



**HAL**  
open science

# La protéine Bax Inhibitor 1 protège des désordres métaboliques et de la mort cellulaire programmée au sein des cellules $\beta$ pancréatiques

Marina Blanc

► **To cite this version:**

Marina Blanc. La protéine Bax Inhibitor 1 protège des désordres métaboliques et de la mort cellulaire programmée au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6031 . tel-04128964

**HAL Id: tel-04128964**

**<https://theses.hal.science/tel-04128964>**

Submitted on 15 Jun 2023

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

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

# THÈSE DE DOCTORAT

La protéine Bax Inhibitor-1 protège des  
désordres métaboliques et de la mort  
cellulaire programmée au sein des  
cellules  $\beta$  pancréatiques

**Marina BLANC**

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
**Docteur en** Sciences de la Vie et de la Santé,  
Spécialité : Interactions Moléculaires et  
Cellulaires  
d'**Université Côte d'Azur**

Dirigée par : Dr **Béatrice BAILLY-MAITRE**

Soutenue le : 14 décembre, 2022

Devant le jury, composé de :

Dr **Jean-Sébastien ANNICOTTE**, CR,  
Université de Lille - Institut Pasteur  
Dr **Serge MANIE**, DR, Université de Lyon -  
CRCL  
Dr **Fabienne FOUFELLE**, DR, Sorbonne  
Université - CRC  
Dr **Sandrine MARCHETTI**, CR, Université Côte  
d'Azur - C3M  
Dr **Christophe GIRARD**, CR, Université Côte  
d'Azur - C3M  
Pr **Alessandra CARDOZO**, DR, Université Libre  
de Bruxelles



# La protéine Bax Inhibitor-1 protège des désordres métaboliques et de la mort cellulaire programmée au sein des cellules $\beta$ pancréatiques

## **Jury**

### **Président du jury :**

Pr **Alessandra CARDOZO**, Directrice de Recherche, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique.

### **Rapporteurs :**

Dr **Jean-Sébastien ANNICOTTE**, Chargé de Recherche, Institut Pasteur, Université de Lille, Lille, France

Dr **Serge MANIE**, Directeur de Recherche, Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Université de Lyon, Lyon, France.

### **Examineurs :**

Dr **Fabienne FOUFELLE**, Directrice de Recherche, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Paris, France.

Dr **Sandrine MARCHETTI**, Chargée de Recherche, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Côte d'Azur, Nice, France.

### **Membre invité :**

Dr **Christophe GIRARD**, Chargé de Recherche, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Côte d'Azur, Nice, France.

### **Thèse dirigée par :**

Dr **Béatrice BAILLY-MAITRE**, Chargée de Recherche, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Côte d'Azur, Nice, France.



## RESUME

---

L'obésité est un problème de santé publique majeur au niveau mondial. En France, plus de 50% de la population est en surpoids ou obèse. L'obésité s'accompagne de pathologies incluant le diabète de type 2 (DT2) dont la prévalence ne cesse d'augmenter corrélant à celle de l'obésité. La résistance à l'insuline au sein des tissus périphériques (foie, muscles, tissu adipeux) ainsi qu'une perte progressive des cellules  $\beta$  du pancréas, participent au développement du diabète de type 2. Les cellules  $\beta$  pancréatiques possèdent un Réticulum Endoplasmique (RE) très développé permettant de répondre efficacement aux fluctuations rapides de la glycémie, conséquences de l'apport journalier en nutriments. Dans ce contexte, l'augmentation accrue de la synthèse de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, peut engendrer une accumulation de protéines mal-conformées, y compris de l'insuline elle-même, au sein du RE activant une voie de signalisation appelée la réponse aux protéines mal-conformées ou Unfolded Protein Response (UPR).

Les études ont montré que lors de l'obésité, l'activation chronique de la réponse UPR participe au développement de la résistance à l'insuline et à la mort des cellules  $\beta$  par apoptose, via des mécanismes moléculaires restant à mieux caractériser. Cette réponse UPR est médiée par trois protéines senseurs transmembranaires : PERK, ATF6 et IRE1 $\alpha$ . Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à IRE1 $\alpha$ , une protéine unique dans l'évolution, par sa double activité enzymatique : une activité sérine/thréonine kinase et une activité endoribonucléase (RNase). Nous avons pu caractériser son dialogue avec la protéine anti-apoptotique : Bax Inhibitor 1 (BI-1), également ancrée à la membrane du RE et capable d'inhiber l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Nous avons tiré avantage des souris déficientes pour BI-1 (souris BI-1 KO) dans nos études. Nos résultats montrent que les souris BI-1 KO développent une hyperglycémie basale avec l'âge ainsi qu'une intolérance au glucose, en comparaison aux souris BI-1 sauvages. Ce phénotype est aggravé lors d'un régime cétogène. Les souris BI-1 KO présentent une diminution de l'insulinémie, et une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une injection au glucose, *in vivo*. Nos analyses montrent une augmentation significative des niveaux sériques de la lipase pancréatique, corrélant à une augmentation de la mort par apoptose au sein des îlots pancréatiques, des niveaux circulants de cytokines pro-inflammatoires et de l'infiltration de neutrophiles au sein des îlots pancréatiques. En combinant des analyses biochimiques et géniques, cette étude permet de mettre en évidence un lien entre la mort cellulaire des cellules

$\beta$  et une suractivation de la voie de signalisation d'IRE1 $\alpha$ , en particulier de son activité RNase, au sein des souris BI-1 KO. En effet, les îlots pancréatiques isolés à partir des souris BI-1 KO s'avèrent également plus vulnérables à la mort induite par des inducteurs chimiques spécifiques du stress du RE et présentent une augmentation significative des niveaux d'expression de gènes et de protéines associées spécifiquement à la signalisation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , tels que XBP1 et CHOP, *ex vivo*. Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  normalise l'hyperglycémie, les niveaux d'insuline et de lipases pancréatiques sériques.

En conclusion, le couple BI-1 - IRE1 $\alpha$  jouerait un rôle central lors du développement du DT2. Normaliser l'expression de la protéine BI-1 ou cibler l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  apparaissent comme des cibles thérapeutiques prometteuses du DT2.

**Mots clés :** Diabète de Type 2, Cellule  $\beta$  pancréatique, Unfolded Protein Response, IRE1 $\alpha$ , BI-1, Apoptose, Inflammation, Inflammasome, Désordres Métaboliques.

## ABSTRACT

---

Obesity is a major public health problem worldwide. In France, more than 50% of the population is overweight or obese. Obesity is accompanied by diseases namely type 2 diabetes (T2D). The prevalence of T2D increases, correlating with the worldwide increases of obesity. Insulin resistance in peripheral tissues (liver, muscle, adipose tissue) and a progressive loss of pancreatic  $\beta$  cells contribute to the development of type 2 diabetes. Pancreatic  $\beta$  cells have an Endoplasmic Reticulum (ER) highly developed to respond effectively to rapid fluctuations in blood sugar, consequences of the daily nutrient intake. In this context, the increased insulin synthesis by pancreatic  $\beta$  cells can lead to an accumulation of misfolded proteins, including insulin itself, within the ER, activating a molecular signalling pathway called the Unfolded Protein Response (UPR).

Studies have shown that during obesity, chronic activation of the UPR contributes to the development of insulin resistance and pancreatic  $\beta$  cell death through apoptosis, via molecular mechanisms that still need to be better characterized. The UPR is mediated by three transmembrane proteins: PERK, ATF6 and IRE1 $\alpha$ . We were particularly interested in IRE1 $\alpha$ , a unique protein in the evolution, by its double enzymatic activity: a serine/threonine kinase activity and an endoribonuclease (RNase) activity. We were able to characterize its dialogue with the anti-apoptotic protein: Bax Inhibitor 1 (BI-1), also anchored in the ER membrane and able to inhibit IRE1 $\alpha$ 's RNase activity. We took advantage of BI-1 deficient mice (BI-1 KO mice) in our studies. Our results show that BI-1 KO mice develop basal hyperglycaemia with age as well as glucose intolerance, compared to wild-type BI-1 mice. This phenotype is aggravated during a 3-month high fat diet. BI-1 KO mice show a decrease in insulinemia, and in insulin secretion in response to glucose injection, *in vivo*. Our analyses show a significant increase in serum levels of pancreatic lipases, correlating with increased cell death by apoptosis within pancreatic islets, an increase in circulating levels of pro-inflammatory cytokines and neutrophils infiltration within pancreatic islets. By combining biochemical and genetic analyses, this study highlights a link between pancreatic  $\beta$  cell death and an overwhelmed IRE1 $\alpha$ 's RNase, in BI-1 KO mice. Indeed, isolated pancreatic islets from BI-1 KO mice are more sensitive to ER stress induced cell death, induced by specific chemical activators of ER stress and exhibit a significant increase in gene expression levels and proteins associated with IRE1 $\alpha$ 's RNase activity, such as XBP1 and CHOP, *ex vivo*. Finally, treatments with specific

pharmacological inhibitor of IRE1 $\alpha$ 's RNase activity normalizes hyperglycaemia, insulin levels and pancreatic lipase levels in serum.

In conclusion, the BI-1-IRE1 $\alpha$  tandem plays a crucial role during the development of T2D. Normalizing the expression of BI-1 protein or targeting IRE1 $\alpha$ 's RNase activity appear to be promising therapeutic targets for T2DM.

**Keywords:** Type 2 Diabetes, Pancreatic  $\beta$  cells, Unfolded Protein Response, IRE1 $\alpha$ , BI-1, Apoptosis, Inflammation, Inflammasome, Metabolic disorders.

## REMERCIEMENTS

---

La partie la plus difficile à écrire mais celle qui donne tout son sens à ce manuscrit...

*Aux membres du jury,*

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Dr **Jean-Sébastien Annicotte** et Dr **Serge Manié**, je vous remercie grandement de prendre le temps d'examiner ce travail et d'avoir répondu présent pour ma soutenance de thèse.

Dr **Fabienne Foufelle** et Dr **Sandrine Marchetti**, merci pour vos conseils, votre aide et votre bienveillance durant nos réunions annuelles pour le suivi de ma thèse. Et un grand merci d'avoir accepté d'être présentes pour la fin de cette histoire et de prendre le temps de venir évaluer la fin de ce travail.

Dr **Alessandra Kupper Cardozo**, nous avons pu discuter à maintes reprises de ce projet. Je vous remercie énormément pour toutes ces discussions, ces échanges et cette aide technique, que vous nous avez apporté avec P. Xiao. Merci à vous et je suis très heureuse que vous ayez accepté d'être présidente de ce jury.

Dr **Christophe Girard**, merci ! Un grand merci à toi Chris. Tu as été le premier à me donner la Passion de la Science avec un grand P. Tu as été un mentor formidable en Master 1. Je suis sincèrement heureuse que tu sois là pour ma soutenance.

*A ma Directrice de Thèse,*

**Béatrice**, je ne saurai comment te remercier... Merci pour tout ! Nous en avons vécu des choses durant cette thèse et nous avons tout surmontées ensemble. Je souhaite te remercier pour tout ce que tu m'as appris au cours de cette thèse, que ce soit scientifiquement comme humainement. L'une de tes plus grandes qualités, à mon sens, est ton humanité... Tu as su me comprendre et prendre le temps de m'orienter, me guider malgré toutes mes idées farfelues. Comme tu l'as dit par le passé, je suis une « perchée » et j'avais besoin d'un mentor comme toi pour me canaliser. Tu as toujours su trouver les bons mots et les bons conseils pour me guider dans cette aventure qu'est la thèse. Tu as toujours été présente, à chaque instant de cette thèse, humainement comme scientifiquement. Et un grand merci pour toute la confiance que tu m'as accordée et tout le soutien durant ces quatre années. On a réussi à mener ce projet à bout et nous pouvons en être fiers. Voilà, tout simplement un grand merci !

*A l'équipe 8,*

Je souhaite vous remercier de m'avoir accueillie dans votre équipe.

Tout d'abord, un merci au Dr **Philippe Gual** pour les conseils et les discussions sur ce projet. Merci aussi au Dr **Albert Tran** et le Dr **Rodolphe Anty** pour les discussions cliniques au cours des réunions d'équipe. L'aspect clinique que vous m'avez apporté me rappelle à quel point la recherche est essentiel pour faire avancer la médecine et la prise en charge thérapeutique des patients. C'était fort intéressant et enrichissant pour la « fondamentaliste » que je suis.

Merci à **Stéphanie Bonnafous** et **Déborah Rousseau** pour l'aide technique que vous m'avez apportée et toutes les discussions que nous avons eu dans votre bureau.

Merci au Dr **Carmelo Luci** et ses étudiantes, Manon et Elodie, pour les discussions sur ce projet.

Merci au Dr **Stéphanie Patouraux** pour son expertise clinique en anatomo-pathologie.

Enfin, merci aux anciennes doctorantes de Béatrice, **Cynthia Lebeau** et **Déborah Vallée**. Vous avez été des sources d'inspiration en tant que doctorantes. Merci pour l'héritage scientifique et technique que vous m'avez laissé.

*A toutes ces personnes qui m'ont apporté de l'aide,*

Merci au Dr **Sandra Lacas-Gervais** pour ton expertise à la microscopie électronique. Tes conseils et ton aide étaient tout simplement incroyables. Tu as été d'une grande aide pour ce projet. Merci pour toutes ces belles images et le temps que tu as su m'accorder.

Merci au Dr **Jérôme Gilleron**. Merci d'avoir pris le temps de m'enseigner tes techniques et d'avoir été si disponible et pédagogue. C'était un vrai plaisir d'interagir avec toi.

Merci à toutes les plateformes du C3M : l'animalerie, l'imagerie, la gestion et la laverie. Parmi ces différentes plateformes, je souhaite tout particulièrement remercier **Carole** et **Virginie** de la gestion, pour votre efficacité et votre gentillesse. Un merci aussi à **Dominique**, pour toutes tes blagues. Tu m'auras bien fait rire pendant ces années de thèse.

Je pense aussi à toutes ces personnes avec qui j'ai pu échanger et discuter autour d'un café voire une bière de temps en temps. **Yann** de l'équipe 1, **Meri** de l'équipe 12, **Patrick**, **Arnaud**, **Guillaume** et **Marie Laure** de l'équipe 2. Merci à vous pour ces échanges.

*A l'équipe 13,*

Cette équipe qui m'a accueillie en cours de 4<sup>ème</sup> année.

Premièrement, un grand merci au Dr **Laurent Yvan-Charvet** (ou Chef). C'est un grand plaisir d'être dans ton équipe. Les nombreux échanges scientifiques que nous avons eu m'ont beaucoup apportée. Je souhaite aussi te remercier pour ta bienveillance. Et surtout merci pour toute l'aide que tu m'as apportée sur cette dernière année. Merci de m'avoir accueillie dans cette super équipe.

Dame **Nathalie**... Que dire sur toi à part que tu es incroyable. Un petit bijou. Tu es d'une gentillesse et d'une pédagogie sans faille. Merci pour tout ! Tu sais, on dit toujours que c'est le bureau des pleurs notre bureau mais grâce à toi, c'est aussi le bureau du bonheur. Sincèrement merci !

**Thibaut** et **Coraline**... Des discussions à rallonge, des remontages de bretelles. Vous trouvez les mots quand il le faut. Et pour ça, merci ! Ça a été un vrai plaisir d'échanger avec vous.

*Aux doctorants de cette équipe,*

**Flo**, on se sera bien tiré la bourre sur la fin. Ça me rassurait un peu quand même de ne pas être seule le soir tard ! Dernière ligne droite maintenant. On y croit !

**Saloua**, petite boule de joie dans le bureau. Tu as toujours la patate et le sourire. Je trouve ça admirable. Reste telle que tu es et je te souhaite tout le meilleur pour toi et ta petite famille. Et n'oublie pas : « Les bonhommes, ça ne pleure pas, ok ? ».

**Clara**, tu as décidé de t'engager dans l'aventure de la thèse. Je sais que tu as les épaules et les compétences pour mener ta propre aventure. Ça va me manquer ces moments de café – clope ensemble.

Ma petite **Lama**... La relève. La nouvelle doctorante de Béatrice. Je n'ai aucun doute sur tes capacités. Tu es une petite merveille et je te souhaite de t'épanouir au cours de cette thèse, que ce soit scientifiquement comme humainement. Pour reprendre tes mots : « You can do it ! I believe in you ». Et bien sûr, tu le sais, je ne serai jamais très loin de toi.

Aux anciens membres, **François**, **Loan**, **Pauline**, **Hyame** et **Mezhoura**. Mes petits canards. Que de moments partagés avec vous. Gardez votre enthousiasme, votre envie et votre bonne humeur. Je me suis éclatée à vos côtés. De la part de votre Maman Canard.

*A mes ami(e)s,*

A ma binôme de thèse... **Marion**. On en a eu des rebondissements. Quand je vois tout le chemin qu'on a pu faire ensemble, je suis juste très heureuse que nous en soyons là. A chaque fois que j'ai eu besoin d'un support

émotionnel, tu as répondu présente. Je t'en remercie grandement. Nos discussions jusqu'à tard le soir sur nos projets respectifs, un pur moment de plaisir scientifique. En tout cas, je voulais te dire que je suis fière de toi et de l'évolution que tu as eu au cours de ta thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite et pour tes plans de carrière (bien sûr, je serai toujours là hihi). Tout simplement, sache que je crois en toi et je sais que tu peux y arriver ! Persévérance, comme on disait ! Et surtout, rappelle-toi que chaque personne a une petite lumière en soi et qu'il suffit de lui implanter la bonne petite graine pour qu'elle finisse par prendre soin d'elle. J'espère au moins t'avoir enseigné ça.

La **team 2 (Polo, Cécile et Max)** et **Lauriane**, que de moments partagés tous ensemble. Merci pour le soutien émotionnel au cours de ces dernières années.

Les anciens de la **team 11 (Christopher, Ilona, Serena et Robin)**, vous avez été les premiers doctorants que j'ai côtoyés. Je vous ai rencontré en Master 1 et nous avons continué à nous suivre pendant les années qui ont suivi. Merci d'avoir été une inspiration !

Spécialement à **Robin et Ju**, merci pour tous les moments partagés ensemble avec **Emie et Chris**. Hâte qu'on se retrouve tous ! Et je vous souhaite d'être heureux dans vos familles respectives !

**Alexandrine** (mon Baboune ou mon Baba), **Océane** et le **Ptit Monstre** (petite **Mira**). Les filles, ça a toujours été un vrai plaisir que de passer du temps avec vous. Vous êtes pleine de vie et de joie. Nos discussions sans fin, à essayer de s'aider les unes les autres. Je ne vous remercierai jamais assez pour le soutien que vous avez pu m'apporter.

Ma petite **Alexandrine**, c'est tout récemment que nous avons créé notre amitié. Tu me fais toujours autant rire quand tu m'appelles dans les couloirs en criant « Baba ». A chaque fois que tu passes me voir, tu me redonnes le sourire avec tes câlins et ta tendresse. Je te souhaite tout le meilleur du monde, mon petit Baboune.

**Pierric** (ou Pierricou mais aussi Grincheux mais n'oublions pas le célèbre Whitson and Brick et le Zebrafriend). J'en ai tellement en tête. Mon binôme de Masters. Tu m'en as fait vivre des fous rire. Mais tu as aussi été un ami en or. Tu dis que je t'ai relevé et soutenu mais sache que c'est réciproque. Tu as toujours été là quand j'en ai eu besoin et je t'en remercie ! A nos chansons d'amour sur les canaux ioniques et notre amour pour l'électrophy. Tout simplement, merci !

**Salma**, je voulais te remercier pour toutes ces années passées proches l'une de l'autre. J'espère que tu vas t'éclater à San Francisco ! Tu mérites tous les compliments que tu as reçu pour ta soutenance de thèse, elle était vraiment incroyable. Je sais que tu ne seras pas là pour la mienne mais je penserai fort à toi !

**Chaïma**, je repense à l'EASD 2022. Notre magnifique séjour à Stockholm ensemble. C'était génialissime ! Que de souvenirs, entre notre envie d'être des « vrais vikings » et nos balades dans Stockholm. Ce séjour n'aurait pas été aussi mémorable si tu n'avais pas été là. Et bien sûr, merci pour toute ton aide sur mon projet, nos discussions à rallonge sur le pancréas et la cellule  $\beta$ . Hâte qu'on se voit pour un petit concert de Abe.

Les **copains des arènes (Véro, Sarah, Gilles et Virginie)**, à vous qui m'avez acceptée avec le Spikydou. A nos balades interminables aux Arènes le soir. Nos apéros interdits dans les Arènes. A votre soutien au cours de ma thèse. Et au « Fuck la thèse » de Gillou... Ce n'est pas parce que je ne passe plus vous voir que je vous oublie. Vous êtes à jamais dans mon cœur. Je pense fort à vous !

Vu qu'on est dans la thématique du Didou, je ne pouvais pas vous oublier **Audric et Estelle**. Merci pour ces rando interminables les week-ends. Audric, tu as été un sacré compagnon de confinement. Je pense qu'on a découvert tout Nice Nord ensemble avec Neva et Spiky. Et merci d'avoir toujours répondu présent quand j'étais en galère. Je vous souhaite tout le bonheur du monde dans votre nouvelle appartement avec la belette Neva.

Toujours dans la thématique du pépère, merci aux parrains de Spiky, **Caro et Bertrand**. Vous avez toujours pris de nos nouvelles depuis son adoption. Merci d'avoir pris grand soin de nous !

**Cyril**... Alala, nos années licence et nos TP en binôme. Les soirées de révision jusqu'à pas d'heure. On aura quand même bien rigolé, avec tes blagues toutes pourries, hein mon Cyrilgolo ? Puis tu m'as quittée en Master pour aller dans ta voie. J'ai hâte que tu reviennes à la maison et qu'on se fasse une après-midi ensemble. Ou une petite virée à Sète (ou sept ? Ça, c'est au moins une blague de ton niveau, non ? Hihi) pour aller voir notre chère **Camille** ? Sache que je pense fort à vous et que j'ai hâte qu'on reparte sur un coup de tête à Sète.

Mes copines Varoises, **Emma** (Bichette) et **Maëva** (Fratoune). Ma bichette, on se connaît depuis tellement d'années maintenant, je pense qu'on en est à 20, non ? A toutes ces années passées ensemble, de la primaire au lycée. On en a vécu des choses ensemble et on a toujours été là l'une pour l'autre. Les années passent et tu restes toujours ma sœur de cœur, « moja sestra ». Au tour de mon petit Fratoune. Tu es arrivée à Nice, on se connaissait à peine et une grande amitié s'est créée. Tu as toujours été ma petite protégée et tu le resteras à jamais. Les filles, on est loin des yeux mais pas du cœur. Je vous aime.

**Marie**, la madame de l'imagerie du C3M... Ma Madame, mon coup de cœur de ces dernières années. Nos rires qui s'entendent à l'autre bout du couloir, nos pauses café, nos discussions interminables, nos bières chez Robert et au BDA. Bref, il y en a tant à dire. Je revois tous les soirs où tu es restée à mes côtés pour me soutenir dans l'écriture de ma thèse. Et comme j'ai su si bien le dire : Tu es parfaite. Tu es INCROYABLE. Ne l'oublie jamais... Tu es le plus beau rayon de soleil du centre. Et s'il y a bien une chose qui est certaine, c'est que tu vas me manquer terriblement quand je vais quitter le centre.

**Romane**, mon p'tit pote, Gromane, copain. Je ne saurai par où commencer. Tu es là depuis tellement d'années. Juste un grand merci ! A nos années dans nos 9m<sup>2</sup>, nos fous rires devant la Quatrième dimension, nos soirées Speed Burger à faire les petits porcs et à commander toujours plus et bien sûr n'oublions pas « La vie ne m'apprend rien » de Daniel Balavoine. Je n'en reviens pas de toutes ces années qui ont défilé. Nous nous sommes relevés ensemble, à plusieurs reprises. Tu as toujours su trouver les mots quand il le fallait et me mettre un bon coup de pied au derrière en temps voulu. Je ne te le dis peut-être pas assez, mais je t'aime mon p'tit pote. Tu fais partie des personnes les plus belles de cette planète.

**Gaby**, par où commencer ? *You are the best person*. Voilà, c'est écrit dans un manuscrit, tu ne pourras pas le nier maintenant. Je suis diabolique, je le sais. Si tu n'avais pas été là, la Marina que je suis n'en serait pas là. A ta bienveillance inébranlable. Tu as toujours gardé un œil sur moi et j'espère sincèrement que je t'ai apporté autant que ce que tu m'as apporté au quotidien durant ces dix dernières années. Juste merci d'avoir toujours été là, en tout temps et en tout lieu. Je t'aime darling.

*A ma famille,*

Commençons par ma belle-famille. **Michèle, Robert, Joffré et Bérangère**, je passe à chaque fois un agréable moment avec vous tous. Merci de m'avoir soutenue au cours de cette aventure. Spécialement à toi **Bérangère**, je suis très heureuse d'avoir une nouvelle amie comme toi à mes côtés. J'ai hâte d'être à nouveau disponible pour passer une soirée toutes les deux.

**Tata Gabrielle, Sébastien et Gaëlle**... Tu as toujours su trouver les mots quand j'ai eu besoin d'une oreille attentive. Et tu as toujours été présente et fière de moi au cours de toutes ces années. Seb et Gaëlle, on en aura vécu des choses ensemble. Il y a un lien indéfectible entre nous. Quoi qu'il arrive, nous serons toujours là les uns pour les autres et merci. Je vous aime.

**Majka** (ou grand-mère en bosniaque), pour plus d'intimité on va switcher en bosniaque. Ti si uvijek bila tu za mene. Koliko sam puta te zvala samo da razgovaram sa tobom jer sam bila tuzna. Hvala ti za sve Majka. Znam da si toliko ponosna na Alana i na mene. Jedva cekam da mogu opet doci tebi u Bosnu. Puno mi nedostajes. I svakako znam da ti i Did ste uz mene preko misla. Volim te, Majka ! Tvoja Maruska.

I naravno, ne zaboravim citavu nasu familiju u Bosnu. Puno mislim na vas sviju.

**Alain**, ou le vilain, je suis très fière de l'homme que tu es devenu. Je te souhaite d'être heureux avec **Léa**. Avec **Papa** et **Maman**, vous m'avez toujours soutenue dans mes choix et je ne vous en remercierai jamais assez. Vous m'avez toujours poussée au-delà de mes limites. Et merci pour tout ça ! On reste une famille soudée et ça, c'est beau. Et au célèbre dicton de Papa : « Entraînement difficile, guerre facile ». Bisous à la petite famille Blanc. **Maman**, merci d'avoir toujours cru en moi. J'espère que tu seras fière ce jour-là de ta petite Marinouchka. Petite dédicace à **Nadia**, merci de prendre autant soin de Mamoune, comme tu l'appelles.

A ma **petite famille, Christian et Spiky**.

Mon petit **Spike**, mon petit baby d'amour, le Spikydou, le S'pik. On a bien galéré à t'éduquer dis donc. Ça a été un long combat et finalement, on a réussi à faire de toi presque un Didou sage. Merci mon petit Didou de me



faire toujours autant rire et de m'apporter toujours autant d'attention et d'amour. Tu as été et tu es toujours mon petit protecteur, ma petite boussole.

A **Christian**, toi qui as bien subi cette thèse, faut le dire... Merci d'avoir été aussi patient sur ces moments de doute et d'anxiété. A tous les petits plats que tu m'as préparé pour les soirs où je rentrais tard. A toutes les balades du Spiky que tu as faites sans moi parce que j'étais occupée dans la rédaction. Et merci de m'avoir toujours soutenue quand j'en ai eu besoin. Comme nous l'avions dit : « Je suis le cerf-volant et tu es la ligne, sans toi je m'envolerais dans le ciel et sans moi, tu sombrerais dans la terre ». Merci de m'aider à garder les pieds sur Terre et à toujours prendre le temps de me rassurer. Je t'aime. Et Ohana !

*La thèse est une expérience de vie avant d'être une expérience professionnelle. Toutes ces personnes ont participé indirectement, et certainement sans le savoir, à ce manuscrit.*

*« Ohana signifie Famille. Famille signifie que personne ne doit être abandonné ni oublié »*

# TABLE DES MATIERES

---

<b>RESUME</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	<b>- 13 -</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLES</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>- 17 -</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 21 -</b>
I. ANATOMIE ET FONCTION DU PANCREAS.....	- 21 -
A. Anatomie.....	- 21 -
B. Physiologie du pancréas exocrine .....	- 22 -
i. Les cellules acinaires .....	- 23 -
ii. Les cellules canalairees .....	- 23 -
C. Physiologie du pancréas endocrine .....	- 23 -
i. Les cellules bêta .....	- 24 -
ii. Les cellules alpha .....	- 27 -
iii. Les cellules delta .....	- 28 -
iv. Les cellules epsilon.....	- 28 -
v. Les cellules PP .....	- 30 -
II. LE DIABETE, UNE EPIDEMIE A L'ECHELLE MONDIALE .....	- 30 -
A. Diabète de Type 1.....	- 32 -
B. Maturity-Onset of the Young (MODY).....	- 34 -
C. Obésité et Diabète de Type 2 .....	- 34 -
D. La mort cellulaire des cellules $\beta$ pancréatiques associée au Diabète.....	- 37 -
i. Apoptose.....	- 39 -
ii. Nécrose .....	- 43 -
iii. Nécroptose.....	- 43 -
iv. Pyroptose .....	- 45 -
v. Ferroptose.....	- 47 -
vi. Autophagie.....	- 48 -
III. LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE : FONCTION PHYSIOLOGIQUE .....	- 51 -
A. Les différentes fonctions du Réticulum Endoplasmique.....	- 51 -
i. Protéostasie et réponse au stress du RE .....	- 54 -

a.	Unfolded Protein Response, la réponse au stress du RE .....	- 57 -
b.	ATF6.....	- 61 -
c.	PERK.....	- 63 -
d.	IRE1 $\alpha$ .....	- 64 -
ii.	Homéostasie calcique .....	- 68 -
iii.	Homéostasie lipidique .....	- 70 -
<b>B.</b>	<b><i>Bax Inhibitor 1</i></b> .....	<b>- 71 -</b>
i.	Structure et fonction.....	- 71 -
ii.	Rôle de BI-1 dans la mort induite par le stress du RE .....	- 72 -
iii.	Rôle de BI-1 dans l'homéostasie calcique et l'autophagie .....	- 74 -
iv.	Rôle de BI-1 dans la réponse antioxydante.....	- 78 -
v.	Rôle de BI-1 dans les différentes pathologies (Table 5) .....	- 80 -
<b>IV.</b>	<b>LE ROLE DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE ET DE L'UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) DANS LA</b>	
	<b>PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE .....</b>	<b>- 82 -</b>
<b>A.</b>	<b><i>La réponse UPR dans la physiologie (fonction, survie et mort) des cellules <math>\beta</math> pancréatiques</i></b> .....	<b>- 82 -</b>
i.	Rôle adaptatif de l'UPR en réponse au glucose au sein de la cellule $\beta$ pancréatique .....	- 82 -
ii.	Rôle de l'UPR dans l'identité et la plasticité des cellules $\beta$ pancréatiques.....	- 84 -
iii.	Rôle de la chronicité des différents stress du RE au sein de la cellule $\beta$ pancréatique .....	- 86 -
a.	Protéostasie et insuline mal conformée .....	- 86 -
b.	Homéostasie calcique.....	- 88 -
c.	Diabète de type 1 et Diabète de type 2 : Inflammation, hyperglycémie et hyperlipidémie .....	- 89 -
iv.	Les différents acteurs de l'UPR dans le diabète .....	- 92 -
a.	ATF6.....	- 94 -
b.	PERK.....	- 95 -
c.	IRE1 $\alpha$ .....	- 97 -
<b>B.</b>	<b><i>Les inhibiteurs pharmacologiques de l'UPR et le Diabète</i></b> .....	<b>- 102 -</b>
i.	Les chaperonnes chimiques .....	- 103 -
ii.	Les inhibiteurs spécifiques des voies de l'UPR .....	- 103 -
a.	ATF6.....	- 104 -
b.	PERK.....	- 104 -
c.	IRE1 $\alpha$ .....	- 105 -
	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>- 107 -</b>
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>- 109 -</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>- 147 -</b>
<b>I.</b>	<b>FONCTION ET MAINTIEN DE LA CELLULE B PANCREATIQUE AU SEIN DES SOURIS BI-1 DEFICIENTES .....</b>	<b>- 148 -</b>
<b>A.</b>	<b><i>De la synthèse à la sécrétion d'insuline</i></b> .....	<b>- 148 -</b>
i.	Rôle du stress oxydant dans les défauts de sécrétions d'insuline liés au stress du RE .....	- 148 -
ii.	Rôle du calcium dans les défauts de sécrétion d'insuline liés au stress du RE.....	- 151 -
<b>B.</b>	<b><i>Dialogue entre le RE, la mitochondrie et la voie lysosomale au sein des cellules <math>\beta</math> pancréatiques BI-1 déficientes</i></b> .....	<b>- 152 -</b>

i.	Mitochondrie .....	- 152 -
ii.	Autophagie.....	- 153 -
II.	ENTRE SURVIE ET MORT CELLULAIRE DES CELLULES B PANCREATIQUES AU SEIN DE L'ÎLOT DE LANGERHANS DES SOURIS BI-1 DEFICIENTES .....	- 158 -
A.	<i>Perte d'identité et de prolifération des cellules <math>\beta</math> pancréatiques délétées pour BI-1 ?</i> .....	- 158 -
i.	Identité de la cellule $\beta$ pancréatique .....	- 158 -
ii.	Prolifération de la cellule $\beta$ pancréatique .....	- 158 -
B.	<i>La mort induite par le stress du RE dans les cellules <math>\beta</math> pancréatiques.</i> .....	- 159 -
i.	Lipotoxicité et suractivation d'IRE1 $\alpha$ .....	- 159 -
ii.	Apoptose.....	- 160 -
iii.	Inflammation.....	- 162 -
III.	PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES .....	- 163 -
A.	<i>Le modèle d'induction de la mort des cellules <math>\beta</math> pancréatiques</i> .....	- 163 -
B.	<i>Le modèle de diabète de type 2</i> .....	- 164 -
C.	<i>L'activité RNase d'IRE1<math>\alpha</math>, une potentielle cible thérapeutique ?</i> .....	- 164 -
	<b>CONCLUSION</b> .....	- 166 -
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	- 167 -
	<b>ANNEXES</b> .....	- 221 -

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

---

<b>Figure 1</b> : Anatomie et histologie du pancréas humain. ....	22 -
<b>Figure 2</b> : Structure tertiaire de l'insuline.....	25 -
<b>Figure 3</b> : Sécrétion et signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques. ....	29 -
<b>Figure 4</b> : Les différentes fonctions du RE.....	52 -
<b>Figure 5</b> : Signalisation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Unfolded Protein Reponse ou UPR).....	60 -
<b>Figure 6</b> : Mécanisme de mort dépendant du stress du réticulum endoplasmique. ....	62 -
<b>Figure 7</b> : Structure de IRE1 $\alpha$ et ses différents domaines. ....	66 -
<b>Figure 8</b> : Structure de BI-1 et ses partenaires.....	72 -
<b>Figure 9</b> : Hypothèses du rôle de BI-1 dans la régulation de l'homéostasie calcique. ....	76 -
<b>Figure 10</b> : Les différents états d'activation de l'UPR en réponse à une haute demande en insuline dans la cellule $\beta$ pancréatique. ....	84 -
<b>Figure 11</b> : Les états de la cellule $\beta$ pancréatique en réponse à une activation soutenue de l'UPR. ....	87 -
<b>Figure 12</b> : Délétion génique d'ATF6.....	95 -
<b>Figure 13</b> : Délétion génique de PERK, eIF2 $\alpha$ ou ATF4. ....	97 -
<b>Figure 14</b> : Délétion génique de IRE1 $\alpha$ et XBP1 au stade embryonnaire et chez l'adulte. ....	102 -
<b>Figure 15</b> : De la synthèse à la sécrétion d'insuline au sein de la cellule $\beta$ pancréatique de la souris sauvage. ....	148 -
<b>Figure 16</b> : De la synthèse à la sécrétion d'insuline au sein de la cellule $\beta$ pancréatique de la souris BI-1 déficiente. ....	157 -
<b>Tableau 1</b> : Caractéristiques physiopathologiques et origines des différents diabètes.....	31 -
<b>Tableau 2</b> : Indice de Masse Corporelle (IMC) chez l'adulte et interprétation. ....	35 -
<b>Tableau 3</b> : Les antidiabétiques et leurs effets bénéfiques/indésirables. ....	36 -
<b>Tableau 4</b> : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des différents types de mort cellulaire rencontrés dans le pancréas, au cours du développement d'un diabète.....	39 -
<b>Tableau 5</b> : Composés pharmacologiques activateurs du stress du RE.....	56 -
<b>Tableau 6</b> : Les niveaux d'expression de BI-1 au sein de différentes pathologies.....	81 -
<b>Tableau 7</b> : Modèles murins de délétion génique des senseurs de l'UPR et conséquences sur la cellule $\beta$ et l'installation du diabète. ....	93 -

## ABRÉVIATIONS

---

-PBA : 4-phenyl butyric acid

5'UTR : 5' Untranslated Region

### A

ADP : Adénosine Diphosphate

AG : Acides Gras

AGL : Acides Gras Libres

ALR : Aim2-Like Receptors

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

APAF : Apoptotic peptidase activating factor 1

ASC : Apoptosis-associated Speck-like protein

ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATF : Activating transcription factor

ATG : AuTophagy related genes

ATP : Adénosine Triphosphate

### B

Bak : BCL-2 homologous antagonist killer

BAR : Bi-functional Apoptosis Regulator

Bax : BCL-2 associated X

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

BCL-xL : B-cell lymphoma extra-large

BI-1 : Bax inhibitor 1

Bid : BH3 interacting-domain death agonist

Bim : Bcl-2-like protein 11

BiP : Binding immunoglobulin Protein ou Grp78 : Glucose Regulated Protein 78

BRCC3 : BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3

bZIP : Basic Leucine Zipper Domain

### C

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CD68 : Cluster of Differentiation 68

cFLIP : cellular FLICE-like inhibitory protein

CHOP : C/EBP homologous protein

Class III - PI3K : class III phosphoinositide 3-kinase

COPII : Coat Protein Complex II

CXCL8 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 8

### D

DAMP : Damage-associated molecular pattern

DGAT : Diacylglycerol acyltransferase

DISC : Death-inducing signalling complex

DR : Death Receptor

Drp1 : Dynamin-related protein 1

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

### E

eIF2 $\alpha$  : Eukaryotic translation initiation factor

ERAD : ER-associated degradation  
ERES : Endoplasmic Reticulum Exit Site  
ERO1 $\beta$  : ER oxidoreductin-1-like  $\beta$   
ERSE : ER Stress-Response Element

## **F**

FADD : Fas-associated protein with death domain  
FASN : Fatty Acid Synthase  
FFA : free fatty acids

## **G**

GADD : Growth arrest and DNA damage-inducible  
GCK : Glucokinase  
GLP1 : Glucagon-like Peptide 1  
GLUT : Glucose transporter  
GPX4 : Glutathione peroxidase 4  
GS : glycogen synthase  
GSK3 : glycogen-synthase kinase 3

## **H**

HFD : High-fat diet  
HMGB1 : High-mobility Group Box 1  
HNF : hepatic nuclear factor  
HO-1 : Heme Oxygenase-1  
HRD1 : HMG-CoA Reductase Degradation Protein

## **I**

IAPP : polypeptide amyloïde  
IFN : Interferon

IL : Interleukine  
IL-1R Interleukine 1 Receptor  
IMC : Indice de Masse Corporel  
iNOS : nitric oxide synthase  
Ins2 : Insulin 2  
Insig : Insulin Induced gene  
IP3R : Inositol trisphosphate receptor  
IRE1 : Inositol-requiring enzyme 1  
IRES : Internal Ribosomal Entry Site  
IRS : Insulin Receptor Substrate

## **J**

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

## **K**

K63 : Lysine 63  
K<sub>ATP</sub>-channels : Canaux potassiques ATP dépendant  
KEAP1 : Kelch-like ECH-associated Protein 1  
KIRA : Kinase-inhibiting RNase attenuator

## **L**

LC3 : Light Chain 3  
LDLR : Low-Density Lipoprotein Receptor  
LPS : Lipopolysaccharide

## **M**

MAFA : MAF bZIP transcription Factor A  
MAM : Mitochondria-associated membrane

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MLKL : Mixed Lineage Kinase domain-Like protein

MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young

MOMP : mitochondrial outer membrane permeabilization

MPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore

mTOR : Mammalian target of rapamycin

## N

NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

NCCD : Nomenclature Committee on Cell Death

NF $\kappa$ B : Nuclear Factor  $\kappa$  B

NKX6.1 : NK6 Homeobox 1

NLR : Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat

NLRP3 : NOD-like Receptor family, Pyrin domain containing 3

NO : nitric oxide (ou oxyde nitrique)

NOD : Non obèse diabétique

NOXA : phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1

NPR : NADPH-reductase

NRF2 : Nuclear factor E2-related factor 2

## O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## P

PAMP : Pathogen-associated molecular pattern

PAX4 : Paired Box 4

PC : proconvertase

PDI : Protein Disulfide Isomerase

PDK1 : phosphoinositide-dependant Kinase 1

PDX1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1

PERK : PKR-like ER kinase

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol 4, 5 phosphate

PIP3 : phosphatidylinositol 3, 4, 5 phosphate

PKB/Akt : Protein kinase B

PKC : Protein kinase C

PP : polypeptide pancréatique

PP1 : phosphatase 1

PRR : Pattern Recognition Receptor

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

## R

RE : Réticulum Endoplasmique

REL : Réticulum Endoplasmique Lisse

RE-phagy : réticulophagie

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

RIDD : Regulated IRE1 $\alpha$ -dependent decay

RIPK : Receptor Interacting Protein Kinase

RLR : RIG-Like helicase Receptors

RNase : Endoribonuclease

ROS : Reactive oxygen species



RTCB : RNA terminal phosphate cyclase  
B

RyR : Ryanodine Receptor

## **S**

S1P : Site Protease 1

S2P : Site Protease 2

SCAP : SREBP Cleavage-Activating  
Protein

SERCA : Sarcoplasmic/Endoplasmic  
Reticulum Ca<sup>2+</sup> transport ATPase

SMACs : second mitochondria-derived  
activator of caspases

SNARE : small-N-ethylmaleimide sensitive  
factor receptor

SREBP : Sterol Regulatory Element-  
Binding Protein

## **T**

TFEB : Transcription Factor EB

TG : Triglycérides

TLR : Toll-Like Receptor

TMBIM : transmembrane BAX inhibitor  
motif containing

TNF : Tumor necrosis factor

TNFR : Tumor necrosis factor Receptor

TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2

TRAIL : Tumor Necrosis Factor related  
apoptosis inducing ligand

TRAILR : Tumor Necrosis Factor related  
apoptosis inducing ligand Receptor)

TRIF : Toll/interleukin1 Receptor domain-  
containing adapter-Inducing IFN- $\beta$

TUDCA : Tauroursodeoxycholic acid

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl  
transferase dUTP nick and labelling

TXNIP : Thioredoxin Interacting Protein

## **U**

ULK1 : Unc-51 like autophagy activating  
Kinase 1

uORF : upstream Open Reading Frame

UPR : Unfolded protein response

## **V**

VDAC : Voltage-Dependent Anion-  
Channel

VDCC : Voltage-Dependant Calcium  
Channel

VEGF : Vascular endothelial growth  
factors 6

VPS : Vacuolar Protein Sorting

## **X**

XBP1 : X-box binding protein 1

## **Z**

ZBP1 : Z-DNA-binding protein 1

Zn<sup>2+</sup> : Zinc

# INTRODUCTION

---

## I. Anatomie et fonction du pancréas

### A. Anatomie

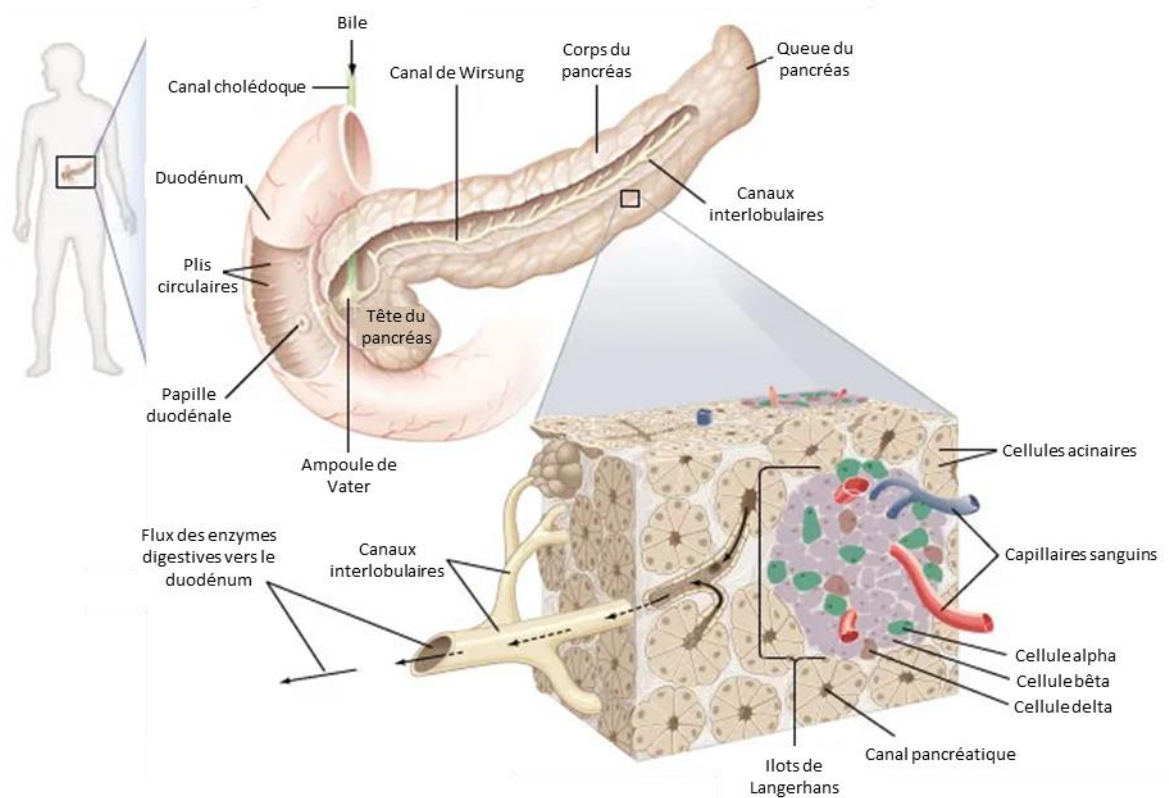
Chez l'Homme, le pancréas est un organe situé dans la cavité abdominale, derrière l'estomac. Le terme « pancréas » provient du grec, signifiant « tout en chair » (de « πάγ » pour « tout » et de « κρεας » pour « chair »), décrit pour la première fois par Herophilos, un anatomiste grec. Chez l'Homme, le pancréas mesure environ 15 cm de long et pèse entre 80 à 100g. Le pancréas peut être divisé en quatre parties distinctes :

- La « tête », la partie la plus volumineuse du pancréas, connectée à l'intestin au niveau du duodénum.
- L'« isthme » faisant la jonction entre la « tête » du pancréas et le reste de l'organe.
- Le « corps », permettant le lien entre les différentes parties du pancréas.
- La « queue » se terminant au contact de la rate.

La subdivision du pancréas s'effectue via des lobes et des lobules (petits lobes), à l'aide d'une capsule fibreuse faisant des connexions distinctes au sein du parenchyme pancréatique.

En revanche, chez la souris, le pancréas est divisé en trois parties moins identifiables. En effet, le pancréas de la souris possède un lobe duodéal, un lobe gastrique et un lobe splénique. En raison de l'absence de capsule fibreuse, les différents lobes du pancréas murin sont séparés par du tissu adipeux, conjonctif et lymphatique contrairement au pancréas humain. Cela engendre une délimitation moins distincte entre les différents lobes du pancréas murin (*Dolenšek et al., 2015*).

Le pancréas est défini comme **une glande mixte** assurant à la fois : **une fonction exocrine** et une **fonction endocrine**. Le pancréas exocrine est impliqué dans la **production d'enzymes digestives** libérées dans le tractus intestinal tandis que le pancréas endocrine sécrète, dans la circulation sanguine, des hormones jouant un rôle essentiel au maintien de **l'homéostasie du glucose** (*Figure 1*).



**Figure 1** : Anatomie et histologie du pancréas humain.

Placé sous l'estomac, le pancréas est divisé en quatre parties (tête, isthme, corps et queue) et communique avec le duodénum via la papille duodénale. Le pancréas exocrine est constitué des cellules acinaires et canaux. Le pancréas endocrine est composé des ilots de Langerhans. Ces ilots sont composés de cinq types cellulaires : les cellules  $\alpha$ , cellules  $\beta$ , cellules  $\delta$ , cellules  $\epsilon$  et les cellules PP. Respectivement, ces cellules sécrètent le glucagon, l'insuline, la somatostatine, la ghréline et le polypeptide pancréatique.

*Adapté d'Encyclopaedia Britannica 2010*

## B. Physiologie du pancréas exocrine

Le **pancréas exocrine** représente **90 - 95 %** du pancréas total. Le pancréas exocrine est composé de **cellules acinaires**, productrices des enzymes essentielles à la digestion, et de **cellules canaux**, formant un réseau permettant le transport de ces enzymes digestives à l'intestin (*Beger et al., 2018*). Ces cellules forment une unité fonctionnelle nommée acinus, composée de cellules regroupées en « grappe de raisins », que l'on retrouve au sein des différents lobules pancréatiques précédemment décrits. La partie exocrine du pancréas est impliquée dans la synthèse et la libération du suc pancréatique au niveau du duodénum.

### i. Les cellules acinaires

Majoritaire au sein du pancréas (environ 90%), les cellules acinaires synthétisent des enzymes de digestion permettant la dégradation de macronutriments comme les lipides (lipases), les glucides (amylases) et les protéines (protéases) (*Whitcomb and Lowe, 2007*). Ces enzymes, telles que le trypsinogène, sont stockées et libérées sous forme de zymogènes, des enzymes inactives. Le stockage de ces enzymes de dégradation s'effectue au sein de granules de zymogènes permettant de préserver l'intégrité cellulaire et la physiologie du pancréas. La libération de ces enzymes dans les canaux excréteurs, au sein des acini, est sous le contrôle du système nerveux parasympathique (le nerf vague) ainsi que de certaines hormones gastriques et intestinales, telles que la sécrétine ou encore la ghréline. Ces enzymes sont acheminées jusqu'au duodénum via le canal de Wirsung, canal excréteur principal. Au sein du duodénum, l'enteropeptidase initie la cascade de signalisation initiatrice du clivage des proenzymes, devenant ainsi actives. Le clivage du trypsinogène engendre le clivage consécutif des autres proenzymes, telles que le chymotrypsinogène en chymotrypsine ou encore la proélastase en élastase.

### ii. Les cellules canalaire

Au départ des acini, des petits canaux excréteurs se rejoignent afin de former de plus gros canaux excréteurs, dont le canal de Wirsung, canal excréteur principal et le canal de Santorini, canal excréteur accessoire. Ces deux canaux pancréatiques sont tapissés par les cellules canalaire. Ces canaux sont chargés d'acheminer les sucs pancréatiques, résultant de la production d'enzymes de dégradation par les cellules acinaires et d'une solution hydroélectrolytique par les cellules canalaire. En effet, les cellules canalaire sont responsables de la sécrétion d'une solution hydroélectrolytique. Cette solution est formée d'eau (à 95%) et d'ions comme le bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), nécessaires à la neutralisation de l'acidité gastrique (*Grapin-Botton, 2005*).

## C. Physiologie du pancréas endocrine

Le pancréas endocrine représente environ **2% de la masse totale du pancréas**. La structure fonctionnelle du pancréas endocrine est l'amas ou l'îlot de Langerhans, décrit par le Dr Paul Langerhans, en 1869. Les îlots de Langerhans mesurent en moyenne 100 à 150  $\mu\text{m}$ , chez l'Homme. Ces îlots possèdent une **structure sphéroïdale** ou ellipsoïdale. Les îlots de

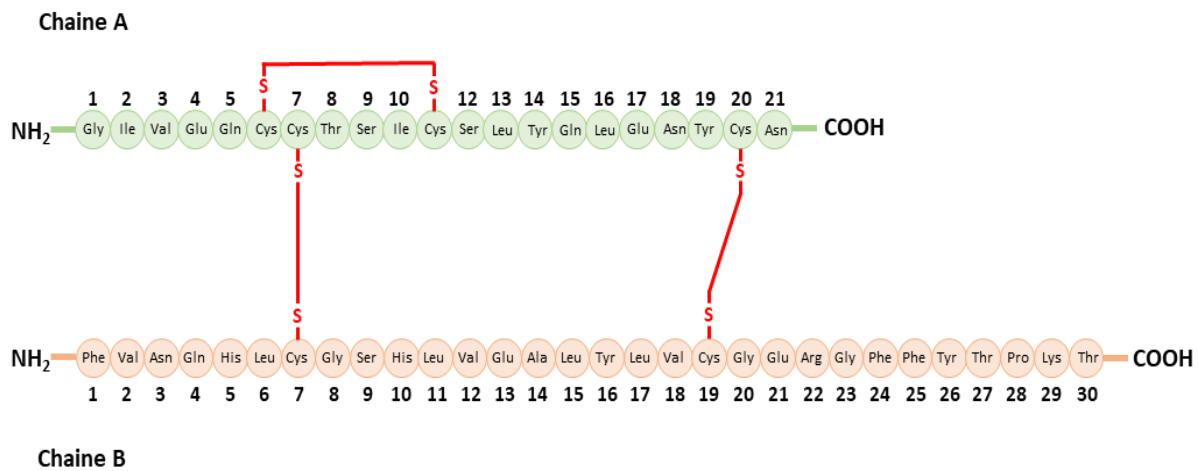
Langerhans sont répartis au sein du parenchyme exocrine du pancréas. Les îlots de Langerhans sont composés de cinq types cellulaires différents : les **cellules  $\beta$  pancréatiques, majoritaires, qui représentent 70% de l'îlot**, les **cellules  $\alpha$**  (20%), les **cellules  $\delta$** , les **cellules  $\epsilon$**  et enfin les **cellules PP**. La fonction principale du pancréas endocrine est la régulation de la glycémie par la sécrétion d'insuline, via les cellules  $\beta$  et la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$ . Ces deux hormones, **hypoglycémiantes** et **hyperglycémiantes** respectivement, sont sécrétées en réponse aux variations de glucose dans le sang pour maintenir la **glycémie entre 4 et 6mM**. Les autres hormones endocrines (la somatostatine, la ghréline et le polypeptide pancréatique) régulent la glycémie de manière indirecte.

Chez la souris, en périphérie de l'îlot de Langerhans se trouvent les cellules  $\alpha$  formant une couronne autour des cellules  $\beta$ , tandis que chez l'Homme, la morphologie de l'îlot a longtemps été décrite comme « aléatoire ». En réalité, l'îlot de Langerhans humain forme une structure tridimensionnelle. Les cellules  $\beta$  forment une monocouche de cellules entourée par deux couches de cellules  $\alpha$ . La littérature démontre que les jonctions cellulaires entre les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  des îlots pancréatiques améliorent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ainsi, la structure tridimensionnelle, via la communication entre les cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , retrouvée au sein des îlots de Langerhans humain semblent accroître la sensibilité au glucose et la sécrétion d'insuline au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Enfin, une étude semble démontrer que la structure tridimensionnelle de l'îlot dépend de la taille de cet îlot. En effet, au sein des petits îlots, la structure avec une couronne de cellules  $\alpha$  encerclant les cellules  $\beta$  est fortement représentée, tandis que les gros îlots de Langerhans semblent avoir une structure laminaire comme décrit précédemment (*Rorsman and Braun, 2013*). Enfin, la zone périphérique des îlots est hautement vascularisée permettant une communication directe entre les îlots, la circulation sanguine et les autres organes.

#### i. Les cellules bêta

Majoritaire au sein des îlots de Langerhans, les cellules  $\beta$  représentent environ 70% des cellules de l'îlot. Les cellules  $\beta$  synthétisent, stockent et sécrètent l'insuline. L'insuline est synthétisée sous forme de préproinsuline. La préproinsuline possède un peptide signal permettant sa localisation au sein du réticulum endoplasmique (RE). Lors de la translocation dans le RE, ce peptide signal est clivé, permettant la production de proinsuline à partir de préproinsuline. Au sein du RE, la proinsuline subira des modifications post-traductionnelles : la formation de 3

ponts disulfures entre les cystéines présentes dans la structure tertiaire de l'insuline. La proinsuline est transportée du RE vers l'appareil de Golgi puis stockée sous forme de granules. Au sein des granules d'insuline, la proinsuline est clivée en insuline et C-peptide, via les **enzymes proconvertases 1/3 (PC1/3) et 2 (PC2) (Figure 2)**.



*Figure 2 : Structure tertiaire de l'insuline.*

L'insuline est produite par la cellule  $\beta$  pancréatique, sous forme de préproinsuline. La préproinsuline possède un peptide signal, lui permettant sa localisation au sein du RE. La perte du peptide signal produit la proinsuline. Cette proinsuline subit des modifications post-traductionnelles : la formation de 3 ponts disulfures. Deux ponts disulfures se forment entre la chaîne A et la chaîne B : entre la cystéine 7 de la chaîne A et la cystéine 7 de la chaîne B, entre la cystéine 20 de la chaîne A et la cystéine 19 de la chaîne B. Enfin le dernier pont disulfure est intra-chaîne A, de la cystéine 6 à la cystéine 11.

Lors d'une hyperglycémie, les cellules  $\beta$  pancréatiques captent le glucose via le transporteur GLUT2 (Glucose Transporter) chez l'Homme et chez la souris. Dans la cellule  $\beta$  pancréatique, le glucose est phosphorylé par une hexokinase spécifique, la glucokinase, première enzyme de la signalisation de la glycolyse. Le métabolisme du glucose, via la glycolyse et le cycle de Krebs, conduit à une augmentation du ratio ATP/ADP, inhibant les canaux potassiques ATP dépendants ( $K_{ATP}$ -channels), ce qui engendre une dépolarisation de la membrane plasmique (Cook and Hales, 1984). Cette dépolarisation de la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques active des canaux calciques voltage dépendant (Voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels, VDCC), entraînant ainsi l'entrée de calcium ( $Ca^{2+}$ ). Cette entrée de  $Ca^{2+}$  dans la

cellule active les protéines SNARE (small-N-ethylmaleimide-sensitive factor receptor) permettant l'exocytose et la sécrétion d'insuline (**Figure 3**).

La sécrétion d'insuline est « biphasique » : un premier pic s'effectue dans les 5 à 6 minutes après la prise alimentaire. Les granules stockés au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques sont sécrétés. L'hyperglycémie augmente ensuite la production d'insuline. Cette insuline néosynthétisée, en plus du pool d'insuline stockée, est à son tour sécrétée lors de la seconde phase pendant 30 à 60 minutes, permettant le maintien de l'homéostasie du glucose en continu.

Une fois libérée dans le sang, l'insuline agit sur les organes périphériques insulino-sensibles (muscle, foie, tissu adipeux) régulateurs de l'homéostasie glucidique (*Miller and Larner, 1973*). L'insuline induit la translocation de GLUT4 à la surface des adipocytes et du muscle squelettique améliorant la capture du glucose. Au niveau hépatique, elle bloque la néoglucogenèse et augmente la synthèse de glycogènes.

L'insuline se lie à son récepteur, le récepteur à l'insuline. Ce récepteur est composé de 4 sous-unités : deux chaînes extracellulaires  $\alpha$ , permettant la liaison avec l'insuline. Ces deux sous-unités  $\alpha$  sont liées à deux sous-unités  $\beta$  par des ponts disulfures. Les sous-unités  $\beta$  sont transmembranaires et permettent la transduction du signal intracellulaire, puisque ces deux chaînes  $\beta$  possèdent des domaines tyrosine kinase (*Luo et al., 1999*).

En l'absence d'insuline, les sous-unités  $\alpha$  maintiennent les chaînes  $\beta$  inactives. En revanche, la liaison de l'insuline avec les chaînes  $\alpha$  engendrent un changement conformationnel des sous-unités  $\beta$  et permettent leur autophosphorylation sur les résidus tyrosines 1146, 1150 et 1151. Cette autophosphorylation permet la liaison de protéines adaptatrices tels que les protéines substrats du récepteur à l'insuline ou IRS (Insulin Receptor Substrate). La phosphorylation des IRS (IRS1 et IRS2) permet une association avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et son activation. Ainsi, la PI3K permet la production de PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5 phosphate) à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 4, 5 phosphate). PIP3 active à son tour la PDK1 (phosphoinositide-dépendant Kinase 1) et la protéine kinase B (PKB ou Akt) ainsi que les isoformes  $\zeta$  et  $\lambda$  de la protéine kinase C (PKC). Les deux isoformes de la PKC permettent la relocalisation des transporteurs du glucose (GLUT4), localisés au sein de vésicules intracellulaires, au niveau de la membrane plasmique, via l'utilisation des microtubules, dans les cellules adipocytaires et musculaires squelettiques.



La kinase Akt/PKB permet l'activation d'autres voies de signalisations. En effet, cette kinase est impliquée dans l'augmentation de la capture du glucose par les muscles et les adipocytes mais aussi l'inhibition de la néoglucogenèse au niveau des hépatocytes. De plus, la signalisation de l'insuline augmente la synthèse de glycogène, via la phosphorylation de GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) par Akt/PKB permettant l'activation de la protéine GS (glycogen synthase), au niveau des muscles squelettiques et du foie (*Figure 3*).

La voie de signalisation de l'insuline permet aussi l'activation de la signalisation des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein), via l'adaptateur Shc. Shc se lie aux sous-unités  $\beta$  du récepteur à l'insuline. La phosphorylation de Shc permet une cascade de phosphorylation de kinases, activant finalement la voie des MAP kinases. La signalisation des MAP kinases permet ainsi l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Saltiel, n.d.).

La signalisation de l'insuline prend fin lors de la dégradation de l'hormone via l'endocytose du complexe hormone-récepteur. Pendant l'internalisation du récepteur et de son hormone, l'activité du récepteur persiste. En revanche, dans l'endosome, les thio-endopeptidases permettent la dégradation de l'insuline. Le récepteur peut, quant à lui, être recyclé ou être dégradé (Posner, 2003).

## ii. Les cellules alpha

Second type cellulaire majoritaire au sein de l'îlot de Langerhans, les cellules  $\alpha$  représentent environ 20% des cellules endocrines du pancréas. En réponse à une hypoglycémie, ces cellules sécrètent le **glucagon**, jouant ainsi **un rôle antagoniste à l'insuline**. Découvert en 1922, le glucagon porte son nom en raison de sa fonction : « glucose agonist ». Synthétisée sous forme de préproglucagon, cette protéine est exprimée au sein des cellules  $\alpha$  pancréatiques mais aussi au niveau du cerveau et des cellules L intestinales, cellules entéro-endocrines. Le préproglucagon est clivé en proglucagon. Le produit résultant du clivage du proglucagon diffère selon le type cellulaire en raison de l'expression tissu-spécifique des enzymes protéolytiques. En effet, au sein des cellules  $\alpha$  pancréatiques, les enzymes proconvertases 2 clivent le proglucagon en glucagon. En revanche, au niveau des cellules L intestinales, le proglucagon est clivé par la proconvertase 1/3 (PC1/3), produisant ainsi le GLP-1 (Glucagon-like Peptide 1). La sécrétion du glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques s'effectue via des modulations du potentiel membranaire, par des canaux calciques et potassiques voltage-dépendant localisés à la membrane plasmique. La sécrétion du glucagon est contrôlée par divers signaux. La



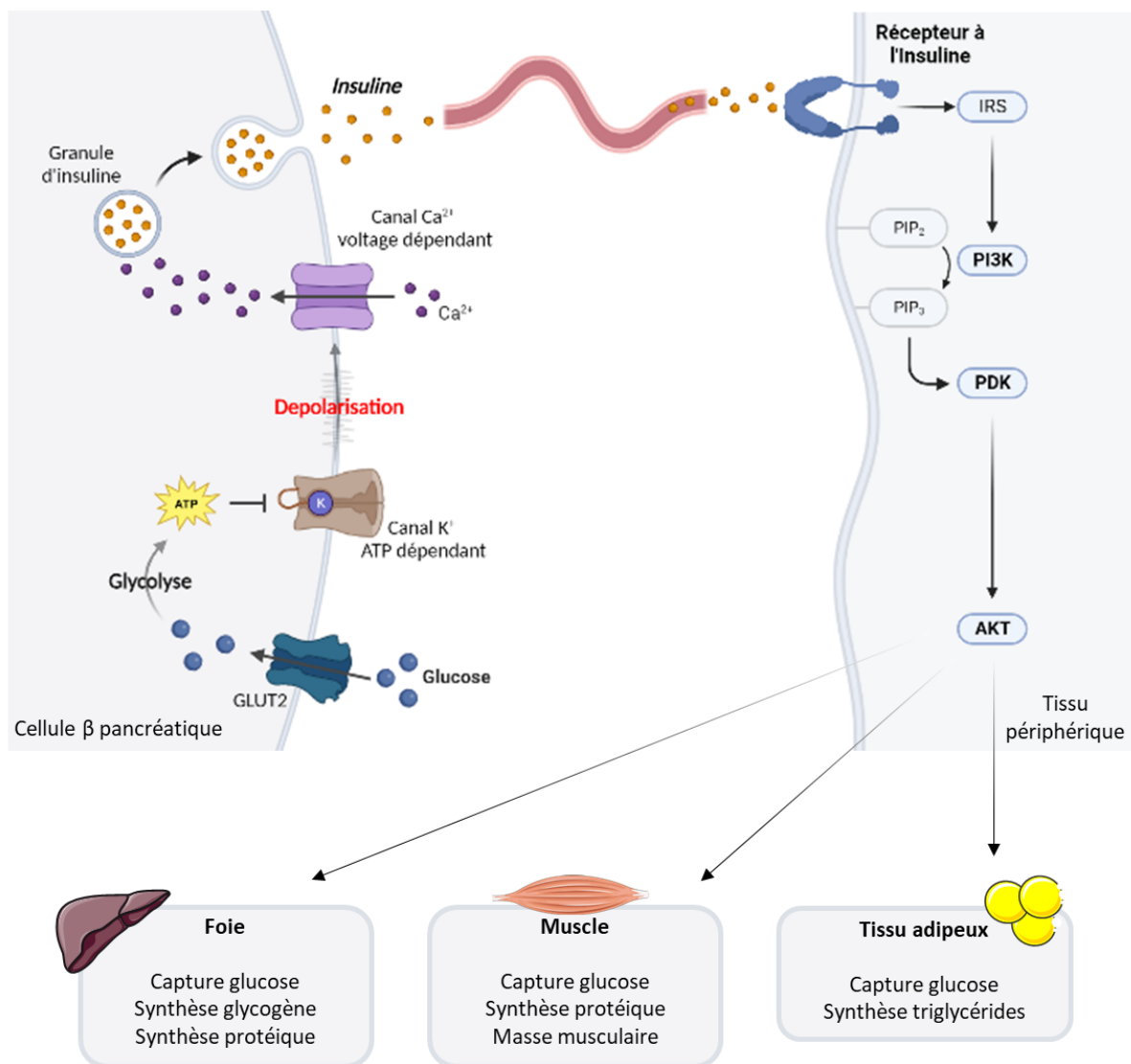
diminution de la glycémie, la glycine ou du glutamate permettent une augmentation de la sécrétion de glucagon. En revanche, l'insuline et la somatostatine inhibent sa sécrétion. Le glucagon sécrété se fixe sur ses récepteurs à la surface des hépatocytes et active la glycogénolyse (formation de glucose à partir du glycogène hépatique). Le glucose alors synthétisé est libéré dans le sang régulant ainsi la glycémie. En revanche, si le stock de glycogène est insuffisant, le glucagon augmentera la néoglucogenèse (production de glucose à partir de pyruvate). La production de glucose par la néoglucogenèse s'effectue également via les lipides et les acides aminés. A partir des lipides, le glucagon peut produire du glucose par la dégradation des triglycérides (TG) en glycérol et en acides gras (AG) via la triglycéride lipase. Ainsi, le glycérol sera utilisé pour la synthèse de glucose via la néoglucogenèse. Enfin, au niveau protéique, le glucagon augmente la capture des acides aminés par le foie afin d'augmenter la production de glucose (*Wendt and Eliasson, 2020*).

### iii. Les cellules delta

Les cellules  $\delta$  représentent moins de 5% des cellules endocrines retrouvées au sein de l'îlot de Langerhans et pourtant, leur faible nombre n'exclut pas leur rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie glucidique. Ces cellules possèdent une morphologie semblable à un neurone, contrairement aux cellules  $\alpha$  et  $\beta$  pancréatiques, possédant une morphologie arrondie. Leur morphologie atypique leur confère la capacité de communiquer avec les cellules  $\alpha$  et  $\beta$  de l'îlot pancréatique via la synthèse et la sécrétion de la somatostatine, une hormone inhibitrice de la sécrétion d'insuline et du glucagon. Par son rôle, la somatostatine empêche les fortes variations de la glycémie prévenant ainsi la potentielle sécrétion excessive de ces deux hormones (*Gao et al., 2021*).

### iv. Les cellules epsilon

Découverte plus récemment en 2002, les cellules  $\epsilon$  sont responsables de la sécrétion de la **ghréline**, dite l'« hormone de l'appétit ». Ces cellules sont davantage présentes à des stades embryologiques du pancréas humain (à des stades tardifs jusqu'au jour 2 post-partum), mais seulement peu d'entre elles sont retrouvées à l'âge adulte. D'abord découverte dans l'estomac du rat, la ghréline est connue comme étant responsable de la sensation de faim. En revanche, son rôle au sein du pancréas reste encore peu connu (*Andralojc et al., 2009 ; Wierup et al., 2014*).



**Figure 3** : Sécrétion et signalisation de l'insuline dans les tissus périphériques.

L'insuline est synthétisée et stockée au sein de granules, au niveau de la cellule  $\beta$  pancréatique. Lors d'une hyperglycémie, le glucose rentre dans la cellule  $\beta$  pancréatique via le transporteur GLUT2. Le métabolisme du glucose engendre la production d'ATP, via la glycolyse. L'augmentation du ratio ATP/ADP ferme le canal potassique ATP dépendant. Cette fermeture du canal potassique engendre une dépolarisation permettant l'ouverture du canal calcique voltage dépendant. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique permet l'exocytose et la sécrétion d'insuline. Dans la circulation sanguine, l'insuline agit sur ses tissus cibles en périphérie (foie, muscle, tissu adipeux). En présence d'insuline, le récepteur à l'insuline dimérise, s'autophosphoryle et crée une liaison avec des protéines substrats, les IRS. La phosphorylation des IRS active la PI3K, permettant la production de PIP<sub>3</sub>, à partir du PIP<sub>2</sub>. Le PIP<sub>3</sub> active la kinase PDK et la kinase AKT. L'activation de la kinase AKT va conduire à l'activation d'autres voies de signalisations permettant d'augmenter la capture de glucose au

sein des organes cibles mais aussi, plus spécifiquement, la synthèse de glycogène dans le foie, la synthèse protéique dans le muscle et de triglycérides dans le tissu adipeux.

#### v. Les cellules PP

Les cellules PP représentent un très faible pourcentage des cellules de l'îlot de Langerhans. Ces cellules sécrètent le polypeptide pancréatique (PP) (*Larsson et al., 1976*). Sa sécrétion est contrôlée par le nerf vague, en réponse à l'acétylcholine, et par la prise alimentaire (*Floyd, 1979*). Le rôle majeur du polypeptide pancréatique est l'inhibition de la sécrétion du suc pancréatique et la diminution du péristaltisme intestinale (*Śliwińska-Mossoń et al., 2017*). Le polypeptide pancréatique permet donc un contrôle de la satiété et du tractus gastro-intestinal.

## II. Le diabète, une épidémie à l'échelle mondiale

Le diabète est une maladie métabolique qui affecte **8,5% de la population mondiale** et qui se caractérise par une **hyperglycémie chronique**. En **2014**, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) compte **422 millions** de personnes atteintes de diabète dans le monde. Le nombre d'individus touchés par les différents types de diabète ne cesse d'augmenter au cours des décennies. La raison de l'**augmentation de la prévalence du diabète** au niveau mondial est imputée à l'**augmentation de la prévalence de facteurs de risque : l'obésité et le surpoids**. De plus, cette augmentation de la prévalence touche plus particulièrement les **pays à faible revenus** que les pays à revenus élevés.

Historiquement, au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle, le **Dr Etienne Lancereaux** met en évidence pour la première fois l'origine pancréatique du diabète et identifie : un diabète « **maigre** » et un diabète « **gras** ». Plus tardivement, les diabètes seront reclassifiés en diabète de type 1 et diabète de type 2 (*American Diabetes Association, 2021*).

L'**hyperglycémie chronique** est la caractéristique commune aux différents diabètes. En revanche, l'origine de cette hyperglycémie diffère selon le type de diabète (DT1 ou DT2) (*Table I*).

Le **Diabète de type 1 est une maladie auto-immune** détruisant les cellules  $\beta$  pancréatiques par le système immunitaire dès l'enfance conduisant à un déficit d'insuline et l'impossibilité de réguler les fluctuations de glucose.

Le **Diabète de type 2** se développe avec l'âge chez l'adulte, par la mise en place d'une résistance à l'insuline périphérique et la destruction progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Les deux types de diabètes sont présentés en détails dans les paragraphes suivants.

Type de diabètes	Description
Diabète de Type 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ <b>Maladie auto-immune : destruction</b> des cellules <math>\beta</math> pancréatiques <b>présentation d'antigènes</b> engendrant le recrutement de <b>cellules immunitaires</b>.</li> <li>✓ Hyperglycémie</li> <li>✓ Déficience en insuline.</li> <li>✓ Apparition dans l'enfance ou chez les jeunes adultes.</li> <li>✓ Injection quotidienne d'insuline.</li> </ul>
Diabètes de Type « MODY »	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Formes <b>rares</b> de <b>diabète monogénique</b>.</li> <li>✓ Dus à des <b>mutations</b> sur un gène autosomique, menant à une <b>perte de fonction</b> de la cellule <math>\beta</math> pancréatique ou un <b>défaut</b> de sécrétion ou de l'<b>action</b> de l'insuline.</li> <li>✓ Hyperglycémie légère.</li> <li>✓ Apparition chez le jeune adulte</li> <li>✓ Administration orale d'agent pharmacologique facilitant la sécrétion d'insuline.</li> </ul>
Diabète de Type 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Le <b>plus commun</b>, généralement diagnostiqué chez l'adulte en <b>surpoids</b> ou <b>obèse</b>.</li> <li>✓ <b>Insulino-résistance périphérique</b> ainsi qu'un dysfonctionnement et la <b>perte progressive</b> des cellules <math>\beta</math> pancréatiques.</li> <li>✓ Hyperglycémie</li> <li>✓ Administration orale d'agent pharmacologique facilitant la sécrétion d'insuline.</li> </ul>

*Tableau 1 : Caractéristiques physiopathologiques et origines des différents diabètes.*

Les différents diabètes sont associés au développement d'autres pathologies et au développement de problèmes de santé, **augmentant le risque général de décès prématuré** du patient diabétique. En premier lieu, le diabète augmente les risques de maladies cardiovasculaires (*WHO Multinational Study Group et al., 2001*). En effet, le diabète multiplie par trois les risques d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux. Cette augmentation des risques cardiovasculaires, via les lésions des vaisseaux sanguins de la rétine, engendre, sur le long terme, plus de risques de cécité et de rétinopathie. La diminution du débit sanguin, chez les patients diabétiques, peut être responsable d'amputations des membres inférieurs et d'insuffisance rénale.

### A. Diabète de Type 1

Aussi nommé **diabète juvénile** ou **diabète insulino-dépendant**, le **diabète de Type 1** est dû à une destruction des cellules sécrétrices d'insuline, les cellules  $\beta$  pancréatiques, par les cellules du système immunitaire. Le diabète de type 1 touche environ 5% à 10% des patients diabétiques. Ce diabète est dit « juvénile » puisqu'il s'agit d'une pathologie qui apparaît majoritairement chez l'enfant ou le jeune adulte, même s'il peut apparaître à l'âge adulte. L'espérance de vie est réduite d'environ 12 ans par rapport à la population générale.

Environ **90% des cellules  $\beta$  pancréatiques** sont détruites au cours de cette pathologie. Résultant d'un **dysfonctionnement génétique**, les cellules  $\beta$  pancréatiques présentent un ou plusieurs antigènes à la surface. Ainsi, **les lymphocytes T reconnaissent ces antigènes** et conduisent à **une réponse auto-immune** contre les cellules  $\beta$  pancréatiques. La destruction des cellules  $\beta$  au sein de l'îlot de Langerhans par les lymphocytes T s'effectue sur plusieurs années et reste souvent « silencieuse », d'où le diagnostic brutal de la pathologie au moment de l'apparition des premiers signes cliniques. Cette destruction s'effectue par les **lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup>** et les **lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup>**, qui induisent l'apoptose des **cellules  $\beta$  pancréatiques**.

En effet, le diabète de type 1 reste indécélable durant des années, tant que les cellules  $\beta$  pancréatiques restantes permettent de compenser la perte progressive de cellules sécrétrices d'insuline, pour le maintien de l'homéostasie glucidique.

La meilleure compréhension de cette pathologie permet tout de même un diagnostic plus précoce par l'apparition de signes cliniques. Effectivement, la **présence d'auto-anticorps** dirigé contre l'**insuline**, le **polypeptide amyloïde**, la **tyrosine phosphatase IA-2** et la

glutamate decarboxylase 65 (**GAD65**), ainsi que l'apparition de plusieurs symptômes comme la **polyurie**, **polydipsie**, une **perte de poids**, une **altération de la vision** et progressivement l'évolution vers une **acidocétose** permettent d'orienter le diagnostic vers un diabète de type 1.

**Multifactorielles**, les causes de la maladie sont l'**association de prédisposition génétique et de facteurs environnementaux**. Ainsi, la génétique n'est pas la seule explication à l'apparition de cette pathologie. **Malgré la prédisposition génétique** au diabète de type 1, avec un risque de prévalence moyen de 6% d'avoir des enfants atteints d'un diabète de type 1 dans une famille avec prédisposition génétique contre 0,4% dans la population générale (*Pociot et al, 2022*), **des facteurs environnementaux** sont aussi responsables de l'apparition de cette pathologie. Parmi les facteurs de risques, **les infections virales**, comme une infection par l'entérovirus Coxsackie B, sont largement décrites, créant ainsi une inflammation pancréatique, favorisant la perte progressive des cellules sécrétrices d'insuline.

De plus, d'autres facteurs environnementaux tels que les chocs émotionnels (via une augmentation du cortisol affaiblissant les cellules  $\beta$  pancréatiques), le taux faible d'activités physiques ou encore l'alimentation peuvent être responsables de l'installation du diabète de type 1. D'après la littérature, la présence de plusieurs facteurs comme la présence d'auto-antigènes, la réponse auto-immune ainsi que les facteurs environnementaux semblent être à l'origine de l'apparition du diabète de type 1.

La prise en charge thérapeutique du patient est basée principalement sur **l'insulinothérapie, un traitement lourd et chronique « à vie »**. Le patient suit lui-même sa glycémie et adapte les doses d'insuline à injecter.

**Ce traitement découle des travaux pionniers des Dr Banting et Dr MacLeod**, co-lauréats, **en 1923**, d'un prix Nobel de médecine ou de physiologie pour la découverte et la purification de l'insuline. Cette découverte majeure a permis une amélioration considérable de l'espérance de vie des personnes atteintes d'un diabète de type 1.

**La greffe d'îlots de Langerhans dans le foie** a ouvert **des perspectives nouvelles** pour le traitement du diabète de type 1. Les cellules sont injectées dans la veine porte menant au foie. Elles se nichent et se mettent à produire de l'insuline. Cette approche nécessite un traitement immunosuppresseur lourd. Elle est souvent réalisée chez des patients en insuffisance rénale terminale et nécessitant conjointement une greffe du rein (*Vantighem et al., 2019*).

**La greffe de pancréas** n'est envisagée que pour les cas extrêmes. 70 greffes de pancréas sont réalisées chaque année en France.

### B. Maturity-Onset of the Young (MODY)

Les « Maturity-Onset of the Young » ou diabète de type « MODY », également appelé diabète monogénique sont des formes rares de diabètes héréditaires, représentant environ 1% à 2% de la population mondiale (*Ledermann, 1995*). Ce sont des diabètes dus à des mutations sur un gène autosomique, causant des défauts de développement, de fonction ou encore de survie de la cellule  $\beta$  pancréatique sans présence d'antigène. Le diagnostic du diabète monogénique se fait chez des individus jeunes (âgés de moins de 25 ans) au sein d'une famille possédant des antécédents de diabètes. Souvent mal diagnostiqué, le diabète monogénique est souvent confondu avec le diabète de type 1 ou de type 2. Ce diabète se caractérise par une hyperglycémie légère. A l'heure actuelle, les traitements pour les diabètes monogéniques sont rarement l'injection quotidienne d'insuline mais plutôt des agents pharmacologiques administrés de manière orale, comme les sulfonylurées.

Assez rare dans la population, il existe 14 gènes connus pour être mutés dans le diabète de type MODY. Les plus représentés dans la population sont les mutations sur les gènes GCK (glucokinase, qui est le MODY-2), HNF1A (MODY-3), HNF1B (MODY-5) et HNF4A (MODY-1).

Les mutations observées dans les MODY sont responsables d'une augmentation du stress du Réticulum Endoplasmique (RE) et de l'activation de l'Unfolded Protein Response (UPR), que nous décrirons plus tardivement dans ce manuscrit (*Yong et al., 2021*).

### C. Obésité et Diabète de Type 2

L'obésité est un problème majeur de santé publique. A travers le monde, l'augmentation constante de sa prévalence en a fait une **pandémie**.

En France, l'étude Obépi-Roche 2020 rapporte qu'environ 50% de la population est obèse (17 %) ou en surpoids (30,3 %). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe le surpoids et l'obésité selon l'Indice de Masse Corporelle (IMC), défini par le rapport poids (en kg) sur le carré de la taille (en m). Selon l'OMS, l'obésité se caractérise par une accumulation excessive de masse grasse qui peut nuire à la santé (*Table 2*).

L'obésité peut être une conséquence de prédispositions génétiques (telles que les mutations sur la leptine, une hormone de la satiété) et/ou de modifications des comportements (déséquilibre dans la balance énergétique : apport et dépense énergétique). En effet, l'augmentation de la sédentarité dans notre société moderne, avec une alimentation « libre d'accès » et riche en carbohydrates et en lipides, sont en partie responsables de l'augmentation de la proportion d'individus obèses ou en surpoids au niveau mondial.

<b>IMC</b>	<b>Interprétation</b>
<b>&lt; 16.5</b>	<i>Extrême Maigreur</i>
<b>16.5 – 18.5</b>	<i>Maigreur</i>
<b>18.5 – 25</b>	<i>Normale</i>
<b>25 – 30</b>	<i>Surpoids</i>
<b>30 – 35</b>	<i>Obésité modérée</i>
<b>35 – 40</b>	<i>Obésité sévère</i>
<b>&gt; 40</b>	<i>Obésité morbide</i>

*Tableau 2 : Indice de Masse Corporelle (IMC) chez l'adulte et interprétation.*

L'obésité s'accompagne de comorbidités telles que les **maladies cardiovasculaires**, les complications hépatiques, nommés **NAFLD** pour Non Alcoholic Fatty Liver Disease, et le **diabète de type 2**.

Aussi connu sous le nom de **diabète gras** ou **diabète non insulino-dépendant**, le diabète de type 2 est une maladie métabolique caractérisée par une **hyperglycémie chronique**. Les individus atteints d'un diabète de type 2 représentent 90% à 95% de tous les patients atteints de diabète. Longtemps observé exclusivement chez l'adulte, le diabète de type 2 est aujourd'hui retrouvé chez les enfants, en raison de la forte augmentation du surpoids et de l'obésité dans le monde.

L'OMS rapporte que la prévalence du diabète de type 2 a triplé entre 1980 et 2014. L'OMS estime qu'environ 379 millions de personnes sont touchées par le diabète de type 2 en 2014 et que ce chiffre est en continuel expansion.



Le diagnostic du diabète de type 2 s'effectue par la mesure du glucose plasmatique à jeûn et/ou sur un test de tolérance au glucose (Glucose Test Tolerance, GTT). Le test de tolérance au glucose s'effectue par une absorption orale de glucose (**75 grammes de sucre**). La glycémie est prise 2 heures après l'ingestion du glucose. Une quantification du glucose plasmatique à jeûn supérieure à 7 mmol/l (soit 125 mg/dl) et une glycémie 2 heures post ingestion de glucose supérieure à 11,1 mmol/l (soit 200 mg/dl) permettent le diagnostic d'un diabète de type 2.

L'hyperglycémie chronique observée chez les patients atteints d'un diabète de type 2 résulte d'un défaut d'action de l'insuline dans les tissus périphériques, au niveau du muscle, du foie et du tissu adipeux et d'un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus évident sur la première étape du développement du diabète de type 2. En revanche, la perte de la sensibilité à l'insuline et la perte de la sécrétion de l'insuline sont associées au développement du DT2 (*Table 3*).

Antidiabétiques	Descriptions	Effets secondaires
<b>Biguanides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Famille de la metformine</li> <li>✓ Diminue l'insulino-résistance périphérique</li> <li>✓ Première ligne de traitement du DT2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Troubles digestifs</li> <li>✓ Acidose lactique</li> </ul>
<b>Sulfamides</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Famille des sulfonylurées</li> <li>✓ Augmente la sécrétion d'insuline</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hypoglycémie</li> <li>✓ Conduit à une perte progressive de la cellule <math>\beta</math> pancréatique</li> </ul>
<b>Incrétines</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Analogues du GLP-1</li> <li>✓ Augmente la sécrétion d'insuline</li> <li>✓ Augmente la sensibilité à l'insuline en périphérie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Hypoglycémie</li> <li>✓ Troubles digestifs</li> </ul>

*Tableau 3 : Les antidiabétiques et leurs effets bénéfiques/indésirables.*

**La résistance à l'insuline en périphérie** est due à une accumulation de lipides dans les tissus périphériques. En effet, l'accumulation de lipides court-circuite la signalisation du récepteur à l'insuline. En périphérie, l'insuline permet la capture du glucose par le tissu adipeux, le foie et le muscle. Lors d'une insulino-résistance, le transporteur de glucose, GLUT4, localisé au sein de vésicules intracellulaires, ne relocalise pas à la surface de la cellule adipocytaire ou

musculaire. Ce processus diminue la capture du glucose par les tissus périphériques, résultant ainsi en une hyperglycémie.

De manière compensatoire, en réponse à cette hyperglycémie, les cellules  $\beta$  pancréatiques sécrètent davantage d'insuline. La production accrue d'insuline, au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique, surcharge le réticulum endoplasmique (RE) de ces cellules. De nombreuses études montrent la présence de marqueurs du stress du RE au sein des pancréas de patients atteints d'un diabète de type 2 (*Shrestha et al., 2021*). Enfin, cette surcompensation de la cellule  $\beta$  pancréatique conduit à un affaiblissement de cette dernière. Les cellules sécrétrices d'insuline s'épuisent en augmentant la quantité d'insuline produite, engendrant une augmentation du stress du RE et enfin, cela peut conduire à la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques par différents mécanismes de mort cellulaire : apoptose, nécrose, nécroptose, pyroptose et plus récemment, la ferroptose. Ces différents types de mort cellulaire sont décrits dans le chapitre suivant.

#### D. La mort cellulaire des cellules $\beta$ pancréatiques associée au Diabète

La mort cellulaire intervient en condition physiologique pour maintenir l'homéostasie tissulaire permettant l'élimination des cellules surnuméraires ou potentiellement dangereuses (par exemple les cellules portant une charge virale importante). Les processus de mort cellulaire sont divisés en deux groupes : la mort cellulaire programmée par apoptose qui n'induit pas de rupture de la membrane plasmique, considérée comme une mort dite « stérile » non-inflammatoire, contrairement à la mort cellulaire non-programmée par nécrose qui aboutit à la rupture de la membrane plasmique et à la libération de nombreux signaux de dangers comme les « Danger Associated Molecular Pattern » (DAMP) induisant une réponse inflammatoire (*Buja et al., 1993*).

Au cours des dernières décennies, de nombreux mécanismes de mort cellulaire ont été identifiés et regroupés, selon des critères morphologiques et biochimiques spécifiques, dans une classification par la « Nomenclature Committee on Cell Death » (NCCD) (*Galluzzi et al., 2018*). Ainsi, l'organisme a dû développer d'autres types de morts cellulaires programmées pour faire face aux stratégies mises en place par les agents pathogènes pour échapper à la surveillance immunitaire. On peut citer la nécroptose, la pyroptose et plus récemment la ferroptose.

Ces types de mort cellulaire ont été associés à la physiopathologie du diabète (*Table 4*). Notons que les interconnexions multiples entre ces différents types de mort cellulaire peuvent entraîner des conséquences importantes sur l'activation des mécanismes inflammatoires au sein du pancréas, lors de l'installation du diabète.

Mort cellulaire	Caractéristiques morphologiques	Caractéristiques biochimiques
<b>Apoptose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mort cellulaire programmée</li> <li>✓ Condensation des cellules, condensation de la chromatine</li> <li>✓ Fragmentation de l'ADN, formation de corps apoptotiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Régulation des membres de la famille Bcl-2 et de activation de caspases apoptotiques</li> <li>✓ Externalisation des phosphatidylsérines de la membrane plasmique « eat-me » signal</li> <li>✓ Perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP)</li> </ul>
<b>Nécrose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mort cellulaire non programmée caractérisée par une déficience mitochondriale et un épuisement de l'ATP</li> <li>✓ Condensation modérée de la chromatine</li> <li>✓ Gonflement du contenu cytoplasmique et des organelles</li> <li>✓ Rupture de la membrane plasmique et libération du contenu intracellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Indépendant des caspases</li> <li>✓ Activation des calpaïnes et des cathépsines</li> <li>✓ Fuite d'ATP et de LDH</li> <li>✓ Phosphorylation et ubiquitination de RIP-1</li> <li>✓ Formation de ROS</li> <li>✓ Perméabilisation du lysosome</li> </ul>
<b>Nécroptose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mort cellulaire régulée</li> <li>✓ Combinaison morphologiques d'apoptose et de nécrose</li> <li>✓ Gonflement des organelles et perméabilisation membranaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Inhibition de la caspase-8</li> <li>✓ Assemblage du nécrosome composé de RIPK1 et RIPK3</li> <li>✓ Activation/phosphorylation de MLKL</li> </ul>
<b>Mort autophagique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dégradation catabolique des composants cellulaires par l'intermédiaire des lysosomes et des composants de la machinerie autophagique</li> <li>✓ Défaut de condensation de la chromatine</li> <li>✓ Vacuolisation du cytoplasme</li> <li>✓ Accumulation d'autophagolysosome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Indépendant des caspases</li> <li>✓ Conversion de LC3-I en LC3-II</li> <li>✓ Implication des ATG</li> <li>✓ Dégradation de p62</li> </ul>
<b>Pyroptose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mort cellulaire régulée</li> <li>✓ Libération de pro-cytokines inflammatoires IL-1<math>\beta</math> et IL-18</li> <li>✓ Gonflement du contenu cytoplasmique</li> <li>✓ Formation de pores sur la membrane plasmique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Initié par les PAMPS/DAMPS menant à l'activation de l'inflammasome</li> <li>✓ Dépend de Caspase 1 – 4/5 chez l'Homme (1 – 11 chez la souris)</li> <li>✓ Clivage/Libération de pro-cytokines inflammatoires (IL-1<math>\beta</math> et IL-18)</li> <li>✓ Fuite d'ATP et de LDH</li> </ul>
<b>Ferroptose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Mort cellulaire régulée</li> <li>✓ Libération de DAMPs</li> <li>✓ Altérations des mitochondries, plus denses et plus petites.</li> <li>✓ Altérations des crêtes mitochondriales.</li> <li>✓ Contrairement à l'apoptose et à la nécrose, la membrane et le noyau sont intacts.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Production de lipides peroxydés dépendante du fer</li> <li>✓ Diminution de l'activité ou de l'expression de GPX4 ou de la glutathione.</li> </ul>

*Tableau 4 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des différents types de mort cellulaire rencontrés dans le pancréas, au cours du développement d'un diabète.*

### i. Apoptose

L'apoptose est une des premières voies de mort cellulaire programmée décrite (*Kerr et al., 1972*). La mort cellulaire programmée par apoptose est caractérisée par des changements morphologiques (condensation de la chromatine et fragmentation du noyau, condensation cytoplasmique et bourgeonnement membranaire avec la formation de bulles) et biochimiques spécifiques (activation d'une famille d'enzymes, les caspases). La modification de la composition membranaire avec l'externalisation des phosphatidylsérines en faveur du feuillet

externe (« Flip-Flop ») conduit à une reconnaissance (« eat-me » signal) et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages (*Segawa and Nagata, 2015*).

Cette mort cellulaire peut être initiée soit par la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie soit par la voie extrinsèque faisant intervenir l'activation des récepteurs de mort transmembranaires.

#### *La voie extrinsèque.*

La voie extrinsèque ou « voie des récepteurs de mort » est dépendante de l'activation des récepteurs de mort à la suite d'un stress extracellulaire. Cette famille de récepteur comporte les récepteurs TNFR (Tumor necrosis factor Receptor, ligand : TNF $\alpha$ ), TRAILR (Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand Receptor) aussi nommé DR5 (Death Receptor 5) et DR4 (Death Receptor 4) (ligand : TRAIL (Tumor Necrosis Factor related apoptosis inducing ligand)) et Fas (ligand : Fas-L). La fixation du ligand de mort spécifique sur son récepteur induit leur trimérisation et la formation d'une plateforme de signalisation spécifique le « DISC » (Death-inducing signalling complex), composé des protéines FADD (Fas-associated protein with death domain), le recrutement et l'auto-activation des caspases -8 et -10 (caspases dites initiateuses de cette voie). L'activation des caspases -8 /-10 permet l'activation par clivage en cascade des caspases dites exécuteurs (caspases -3, -6 et -7) amplifiant le signal de mort. Cette étape rend alors l'apoptose irréversible. Les caspases exécuteurs altèrent définitivement l'intégrité de la cellule (formation des corps apoptotiques) et activent des endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN. Les cellules capables d'enclencher cette voie de signalisation sont dites de type 1.

#### *La voie intrinsèque.*

La voie intrinsèque est dépendante de la mitochondrie. Elle est déclenchée lors de stress intracellulaires (les dommages à l'ADN, le stress oxydatif ou encore les lipides). Ainsi, dans des pathologies associées à l'obésité, comme le diabète de type 2, les lipides et leurs métabolites (acides gras libres, les lysophosphatidylcholines, les céramides et le cholestérol libre) peuvent induire la voie de l'apoptose mitochondriale engendrant les phénomènes de lipotoxicité.

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (mitochondrial outer membrane permeabilization ; MOMP) est nécessaire pour l'engagement de la voie intrinsèque

de l'apoptose. Cette perméabilisation est régulée par les membres de la famille de protéines Bcl-2 (B cell lymphoma-2). Les différents stress intracellulaires vont conduire à l'activation spécifique des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax (BCL-2 associated X), Bak (BCL-2 homologous antagonist killer), Bid (BH3 interacting-domain death agonist), Bim (Bcl-2-like protein 11), etc). Ces protéines forment des pores au sein de la membrane externe de la mitochondrie, libérant des molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome C ou les SMACs (second mitochondria-derived activator of caspases) dans le cytosol. La libération du cytochrome C permet la formation de l'apoptosome, un complexe protéique composé du cytochrome C, d'APAF-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) et de la caspase -9, la caspase initiatrice de la voie intrinsèque.

L'activité pro-apoptotique peut être inhibée en amont par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, à un instant « t », le devenir de la cellule dépendra de la balance entre l'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques.

Comme pour la voie extrinsèque, l'activation de la caspase -9 initiatrice permet alors le clivage des caspases exécutrices : caspases -3, -6 et -7 amplifiant le signal de mort et responsables de la mort de la cellule. Les cellules capables d'enclencher cette voie de signalisation sont dites de type 2.

Notons que dans certaines cellules ces deux voies, extrinsèque et intrinsèque, communiquent. Ainsi dans les hépatocytes, la voie extrinsèque n'est pas suffisante pour induire l'apoptose. Une amplification avec l'induction de la voie intrinsèque est nécessaire, soulignant l'importance du dialogue entre ces deux voies. Dans les hépatocytes, les caspases -8 et -10 clivent dans le cytosol la protéine pro-apoptotique Bid en sa forme tronquée (tBID), qui relocalise alors du cytosol à la membrane mitochondriale, induisant la MOMP puis la mort de la cellule par apoptose, comme décrit précédemment.

L'apoptose est le type de mort le plus décrit dans les études lors de la perte de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques, associées à la fois au DT1 et au DT2.

Dans le cas du diabète de type 1, les mécanismes de l'apoptose au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques sont induites par : i) la présence du ligand Fas-L et le récepteur Fas à la surface des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des cellules  $\beta$  pancréatiques, ii) la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  (interleukine 1 $\beta$ ), le TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) et l'IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), par les cellules immunitaires au sein de l'îlot de Langerhans et enfin iii) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'oxyde nitrique (NO) par les

macrophages et les cellules  $\beta$  pancréatiques (*Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001 ; Kay et al., 2008 ; Pirot et al., 2008*). Ces différents mécanismes empruntent la voie extrinsèque mais aussi la voie intrinsèque de l'apoptose et sont responsables de la perte de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques de patients atteints d'un diabète de type 1 (*Cnop et al., 2005 ; Rojas et al., 2018*).

Au sein de l'îlot de Langerhans, l'interaction du ligand Fas-L avec son récepteur Fas permet l'induction du signal apoptotique via le recrutement du complexe DISC sous le récepteur. Ce recrutement permet la maturation par clivage de la caspase -8 et de ses effecteurs, dont la caspase -3 par la suite. Enfin, cette signalisation mène à la mort par apoptose de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Park et al., 2012*). Les cytokines telles que le TNF $\alpha$  permettent aussi d'induire l'apoptose via les récepteurs de mort (*Hui et al., 2004*).

En revanche, la présence de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  et l'IFN $\gamma$  sécrétées par les cellules immunitaires activent l'apoptose par la voie intrinsèque.

Dans le cas de l'IL-1 $\beta$ , cette cytokine se fixe à son récepteur, l'IL-1R (Interleukine 1 Récepteur) à la surface de la cellule  $\beta$  pancréatique. La transduction du signal mène à l'activation de la voie NF $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$  B), permettant sa translocation dans le noyau. Ce facteur de transcription augmente l'expression de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et ainsi la production d'oxyde nitrique (NO) (*Thomas et al., 2002 ; Zumsteg et al., 2000*). La présence de NO engendre ensuite la perte de fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique, puisque le NO est impliqué dans la diminution de l'activité de l'ATP synthase, or l'ATP est essentiel à la synthèse et la sécrétion d'insuline (*Wang et al., 2010*). Le NO est aussi responsable de la libération de cytochrome C au niveau de la membrane de la mitochondrie, médiant ainsi une apoptose dépendante de la mitochondrie. De plus, la présence de NO engendre la diminution de l'expression de la pompe SERCA2b (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase) au niveau du RE. Ainsi, cela diminue le stockage du Ca<sup>2+</sup> au sein du RE et induit un stress du réticulum endoplasmique (RE) conduisant à une mort dépendante du stress du RE (*Cardozo et al., 2005*). Enfin, cette déplétion calcique du RE engendre l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinases), responsable aussi de la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique en réponse à l'IL-1 $\beta$  (*Wang et al., 2009*).

En revanche, au sein du diabète de type 2, les mécanismes responsables de l'apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques sont la glucotoxicité et la lipotoxicité. En effet, ces désordres métaboliques (augmentation de la glycémie et des acides gras libres circulants) engendrent une perte de fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques. Progressivement, l'exposition prolongée à de

fortes concentrations de glucose et d'acides gras libres induisent la mort par apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques. Effectivement, les îlots isolés de patients atteints d'un diabète de type 2 présentent une augmentation du clivage des caspases -3 et -8 (*Marchetti et al., 2004*).

De manière similaire aux mécanismes décrits dans le diabète de type 1, l'hyperglycémie et la forte concentration d'acides gras libres augmentent l'inflammation au sein des îlots de Langerhans, via la présence de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ). De plus, ces désordres métaboliques sont responsables de la production de ROS. Ces mécanismes sont responsables de la mort progressive par apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein des patients atteints d'un diabète de type 2 (*Fontés et al., 2010 ; Goh et al., 2007 ; Lytrivi et al., 2020*).

## ii. Nécrose

En opposition avec l'apoptose, la nécrose est définie par la rupture de la membrane plasmique et la libération du contenu intracellulaire, dans le milieu extracellulaire, et conduit à l'activation du système immunitaire. La nécrose est donc immunogénique. Contrairement à l'apoptose, cette mort est indépendante des caspases. Cette mort aboutit notamment à la perte de l'homéostasie ionique par l'ouverture prolongée du MPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore), un canal ionique non sélectif de la membrane interne de la mitochondrie. La perte de l'homéostasie ionique induit un changement du potentiel membranaire (dépolérisation) de la mitochondrie et donc la perte du gradient de protons essentiels à la synthèse d'ATP. Ainsi, la nécrose est le résultat d'un dysfonctionnement mitochondrial et d'une déplétion en ATP de la cellule.

Pendant longtemps, la nécrose a été considérée comme accidentelle et non régulée en raison d'une atteinte physico-chimique ou mécanique de la cellule. Cependant, depuis, les études ont montré que la nécrose peut être aussi régulée par l'existence de voies de signalisations intracellulaires spécifiques. Ainsi, la nécroptose et la pyroptose sont apparues comme des formes régulées de la nécrose.

## iii. Nécroptose

La nécroptose, nécrose « programmée », partage une partie de la machinerie moléculaire de l'apoptose extrinsèque mais présente les caractéristiques phénotypiques de la nécrose. Sa cinétique serait plus rapide que celle de l'apoptose.



La nécroptose dépend de la signalisation des récepteurs de la mort : TRAILR, TNFR ou encore Fas et se met en place lorsque la caspase -8 est inhibée. La fixation du ligand sur son récepteur permet alors le recrutement intracellulaire et l'activation des kinases RIPK1 (Receptor Interacting Protein Kinase 1) et RIPK3 (Receptor Interacting Protein Kinase 3) et ainsi, conduire à la formation d'un complexe protéique nommé le nécrosome. Les kinases du complexe phosphorylent MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like protein). MLKL s'oligomérisent et transite à la membrane plasmique afin d'y former des pores et induit alors la perméabilisation de la cellule.

La différence moléculaire avec l'apoptose est l'activation de la caspase -8. Dans le cas de l'apoptose, la caspase -8 activée clive RIPK1 et RIPK3, inhibant ainsi la formation du nécrosome. Au contraire pour la nécroptose, cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) inhibe la caspase -8 via la formation d'un hétérodimère, aboutissant ainsi à la formation du nécrosome (*Kaczmarek et al., 2013 ; Vandenabeele et al., 2010*).

Notons que la signalisation par la voie des IFN1 et 2 peut également induire la nécroptose. En effet, si RIPK1 a été clivée par la caspase -8 et ne peut plus être recrutée au nécrosome, alors l'IFN induit la protéine ZBP1 (Z-DNA-binding protein 1) qui peut recruter RIPK3 et conduire à la nécroptose. Également, la reconnaissance de motifs de dangers de pathogènes par les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) peut induire cette mort en recrutant la protéine TRIF (Toll/interleukin1 Receptor domain-containing adapter-Inducing IFN- $\beta$ ) recrutant RIPK3 et induisant la nécroptose.

Au niveau du pancréas, la littérature décrit la présence de nécroptose en réponse à l'IL-1 $\beta$ . En effet, la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques est aussi associée à la libération de HMGB1 (High Mobility Group Box), un marqueur de la nécrose, indépendamment du clivage de la caspase 3 ou de l'exposition externe des phosphatidylsérines, en réponse à la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  (*Steer et al., 2006*). De plus, l'IL-1 $\beta$  permet l'augmentation de la nécrose dépendante de l'oxyde nitrique (*Hoorens et al., 2001*). Enfin, une étude démontre que la stimulation au TNF $\alpha$  de cellules  $\beta$  pancréatiques, en présence d'inhibiteurs des caspases, engendre une mort de type nécroptotique au sein de ces cellules (*CONTRERAS et al., 2021*).

Pour conclure, la nécroptose retrouvée au sein du pancréas semble s'effectuer en réponse aux cytokines pro-inflammatoires. Effectivement, en tant que processus de défense contre les virus, la nécroptose permet de contre-carrer l'inhibition des caspases par les virus et ainsi induire une mort indépendante des caspases. Etant donné le lien entre les virus et le diabète de type 1, la

nécroptose pourrait être responsable en partie de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques dans le cadre du diabète.

#### iv. Pyroptose

La pyroptose est une mort cellulaire programmée lytique « inflammatoire ». Historiquement, cette mort a été principalement observée au niveau des monocytes et des macrophages (*Boise and Collins, 2001 ; Zychlinsky et al., 1992*) mais également au niveau d'autres types cellulaires, comme les cellules endothéliales intestinales (*Tan et al., 2021*), les hépatocytes (*Lebeaupin et al., 2015 ; Wree et al., 2014*) mais aussi les cellules  $\beta$  pancréatiques (*Chen et al., 2018 ; Wang et al., 2015*).

La pyroptose aboutit à la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18 par les cellules et augmente ainsi l'inflammation. Cette mort cellulaire dépend de la formation d'un complexe protéique nommé l'inflammasome, permettant la détection rapide de signaux de danger pour la cellule tels que les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) et les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) (*Schroder et al., 2010*). En réponse à ces signaux de danger, trois familles de récepteurs sont actuellement décrites pour l'activation de l'inflammasome : la famille NLR (Nucleotide-binding domain Leucine-rich Repeat), la famille ALR (Aim2-Like Receptors) et la famille RLR (RIG-Like helicase Receptors). Ces récepteurs s'associent avec différents partenaires protéiques afin de former une plateforme multiprotéique avec les protéines adaptatrices de type ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein) et les pro-caspases inflammatoires (Caspase -1 et -11 chez la souris et caspase -1, -4 et -5 chez l'Homme). Par la suite, ces caspases s'activent par auto-clivage et permettent la maturation par clivage de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL18).

L'inflammasome NLRP3 est le plus décrit dans la littérature et le plus étudié dans les maladies métaboliques. Il est capable de percevoir des signaux de dangers métaboliques (LPS, Glucose, AGL).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 dépend de deux « hits » : un premier « hit » permettant la transcription de NLRP3 et des précurseurs de l'IL-1 $\beta$  et IL-18. Chez les individus obèses, une endotoxémie est notamment observée (élévation du LPS circulant) consécutive à une augmentation de la perméabilité de la paroi intestinale. Le LPS se lie à son récepteur TLR (Toll-Like Receptor) et active une cascade moléculaire aboutissant au « priming » de NLRP3 et des cytokines via la voie NF $\kappa$ B. Un second « hit » permet ensuite l'assemblage du complexe

multiprotéique avec la protéine adaptatrice ASC et la caspase 1. La caspase -1 s'autoclive induisant son activation, permettant le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18 inactives en leur forme active IL-1 $\beta$  et IL-18, responsables de la réponse inflammatoire. L'inflammasome NLRP3 permet le clivage de la Gasdermine D entre les domaines « N-terminal » et « C-terminal », par les caspases pro-inflammatoires. La Gasdermine D non clivée s'auto-inhibe entre ces deux domaines. Le clivage de la Gasdermine D conduit à la formation de deux protéines : la Gasdermine D « N-terminal » de 31 kDa et la Gasdermine D « C-terminal » de 22 kDa. La Gasdermine D « C-terminal » reste dans le cytosol tandis que la Gasdermine D « N-terminal » s'oligomérisse et forme des pores à la membrane, permettant la sortie des formes matures de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18. Cette signalisation est nommée la voie canonique de l'inflammasome NLRP3. L'activation de l'inflammasome NLRP3 impliquant la caspase -11 chez la souris et la caspase -4 et -5 chez l'Homme est dite « non canonique ». Cette dernière est moins décrite dans la littérature.

De façon intéressante, l'activité de l'inflammasome NLRP3 peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. Effectivement, la déubiquitination de NLRP3 par BRCC3 (BRCA1/BRCA2-Containing Complex Subunit 3) empêche le recrutement du marqueur autophagique p62 et ainsi sa dégradation au protéasome. Cette déubiquitination permet son activation et la sécrétion de l'IL-1 $\beta$  (Py *et al.*, 2013). De plus, la phosphorylation de NLRP3 (sur la sérine S198 chez l'Homme, S194 chez la souris) par JNK1 (c-Jun N-terminal kinase 1) permet sa déubiquitination, favorisant son activation (Song *et al.*, 2017).

Aux vues de l'infiltration de cellules du système immunitaire au sein des îlots pancréatiques de patients atteints de diabète (DT1 ou DT2) et de la présence de l'IL-1 $\beta$ , l'inflammasome NLRP3 est largement décrit dans ces pathologies. Ainsi, la présence de cellules immunitaires, telles que les macrophages au sein de l'îlot de Langerhans, engendre la production d'IL-1 $\beta$ , via une augmentation de l'activité de NLRP3 et la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques, chez les patients diabétiques. D'ailleurs, l'inhibition du récepteur à l'IL-1 $\beta$ , soit l'IL-1R, de manière pharmacologique permet de normaliser la glycémie et d'améliorer la fonction des cellules  $\beta$  dans des modèles de souris obèses soumises à un régime gras (DT2) mais aussi dans des modèles murins de diabète de type 1 (souris non obèses diabétiques NOD) (Nicoletti *et al.*, 1994; Osborn *et al.*, 2008).

L'IL-1 $\beta$  a longtemps été décrit comme étant sécrétée seulement par les cellules immunitaires dont les macrophages, au sein du pancréas. Pourtant, son expression génique et protéique a été retrouvée au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques d'un modèle murin de diabète de type 1 (souris

non obèse diabétique, NOD) mais aussi au sein d'îlots provenant de patients atteints d'un diabète de type 2 (Böni-Schnetzler et al., 2008 ; Reddy et al., 2001). De plus, NLRP3 est actif dans les cellules  $\beta$  pancréatiques (Chen et al., 2018 ; Lebreton et al., 2018).

Des études démontrent aussi le rôle essentiel de TXNIP (Thioredoxin-interacting Protein) dans le diabète de type 2 et l'activation de NLRP3. Effectivement, lors d'une hyperglycémie, l'expression de TXNIP est augmentée et cela corrèle avec une augmentation de la caspase -3 au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. La haute concentration en glucose engendre une production de ROS au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette production de ROS conduit à la dissociation de la thioredoxin de TXNIP. Ainsi, TXNIP active l'inflammasome NLRP3 au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques (Chen et al., 2008; Minn et al., 2005; Zhou et al., 2010).

Au cours du diabète de type 2, les patients présentent un dépôt de polypeptide amyloïde (IAPP) dans les îlots de Langerhans. Des études montrent que l'IAPP active l'inflammasome NLRP3 de macrophages pancréatiques. Plus le dépôt d'IAPP est élevé, plus les macrophages présentent un inflammasome NLRP3 activé et sécrètent davantage d'IL-1 $\beta$  (Masters et al., 2010). Récemment, ce mécanisme a été mis en évidence également au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques (Morikawa et al., 2018).

Enfin l'utilisation de modèles murins déficients pour NLRP3 permet de normaliser la glycémie, la sécrétion d'insuline et la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques dans le diabète de type 1 mais aussi dans le diabète de type 2 (Ding et al., 2019 ; Hu et al., 2015 ; Yu et al., 2020).

#### v. Ferroptose

La découverte d'une molécule nommée l'erastin a mis en évidence l'existence d'une nouvelle mort cellulaire en 2003, la ferroptose (Dolma et al., 2003). La ferroptose est une mort cellulaire due à des perturbations oxydatives, conduisant à l'oxydation de lipides (accumulation de lipides peroxydés) dépendante du fer, au sein de la cellule. Effectivement, l'utilisation de chélateurs du fer inhibe cette mort cellulaire régulée (Dixon et al., 2012). La ferroptose est donc liée à une augmentation de la présence de lipides peroxydés, toxiques pour la cellule. Indépendante des caspases et des composants du nécrosome, la ferroptose présente des caractéristiques morphologiques spécifiques, dont une altération des mitochondries, qui deviennent petites et denses avec une altération des crêtes mitochondriales et une rupture de la membrane externe mitochondriale ainsi que la libération de DAMPs. Ainsi, contrairement à l'apoptose et à la nécrose, les cellules subissant la ferroptose présentent une membrane et un noyau intacts.

Au niveau biochimique, la ferroptose résulte donc de la production de lipides peroxydés de manière dépendante du fer. Les lipides peroxydés peuvent s'obtenir de trois manières i) via la réaction de Fenton (réaction d'oxydation résultant en la production de ROS, via le transfert d'électrons sur un atome de fer ( $\text{Fe}^{2+}$ )) de manière non-enzymatique, ii) via l'estérification et l'oxygénation d'acides gras polyinsaturés et enfin iii) via l'auto-oxydation des lipides catalysée par le fer. Dans tous les cas, la formation excessive de lipides peroxydés conduit à la mort de la cellule par la ferroptose. Les protéines antioxydantes sont décrites pour résoudre cette accumulation de lipides peroxydés. Effectivement, GPX4 (Glutathione peroxidase 4) est une protéine antioxydante chargée de neutraliser les lipides peroxydés et de maintenir la fluidité membranaire. La glutathione est un cofacteur de GPX4. Au cours de la ferroptose, la neutralisation des lipides peroxydés est diminuée à la suite d'une diminution soit de l'activité enzymatique de GPX4, soit de son expression.

Des études épidémiologiques ont mis en évidence un potentiel rôle du fer dans le diabète de type 2. Effectivement, un lien a été trouvé entre le stockage du fer au sein du corps et le diabète de type 2 (*Basuli et al., 2014*). Ainsi, plus le corps stocke du fer, plus les risques de développer un diabète de type 2 augmentent (*Jehn et al., 2004*). Au sein d'un modèle de souris hétérozygotes pour l'hémochromatose, une maladie augmentant l'absorption et le stockage du fer au sein du corps, il a été mis en évidence une augmentation de l'insulino-résistance périphérique (*Cooksey et al., 2004*). Malheureusement, les études sur la ferroptose et l'installation du diabète de type 2 sont encore peu nombreuses (*Yang and Yang, 2022*).

## vi. Autophagie

L'autophagie est un mécanisme de survie permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire via la dégradation des protéines et des organites non fonctionnels. Pour ce faire, à partir d'une vésicule composée d'une bicouche lipidique, l'autophagosome, structure fonctionnelle de l'autophagie, englobe les molécules cytoplasmiques ainsi que les organelles dédiées à la dégradation. En effet, ces composants cellulaires sont endommagés ou non essentiels à la survie de la cellule, et ainsi ces molécules sont orientées vers la dégradation. Ensuite, cet autophagosome fusionne avec des lysosomes, organelles composées de nombreuses hydrolases, formant ainsi un autophagolysosome. Ce mécanisme permet la production d'énergie en recyclant les molécules essentielles à la survie de la cellule. L'autophagie est essentielle dans des conditions pauvres en nutriments, dans des mécanismes de protection face à des traitements et dans la clairance de virus.

En fonction du cargo de l'autophagosome, l'autophagie porte différents noms. Par exemple, la dégradation des mitochondries par un mécanisme autophagique se nomme la mitophagie. Pour le réticulum endoplasmique, ce mécanisme se nomme réticulophagie ou RE-phagie, que nous introduirons plus tard.

L'autophagie est divisée en plusieurs étapes et est régulée par de nombreuses protéines, nommées les ATG (AuTophagy related genes). La première étape de l'autophagie est l'induction de l'autophagosome. Cette induction s'effectue par l'assemblage d'un complexe multiprotéique entre les protéines ATG13, ATG101, FIP200 et ULK1 (Unc-51 like autophagy activating Kinase 1) au niveau de ATG9, apposée le long de la membrane de certaines organelles afin d'induire la synthèse de lipides pour la biogenèse de l'autophagosome.

L'autophagosome se forme à partir d'une double membrane lipidique nommée le phagophore. La formation de ce phagophore reste encore peu connue mais des études démontrent que la formation initiale de la bicouche lipidique de l'autophagosome semble venir des organelles telles que la mitochondrie, l'appareil de Golgi mais aussi le RE. Plus récemment, la littérature décrit la formation de l'autophagosome à des sites spécifiques du RE, les « sites de sortie du RE » (ERES pour Endoplasmic Reticulum Exit Site) mais aussi via la formation d'omegasome, structure spécifique du RE suite à la présence d'Atg9 et d'Atg2 à sa surface (*Gómez-Sánchez et al., 2018 ; Graef et al., 2013; Karanasios et al., 2016; Valverde et al., 2019; Ylä-Anttila et al., 2009*). De plus, le phagophore se forme au niveau de sous-domaines du RE enrichis en phosphatidylinositol synthase, permettant ainsi la synthèse *de novo* de lipides pour l'initiation du phagophore (*Axe et al., 2008 ; Nishimura et al., 2017*). Ainsi, ces différentes études démontrent l'importance du RE dans l'initiation et la biogenèse de l'autophagosome ainsi que l'élongation de la membrane de l'autophagosome. D'ailleurs, l'initiation et l'élongation de l'autophagosome nécessite la présence d'un complexe protéique nommé class III - PI3K (class III phosphoinositide 3-kinase), composé de Beclin 1, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting), VPS15 et ATG14L. Le recrutement du complexe ATG5-ATG12 et LC3-II (Light-Chain 3) aide à la formation de l'autophagosome. LC3-I est une protéine cytoplasmique, recrutée au niveau du site d'élongation de l'autophagosome, via la conjugaison avec du phosphatidyléthanolamine. Cette conjugaison convertit le LC3-I en LC3-II. Enfin, la protéine LC3-II interagit avec la protéine p62, chargée d'amener les protéines ubiquitinylées au sein de l'autophagosome pour leur dégradation avant la fusion avec le lysosome.

Malgré son rôle dans la survie et l'homéostasie cellulaire, l'autophagie peut participer à la mort cellulaire dans des conditions particulières. En effet, l'autophagie est souvent un processus moléculaire accompagnant l'apoptose ou la nécrose.

D'après le « Nomenclature Committee of Cell Death », la mort cellulaire dépendante de l'autophagie est une mort cellulaire régulée, dépendante de la machinerie de l'autophagie, et qui se produit indépendamment de l'apoptose et de la nécrose. Cela veut dire que la mort observée au sein d'un modèle doit être spécifique de l'autophagie, donc que l'inhibition de la machinerie autophagique prévient la mort cellulaire. La littérature décrit la mort induite par l'autophagie comme un mécanisme compensatoire dans des conditions d'inhibition de l'apoptose. En effet, au sein d'un modèle de souris doublement déficientes pour Bax et Bak, deux protéines pro-apoptotiques, l'invalidation de Atg5 augmente la survie cellulaire et diminue fortement l'autophagie. Les parties interdigitaux, à des stades embryonnaires précoces, sont fortement conservées dans les souris triplement déficientes (Bax, Bak, Atg5) en comparaison avec les souris doublement déficientes (Bax, Bak). Ainsi, cette étude met en évidence la présence d'un système compensatoire de l'apoptose via une mort cellulaire dépendante de l'autophagie (*Arakawa et al., 2017*).

L'autophagie est un processus essentiel à la survie des cellules  $\beta$  pancréatiques et cela en fait un mécanisme important dans l'apparition et le développement de la physiopathologie du diabète. En effet, la littérature rapporte que les souris génétiquement modifiées pour être diabétiques (db/db) ou des souris soumises à un régime riche en graisse (High Fat Diet : HFD) présentent une augmentation de la formation d'autophagolysosomes au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Lors d'une ablation génique d'Atg7 au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques, les souris déficientes pour Atg7 présentent une diminution de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques, une détérioration de l'architecture de l'îlots, une hypoinsulinémie mais aussi une forte accumulation de protéines agrégées. La délétion génique d'Atg7 n'est pas suffisante pour induire un diabète au sein de ces souris en condition basale, même si cela augmente l'intolérance au glucose et diminue la sécrétion d'insuline. Par contre, lorsque ces souris Atg7 déficientes sont soumises à un régime gras, l'hyperplasie de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques est absente en comparaison avec les souris sauvages (*Ebato et al., 2008 ; Jung et al., 2008 ; Riahi et al., 2016*). Une étude démontre que la délétion génique d'Atg7 spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques au sein de souris génétiquement modifiées pour être obèses (souris ob/ob) conduit à une forme sévère de diabète, mettant en évidence le rôle protecteur de l'autophagie au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Quan et al., 2012*).



Deuxièmement, l'autophagie permet la régulation du pool de granules d'insuline au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique. Dans des conditions de jeûne, les cellules  $\beta$  pancréatiques diminuent la quantité d'insuline sécrétée. Les granules néosynthétisés sont donc dégradés par la voie lysosomale (*Goginashvili et al., 2015*). Ce mécanisme de dégradation des granules d'insuline est fortement augmenté dans une lignée cellulaire « diabétique » et un modèle murin d'obésité (ob/ob), participant à la défaillance progressive de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Pasquier et al., 2019*). Ce type d'autophagie, menant à la dégradation des granules d'insuline, se nomme la crinophagie. Ce mécanisme consiste en la fusion des granules d'insuline stockés avec les lysosomes, permettant ainsi la formation d'un corps crinophagique, dégradant le contenu des granules d'insuline (*Marsh et al., 2007 ; Orci et al., 1984*). Dans un modèle de souris avec une autophagie hyperactive au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Becn1<sup>F121A</sup>* : forme constitutivement active de Beclin1, un acteur de l'autophagie), le pool de granules d'insuline est fortement réduit au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Yamamoto et al., 2018*).

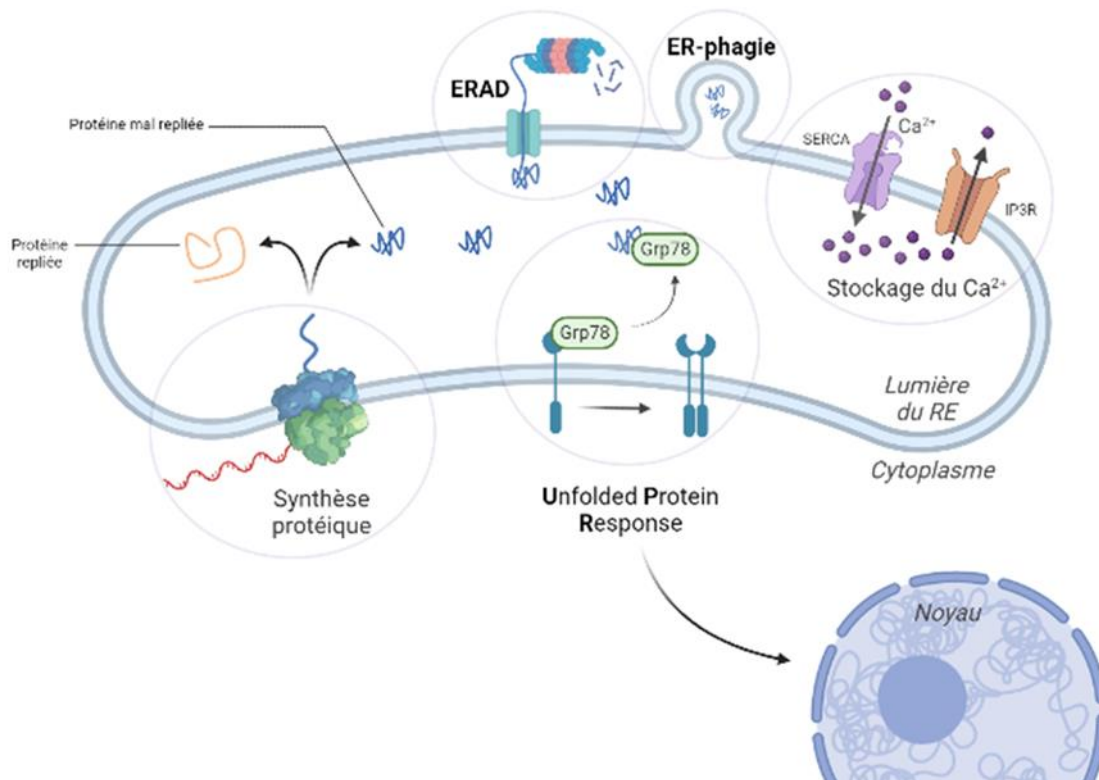
### **III. Le Réticulum Endoplasmique : Fonction physiologique**

#### **A. Les différentes fonctions du Réticulum Endoplasmique**

Découvert en 1945, à l'aide d'échantillons analysés en microscopie électronique dans les bonnes conditions de fixation, le réticulum endoplasmique (RE) est premièrement décrit comme un « réticulum en forme de dentelle » (« lace-like reticulum ») (*Porter et al., 1945 ; Palade, 1955 ; Palade and Porter, 1954*). Cette première observation du RE montre la présence d'un réseau intracellulaire, au sein du cytoplasme, composé de tubules et de vésicules d'environ 100 à 150 nm de diamètre.

Le RE est une organelle complexe et dynamique formée d'une membrane continue incluant l'enveloppe nucléaire et une membrane périphérique, définie par des tubules et des vésicules, permettant de nombreuses connexions avec les autres organelles intra-cellulaires (l'appareil de Golgi, les mitochondries, les endosomes) et la membrane plasmique (*Voeltz et al., 2002 ; Shibata et al., 2006 ; Salvador-Gallego et al., 2017 ; Friedman and Voeltz, 2011*).





**Figure 4 :** Les différentes fonctions du RE.

Le RE est une organelle complexe et dynamique. Le RE possède de nombreuses fonctions. Cette organelle permet la synthèse des protéines sécrétées ou transmembranaires. À la suite de leur synthèse, les protéines se retrouvent dans la lumière du RE. Malencontreusement ou en cas de stress, des protéines mal conformées peuvent s'accumuler dans le RE. La cellule a mis en place un système de surveillance permettant d'aider au repliement ces protéines mal-conformées via la réponse au stress du RE (Unfolded Protein Response ou UPR) qui va augmenter l'expression des gènes de chaperonnes et la capacité du RE. *In fine*, l'excès de protéines mal conformées pourra être dégradé par le système ERAD ou la RE-phagie. Si la cellule ne parvient pas à résoudre le stress généré alors la cellule enclenchera l'apoptose. Le RE permet aussi le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire via un transport actif du calcium au niveau de la pompe SERCA, qui hydrolyse une molécule d'ATP afin de faire rentrer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Le calcium est essentiel au bon fonctionnement de certaines chaperonnes et foldases trouvées au sein du RE. Ainsi, des perturbations de l'homéostasie calcique peuvent aussi perturber le fonctionnement des chaperonnes et activer la réponse UPR.

Le RE assure des fonctions essentielles dans **la synthèse, le repliement et la sécrétion des protéines, le stockage du calcium et la synthèse lipidique (Figure 4)**. Ainsi, par ses fonctions, le RE permet le maintien de l'**homéostasie protéique, calcique et lipidique**. Le RE peut être de type « **rugueux** » ou « **lisse** ». Le RE dit « rugueux » ou RER est nommé ainsi en raison de la présence de ribosomes à la surface de sa membrane. Le RER est le lieu de synthèse des protéines membranaires et sécrétées. À la suite de la traduction, ces protéines se trouveront dans

la lumière du RE pour y subir des modifications post-traductionnelles comme la **N-glycosylation** ou bien la formation de **ponts disulfures**. Comme décrit précédemment, les ponts disulfures sont une modification post-traductionnelle essentielle à la synthèse et la production de l'insuline.

Le RE de type « lisse » ou aussi nommé REL, sans ribosome, est responsable de la synthèse des **lipides**, du **cholestérol**, des **carbohydrates**, des **hormones stéroïdiennes** et des processus de **détoxification des xénobiotiques**.

Malgré le fait que le RER et le REL soient connectés, continus et partagent du « matériel » (que ce soit membranaire ou protéique), la composition protéique du RER et du REL reste distincte. En effet, afin de maintenir leurs fonctions respectives, **la composition protéique du RER et du REL diffère** puisque le RER est enrichi en protéines impliquées dans la translocation et le repliement des protéines tandis que le REL est enrichi en protéines jouant un rôle dans la détoxification ou encore dans le métabolisme des lipides (*Kreibich et al., 1978 ; Vogel et al., 1990 ; Amar-Costesec et al., 1989*). Les deux types de RE se trouvent au sein de chaque type cellulaire, dans des proportions différentes. En effet, dans une cellule hautement sécrétrice, le RER est davantage représenté afin d'assurer les fonctions sécrétrices et la haute demande en synthèse protéique de la cellule (par exemple, au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique). En revanche, dans un type cellulaire spécialisé dans la détoxification de l'organisme ou bien dans la production d'hormones stéroïdiennes, le REL est plus présent pour soutenir la fonction de la cellule (comme les hépatocytes ou les cellules surrénales) (*Chen et al., 2010 ; Gilchrist et al., 2006*). De plus, le REL possède une fonction bien distincte d'un type cellulaire à l'autre. Au sein des hépatocytes, le REL possède des protéines appartenant à la famille des cytochromes P450 impliqués dans la détoxification des xénobiotiques afin d'assurer la fonction de l'hépatocyte dans la détoxification de l'organisme. Cependant, dans le muscle, le REL présente une forte quantité de protéines impliquées dans l'homéostasie calcique (entrée et sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE) afin d'assurer la contraction musculaire. La taille du RE varie aussi en fonction des besoins de la cellule à un instant donné.

Enfin, un autre type de RE se trouve de manière ubiquitaire : le **RE transitoire (REt)**. Le REt est impliqué dans le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. Ce REt a été identifié suite à l'observation d'un domaine du RE fortement concentré en protéines impliquées dans la biogenèse des vésicules COPII (Coat Protein Complex II), essentielles à l'export de cargo en direction de l'appareil de Golgi (*Hobman et al., 1998*).

En conclusion, le RE est subdivisé en différentes parties, via la présence de protéines spécifiques au sein des différents sous-domaines du RE. Ces protéines, aux fonctions bien distinctes, se retrouvent dans différents sous-domaines du RE afin de subdiviser le RE en différentes fonctions (repliement et synthèse protéique, détoxification, synthèse du cholestérol, etc) (**Figure 4**). Enfin, chaque type cellulaire possède des fonctions qui leur sont propres. Ainsi, le RE possède une fonction correspondant aux besoins d'une cellule donnée à un instant « t ».

#### i. Protéostasie et réponse au stress du RE

L'homéostasie des protéines (ou **protéostasie**) est l'ensemble des mécanismes cellulaires permettant la synthèse (transcription et traduction), le repliement, le transport et la dégradation des protéines permettant le maintien avec fidélité du **protéome** (*Balch et al., 2008*). Comme décrit dans le paragraphe précédent, les protéines se trouvant dans le RE sont des protéines sécrétées ou membranaires. Or, 30% de la totalité des protéines retrouvées au sein des cellules eucaryotes sont des protéines appartenant à la voie de sécrétion (*Huh et al., 2003*). Ainsi le rôle du RE dans l'homéostasie protéique est essentiel (*Buchberger et al., 2010*).

Pour ce faire, le RE possède un environnement oxydatif, favorable à la synthèse et aux modifications post-traductionnelles (N-glycosylation, ponts disulfures, oligomérisation) des protéines. A l'aide du translocon Sec61, les protéines entrent dans le RE. Au sein du RE, ces protéines devront être correctement repliées pour atteindre leur conformation finale et adéquate. Afin d'éviter l'agrégation et le mauvais repliement des protéines néosynthétisées, la lumière du RE héberge de nombreuses **protéines chaperonnes** (Grp78 (Glucose-regulated protein 78 ou BIP : Binding Immunoglobulin Protein), calnexine, calréticuline, Grp94) ainsi que des **foldases**, mais aussi **des oxydoréductases**, ou encore des enzymes permettant la liaison à un glycan et de nombreux co-facteurs comme le  $Ca^{2+}$  (*van Anken and Braakman, 2005*). L'ensemble de ces caractéristiques font du RE un environnement favorable à la synthèse et au bon repliement des protéines (*Adams et al., 2019*).

Le RE possède donc un contrôle qualité protéique efficace afin i) d'éviter l'export prématuré de protéines dans des états de conformation intermédiaires ou incomplets dans l'appareil de Golgi (*Mezzacasa and Helenius, 2002*), ii) de prévenir la relocalisation d'une protéine mal repliée au niveau des autres compartiments cellulaires (*Zerangue et al., 1999*), iii) de réguler le transport et l'activation spécifique d'une protéine de manière post-traductionnelle (*Bichet et al., 2000*). Ainsi, tous ces mécanismes de contrôle qualité sont mis en place afin de mener à bien le

repliement protéique et l'acquisition de la conformation terminale de ces protéines (*Phillips et al., 2020*).

Une protéine clé du contrôle qualité des protéines au sein du RE est la protéine chaperonne **Grp78**, aussi nommée BIP. Chaperonne majoritaire au sein de la lumière du RE, la Grp78 a été décrite comme jouant un rôle dans le repliement, la translocation, la rétention des protéines dans le RE mais aussi dans la mise en place de la dégradation des protéines par le RE, nommée Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (**ERAD**) (*Hendershot, 2004 ; Pobre et al., 2019*).

Au cours d'un échappement à ces mécanismes de contrôle, les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE et exposent leurs régions hydrophobes. Ces régions sont reconnues par les protéines chaperonnes présentes dans le RE, prenant en charge ces protéines, pour les conformer correctement (*Simons et al., 1995 ; Behnke et al., 2016*). Ainsi les protéines acquérant leur conformation finale peuvent finir leur trajet à travers le RE jusqu'à leur destination finale (appareil de Golgi, membrane plasmique, matrice extracellulaire). En revanche, si cette correction échoue, les protéines non conformes sont dégradées par une des deux voies de dégradation dépendante du RE : le système ERAD ou l'autophagie dépendante du RE, nommée également la réticulophagie ou « RE-phagie » (*Chino and Mizushima, 2020*).

Le système ERAD consiste en une rétrotranslocation des protéines mal repliées en direction du cytosol. Au niveau du cytosol, ces protéines sont prises en charge par le système ubiquitine-protéasome, qui mène à leur dégradation (*Lippincott-Schwartz et al., 1988 ; McCracken and Brodsky, 1996*).

Comme décrit précédemment, l'autophagie consiste en un mécanisme de dégradation des macromolécules via la formation d'une vésicule fusionnant avec les lysosomes. La réticulophagie ou « RE-phagie » est un mécanisme autophagique spécifique du RE. Ce mécanisme permet de dégrader spécifiquement certains sous-domaines du RE, que ce soit la dégradation de certaines parties de sa lumière ou de sa membrane, via des mécanismes sélectifs. L'objectif de la réticulophagie est de se débarrasser des protéines mal repliées accumulées au sein de la lumière ou de la membrane du RE. Lors d'un stress, le RE subit une expansion membranaire. La réticulophagie permet aussi de réduire la taille du RE (*Bernales et al., 2006 ; Chino and Mizushima, 2020 ; Schuck et al., 2014 ; Smith et al., 2018*).

Environ 30% des protéines ne sont pas conformées correctement, représentant un risque protéotoxique important pour la cellule. Ces deux systèmes, que sont le système ERAD ou la réticulophagie, sont donc essentiels au maintien de l'homéostasie protéique et cellulaire.

Néanmoins, lorsque les capacités de réparation et de dégradation du RE sont dépassées, il en résulte une accumulation trop importante de protéines non conformes, aboutissant à l'induction d'une réponse adaptative nommée **la réponse UPR** pour **Unfolded Protein Response**. Cette réponse adaptative est également nommée « réponse au stress du réticulum endoplasmique ». La réponse UPR regroupe un réseau de voies de signalisation à visée adaptative, visant à contrecarrer le stress au sein du RE en synthétisant des protéines chaperonnes (diminution de la synthèse protéique) et des protéines du système ERAD (augmentation des processus de dégradation protéique) pour que la cellule survive. On parle d'**UPR adaptatif**. Cependant, si le stress devient chronique ou trop intense, ces voies conduisent à l'activation de l'apoptose de la cellule (*Ron and Walter, 2007 ; Schröder and Kaufman, 2005*). Ainsi, la réponse UPR pro-survie devient pro-apoptotique en conditions de stress intenses : on parlera d'**UPR terminale**. Cette réponse UPR sera détaillée dans le prochain paragraphe.

Des stress intracellulaires (perturbations de l'homéostasie calcique, modifications du potentiel redox) ou des stress extra-cellulaires (hyperlipidémie lors de l'obésité, l'exposition aux médicaments, virus) peuvent altérer l'homéostasie du RE, entraînant ainsi une accumulation de protéines mal repliées et l'activation de la réponse UPR.

Composés	Mécanismes d'action	Conséquences
<i>Tunicamycine</i>	Inhibition de la <b>N-glycosylation</b> des protéines	Accumulation de protéines mal conformées
<i>Thapsigargine</i>	Inhibition de la <b>pompe SERCA</b>	Diminution de la [Ca <sup>2+</sup> ] du RE
<i>Brefeldin A</i>	Inhibition du <b>transport RE – Golgi</b>	Défaut du transport des protéines
<i>Bortezomib</i>	Inhibition de l' <b>activité du protéasome</b>	Bloque l'ERAD, conduisant à l'accumulation de protéines mal appariées dans le RE

*Tableau 5 : Composés pharmacologiques activateurs du stress du RE.*

Au niveau expérimental, l'utilisation de différentes molécules pharmacologiques dédiées permet d'induire spécifiquement l'activation des voies de l'UPR par des mécanismes distincts.

En effet, ces composés touchent différents mécanismes essentiels au bon fonctionnement du RE (tels que l'homéostasie calcique ou encore la N-glycosylation) et aboutissent tous à une activation de l'UPR (*Table 5*).

*a. Unfolded Protein Response, la réponse au stress du RE*

*Définition.*

La surveillance de la protéostasie du RE est réalisée par la réponse UPR, un réseau de voies de signalisation moléculaire percevant les défauts associés à la biogénèse des protéines au sein du RE. La réponse UPR est une réponse adaptative, qui vise à rétablir l'homéostasie protéique en limitant la synthèse globale des protéines, et ainsi diminuer l'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE. Par conséquent, la réponse UPR conduit en première ligne à l'atténuation de la traduction des protéines pour limiter la synthèse protéique et l'accumulation de nouvelles protéines au sein du RE. En parallèle, une synthèse préférentielle de protéines chaperonnes et foldases intervient alors pour aider au repliement des protéines, ainsi qu'une augmentation du volume du RE due à l'expansion de sa membrane (augmentation de la synthèse des lipides) pour permettre la mise en place de nouveaux systèmes de repliement des protéines. Cette réponse UPR induit donc une **reprogrammation transcriptionnelle** importante de la cellule pour rétablir l'homéostasie au sein du RE.

La réponse au stress du RE est médiée, au niveau moléculaire, par trois protéines transmembranaires senseurs du stress du RE, localisées au sein de la membrane du RE : **IRE1 $\alpha$**  (Inositol Requiring Enzyme 1 alpha), **PERK** (PKR-like endoplasmic reticulum kinase) et **ATF6** (Activating Transcription Factor 6). IRE1 $\alpha$  a été découverte en premier chez la levure. Cette protéine est la plus conservée dans l'évolution, retrouvée de la levure jusqu'à l'Homme. En revanche, les protéines PERK et ATF6 sont trouvées uniquement chez les métazoaires.

Ces trois protéines possèdent un domaine dans la lumière du RE, leur permettant de détecter les protéines mal repliées, un domaine transmembranaire et un domaine cytosolique, transduisant le signal en réponse à un stress. De manière intéressante, chaque senseur présente sa propre sensibilité aux différentes sources du stress du RE et ainsi, répondent différemment selon le stress. Par exemple, dans des conditions de stress dues à une perturbation de l'homéostasie calcique, PERK et IRE1 $\alpha$  s'activeront très rapidement et ATF6 plus tardivement. En revanche, ATF6 répond davantage à des stress associés à la surcharge en protéines du RE ou encore à des défauts de glycosylation. D'ailleurs, en fonction du stress responsable de la réponse UPR, la

cinétique d'activation des différents acteurs change et est également type cellulaire spécifique (*Credle et al., 2005 ; DuRose et al., 2006 ; Yoshida et al., 2003*).

Dans les conditions physiologiques, ces trois senseurs sont maintenus dans un état inactif, sous forme monomérique, par leur interaction directe avec la **protéine chaperonne Grp78**. Dans des conditions de stress intracellulaires ou environnementaux entraînant une accumulation de protéines mal conformées, **il existe trois modèles hypothétiques expliquant la reconnaissance des protéines mal repliées par les différents médiateurs de la réponse UPR.**

- Le premier modèle est la **régulation négative de l'UPR par la chaperonne Grp78**. Lors d'un stress du RE, la Grp78 se dissocie des trois protéines senseurs. Cette dissociation s'effectue au profit des protéines mal appariées puisque la Grp78 présente une plus forte affinité pour les protéines non conformes. Cette dissociation permet l'activation de la réponse UPR, à visée adaptative (*Bertolotti et al., 2000 ; Kimata et al., 2004 ; Vitale et al., 2019*).
- Le deuxième modèle est le **modèle d'association directe**. Chez la levure, IRE1 est décrit comme pouvant être directement activé par les protéines mal repliées. Cette interaction directe permet l'oligomérisation et la transduction du signal cytoplasmique, et ainsi la réponse UPR (*Credle et al., 2005 ; Gardner and Walter, 2011*). Dans ce modèle, la Grp78 n'est pas un senseur du stress du RE mais un modulateur de la réponse au stress du RE. La Grp78 joue un rôle dans la séquestration des monomères des différents senseurs de l'UPR. Lors d'une accumulation de protéines mal repliées dans le RE, la Grp78 permet ainsi d'intégrer la réponse UPR et de s'assurer que cette réponse n'est pas trop intense en fonction du stress induit. Dans ce modèle, l'interaction de la Grp78 avec les différents senseurs permet d'atténuer et de contrôler les niveaux d'activation de chacun des senseurs.
- Le dernier modèle est un **mécanisme hybride**. Ce mécanisme propose que la Grp78 se dissocie des trois senseurs et que les protéines mal conformées interagissent directement avec les senseurs de l'UPR. Ainsi, dans ce modèle, la Grp78 est un régulateur de l'activation et la désactivation des senseurs (*Pincus et al., 2010*).



*In fine*, l'activation des trois senseurs de l'UPR conduit à la mobilisation de leurs facteurs de transcriptions respectifs : sXBP1 pour IRE1 $\alpha$ , ATF4 pour PERK et ATF6 clivé pour ATF6, impliqués dans la reprogrammation transcriptionnelle de la cellule à visée adaptative. Ces trois voies seront détaillées dans les sections suivantes (**Figure 5**).

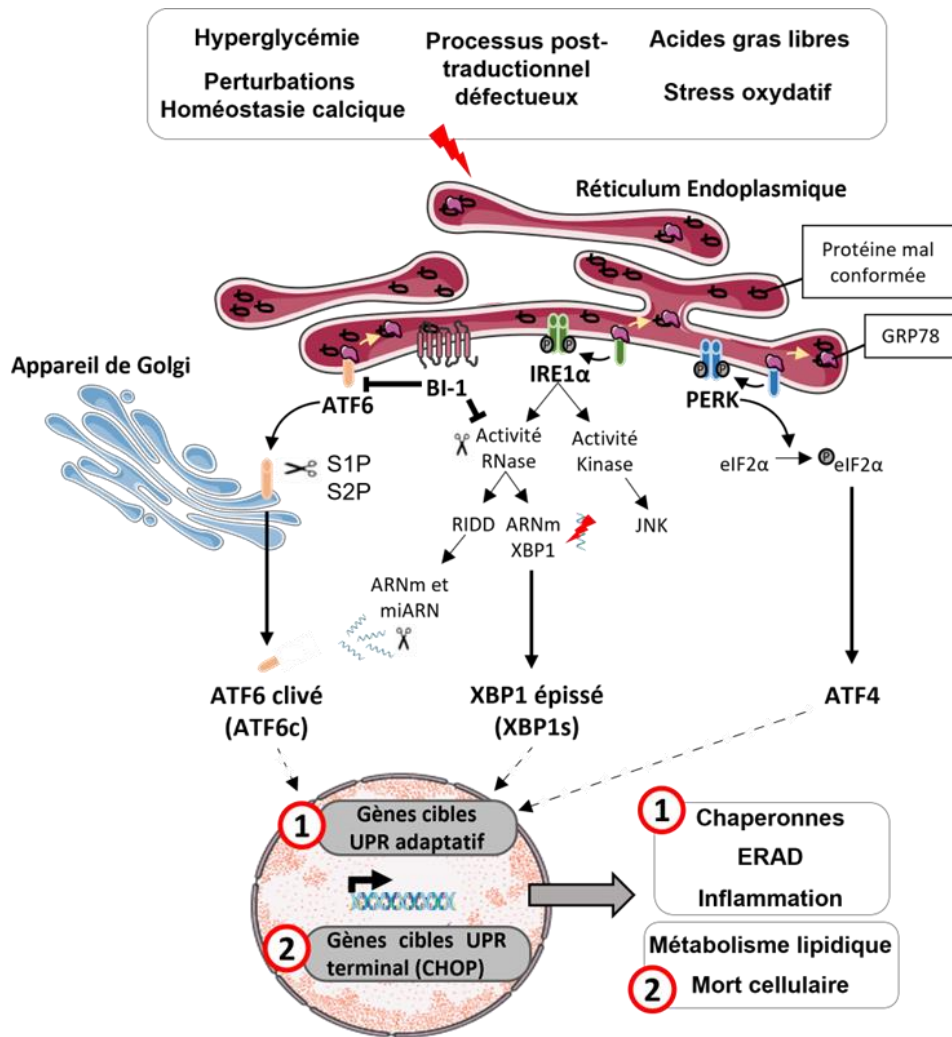
Cependant, si le stress devient chronique ou intense, alors ces trois voies enclenchent la mort de la cellule par apoptose. Les trois voies (PERK, ATF6, IRE1 $\alpha$ ) augmentent alors l'expression de CHOP (C/EBP homologous protein), un facteur de transcription pro-apoptotique, via leurs facteurs de transcription respectifs (ATF4, ATF6c, sXBP1). La surexpression de CHOP suffit pour induire l'apoptose de la cellule. En se liant à leur promoteur, CHOP permet également l'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3-only proteins (PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1) et BIM) et la diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-XL.

Le RE peut également induire l'apoptose via d'autres mécanismes. A la suite d'un stress du RE, un flux massif de Ca<sup>2+</sup> de la lumière du RE vers la mitochondrie via les MAMs (Mitochondria-Associated Membranes) engendre une modification de son potentiel membranaire, enclenche la MOMP, la libération de cytochrome C et l'activation de la caspase -9, puis des caspases -3, -6 et -7. Il est ainsi établi que la voie mitochondriale de l'apoptose peut amplifier en aval la voie de l'apoptose induite au niveau du RE (**Figure 6**).

De plus, les protéines pro- (Bax et Bak) et anti-apoptotiques (Bcl2 et Bcl-XL), qui jouent un rôle dans l'apoptose mitochondriale, possèdent également un rôle crucial dans la régulation de la mort cellulaire induite par le stress du RE. En effet, les membres de la famille Bcl2 sont capables i) de réguler la concentration calcique au sein même du RE par leur liaison à IP3R (Inositol 3 Phosphate Receptor) et à RyR (Ryanodine Receptor) ; ii) de se lier physiquement aux senseurs de l'UPR régulant alors leur activité. Ces mécanismes sont détaillés plus bas dans le manuscrit.

La réponse UPR et ses dysfonctionnements sont associés au développement de nombreuses pathologies : les maladies inflammatoires, neurodégénératives et les cancers. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués fait l'objet d'une recherche intensive (*Oakes and Papa, 2015*).





**Figure 5 :** Signalisation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (Unfolded Protein Reponse ou UPR).

De nombreux facteurs extracellulaires et intracellulaires conduisent à l'activation de l'UPR. La réponse UPR est médiée par 3 protéines transmembranaires du RE : ATF6, IRE1 $\alpha$  et PERK. La Grp78 maintient inactifs ces protéines senseurs, via une interaction directe. En cas de stress du RE, la Grp78, possédant une plus forte affinité pour les protéines mal repliées, se dissocie des senseurs de l'UPR. Ainsi, les trois senseurs sont libres. ATF6 migre dans l'appareil de Golgi où il est clivé, produisant un facteur de transcription nommé ATF6 clivé. PERK dimérise et phosphoryle eIF2 $\alpha$ , bloquant la traduction des protéines et favorisant la traduction du facteur de transcription ATF4. IRE1 $\alpha$  dimérise et s'autophosphoryle, engendrant un changement de conformation. Ce changement de conformation active son activité RNase et permet l'épissage de l'ARNm de XBP1, aboutissant à la traduction d'un facteur de transcription nommé XBP1 épissé ou « spliced XBP1 », sXBP1. Ces trois protéines augmentent l'expression du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP.

Ces trois signalisations augmentent la clairance du RE, en augmentant l'expression de protéines chaperonnes et de l'ERAD, pour rétablir l'homéostasie cellulaire. Si ces voies moléculaires échouent, l'UPR mène alors à la mort de la cellule par apoptose. Adapté de « La réponse au stress du réticulum endoplasmique dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie » Déborah Vallée, Marina Blanc, Cynthia Lebeaupin et Béatrice Bailly-Maitre. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 119-129.

### *b. ATF6*

ATF6 est une protéine transmembranaire de type II, codée par le gène *ATF6A* localisé sur le chromosome 1. Ce gène possède 17 exons. ATF6 présente un site de liaison à l'ADN : un domaine **bZIP** (Basic Leucine Zipper Domain). Lors d'un stress du RE, la Grp78 se dissocie d'ATF6. ATF6 est ensuite relocalisée au sein de l'appareil de Golgi à l'aide de vésicules (Schindler and Schekman, 2009). Au sein de cet organe, ATF6 est clivée successivement par les protéases résidentes du Golgi **S1P et S2P (Site Protease 1 et 2, respectivement)**, résultant en un facteur de transcription cytosolique qui migre dans le noyau pour réguler l'expression des gènes de l'UPR adaptatif. Le domaine luminal est clivé en première ligne puis le domaine transmembranaire (Haze et al., 1999 ; Ye et al., 2000). La partie cytosolique ATF6 clivée (**ATF6c**) est alors relocalisée dans le noyau pour activer les gènes de la réponse UPR. Parmi les gènes régulés, ATF6c augmente l'expression de gènes impliqués dans le repliement des protéines et l'ERAD. Également, ATF6c régule l'expression de XBP1, et ainsi dialogue avec la voie de signalisation dépendante d'IRE1 $\alpha$  (Yoshida et al., 2001).

D'une façon générale, ATF6c active les gènes codant pour les protéines du contrôle qualité du RE, les chaperonnes et des protéines impliquées dans l'augmentation du volume du RE (Adachi et al., 2008 ; Bommiasamy et al., 2009). Enfin, ATF6c peut *in fine* activer la transcription de CHOP pour induire l'apoptose lors d'un stress soutenu.

Ainsi, les souris déficientes pour ATF6 présentent une hypersensibilité à un stress du RE aigu et chronique, comme les souris PERK déficientes.

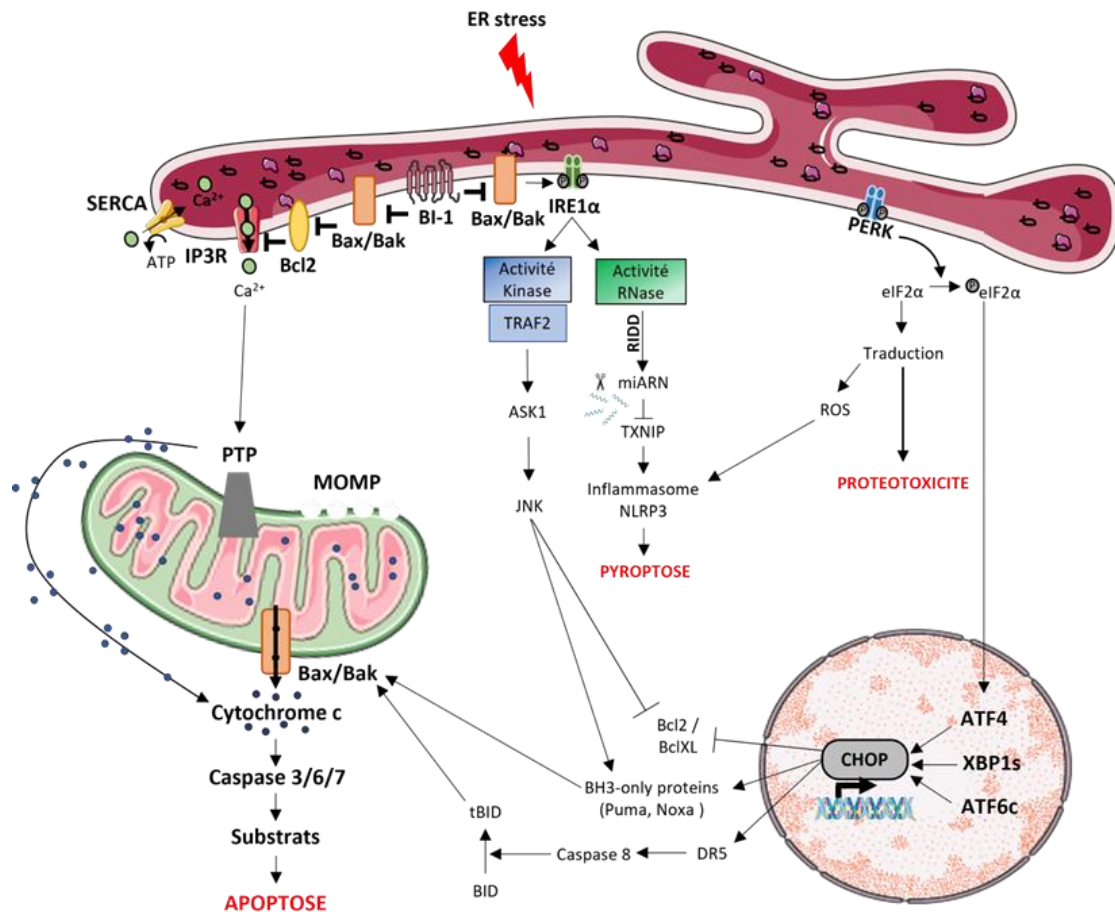


Figure 6 : Mécanisme de mort dépendant du stress du réticulum endoplasmique.

Le stress du RE active la réponse UPR (Unfolded Protein Response), médiée par trois protéines transmembranaires : PERK (PKR Endoplasmic Reticulum Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6) et IRE1 $\alpha$  (Inositol Requiring Enzyme 1 alpha). Ces trois protéines activent leur facteur de transcription respectif soit ATF4 (Activating Transcription Factor 4), ATF6clivé et XBP1 (X-box Binding Protein 1). Ces facteurs de transcription activent le facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP Homologous Protein). CHOP augmente notamment l'expression d'autres protéines pro-apoptotiques, les BH3-only protéines, comme PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) et Noxa (Phorbol-1 $\epsilon$ -Myristate-13-Acetate-induced protein 1), BIM (Bcl-2-like protein 11) et diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 (B-cell Lymphoma 2) et Bcl-XL (B-cell Lymphoma-extra large).

Le RE peut aussi conduire à l'apoptose via la libération massive de Ca<sup>2+</sup> au niveau des MAM vers la mitochondrie. Cet afflux massif de Ca<sup>2+</sup> dans la mitochondrie engendre une modification du potentiel membranaire de la mitochondrie, ce qui engendre la libération de cytochrome c, l'activation de la caspase -9 et ensuite des caspases -3, -6 et -7, responsables de l'induction de l'apoptose.

Adapté de « La réponse au stress du réticulum endoplasmique dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie » Déborah Vallée, Marina Blanc, Cynthia Lebeauvin et Béatrice Bailly-Maitre. *Med Sci (Paris)* 2020 ; 36 : 119-129.

### c. PERK

PERK est une protéine transmembranaire de type I, codée par le gène *EIF2AK3* localisé sur le chromosome 2 et possédant 21 exons. PERK possède un domaine senseur de stress, en « N-terminal » dans la lumière du RE et un domaine sérine/thréonine kinase, en « C-terminal », dans le cytosol. Lors d'un stress du RE, la dissociation de la Grp78 permet l'oligomérisation de PERK et son autophosphorylation en trans, induisant son activation. PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction **eIF2 $\alpha$**  (eukaryotic Translation Initiation Factor 2) sur sa sérine 51 (*Donnelly et al., 2013*). La phosphorylation de eIF2 $\alpha$  empêche l'assemblage des ribosomes 80S, aboutissant ainsi à l'arrêt de la traduction des ARNm. En revanche, la traduction de certains ARNm, possédant un IRES (Internal Ribosomal Entry Site) ou un petit uORF (upstream Open Reading Frame) dans leur région 5'UTR (5' Untranslated Region), est augmentée, lorsque le taux d'eIF2 est bas. Parmi ces ARNm traduits, on trouve l'ARNm codant pour ATF4 (Activating Transcription Factor 4). Ces ARNm spécifiquement traduits codent pour des protéines chaperonnes et foldases permettant le bon repliement des protéines ou pour la voie de l'ERAD, afin de réduire l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Lorsque ces processus échouent à rétablir l'homéostasie du RE, l'UPR induit la mort cellulaire par apoptose.

ATF4 est un facteur de transcription, activant des gènes cibles de l'UPR « adaptatif », essentiels au repliement des protéines (gènes codant les chaperonnes), à l'élimination des protéines (gènes codant pour l'ERAD et pour la machinerie de l'autophagie), au maintien de l'homéostasie redox et au métabolisme des acides aminés.

PERK permet également de résister au stress oxydatif associé à l'activation des voies de l'UPR. PERK induit une réponse antioxydante, via la phosphorylation du facteur de transcription NRF2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2). Phosphorylé, **NRF2** se dissocie de **KEAP1** (Kelch-like ECH-associated protein1) et ainsi, permettra l'expression de gènes associés à une réponse antioxydante notamment le maintien du glutathion permettant de favoriser la survie (*Cullinan et al., 2003 ; Cullinan and Diehl, 2006 ; Sarcinelli et al., 2020*). ATF4 favorise l'expression du facteur de transcription CHOP ou GADD153 (Growth Arrest and DNA Damage inducible 153) (*Averous et al., 2004*). ATF4 et CHOP peuvent former des hétérodimères pour réguler l'expression de gènes impliqués dans la voie du stress oxydatif et de la mort cellulaire (*Ameri and Harris, 2008 ; Han et al., 2013*). Si l'homéostasie du RE est rétablie, cet hétérodimère conduit à la transcription de **GADD34**, une protéine activatrice de la protéine **phosphatase 1** (PP1), qui déphosphoryle eIF2 $\alpha$ , permettant la ré-initiation de la traduction

globale des ARNm (*Ma and Hendershot, 2003*). La phosphatase CreP peut aussi déphosphoryler eIF2 $\alpha$  (*Jousse et al., 2003 ; Novoa et al., 2003*).

En revanche, si le stress du RE est trop intense ou prolongé, CHOP induit alors la mort de la cellule. La surexpression de CHOP est suffisante pour induire l'apoptose au sein de la cellule (*Chan et al., 2015*). CHOP inhibe l'expression de Bcl-2 et/ou induit l'expression de gènes pro-apoptotiques, tels que ceux codant pour les protéines DR5, BIM ou PUMA pour induire l'apoptose. CHOP est un marqueur terminal de l'apoptose induite par la voie de la réponse UPR, et plus particulièrement de PERK.

De façon remarquable, les domaines endoluminaux d'IRE1 $\alpha$  et de PERK capables de percevoir le stress dans la lumière du RE sont extrêmement similaires (structure et fonction) et sont interchangeables dans les modèles d'études *in vitro* (*Liu et al., 2000*).

Enfin, les souris transgéniques déficientes pour PERK présentent une hypersensibilité et une survie réduite lorsqu'elles sont exposées à un stress du RE (*Harding et al, 2001*), ce qui démontre bien l'importance de PERK dans la réponse adaptative au stress du RE.

#### d. IRE1 $\alpha$

IRE1 est la première protéine senseur de l'UPR à avoir été identifiée. Premièrement découvert chez la levure, IRE1 est la branche de l'UPR la plus conservée au cours de l'évolution, par sa présence chez tous les eucaryotes, de la levure aux mammifères (*Nikawa and Yamashita, 1992*).

Il existe deux isoformes d'IRE1 chez les mammifères : IRE1 $\alpha$  et  $\beta$ , respectivement codées par *ERN1* et *ERN2* (Endoplasmic Reticulum to Nucleus signalling). IRE1 $\beta$  est spécifique de l'épithélium digestif tandis qu'IRE1 $\alpha$  est ubiquitaire chez les mammifères.

IRE1 $\alpha$  est une protéine transmembranaire de type I de 110 kDa, localisée dans la membrane du RE à l'aide d'un peptide signal spécifique du RE. Le gène codant pour IRE1 $\alpha$ , *ERN1*, se trouve sur le chromosome 17 et présente 22 exons. IRE1 $\alpha$  se trouve préférentiellement localisée à proximité de la membrane nucléaire, au sein du RE, bien qu'une sous-population d'IRE1 $\alpha$  soit retrouvée au sein de la membrane nucléaire. IRE1 $\alpha$  possède un domaine luminal en « N-terminal » (de l'acide aminé 24 à 390), transmembranaire (de l'acide aminé 444 à 464) et un domaine cytosolique en « C-terminal » composé d'un domaine sérine/thréonine kinase (de l'acide aminé 571 à 832) et d'un domaine endoribonucléase (RNase, de l'acide aminé 832 à 963), reliés au domaine transmembranaire par un domaine dit « linker » (*Sidrauski and Walter,*

1997 ; Tirasophon et al., 1998). En condition physiologique, IRE1 $\alpha$  est maintenu dans un état inactif, sous forme de monomère, par la Grp78. Lors d'un stress du RE, la Grp78 se dissocie, libérant ainsi IRE1 $\alpha$  et cette dernière s'oligomérisse (*Kopp et al., 2018*). Cette oligomérisation permet son autophosphorylation en trans et ainsi l'exposition de son domaine RNase (*Shamu and Walter, 1996*).

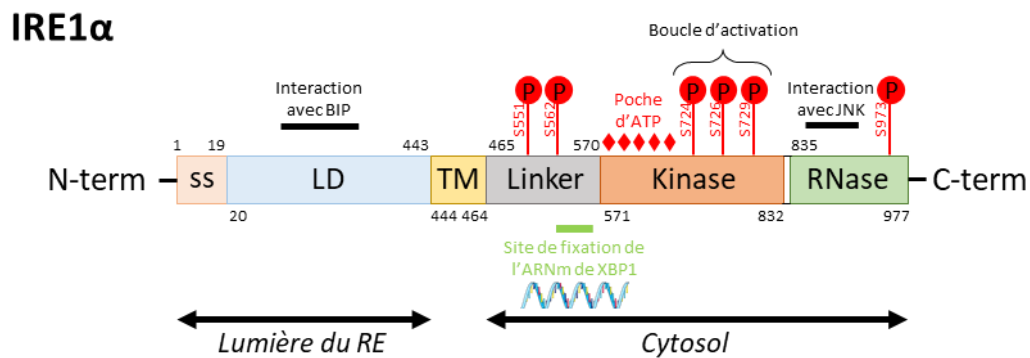
La dissociation de la Grp78 d'IRE1 $\alpha$  n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'activation d'IRE1 $\alpha$ . Plusieurs études rapportent qu'IRE1 $\alpha$  peut être activée directement par les protéines mal repliées mais aussi par la composition membranaire du RE (*Halbleib et al., 2017 ; Volmer et al., 2013*).

La liaison à une molécule d'ATP par son activité kinase conduit à un changement conformationnel permettant l'activation du domaine RNase. Sa double activité enzymatique rend IRE1 $\alpha$  unique. Notons ici que l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$  est un prérequis pour son activité RNase. D'ailleurs, IRE1 $\alpha$  possède trois zones de phosphorylation dans ses différents domaines. Le domaine linker d'IRE1 $\alpha$  présente deux sites de phosphorylation (Sérines 551 et 562), le domaine kinase en présentent trois (Sérines 724, 726 et 729) et enfin le domaine RNase n'en possède qu'un (Thréonine 973) (*Prischi et al., 2014*). Ce sont les phosphorylations sur les sérines 724 et 726 qui sont essentielles à l'activation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Les autres sites de phosphorylation ne semblent avoir aucun effet sur les différentes activités enzymatiques d'IRE1 $\alpha$ , ni sur sa dimérisation ou encore son oligomérisation (**Figure 7**).

L'activité RNase de IRE1 $\alpha$  effectue l'épissage non conventionnel de l'ARNm codant pour XBP1 et la dégradation d'ARNm et de microARN via un mécanisme appelé le **RIDD** (Regulated IRE1-Dependant Decay) (*Hollien et al., 2009 ; Maurel et al., 2014*). L'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  recrute la ligase tRNA RTCB (RNA terminal phosphate cyclase B) afin d'épisser l'ARNm de XBP1 (*Jurkin et al., 2014*). Par l'excision d'un intron de l'ARNm de XBP1 en forme de structure tige boucle, l'épissage de l'ARNm de XBP1 aboutit à la délétion de 26 nucléotides, décalant ainsi le cadre de lecture. Ce décalage aboutit à la production d'un facteur de transcription stable et actif, nommé XBP1 « splicé » (sXBP1) (*Calfon et al., 2002 ; Oikawa et al., 2010*). sXBP1 est un facteur de transcription de la famille ATF/CREB, possédant un domaine bZIP, qui lui permet de se fixer sur les séquences ERSE (ER Stress-Response Element) (*Clauss et al., 1996 ; Yamamoto et al., 2004*). Les gènes cibles de sXBP1 codent pour des protéines du système de dégradation ERAD, du repliement des protéines (Grp78), de la fonction sécrétrice, de la synthèse des lipides mais aussi dans l'homéostasie glucidique



permettant de rétablir l'homéostasie au sein du RE et de la cellule (Lee et al., 2003 ; Park et al., 2021 ; Piperi et al., 2016). De plus, sXBP1 joue un rôle important dans le développement de différents types cellulaires, dont les cellules acinaires et les cellules  $\beta$  pancréatiques (A.-H. Lee et al., 2011 ; Lee et al., 2005).



**Figure 7** : Structure de IRE1 $\alpha$  et ses différents domaines.

ss : séquence signal, LD : domaine luminal, TM : domaine transmembranaire, Kinase : domaine Sérine/Thréonine kinase, RNase : domaine endoribonucléase. Les ronds rouges avec le P symbolisent les sites de phosphorylation avec les résidus phosphorylés et les losanges rouges symbolisent les sites de liaison à l'ATP.

La protéine non épissée de XBP1, nommée uXBP1 pour XBP1 « unspliced » (non épissée) est exprimée continuellement mais est très instable, rapidement dégradée par le protéasome. La forme non épissée de XBP1 peut se fixer sur la forme épissée de XBP1, menant ainsi ce complexe protéique à la dégradation, par le protéasome. La fonction biologique de la forme non épissée de XBP1 reste à caractériser (Luo et al., 2022 ; Yoshida et al., 2006).

Chez la levure, IRE1 ne présente qu'une activité RNase permettant l'épissage non-conventionnel de XBP1. En revanche, chez les métazoaires, l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  est caractérisée aussi par le RIDD. De manière intéressante, la différence fonctionnelle entre IRE1 $\alpha$  et IRE1 $\beta$  se trouve dans leur capacité à épisser XBP1 et à dégrader des ARNm et des microARN. IRE1 $\alpha$  présente une meilleure activité d'épissage de XBP1 tandis que IRE1 $\beta$  possède une activité RIDD plus importante (Imagawa et al., 2008).

Contrairement à XBP1, qui n'est épissé que dans des conditions de stress du RE, le RIDD est essentiel pour le maintien de l'homéostasie du RE en condition physiologique (Lipson et al.,

2006). De plus, le RIDD permet la dégradation de l'ARNm d'IRE1 $\alpha$ , permettant un rétrocontrôle négatif sur sa propre expression (*Tirasophon et al., 2000*). Par la dégradation des ARNm, le RIDD d'IRE1 $\alpha$  bloque la synthèse protéique et ainsi, empêche l'encombrement du RE par les nouvelles futures protéines. Les ARNm sont reconnus par le RIDD via la présence de sites de clivage apparentés à XBP1 (XBP1-like) (*Maurel et al., 2014*). L'activation soutenue du RIDD enclenche l'apoptose de la cellule, nommée le « prodeath RIDD » pour « RIDD pro-mort ». Par exemple, le RIDD dégrade des microARNs (miARN) qui inhibent la traduction de l'ARN messager (ARNm) de la Caspase-2, conduisant à l'apoptose (*Upton et al., 2012*).

La voie de signalisation de IRE1 $\alpha$  sert aussi de plateforme protéique. Effectivement, la forme active d'IRE1 $\alpha$  lie la protéine TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2). Le recrutement de TRAF2 permet la formation d'un complexe protéique recrutant d'autres protéines, telles que ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1). En effet, le recrutement de TRAF2 permet l'activation de ASK1, par phosphorylation, et sa signalisation. ASK1 phosphoryle à son tour la protéine JNK, impliquée dans l'apoptose et l'inflammation (*Urano et al., 2000*). L'activation de JNK induit aussi de l'insulino-résistance périphérique. Le récepteur de l'insuline est une tyrosine kinase activant une voie de signalisation dépendante de phosphorylation sur tyrosine, dont les IRS. La protéine JNK est une sérine/thréonine kinase. La phosphorylation des IRS par la protéine JNK court-circuite la signalisation du récepteur à l'insuline en périphérie (*Flamment et al., 2012*). De plus, TRAF2 recrute et phosphoryle I $\kappa$ B, l'inhibiteur de NF $\kappa$ B. La phosphorylation d'I $\kappa$ B libère les deux sous-unités (p50 et p65) du facteur de transcription NF $\kappa$ B, lui permettant de transloquer dans le noyau et augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (IL-6, TNF $\alpha$ , etc).

Le rôle d'IRE1 $\alpha$  en tant que plateforme protéique a initié l'idée d'UPRosome (*Urria et al., 2020*). La découverte de ces nombreuses protéines interagissant avec IRE1 $\alpha$  a mis en évidence l'importance de la dynamique d'interactions et la formation d'une plateforme protéique via l'oligomérisation d'IRE1 $\alpha$ , au sein du RE (*Belyy et al., 2020*). En réponse à un stress du RE, la formation dynamique d'oligomères d'IRE1 $\alpha$  permet ainsi de réguler plus finement sa signalisation (*Belyy et al., 2022*). En fonction des protéines qui interagissent avec IRE1 $\alpha$ , sa dynamique d'activation et d'inactivation est régulée ainsi que l'intensité de ces activités enzymatiques. De plus, le recrutement de ces différentes protéines au niveau du RE permet de mettre en évidence un rôle non-canonique d'IRE1 $\alpha$  dans des processus moléculaires très variés, allant de la régulation de l'autophagie, de la migration cellulaire, ou encore dans l'homéostasie calcique (*Carreras-Sureda et al., 2019 ; Castillo et al., 2011 ; Urria et al., 2018*).



L'implication de IRE1 $\alpha$  dans l'apoptose dépend de son interaction avec les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. En effet, Bax et Bak peuvent interagir avec la partie « C-terminale » de IRE1 $\alpha$ , contribuant à la signalisation pro-apoptotique dépendante d'IRE1 $\alpha$ . D'abord pro-survie, cette interaction avec les protéines pro-apoptotiques fait basculer IRE1 $\alpha$  dans des mécanismes pro-apoptotiques. Néanmoins, Bax Inhibitor 1 (BI-1), l'inhibiteur endogène de l'activité RNase de IRE1 $\alpha$ , fait compétition avec Bax et Bak au niveau du domaine « C-terminale » de IRE1 $\alpha$ . Via son rôle anti-apoptotique, BI-1 régule la signalisation de IRE1 $\alpha$ . Le tandem IRE1 $\alpha$  – BI-1 sera décrit ultérieurement.

La délétion génique d'*ERN1* est létale à des stades précoces de l'embryon (entre 9,5 à 11,5 jours de gestation), mettant l'accent sur son rôle essentiel dans la survie et le développement (*Zhang et al., 2005*). Une étude démontre que la létalité de la délétion d'*ERN1* est due à une perte de la vascularisation du placenta au cours des stades embryonnaires. Effectivement, cette étude met en avant le rôle essentiel de IRE1 $\alpha$  dans l'augmentation de l'expression du VEGF-A et ainsi dans la vascularisation du placenta à des stades précoces de l'embryogenèse (*Iwawaki et al., 2009*).

D'ailleurs, la délétion génique de *XBPI* est aussi létale à des stades embryonnaires (de 12,5 à 14,5 jours de gestation). La létalité dans les souris *XBPI* déficientes à des stades embryonnaires est due à des défauts hépatiques (hypoplasie hépatique accompagnée d'une augmentation de l'apoptose au niveau du foie embryonnaire) (*Reimold et al., 2000*).

Pour résumer, grâce à leur signalisation respective, ces trois protéines senseurs de l'UPR - IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6 - conduisent à l'activation des facteurs de transcription spécifiques de chacune de ces branches, respectivement sXBPI, ATF4 et ATF6f, essentiels à une réponse coordonnée et dynamique afin de réguler l'homéostasie cellulaire. En cas d'échec, ces voies finissent par aboutir à l'apoptose de la cellule, via CHOP.

## ii. Homéostasie calcique

Le RE est l'organelle de réserve calcique dans la cellule (*Berridge, 2002*). Le calcium (Ca<sup>2+</sup>) est un second messenger dont la disponibilité intracellulaire doit être finement régulée. Effectivement, la concentration calcique, au sein du cytoplasme, est de l'ordre de 10 à 100 nM. En revanche, au sein du RE, sa concentration est de 0,3 à 0,5 mM, soit entre 3000 à 5000 fois

plus élevée que dans le cytoplasme. Le maintien d'une concentration calique basse dans le cytosol permet d'éviter l'activation de signalisation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , comme l'apoptose. (Clapham, 2007). De plus, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE est essentielle pour assurer la fonction optimale des protéines chaperonnes dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  et ainsi réguler les processus de modifications post-traductionnelles, de repliement et d'export des protéines. Une dérégulation de l'homéostasie calcique conduit donc à une accumulation de protéines mal repliées et ainsi, amène à l'activation de la voie UPR (Krebs et al., 2015).

Pour réguler l'entrée et la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE, des canaux et des pompes calciques se trouvent à la surface du RE afin de maintenir le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'état d'équilibre (Carreras-Sureda et al., 2018). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE s'effectue contre son gradient de concentration à l'aide de la pompe **SERCA**, qui permet le transport actif de  $\text{Ca}^{2+}$ , via l'hydrolyse d'ATP, du cytosol vers le RE pour son stockage. La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol est régulée finement par le récepteur **IP3R** (Inositol Triphosphate Receptor) et le récepteur à la ryanodine (**RyR**).

Lors d'un stress, la libération excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol pourrait donc être toxique pour la cellule. Afin d'éviter une trop forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, le RE fait des interconnexions avec d'autres organelles, comme la mitochondrie qui peut faire office de tampon. Premièrement décrit par le Dr Copeland et Dalton, les points de contacts entre le RE et la mitochondrie se nomment MAM pour Mitochondria-Associated Membranes (Copeland and Dalton, 1959). Ces MAM possèdent de nombreuses caractéristiques. En effet, les MAM permettent l'échange de lipides et de  $\text{Ca}^{2+}$  entre les deux organelles. De plus, les MAM sont impliqués dans la fusion et la fission mitochondriale mais aussi dans le stress du RE, l'apoptose et l'autophagie. La présence de transporteurs du  $\text{Ca}^{2+}$  au sein des MAM permet de faciliter la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE en direction de la matrice mitochondriale. En effet, au sein des points de connexions entre la mitochondrie et le RE, on retrouve le récepteur IP3R sur la membrane du RE et VDAC (Voltage Dependant Anion Channel) au niveau de la membrane de la mitochondrie. L'interaction de ces deux protéines facilite l'échange du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE en direction de la mitochondrie. En revanche, si la mitochondrie n'arrive plus à tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RE, cela engendre l'activation de l'apoptose par une modification du potentiel membranaire de la mitochondrie et de la libération de cytochrome C.

Des acteurs de l'UPR ont été retrouvés au sein de ces points de contact. En effet, la littérature décrit la présence de PERK au niveau des sites de contact entre le RE et la mitochondrie. La délétion de PERK conduit à une perte des connexions RE-mitochondrie. Dans ce papier, PERK

est décrit comme un acteur de la formation des MAM et permettant ainsi la transmission d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) du RE en direction de la mitochondrie. Dans ce contexte, PERK permet l'induction d'une mort par apoptose dépendante du stress oxydant du RE à la mitochondrie via les MAM (Verfaillie et al., 2012). De plus, IRE1 $\alpha$  est aussi retrouvé au sein des MAM (Carreras-Sureda et al., 2019). Maintenu au sein des MAM par Sigma1R, une protéine chaperonne du RE, cette interaction entre IRE1 $\alpha$  et Sigma1R permet une activation plus longue de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  afin de corriger l'accumulation de ROS mitochondriaux (Mori et al., 2013).

### iii. Homéostasie lipidique

La synthèse lipidique et l'homéostasie lipidique dépendent en partie du RE lisse. Effectivement, la synthèse des phospholipides membranaires s'effectue dans le feuillet cytoplasmique du RE, à partir de précurseurs hydrosolubles, via **la voie Kennedy**. Grâce à sa structure dynamique et réticulée, le RE possède des sites de contacts avec d'autres organelles. Ainsi, ces phospholipides néosynthétisés permettent l'expansion des membranes de la cellule et ces lipides sont distribués aux autres membranes, via juxtaposition des membranes de deux organelles ou via un transfert assuré par des protéines spécifiques.

De plus, le RE est impliqué dans la **synthèse du cholestérol**. Outre son implication dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires en permettant leur fluidification et leur intégrité. De plus, le cholestérol est impliqué dans la formation des « rafts lipidiques » connus pour être des régions de la membrane lipidique riche en cholestérol et sphingolipides, permettant un recrutement de protéines au sein de ces régions membranaires et cela améliore la transduction du signal protéique (Simons and Toomre, 2000). La synthèse du cholestérol requiert plus de 20 enzymes. L'expression des protéines impliquées dans la synthèse du cholestérol dépend d'un facteur de transcription nommé SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein). SREBP est localisée au sein de la membrane du RE. En cas de besoin en cholestérol, la protéine SREBP migre dans l'appareil de Golgi à l'aide de la protéine SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein), où la liaison entre ces deux protéines est clivée par S1P et S2P (Shao and Espenshade, 2014). Ainsi SREBP migre dans le noyau afin d'augmenter l'expression de gènes associés à l'entrée ou à la synthèse du cholestérol (LDLR, Low-Density Lipoprotein Receptor ou encore FASN, Fatty Acid Synthase). La concentration élevée de cholestérol dans la membrane du RE engendre un changement conformationnel de la protéine SCAP. Ce changement conformationnel permet une interaction

entre SCAP et Insig 1 et 2 (Insulin Induced gene), ce qui maintient le complexe SCAP et SREBP au sein de la membrane du RE.

## B. Bax Inhibitor 1

### i. Structure et fonction

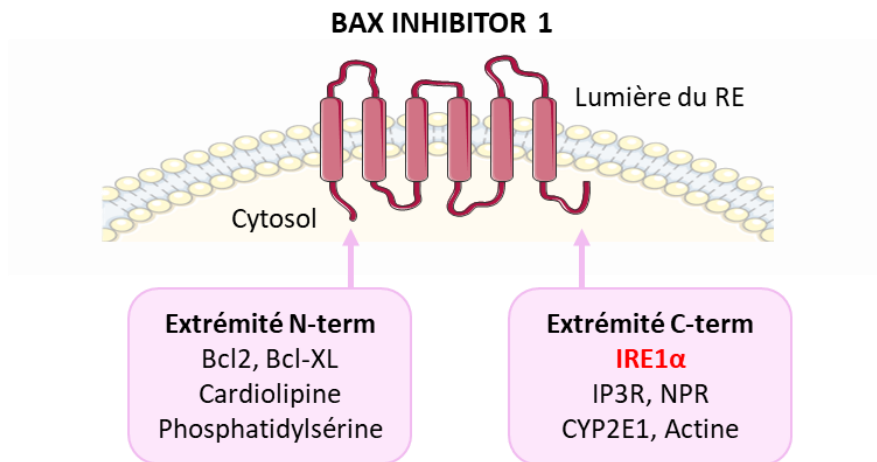
Bax Inhibitor 1 (BI-1) est une protéine anti-apoptotique, appartenant à la famille des Transmembrane Bax Inhibitor Motif (TMBIM) (*Henke et al., 2011; Rojas-Rivera and Hetz, 2015*). BI-1 est une protéine hydrophobe de 237 acides aminés, soit 26 kDa. Très conservée dans l'évolution, le niveau d'expression de BI-1 varie au cours du développement et de manière tissu spécifique (*Grznil et al., 2006*). Effectivement, l'expression de BI-1 semble promouvoir la survie de certaines populations cellulaires au moment des « hauts pics » d'apoptose présents au cours du développement (*Jean et al., 1999*). Malgré une expression ubiquiste, BI-1 est fortement exprimée dans le foie, les reins, le cerveau et le pancréas. Localisée au sein de la membrane du RE, BI-1 possède six domaines transmembranaires et ses deux extrémités « C-terminal » et « N-terminal » sont orientées vers le cytosol (*Bultynck et al., 2012 ; Lebeaupin et al., 2020 ; Lisak et al., 2015*).

Les premières études ont montré que BI-1 protège de l'apoptose induite par Bax chez la levure, d'où sa nomenclature (*Xu and Reed, 1998*). Son domaine « C-terminal » apparaît essentiel pour ses propriétés anti-apoptotiques. En effet, sa délétion entraîne l'apoptose induite par Bax, chez la levure. En revanche, la fonction cytoprotectrice de BI-1 ne se fait pas via une interaction directe avec Bax. Effectivement, lors d'une co-immunoprécipitation de BI-1, Bax ne faisait pas partie des protéines liant BI-1. En revanche, Bcl2 et Bcl-XL, deux protéines de la famille anti-apoptotique de Bcl2, ont été retrouvées comme liant BI-1 à son extrémité « N-terminal ».

Les études ont montré que BI-1 interagit avec IRE1 $\alpha$  en « C-terminal », ainsi qu'avec les protéines IP3R, NPR (NADPH-réductase) et le cytochrome CYP2E1 (*Robinson et al., 2011*). Ainsi, BI-1 protège de l'apoptose en faisant compétition à Bax (inhibition compétitrice) sur le même site de fixation au niveau de IRE1 $\alpha$ .

La surexpression de la protéine BI-1 protège de l'apoptose induite par un stress du RE : les inducteurs chimiques du stress du RE (tunicamycine, thapsigargine) et les procédures expérimentales mobilisant le Ca<sup>2+</sup> (ischémie reperfusion). En revanche, la délétion de BI-1 rend les cellules plus vulnérables à l'apoptose à ces mêmes composés (*Chae et al., 2004*).

Le panel de partenaires de BI-1 rend cette protéine essentielle au maintien de la survie cellulaire, puisqu'elle permet une inhibition de la mort cellulaire programmée par apoptose via son rôle dans le stress du RE (IRE1 $\alpha$ ), la régulation de l'homéostasie calcique (IP3R) et la réponse antioxydante (NPR) (*Figure 8*).



*Figure 8 : Structure de BI-1 et ses partenaires.*

Bax Inhibitor 1 (BI-1) est une protéine anti-apoptotique de 26 kDa, localisée au sein de la membrane du RE. Composé de 6 domaines transmembranaires et d'un septième domaine dit « loop » réentrante, BI-1 possède de multiples partenaires protéiques au niveau de ses extrémités « N-terminal » et « C-terminal », orientées vers le cytosol. Au niveau de son extrémité « N-terminal », BI-1 peut interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-XL, ainsi que la Cardiolipine et la Phosphatidylsérine. Au niveau de son « extrémité C-terminal », BI-1 interagit avec IP3R, la NADPH-réductase (NPR) et CYP2E1. Enfin, sur cette extrémité, BI-1 interagit avec IRE1 $\alpha$ , au niveau de son activité RNase et permet l'inhibition de cette dernière via compétition avec la protéine pro-apoptotique Bax.

## ii. Rôle de BI-1 dans la mort induite par le stress du RE

L'équipe de Korsmeyer fut la première à établir un lien physique entre la machinerie apoptotique et le senseur de l'UPR, IRE1 $\alpha$ . Ainsi, les auteurs montrent que Bax et Bak interagissent avec IRE1 $\alpha$  au niveau de son domaine cytosolique « C-terminal », permettant l'amplification du signal de mort (*Hetz et al., 2006*).

Puis des études complémentaires ont montré que BI-1 inhibe l'apoptose induite par Bax, en faisant compétition avec celui-ci au même site de fixation sur le domaine « C-terminal » d'IRE1 $\alpha$ . Ainsi, BI-1 inhibe l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  et l'épissage de l'ARNm de XBP1 (*Bailly-Maitre et al., 2010 ; Lisbona et al., 2009*).

Au sein de cellules double déficientes pour Bax et Bak, la délétion de BI-1 ne normalise pas les niveaux d'expression de l'ARNm de XBP1. En conclusion, BI-1 se trouve en amont de Bax et Bak dans la régulation de la signalisation de l'axe IRE1 $\alpha$ /sXBP1.

La littérature décrit que les cellules déficientes pour BI-1 présentent une augmentation du flux autophagique en comparaison avec des cellules sauvages. Cette observation est aussi décrite dans le foie et les reins de souris BI-1 déficientes. De plus, les drosophiles BI-1 déficientes présentent une meilleure survie à la déprivation en nutriment grâce à une augmentation du flux autophagique. Dans ces modèles, la signalisation de la kinase JNK est augmentée ainsi que l'expression d'IRE1 $\alpha$ . L'augmentation du flux autophagique s'effectue via le recrutement de TRAF2 au niveau d'IRE1 $\alpha$ , permettant ainsi l'activation de la kinase JNK et, par la suite, de l'autophagie. Ainsi, BI-1 semble réguler aussi l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$  (*Castillo et al., 2011*).

De plus, BI-1 est régulé négativement par la protéine BAR (Bi-functional Apoptosis Regulator). La protéine BAR est une E3 Ubiquitine ligase associée au RE. Cette protéine permet l'ubiquitination de BI-1, régulant ainsi sa dégradation et levant l'inhibition de BI-1 sur IRE1 $\alpha$  au cours d'un stress du RE (*Rong et al., 2011*).

Enfin, au sein des souris BI-1 déficientes, la littérature décrit une suractivation constitutive hépatique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Ces souris sont plus sensibles aux stress du RE. Ainsi, les foies de ces souris BI-1 déficientes sont plus vulnérables à l'apoptose induite lors de procédure d'ischémie reperfusion hépatique que les souris sauvages. Lorsque les souris BI-1 déficientes sont soumises à un régime riche en graisse, ces souris développent des troubles métaboliques hépatiques importants (NASH) en comparaison avec les souris sauvages (*Lebeau-pin et al., 2018*).

Les études ont aussi suggéré que BI-1 puisse agir aussi sur ATF6 et PERK. Effectivement, dans des modèles de surexpression de BI-1, les niveaux de clivage d'ATF6 et de phosphorylation de eIF2 $\alpha$  sont diminués (*Lee et al., 2007*). En revanche, d'autres équipes montrent un clivage plus important d'ATF6 au sein des foies des souris BI-1 déficientes (*Bailly-Maitre et al., 2006*).

Une étude récente suggère un rôle de BI-1 dans l'apparition de modifications post-traductionnelles sur IRE1 $\alpha$  associées au vieillissement. En effet, à l'aide de souris BI-1 déficientes âgées, l'équipe de Chae démontre une augmentation de la S-nitrosylation et de la sulfonylation de IRE1 $\alpha$ , modulant ainsi son activité. BI-1 apparaît comme un protecteur contre les modifications post-traductionnelles associées à l'oxydo-réduction sur IRE1 $\alpha$  avec l'âge (*Bhattarai et al., 2021*).

### iii. Rôle de BI-1 dans l'homéostasie calcique et l'autophagie

BI-1 protège de l'apoptose en modulant la concentration calcique au sein du RE. Comme indiqué précédemment, le RE est l'organelle essentielle pour le stockage et le maintien de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ . BI-1 est décrit comme étant impliqué dans la régulation de la concentration calcique au sein du RE. Effectivement, dans des modèles expérimentaux de surexpression protéique de BI-1, la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE est diminuée, soutenant des flux calciques modérés vers le cytosol (Xu *et al.*, 2008). Ainsi, en diminuant la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du RE, en condition basale, BI-1 permet d'éviter une fuite calcique trop intense en direction du cytosol. Etant donné le rôle tampon de la mitochondrie lors d'une fuite massive du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, cet effet permet d'éviter une surcharge calcique de la mitochondrie et ainsi de protéger de l'apoptose.

L'étude de Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2008) met également en évidence que BI-1 exerce son rôle sur l'homéostasie calcique en amont de la signalisation des membres de la famille Bcl-2. Des études montrent un rôle des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'homéostasie calcique au sein du RE. En effet, la surexpression de Bcl-XL diminue la concentration calcique au sein du RE. Lors d'une délétion de BI-1, Bcl-XL ne peut plus réguler l'homéostasie calcique, suggérant donc que BI-1 puisse posséder un rôle en amont de Bcl-XL dans l'homéostasie calcique du RE.

Afin de mieux appréhender le rôle de BI-1 dans l'homéostasie calcique, de nombreuses études ont investigué la structure de BI-1. Comme indiqué précédemment, BI-1 présente six domaines transmembranaires. En revanche, les études topologiques déterminent un septième domaine transmembranaire moins hydrophobe que les six autres, au niveau du « C-terminal » de BI-1. Ces études relatent l'existence d'une structure « loop » réentrante, orientant ainsi le domaine « C-terminal » en direction du cytosol (Carrara *et al.*, 2012).

La fonction canal ionique de BI-1 est encore un débat. Il existe trois hypothèses autour du rôle de BI-1 dans l'homéostasie calcique : 1) BI-1 est un anti-porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , 2) BI-1 est un canal calcique ( $\text{Ca}^{2+}$  channel like), 3) BI-1 permet de sensibiliser le récepteur IP3R (**Figure 9**).

#### Hypothèse 1 : BI-1 est un anti-porteur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$

La structure « loop » du « C-terminal » de BI-1 est également très riche en lysines. La littérature rapporte que cette structure permettrait le passage du  $\text{Ca}^{2+}$ , de manière pH dépendante (Kim *et*



*al.*, 2008). En réponse à des conditions acides, les cellules surexprimant BI-1 présentent une augmentation de la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol. Dans un modèle de protéoliposome, BI-1 a été mis en présence d'un milieu acide (*Ahn et al.*, 2009; *Yun et al.*, 2012). L'acidité de cet environnement conduit à une augmentation de la libération calcique depuis le protéoliposome vers l'extérieur tandis que les protons rentrent en direction du protéoliposome. Cette étude démontre que BI-1 possède une activité anti – porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  pH dépendant. La sensibilité de BI-1 au pH acide lui permettrait donc de diminuer l'acidité cytosolique en échangeant un calcium en direction du cytosol contre un proton en direction du RE.

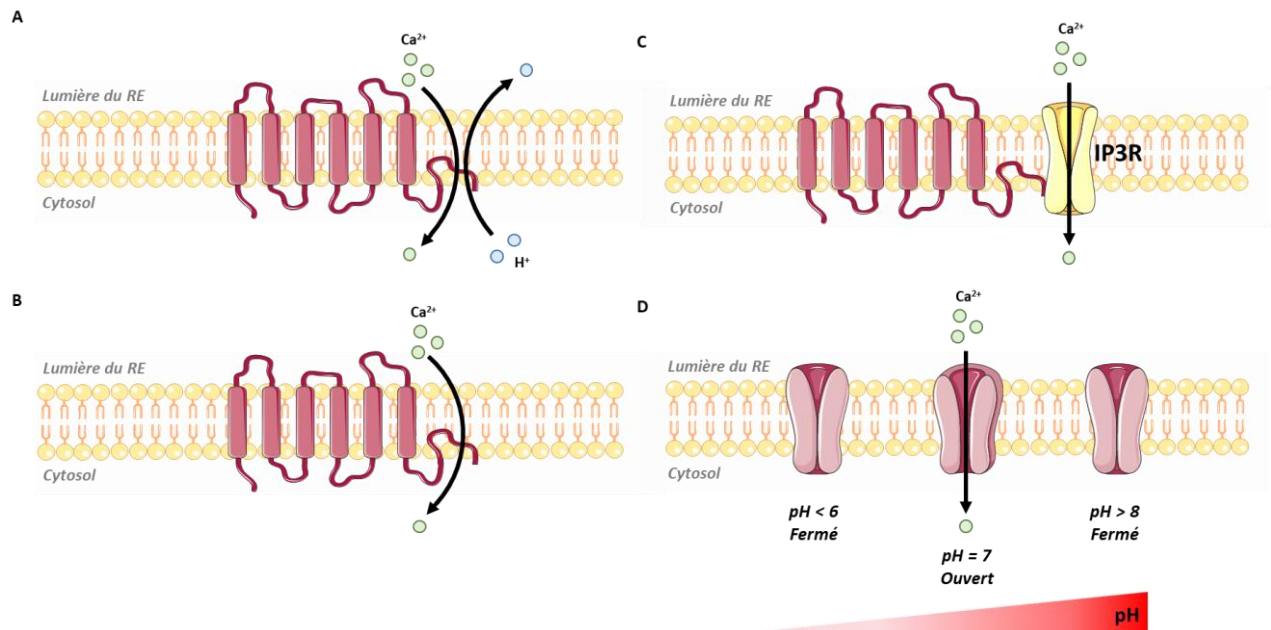
L'acidité n'est pas le seul activateur de l'anti-porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  BI-1. Dans des modèles de protéoliposome, il a été démontré que les membres de la famille des Bcl2, via leur domaine BH4 (protéines Bcl-XL et Bcl2), ainsi que la cardiolipine et la phosphatidylsérine activeraient l'activité anti-porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  de BI-1. Ces différents acteurs augmenteraient l'oligomérisation de BI-1, permettant ainsi la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par BI-1 (*Ahn et al.*, 2010).

#### Hypothèse 2 : BI-1 possède une structure de type canal calcique (Calcium channel-like)

Dans la seconde hypothèse, BI-1 posséderait une structure de type canal calcique uniquement. Effectivement, cette hypothèse met en évidence la fonction pH senseur de BI-1, mais sans le passage de protons afin de diminuer l'acidité du cytosol.

L'étude de la structure d'un homologue de BI-1 provenant de la bactérie montre la présence d'un domaine senseur du pH (des résidus di-aspartyl) dans le domaine « C-terminal » de BI-1. Au sein de cette étude, BI-1 se présenterait comme un canal calcique mais, contrairement à ce qui a été dit précédemment, un pH acide ou basique inhiberait le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  à travers cet homologue bactérien de BI-1 (*Chang et al.*, 2014). La présence de ce domaine di-aspartyl permettrait la protonation de ces résidus et donc ferait de BI-1 un canal calcique pH dépendant. Effectivement, dans des conditions à pH inférieurs à 6, ce domaine di-aspartyl est protoné, empêchant le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  à cause de la surcharge positive au sein du pore. En revanche, dans des conditions à pH supérieurs à 8, les di-aspartyl de la structure de BI-1 sont déprotonés, permettant la formation d'un pont hydrogène, engendrant la fermeture du pore de BI-1.





**Figure 9** : Hypothèses du rôle de BI-1 dans la régulation de l'homéostasie calcique.

Le C-terminal de BI-1 possède des propriétés de type « canal calcique ». Plusieurs hypothèses existent sur la régulation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  par BI-1.

- A. BI-1 est un anti-porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  permettant la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE en échange d'un proton.
- B. BI-1 possède une structure de type canal calcique, ainsi BI-1 laisserait « fuiter » du  $\text{Ca}^{2+}$  en direction du cytosol afin d'éviter la sortie excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE, en cas de stress. Ce mécanisme protégerait la cellule de la mort induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ .
- C. BI-1 augmenterait la sensibilité de IP3R. BI-1 interagit avec IP3R au niveau de son domaine C-terminal. Via cette interaction, BI-1 permettrait à IP3R d'augmenter la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol, voir même vers la mitochondrie puisque IP3R intervient dans la formation des MAM et l'échange calcique entre le RE et la mitochondrie.
- D. BI-1 est sensible au pH. BI-1 possède une structure di-aspartyl, le rendant sensible au pH. Dans cette hypothèse, un pH neutre (7) active la fonction calcique de BI-1 et ainsi la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol.

Ces données obtenues sur cet homologue de BI-1 ont été reproduit avec le BI-1 humain (*Kiviluoto et al., 2013*). Auparavant, Bultynck *et al* ont pu mettre en évidence la présence d'une séquence protéique au sein de BI-1 responsable de la fonction canal calcique de BI-1 au niveau du domaine « C-terminal » (*Bultynck et al., 2012*).

Kiviluoto *et al.*, n'utilisant pas de modèle de protéoliposome, évitent l'utilisation d'un modèle artificiel pour étudier la fonction calcique de BI-1. Dans cette étude, en présence d'un pH neutre, BI-1 laisse passer le  $\text{Ca}^{2+}$ . En revanche, à des pH inférieurs à 6,8, le  $\text{Ca}^{2+}$  passe difficilement du RE vers le cytosol, et, à des pH inférieurs à 6, le  $\text{Ca}^{2+}$  ne passe plus à travers BI-1. Enfin, dans ces différentes études, BI-1 est présenté davantage comme un canal calcique sensible au pH plutôt qu'un anti-porteur  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Bultynck *et al.*, 2014).

### Hypothèse 3 : BI-1 augmente la sensibilité de IP3R

Comme décrit précédemment, IP3R est un canal ionique permettant la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol. Les données de la littérature suggèrent que BI-1 interagisse avec IP3R. Premièrement, les études ont montré que BI-1 co-immunoprécipite avec IP3R, au niveau du domaine « C-terminal » de BI-1 (Kiviluoto *et al.*, 2012). L'interaction entre BI-1 et IP3R contrôlerait leur libération calcique respective. Effectivement, le contrôle de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  au sein du cytosol par BI-1 permet de diminuer l'échange de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le RE et la mitochondrie au niveau des MAM par IP3R. Ainsi, cette interaction modifie aussi la bioénergétique de la mitochondrie, puisque dépendante de la concentration calcique au sein de la mitochondrie et les mécanismes autophagiques qui en découlent (Sano *et al.*, 2012).

Comme mentionné précédemment, les protéines anti- et pro-apoptotiques jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique au sein du RE. Effectivement, les cellules double déficientes pour Bax et Bak présentent une diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  intra-RE, due à une augmentation de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par IP3R. En l'absence de Bax et de Bak, Bcl-2 conduit à une hyperphosphorylation de IP3R, ce qui diminue le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE et augmente la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE en direction du cytosol (Oakes *et al.*, 2005). En ce qui concerne les protéines anti-apoptotiques, Bcl-2 interagit directement avec IP3R afin de l'inhiber. Effectivement, via son domaine BH4, Bcl-2 fait compétition avec le ligand de l'IP3R, IP3 (Ivanova *et al.*, 2020, 2019). En revanche, Bcl-XL a récemment été décrit comme inhibant IP3R avec un autre domaine que son domaine BH4, au même site de fixation que son ligand et Bcl-2 (Popgeorgiev and Gillet, 2022 ; Rosa *et al.*, 2022).

Étant donné les multiples interactions protéiques possibles entre Bcl-2, Bcl-XL, BI-1 et IP3R et les rôles antagonistes de Bax et de Bak, l'ensemble de leurs rôles respectifs dans l'homéostasie calcique reste encore largement à étudier. En revanche, la fonction « calcique » de BI-1 ne peut être niée, par les études de sa structure et plus particulièrement de son domaine

« C-terminal ». Mais la présence de cette fonction ne remet pas en question son interaction et son rôle dans la sensibilisation de l'IP3R.

Plus généralement, les données de la littérature suggèrent que BI-1 régulerait de nombreuses voies de signalisations intra-cellulaires : la réponse au stress du RE, l'homéostasie calcique, l'autophagie, l'activité lysosomale ou encore le maintien de l'homéostasie mitochondriale. Ainsi, de récentes études rapportent que BI-1 contrôle la concentration calcique des lysosomes et permet ainsi une augmentation de l'activité lysosomale et autophagique dans des conditions de stress métaboliques, de manière indépendante de IP3R (*Kim et al., 2021*). Le lysosome est une organelle permettant le stockage du  $\text{Ca}^{2+}$  au sein de la cellule, tout comme le RE. Dans cette étude, la surexpression de BI-1 permet d'augmenter la concentration calcique au sein du lysosome et augmente l'activité autophagique des cellules, dans des conditions de stress métaboliques. De plus, cette étude démontre une augmentation des contacts entre le RE et le lysosome dans un modèle de surexpression de BI-1, mais aussi avec la mitochondrie, indépendamment de IP3R. Les contacts entre le RE et les autres organelles, dans ce modèle de surexpression de BI-1, semble s'effectuer de manière  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant. En effet, lors de la surexpression d'un BI-1 muté au niveau de son pore calcique (D213A), la perte de la fonction canal de BI-1 diminue fortement les contacts entre le RE et les autres organelles, comme la mitochondrie et le lysosome.

Ces études apportent une lumière nouvelle sur la complexité des voies intra-cellulaires dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  régulées par BI-1 et ses partenaires qui restent encore largement à explorer.

#### iv. Rôle de BI-1 dans la réponse antioxydante

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), tels que le  $\text{H}_2\text{O}_2$  ou le  $\text{O}_2^-$ , sont produites naturellement au cours des processus de métabolisation. L'accumulation de ROS due au stress oxydant au sein de la cellule peut conduire à des altérations de la cellule, dont des dommages à l'ADN, jusqu'à la mort cellulaire par apoptose.

Au sein du RE, le repliement oxydatif des protéines, permettant la formation de ponts disulfures, mène à la production de ROS. La majorité des ROS présents au sein du RE provient du système microsomal monooxygénase. Ce système est une chaîne de transfert d'électrons, produisant des ROS au sein du RE. Le système microsomal monooxygénase est composé des cytochromes P450, dont le majoritaire est le CYP2E1 et de NADPH P450 réductase (NPR), majoritairement exprimé dans le foie.

Initialement, différents orthologues de BI-1 provenant de différentes espèces (allant de la levure, à la drosophile mais aussi passant par *Arabidopsis thaliana*) furent surexprimés au sein de la levure. Ces surexpressions confèrent une protection contre la mort induite par le stress oxydant, via un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Chae et al., 2003*).

La première étude démontrant le rôle antioxydant de BI-1 met en évidence que la surexpression de BI-1 diminue la production de ROS, dans des conditions de stress du RE. La surexpression de BI-1 augmente l'expression de gènes antioxydants tels que NRF2 et son gène cible HO-1 (Heme Oxygenase 1) diminuant la production de ROS (*Lee et al., 2007*).

D'autres études démontrèrent que la surexpression de BI-1 diminue l'expression de CYP2E1, le cytochrome P450 majoritaire au sein du système microsomal monooxygénase. Dans ce papier, BI-1 est décrit comme interagissant aussi avec la NADPH P450 réductase (NPR). D'ailleurs, BI-1, au niveau de son domaine « C-terminal » possède une meilleure affinité avec la NPR plutôt qu'avec le CYP2E1. Mais cette interaction entre BI-1 et les composants du système microsomal monooxygénase permet de diminuer la production de ROS, en bloquant la chaîne de transfert d'électrons entre ces protéines (*Kim et al., 2009*).

Wang *et al* rapporte qu'au sein des hépatocytes, la dégradation de CYP2E1 s'effectue par le système de dégradation via le protéasome mais aussi via le lysosome (*Wang et al., 2011*). Dans ce contexte, Lee *et al* démontrent que les cellules surexprimant BI-1 présentent une activité lysosomale importante et que cette activité lysosomale serait responsable de la dégradation de CYP2E1 (*G.-H. Lee et al., 2011*). L'augmentation de l'activité lysosomale par BI-1 permet de dégrader le CYP2E1 et réduit la production de ROS (*Lee et al., 2012*).

En conclusion, BI-1 est impliquée dans la réponse antioxydante face aux ROS produits lors d'un stress du RE. BI-1 permet de diminuer la production de ROS en bloquant la chaîne de transfert d'électrons via son interaction avec CYP2E1 et NPR, mais aussi en augmentant la dégradation de CYP2E1 via une augmentation de l'activité lysosomale de la cellule.

Récemment, une équipe a démontré que l'effet antioxydant de BI-1 protège de la fission mitochondriale dans un modèle d'ischémie reperfusion de la microvascularisation cardiaque. En effet, la surexpression de BI-1 permet de diminuer la production de ROS, bloquant ainsi la dépolymérisation de la F-actine et l'activation de Drp1 (Dynamin-related protein 1), deux mécanismes impliqués dans la fission mitochondriale. Dans ce contexte, la surexpression de BI-1 conduit à une protection contre la fission mitochondriale, via une inhibition de la production des ROS, en réponse à une hypoxie-réoxygénation (*Zhou et al., 2019, 2018*).

v. Rôle de BI-1 dans les différentes pathologies (Table 5)

En raison de ses nombreux rôles, BI-1 est impliqué dans diverses pathologies, que ce soit dans les maladies du foie, les infections, les maladies neurologiques ou bien les cancers (**Table 5**). L'expression et l'action de BI-1 dans les différentes pathologies sont très différentes. Nous introduirons ses rôles et son expression dans la table qui suit, en fonction des différentes pathologies.

Maladies	Niveaux d'expression de BI-1	Observations	Références
<b>Maladies hépatiques</b> Insulino-résistance	Diminué	Surexpression de BI-1 sensibilise le foie à l'insuline	<i>Bailly-Maitre et al, 2010</i> <i>Lee et al, 2016</i>
Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)	Diminué	Souris BI-1 KO plus vulnérables aux atteintes hépatiques, suite à un stress du RE aigue et un régime cétogène	<i>Lee et al, 2016</i> <i>Lebeaupin et al, 2018</i>
Hypoxie / Ischémie Reperfusion	Augmenté	Souris BI-1 KO présentent un stress du RE et de la mort. Souris sauvages : augmentation de l'expression de BI-1	<i>Bailly-Maitre et al, 2006</i>
CCI4	Diminué	Transplantation de cellules souches mésenchymateuses augmente l'expression de BI-1	<i>Cho et al, 2012</i>
Hépatectomie partielle	Diminué	Souris BI-1 KO présentent une régénération du foie accélérée	<i>Bailly-Maitre et al, 2007</i>
<b>Régulation du système immunitaire et infection</b> Encéphalomyélite autoimmune	?	Souris BI-1 KO présentent des signes cliniques plus tardifs avec une atténuation des fonctions des lymphocytes T et B.	<i>Lisak et al, 2016</i>
Grippe	?	Surexpression de BI-1 diminue la mort cellulaire induite par les virus	<i>Hossain et al, 2018</i>
<b>Maladies neurologiques</b> Accidents vasculaires cérébraux	?	Souris BI-1 KO sont vulnérables aux dommages cérébraux, suite à une occlusion artérielle Souris BI-1 transgéniques présentent moins de dommages cérébraux et une meilleure récupération post-AVC.	<i>Chae et al, 2004</i> <i>Krajewska et al, 2011</i>
Dépression	?	Les souris BI-1 transgéniques sont protégées face à des stimuli anxiogènes. Les souris BI-1 KO sont plus vulnérables à la dépression induite par le stress	<i>Hunsberger et al, 2011</i> <i>Lee et al, 2013</i>
Maladie d'Alzheimer	?	BI-1 interagit avec la presenilin 1, une protéine mutée dans la maladie d'Alzheimer	<i>Wu et al, 2019</i>
<b>Autres pathologies</b> Ischémie – reperfusion cardiaque	Diminué	Les souris BI-1 transgéniques sont protégées contre les dommages microvasculaires et les dysfonctions mitochondriales	<i>Zhou et al, 2018</i>
Dommages hypoxiques / ischémiques néonataux	Augmenté	La surexpression de BI-1 atténue l'inflammation suite à des dommages suite à augmentation de l'expression d'enzymes anti-oxydantes	<i>Doycheva et al, 2019</i>
Fibrose pulmonaire	?	Les souris BI-1 déficientes sont plus sensibles aux dommages pulmonaires induits par la bleomycine	<i>Lee et al, 2014</i>
<b>Cancers</b> Foie	Diminué	Diminution de l'expression de BI-1 au cours de l'évolution des pathologies hépatiques	<i>Kotsafti et al, 2010</i>
Seins	Augmenté	Augmentation de l'expression de BI-1 dans le cancer du sein	<i>Grzmil et al, 2006</i>
Prostate	Augmenté	Diminution de l'expression de BI-1 conduit à une mort cellulaire des carcinomes prostatiques	<i>Grzmil et al, 2003</i>
Testicules	Augmenté	BI-1 protège de la toxicité de la cisplatine	<i>Kim et al, 2018</i>
Carcinome nasopharyngien	Augmenté	La diminution de l'expression de BI-1 inhibe la croissance tumorale et augmente l'apoptose	<i>Li et al, 2011</i>
Poumon	Augmenté	L'expression de BI-1 est associée à une augmentation de la progression et des métastases dans les cancers du poumon non à petite cellules	<i>Lu et al, 2015</i>

*Tableau 6 : Les niveaux d'expression de BI-1 au sein de différentes pathologies.*

## IV. Le rôle du stress du Réticulum Endoplasmique et de l'Unfolded Protein Response (UPR) dans la physiopathologie du Diabète

En conditions physiopathologiques, le stress du RE induit des dysfonctionnements de la réponse UPR impliqués dans de nombreuses pathologies, allant des maladies métaboliques (Diabète, NAFLD, Athérosclérose), neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson) mais aussi différents cancers (myélome multiple, cancer du sein triplement négatif, carcinome hépatocellulaire, etc) (*Zhao and Ackerman, 2006*).

En conditions physiologiques, la réponse UPR est essentielle au maintien de l'homéostasie de l'organisme, tout particulièrement au niveau des organes sécréteurs comme le pancréas, composé de cellules hautement sécrétrices : les cellules exocrines et des cellules endocrines, particulièrement les cellules  $\beta$  pancréatiques affectées lors du diabète.

Dans cette partie, nous discuterons i) du rôle de la réponse adaptative de l'UPR dans la physiologie et le maintien de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique, ii) de l'impact l'insuline mal conformée et des autres paramètres physiopathologiques à l'origine d'un stress du RE au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques, iii) de la dérégulation des voies de l'UPR et leurs mutations dans le diabète.

### A. La réponse UPR dans la physiologie (fonction, survie et mort) des cellules $\beta$ pancréatiques

#### i. Rôle adaptatif de l'UPR en réponse au glucose au sein de la cellule $\beta$ pancréatique

Dans des conditions physiologiques, la réponse UPR au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques, particulièrement IRE1 $\alpha$ , **favoriserait la synthèse de proinsuline/insuline et sa sécrétion face au glucose.**

En premier lieu, une étude démontre l'importance des protéines chaperonnes du RE dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les MIN6, une lignée murine de cellules  $\beta$  pancréatiques, perdent leur capacité à sécréter l'insuline en réponse au glucose au fur et à mesure des passages. Cette étude utilise donc des cellules à haut passage cellulaire, ne répondant plus au glucose, et d'autres à bas passage cellulaire, sécrétant de l'insuline en réponse au glucose. Lors d'une stimulation au glucose, les MIN6 à haut passage présentent une

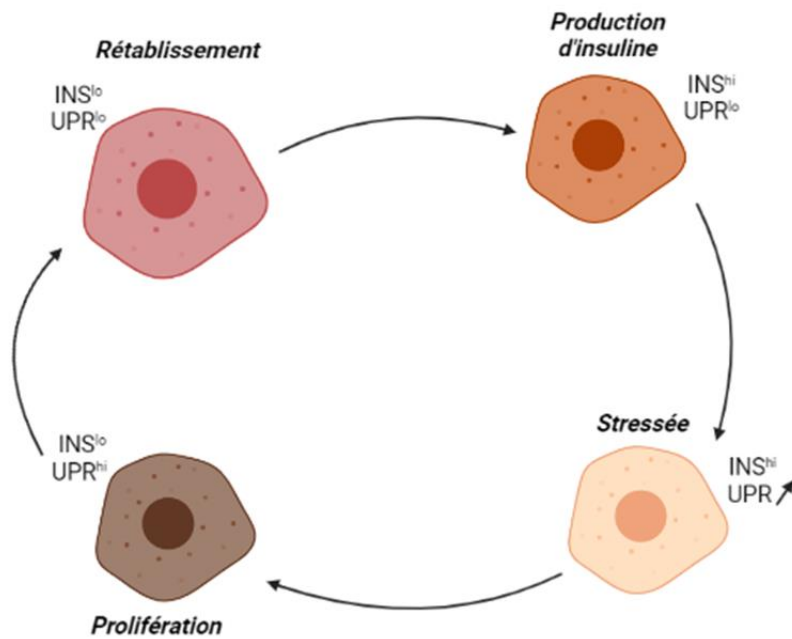


diminution de l'expression des protéines chaperonnes (Grp78, Grp94 et les PDI (Protein Disulfide Isomerase)) corrélant avec la perte de sécrétion d'insuline, en comparaison avec des MIN6 de bas passage répondant au glucose (*Dowling et al., 2006*).

Au sein d'îlots isolés de souris et d'une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques de rat (INS-1), l'exposition aiguë ou chronique à une forte concentration de glucose induit une augmentation de l'activation d'IRE1 $\alpha$  et de la sécrétion de l'insuline. L'exposition aiguë à une forte concentration de glucose mime l'hyperglycémie postprandiale, donc physiologique. Cette stimulation aiguë au glucose conduit à une augmentation de la forme phosphorylée d'IRE1 $\alpha$ , ne coïncidant pas avec une augmentation de l'épissage de XBP1. L'augmentation de la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$  est favorable à la synthèse de la proinsuline (*Lipson et al., 2006*). En revanche, lors d'une hyperglycémie chronique mimant des conditions physiopathologiques, la suractivation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  conduit à une dégradation de l'ARNm de l'insuline diminuant la surcharge en insuline néosynthétisée pour soulager le RE (*Lipson et al., 2008*). Nous introduirons les mécanismes associés à ces études plus tardivement dans le manuscrit.

Récemment, **Xin et al ont démontré que les cellules  $\beta$  pancréatiques humaines présentent différents états d'activation de la réponse UPR en fonction de la demande en insuline.** En effet, lors d'une haute demande en insuline, les cellules  $\beta$  pancréatiques se trouvent en état qualifié de « stress ». Ces cellules augmentent l'expression de l'insuline mais cela ne corrèle pas avec une augmentation de la réponse UPR. Cet état de « stress » conduirait à une augmentation progressive adaptative de la réponse UPR, afin de corriger les potentielles erreurs de repliement au cours de la biosynthèse de la proinsuline. Au cours de cet état qualifié alors de « rétablissement », la réponse UPR augmenterait au détriment de la synthèse de la proinsuline. Lors d'une augmentation de la réponse UPR, notamment via le senseur ATF6, les cellules  $\beta$  pancréatiques prolifèrent davantage afin de compenser la haute demande en insuline et de retourner à un état « basal » de faible expression d'insuline. Cette étude suggère que ces différents états permettent aux cellules sécrétrices d'insuline de s'adapter à la demande en insuline et souligne un rôle nouveau pour ATF6. Lors d'une hyperglycémie chronique, ces cellules resteraient dans un état de « stress » avec une haute demande de production d'insuline. Cet état de « stress » les empêcheraient donc de passer dans un état de « rétablissement » et de prolifération, expliquant ainsi la perte progressive de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du diabète (*Sharma et al., 2015 ; Xin et al., 2018*) (**Figure 10**).





**Figure 10** : Les différents états d'activation de l'UPR en réponse à une haute demande en insuline dans la cellule  $\beta$  pancréatique.

Lors d'une haute demande en insuline, la cellule  $\beta$  pancréatique se trouve en état dit de « stress ». Durant cet état, la cellule  $\beta$  pancréatique augmente sa production d'insuline. En revanche, suite à cet état de stress, l'UPR s'active progressivement afin de corriger les erreurs éventuelles lors de la synthèse intensive de l'insuline. L'activation de l'UPR conduit progressivement à un état de prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques pour faire face aux futures hautes demande en insuline. Enfin, la cellule  $\beta$  pancréatique retrouve un état basal dit de « rétablissement ».

Ces mécanismes adaptatifs peuvent expliquer la raison pour laquelle les cellules  $\beta$  pancréatiques de certains patients avec un DT2 arrêtent la production de l'insuline sans enclencher l'apoptose. De plus, l'hypothèse a été émise que cette adaptation puisse diminuer les quantités d'insulines mal-conformées, sources potentielles de « néo-antigènes » dans le diabète de type 1 (Lipson *et al.*, 2008) et évitant *in fine* à la cellule  $\beta$  d'enclencher l'apoptose.

## ii. Rôle de l'UPR dans l'identité et la plasticité des cellules $\beta$ pancréatiques

L'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique est maintenue par l'expression de gènes spécifiques, tels que MAFA (MAF bZIP transcription Factor A), PDX1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) et NKX6.1 (NK6 Homeobox 1). Ces gènes permettent de maintenir la cellule  $\beta$  pancréatique

dans un état dit « mature » (ou « différencié »). La littérature démontre que le stress du RE et la réponse UPR peuvent être responsables d'une diminution de l'expression de ces différents gènes voire d'une perte d'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique (« dédifférenciée »).

Il a été mis en évidence que les cellules  $\beta$  pancréatiques au sein d'un îlot de Langerhans présentent une hétérogénéité de leur identité permettant le maintien de l'intégrité et de la fonction de l'îlot de Langerhans (*Nasteska et al., 2021*). Afin de maintenir la fonction de l'îlot pancréatique chez l'Homme, certaines cellules  $\beta$  pancréatiques sont dites « matures » (exprimant PDX1<sup>high</sup>/MAFA<sup>high</sup>) tandis que d'autres sont qualifiées d'« immatures » (exprimant PDX1<sup>low</sup>/MAFA<sup>low</sup>). L'équilibre entre ces différents stades de maturité de la cellule  $\beta$  pancréatique permet de préserver l'îlot de Langerhans contre les désordres métaboliques.

Dans un contexte d'adaptation à un stress chronique du RE, les cellules  $\beta$  pancréatiques peuvent perdre leur identité cellulaire. Au sein de la lignée cellulaire MIN6, des traitements chroniques avec de l'acide cyclopiazonique (CPA), un inhibiteur de la pompe SERCA, responsable d'un stress du RE, engendrent une diminution de la quantité d'insuline. Cette étude montre qu'un stress chronique du RE conduit à une diminution de l'expression des gènes associés à l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique (MAFA, Glut2 et Ins2 (Insulin 2)). Lorsque les MIN6 ne sont plus traitées au CPA, ces cellules sont capables de « récupérer » et sécréter à nouveau l'insuline en réponse au glucose. L'expression de ces gènes (MAFA, Glut2 et Ins2) revient à la normale ainsi que la fonction et l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique. Ces données suggèrent donc une plasticité « réversible » et adaptative de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique en réponse à un stress du RE chronique. En revanche, si le stress du RE est répété et fréquent, comme dans le cadre du diabète de type 1 ou de type 2, la cellule  $\beta$  pancréatique finirait par perdre totalement son identité et sa fonction, dont l'expression des gènes *Ins1* et *Ins2*, au détriment d'une augmentation de l'expression de marqueurs de l'UPR, dont Grp78. Au sein d'îlots de patients atteints d'un diabète de type 1, la perte des marqueurs de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Ins*) est positivement corrélée à l'augmentation de l'expression de Grp78 (*Chen et al., 2022*).

Récemment, une étude transcriptomique a mis en évidence un lien entre la perte d'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique et une augmentation de la réponse UPR, chez des patients atteints d'un diabète de type 2 (*Groen et al., 2021*). Dans cette étude, une activation soutenue des marqueurs de la réponse UPR (sXBP1 et CHOP), à la suite de l'induction chimique d'un stress du RE via la thapsigargine, conduit à une diminution de *MAFA*, *PDX1* et *PAX4* (Paired Box 4), des gènes essentiels au maintien de la fonction et de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique, au sein d'îlots pancréatiques humains. Le stress du RE engendre une réponse UPR menant soit à un état de

« rétablissement » au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique via son rôle adaptatif, soit à un état qualifié d'« altéré » dans cette étude. L'état « altéré » de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique permet d'éviter une réponse UPR terminale menant à l'apoptose de la cellule (**Figure 11**). Ces données obtenues via l'utilisation d'un activateur du stress du RE reflètent les observations effectuées au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques de patients atteints de diabète de type 2. De plus, au sein de modèles de diabète de type 2, les souris db/db, l'échec de la réponse adaptative de l'UPR est associé à une diminution de l'expression des gènes du maintien de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique, au sein d'un environnement diabétique (*Chan et al., 2013*).

Ces études devront être reproduites dans des conditions de stress du RE plus proches de situations physiopathologiques associées au diabète (hyperlipidémie, hyperglycémie, environnement pro-inflammatoire).

Ainsi, la réponse UPR adaptative permet, dans un premier temps, la survie de la cellule  $\beta$  pancréatique face aux modifications de son environnement, en diminuant les niveaux d'expression des gènes associés à leur identité (*Kaufman et al., 2010*). En revanche, l'exposition prolongée aux désordres métaboliques finit par diminuer leurs capacités compensatoires, menant progressivement à une réponse UPR terminale et à la mort par apoptose. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette transition UPR adaptative - UPR terminale permettra d'identifier des cibles nouvelles dans la prise en charge thérapeutiques du diabète.

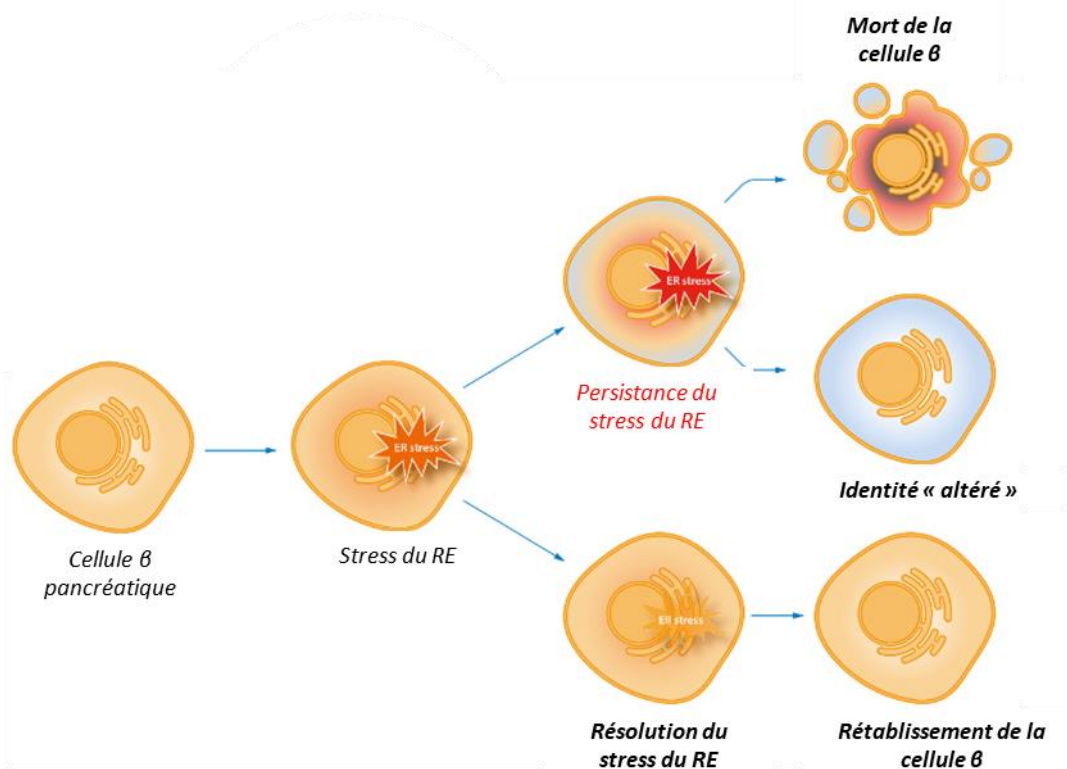
### iii. Rôle de la chronicité des différents stress du RE au sein de la cellule $\beta$ pancréatique

#### a. Protéostasie et insuline mal conformée

Il est relativement bien établi que l'insuline mal conformée puisse provoquer le diabète chez l'Homme et au sein des modèles murins. C'est le cas dans les patients atteints de certains types de diabète monogénique (*Haataja et al., 2021*). Chez ces patients, les gènes mutés associés à la fonctionnalité de la cellule  $\beta$  pancréatique conduisent à une altération de l'homéostasie du RE, une insuline mal-conformée, et ainsi par la suite, à une dysfonction de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Ainsi, chez les patients atteints d'un diabète de type MODY 10, une mutation sur le gène *INS* engendre la perte de la formation des ponts disulfures dans la structure de l'insuline. Ces mutations touchant les cystéines sont responsables d'un mauvais repliement de la proinsuline,

qui s'accumule dans le RE engendrant un stress du RE et l'apoptose des cellules  $\beta$  (Liu *et al.*, 2010).



**Figure 11** : Les états de la cellule  $\beta$  pancréatique en réponse à une activation soutenue de l'UPR.

Lors d'un stress du RE, la réponse UPR est augmentée afin de mener à un état de « rétablissement », au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique. Cependant, si le stress du RE persiste, l'activation soutenue de la réponse UPR conduit à une diminution de l'expression des marqueurs de son identité de la cellule  $\beta$  pancréatique, menant à un état dit « altéré ». Cet état « altéré » permet de contourner l'UPR terminale et donc la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique.

Adapté de Groen *et al* 2021.

Les souris, quant à elles, possèdent deux gènes pour l'insuline : *Ins1* et *Ins2*. Chez la souris Akita, également connue sous le nom de souris *Ins2* ou souris MODY4, une mutation spontanée du gène *Ins2* entraîne un diabète précoce (Yoshioka *et al.*, 1997). La mutation *Ins2C96Y* entraîne la perte de formation de ponts disulfures, une mauvaise conformation de la proinsuline-2 qui s'accumule dans le RE des cellules  $\beta$  pancréatiques, pour enfin déclencher à son tour la réponse UPR et l'apoptose des cellules  $\beta$  (Wang *et al.*, 1999). Les coupes histologiques de pancréas de ces souris présentent une diminution du nombre d'îlots et de la quantité d'insuline

au sein des îlots pancréatiques. Ces souris, modèle de diabète de type 1, présentent une hyperglycémie précoce, à l'âge de 4 semaines, une hypoinsulinémie, une polydipsie et une polyurie. La présence de cette mutation est corrélée à une surexpression de la Grp78 (*Izumi et al., 2003*).

Des images de microscopie électronique montre également une diminution du nombre de granules d'insuline et une expansion du RE. Des souris Akita déficientes pour le facteur pro-apoptotique CHOP ont été générées. Ces souris présentent une normalisation de la glycémie. La délétion génique de CHOP préserve les cellules  $\beta$  pancréatiques de l'apoptose et de la perte de la masse de cellules sécrétrices d'insuline (*Oyadomari et al., 2002*). Ainsi, le rôle de la réponse UPR dans la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein des Akita font de ces souris un bon modèle d'étude de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques lors du stress du RE dans le diabète de type 2 également.

#### *b. Homéostasie calcique*

En parallèle de son rôle régulateur de la protéostasie, le RE de la cellule  $\beta$  pancréatique augmente la capture du  $\text{Ca}^{2+}$  via la pompe SERCA, en réponse à des doses élevées de glucose. Aux vues de la fonction du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le bon repliement des protéines, sa recapture par le RE permet d'assurer les fonctions  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes des **chaperonnes** au cours de la biosynthèse de la proinsuline (*Corbett et al., 1999 ; Guest et al., 1997 ; Tengholm et al., 1999*). Une étude utilisant des souris hétérozygotes déficientes pour la pompe **SERCA2** soumises à un régime gras indique une diminution de la sécrétion d'insuline, due à une augmentation de la présence de proinsuline au détriment de l'insuline au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ce défaut de sécrétion d'insuline s'accompagne d'une augmentation de la réponse UPR au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques hétérozygotes pour SERCA2. Ainsi, un défaut dans la régulation de l'homéostasie calcique au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques conduit à une augmentation de la réponse UPR et un défaut de sécrétion d'insuline (*Tong et al., 2016*).

Le syndrome de Wolfram est dû à une perte de fonction de la Wolframine (gène *WFS1*) (*Khanim et al., 2001*). C'est une maladie neurodégénérative rare qui s'accompagne d'un diabète précoce. La protéine Wolframine n'appartient pas à la réponse UPR mais contribue à maintenir l'homéostasie calcique au sein du RE. Ainsi, la perte de la Wolframine engendre un stress du RE, par une diminution de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Cette dérégulation de l'homéostasie calcique conduit à l'activation de la réponse UPR, dont une augmentation de

l'expression de CHOP, responsable de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Riggs et al., 2005*). De plus, l'expression de la Wolframine est sous le contrôle du facteur de transcription sXBP1 (*Kakiuchi et al., 2006*) et donc de l'axe IRE1 $\alpha$  - sXBP1, suggérant un lien potentiel entre cette voie de signalisation de l'UPR et l'installation du diabète chez les patients (*Kakiuchi et al., 2006*).

En conditions physiologiques, la Wolframine régule négativement la réponse au stress du RE. Effectivement, cette protéine stabilise une E3 ubiquitine ligase, HRD1 (HMG-CoA Reductase Degradation Protein), impliquée dans la dégradation du facteur de transcription ATF6c. Les modèles déficients pour la Wolframine présentent une réponse au stress du RE élevée, associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de ATF6c. La mort des cellules  $\beta$  pancréatiques dans le syndrome de Wolfram pourrait également être associée à une augmentation de l'activité d'ATF6c (*Fonseca et al., 2010*).

### *c. Diabète de type 1 et Diabète de type 2 : Inflammation, hyperglycémie et hyperlipidémie*

De nombreuses études relatent la présence des marqueurs de l'UPR dans l'étiologie et la progression des diabètes (DT1 ou DT2). Que ce soit associé au diabète de type 1, avec l'apparition d'un environnement pro-inflammatoire ou dans le cadre du diabète de type 2, face aux perturbations métaboliques (hyperglycémie, hyperlipidémie, insulino-résistance), le RE se trouve face à des paramètres délétères pour son fonctionnement, impactant son homéostasie et la survie de la cellule  $\beta$  pancréatique. Comme décrit plus haut, les cellules  $\beta$  pancréatiques sont exposées à des fluctuations constantes de la glycémie, mobilisant une réponse UPR importante au sein de ces cellules, les rendant intrinsèquement plus vulnérables à un stress supplémentaire.

Dans les îlots pancréatiques de patients atteints d'un diabète de type 1 ainsi que de patients atteints d'un diabète de type 2, il a été mis en évidence la présence de marqueurs de l'UPR, comme la Grp78 et CHOP (*Laybutt et al., 2007 ; Marchetti et al., 2007 ; Marhfour et al., 2012*). De plus, les sections pancréatiques des patients atteints de diabète de type 2, analysées en microscopie électronique, présentent un RE gonflé (signe d'un stress du RE).

Au sein des modèles murins de diabète de type 1 (souris NOD) et de diabète de type 2 (souris db/db), l'isolation d'îlots pancréatiques met en évidence une augmentation de l'expression de marqueurs de l'UPR, dont la Grp78 et CHOP ainsi que sXBP1 (*Tersey et al., 2012 ; Yusta et*

*al.*, 2006). Enfin, les modèles de souris diabétiques db/db présentent une accumulation de proinsuline mal repliée dans le RE (*Arunagiri et al.*, 2019).

L'environnement pro-inflammatoire est une caractéristique physiopathologique présente dans le diabète de type 1 mais aussi dans le diabète de type 2. D'ailleurs, l'impact des cytokines pro-inflammatoires sur la réponse UPR est documenté.

En premier lieu, rappelons que le diabète de type 1 est caractérisé par l'apparition de l'« insulitis » : l'inflammation des îlots de Langerhans. L'insulitis est définie par la présence de cellules immunitaires (lymphocytes T et B) au sein de l'îlot de Langerhans. Ces cellules participent à l'installation d'un environnement pro-inflammatoire et à l'amplification de l'inflammation intra-îlot pancréatique, menant à la destruction progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques. Il s'agit du stade précoce du diabète de type 1. L'invalidation génique de IRE1 $\alpha$ , à des stades précoces inflammatoires, donc au stade « insulitis », préserve de la mort induite par les cellules immunitaires, via une augmentation de la dédifférenciation des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ce papier sera détaillé davantage plus tardivement (*Lee et al.*, 2020).

Ensuite, la littérature rapporte que la stimulation à l'aide de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$ ) de la lignée humaine de cellules  $\beta$  pancréatiques nommée les EndoC- $\beta$ H1 et d'îlots isolés de patients atteints de diabète de type 1 permet la translocation de la Grp78 à la membrane plasmique de la cellule  $\beta$  pancréatique. Cette translocation de la Grp78 est due à une modification post-traductionnelle : la citrullination (conversion d'une arginine en citrulline). Ainsi, la citrullination de la Grp78 fait de la Grp78 un auto-antigène de la cellule  $\beta$  pancréatique dans le cadre du diabète de type 1. Des anticorps et des lymphocytes T dirigés contre la Grp78 ont été identifiés au sein des souris NOD. De manière intéressante, la présence de la Grp78 à la membrane plasmique des cellules  $\beta$  pancréatiques mène à une activation de la réponse UPR, et plus particulièrement à une réponse UPR terminale (augmentation de l'expression de CHOP). Ainsi, ces études suggèrent que la Grp78 citrullinée est un auto-antigène mais aussi un facteur pro-apoptotique dans le cadre de la réponse aux cytokines pro-inflammatoires, dans le diabète de type 1 (*Buitinga et al.*, 2018 ; *Rondas et al.*, 2015 ; *Vig et al.*, 2019).

D'autre part, la présence de cytokines pro-inflammatoires a pour effet de conduire à la production d'oxyde nitrique (NO) au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique, engendrant la mort de ces cellules. De façon intéressante, des études indiquent que la présence de NO conduit à une mort de la cellule  $\beta$  pancréatique dépendante du stress du RE (*Oyadomari et al.*, 2001).



Effectivement, en réponse au NO, la lignée cellulaire murine MIN6 ainsi que les îlots isolés de souris présentent une déplétion calcique du RE suivie d'une augmentation de l'expression de CHOP. La délétion de CHOP dans ce modèle protège contre la mort induite par la production de NO. Cela met donc en évidence que le NO induirait une réponse UPR terminale et enfin à une mort dépendante du facteur pro-apoptotique CHOP. Par la suite, il a été mis en évidence que la stimulation d'une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques de rat (INS-1E) ainsi que des îlots isolés à partir de rat avec des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$ ) conduit à une déplétion calcique du RE due à l'inhibition de la pompe SERCA2b. La production de NO, en réponse à la stimulation en cytokines pro-inflammatoires, inhibe donc la pompe SERCA2b et conduit ainsi à une réponse UPR terminale, menant à la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Cardozo et al., 2005*).

En revanche, l'augmentation de la réponse UPR et de la mort suite à une production de NO en réponse aux cytokines pro-inflammatoires n'a pas été reproduite chez l'Homme (*Brozzi et al., 2015 ; Chan et al., 2011*). Ces deux études suggèrent qu'il existe un mécanisme de réponse aux cytokines pro-inflammatoires différent en fonction des espèces (rat, souris, Homme). Au sein de cellules  $\beta$  pancréatiques humaines, murines et de rat, la délétion génique ou l'inhibition pharmacologique de iNOS (enzyme productrice de NO) ont été effectuées (*Brozzi et al., 2015*). La stimulation de ces cellules  $\beta$  pancréatiques, provenant de différentes espèces, avec des cytokines pro-inflammatoires conduit, dans tous les cas, à une augmentation de la réponse UPR. Chez le rat, la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques induites par les cytokines pro-inflammatoires dépend de la production de NO. En revanche, chez l'Homme, comme chez la souris, la combinaison des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IFN $\gamma$  est suffisante pour induire une inhibition de la pompe SERCA2b avec une augmentation de la réponse UPR, et CHOP est le médiateur de la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique, indépendamment de la formation de NO (*Allagnat et al., 2012 ; Brozzi et al., 2015 ; Chan et al., 2011*).

De manière intéressante, dans les trois espèces, que ce soit chez le rat, la souris ou chez l'Homme, la délétion génique de CHOP protège de la mort induite par les cytokines pro-inflammatoires (*Shao et al., 2010*).

L'hyperglycémie ainsi que l'hyperlipidémie associées au diabète de type 2 peuvent être à l'origine du stress activant la réponse UPR, soit via l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE, soit via une activation directe des senseurs de l'UPR. La littérature rapporte que



PERK et IRE1 $\alpha$  peuvent être activés directement par les changements de composition membranaire du RE (Halbleib *et al.*, 2017). On peut supposer que l'hyperlipidémie est responsable de ces changements. De manière différente, au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique, l'hyperglycémie conduit à une augmentation de la synthèse d'insuline pouvant surcharger le RE et ainsi, activer la réponse UPR. De plus, l'hyperglycémie peut conduire à une augmentation des ROS, menant à une accumulation de protéines mal repliées dans le RE.

En conclusion, le rôle du RE via la protéostasie et l'homéostasie calcique, ainsi que la réponse UPR au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique en fait une organelle essentielle face aux fluctuations régulières de la glycémie. La réponse UPR est en premier lieu adaptative, permettant de répondre à la demande accrue en insuline de l'organisme et de mettre en place des systèmes compensatoires par la cellule  $\beta$  pancréatique, afin d'éviter la mort cellulaire. En revanche, l'inflammation, l'hyperglycémie ou encore l'hyperlipidémie challengent la réponse UPR de la cellule  $\beta$  pancréatique. Les stress du RE chroniques conduisent progressivement à une perte de l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique. Cet état « dédifférencié » permet le maintien de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques, en premier lieu. Malheureusement, ces stress du RE chroniques engendrent progressivement la réponse UPR terminale induisant l'apoptose des cellules  $\beta$ .

#### iv. Les différents acteurs de l'UPR dans le diabète

Les différents acteurs présentent des rôles distincts dans la mise en place du diabète, que nous allons introduire dans cette partie. Étonnamment, la délétion des trois acteurs de la réponse UPR peuvent avoir des effets similaires mais aussi différents, en fonction de l'âge ou du modèle dans lesquels ces protéines sont délétées (**Table 7**) (Rabhi *et al.*, 2014).

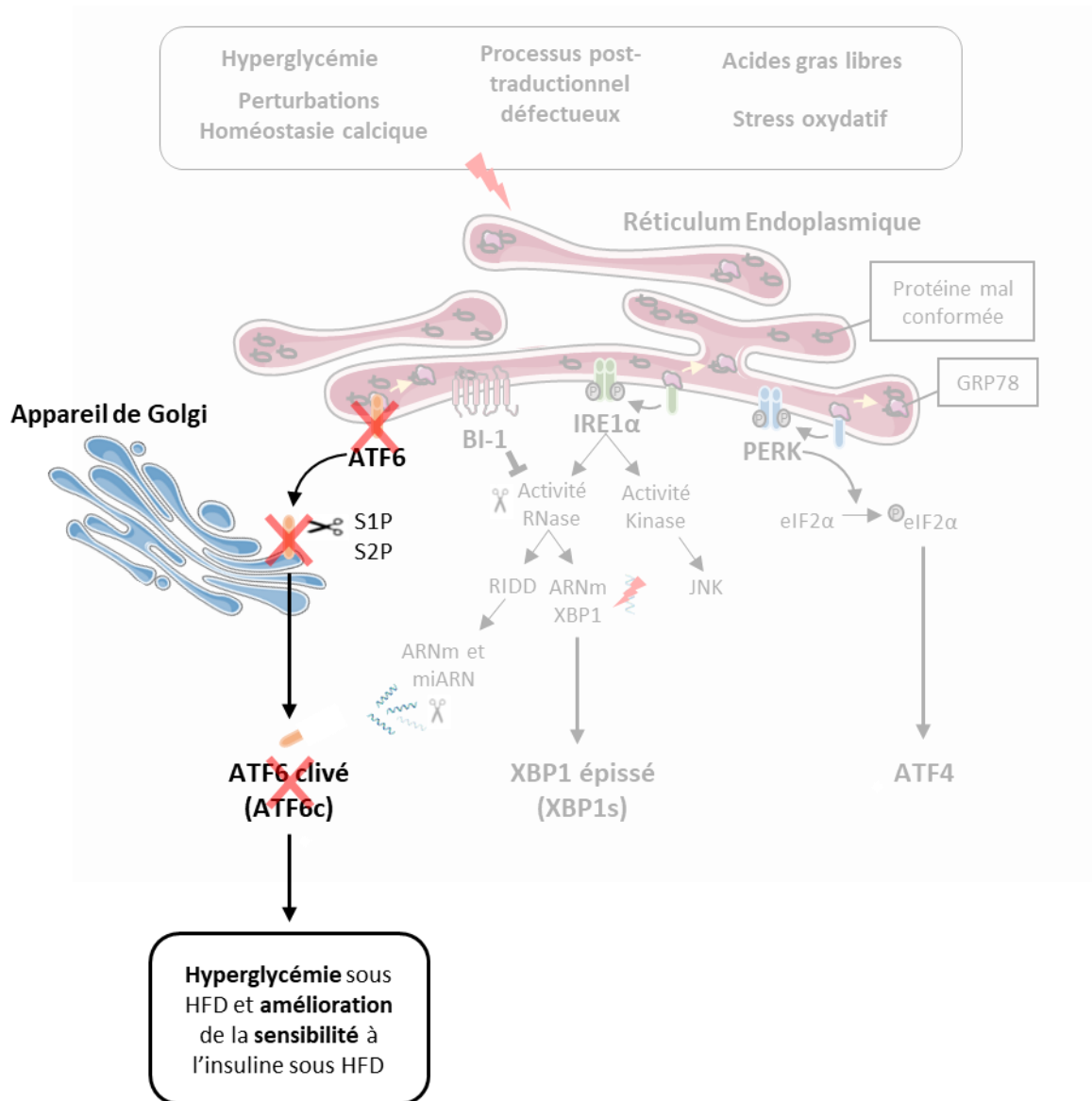
Délétion	KO	Stade de délétion	Fond génétique	Phénotype	Référence
<b>PERK</b>	Général	Embryonnaire	129svev	Diabète avec perte des cellules $\beta$ pancréatiques	<i>Harding et al, 2001</i>
	Pancréas		C57BL/6J	Diabète avec défaut de prolifération et de différenciation des cellules $\beta$ pancréatiques	<i>Zhang et al, 2006</i>
	Cellules $\beta$	Adulte	C57BL/6	Diabète avec perte des cellules $\beta$ pancréatiques	<i>Gao et al, 2012</i>
<b>eiF2<math>\alpha</math> muté sur Ser51 Hétérozygotes</b>	Général	Embryonnaire	C57BL/6J	Diabète et diminution de la sécrétion d'insuline / atteinte de la quantité de granules d'insuline, sous HFD	<i>Scheuner et al, 2005</i>
<b>ATF4</b>	Général	Embryonnaire	C57BL/6	Protège du diabète et de l'obésité induite par un régime gras	<i>Yoshizawa et al, 2009</i>
<b>CHOP</b>	Général	Embryonnaire	C57BL/6	Diminution de l'hyperglycémie et de l'intolérance au glucose sous HFD	<i>Song et al, 2008</i>
			db/db	Expansion de la masse de cellules $\beta$ pancréatiques	
			Akita	Retard dans l'installation du diabète	<i>Oyadomari et al, 2002</i>
			NOD	Pas d'effet sur l'installation du diabète mais retard dans l'apparition des auto-antigènes de l'insuline	<i>Satoh et al, 2011</i>
<b>ATF6</b>	Général	Embryonnaire	C57BL/6 Agouti Akita	Hyperglycémie sous HFD et amélioration de la sensibilité à l'insuline sous HFD	<i>Usui et al, 2012</i>
<b>IRE1<math>\alpha</math></b>	Cellules $\beta$	Embryonnaire	C57BL/6	Défaut de sécrétion d'insuline mais pas de différence dans la taille et masse des îlots Perte de la prolifération cellulaire sous HFD	<i>Xu et al, 2014</i>
		Adulte	C57BL/6	Diabète, défaut dans la sécrétion d'insuline	<i>Hassler et al, 2015</i>
		Postnatal	NOD	Protection contre le diabète via dédifférenciation des cellules $\beta$ pancréatiques	<i>Lee et al, 2020</i>
<b>XBP1</b>	Cellules $\beta$	Embryonnaire	C57BL/6	Hyperglycémie et défaut de sécrétion d'insuline	<i>Lee et al, 2011</i>
	Cellules $\beta$	Adulte	C57BL/6 ob/ob	Perte de la prolifération compensatoire des cellules $\beta$ pancréatiques, augmentation de la mort des cellules $\beta$ pancréatiques et diminution de la sécrétion d'insuline	<i>Lee et al, 2022</i>

*Tableau 7 : Modèles murins de délétion génique des senseurs de l'UPR et conséquences sur la cellule  $\beta$  et l'installation du diabète.*

### *a. ATF6*

Comme dit précédemment, ATF6 est impliqué dans la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques lors de l'augmentation de la réponse UPR à la suite d'une demande accrue d'insuline. Paradoxalement, les souris ATF6 déficientes présentent une glycémie et une sécrétion d'insuline normales, en condition basale. En revanche, lors d'un test de tolérance à l'insuline, les souris ATF6 déficientes sont plus sensibles à l'insuline que les souris sauvages, en basale et sous un régime riche en graisse. Cependant, lorsque soumises à un régime gras, les souris ATF6 déficientes présentent un RE gonflé et dilaté, au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques, qui s'accompagne d'une diminution de la sécrétion et de la quantité intracellulaire d'insuline (*Usui et al., 2012*) (**Figure 12**). Il semble donc évident que ATF6 possède un rôle important dans la survie et le maintien de la cellule  $\beta$  pancréatique, lors d'un stress du RE. D'ailleurs, des polymorphismes de ATF6 ont été identifiés dans une population de natifs américains (les Pima) atteinte de diabète de type 2 (*Thameem et al., 2006*).

Similaire au syndrome de Wolfram présentant une suractivation de ATF6, une étude a surexprimé ATF6 dans une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques de rat, les INS1-E. La surexpression de ATF6 mène à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et cela s'accompagne d'une diminution de l'expression de gènes du maintien de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique (*PDX1* et *MAFA*) (*Seo et al., 2008*).



**Figure 12 :** Délétion génique d'ATF6.

La délétion génique d'ATF6 au stade embryonnaire mène à une hyperglycémie lorsque ces souris sont soumises à un régime cétogène. En comparaison avec les souris sauvages, les souris ATF6 déficientes sont plus sensibles à l'insuline sous HFD.

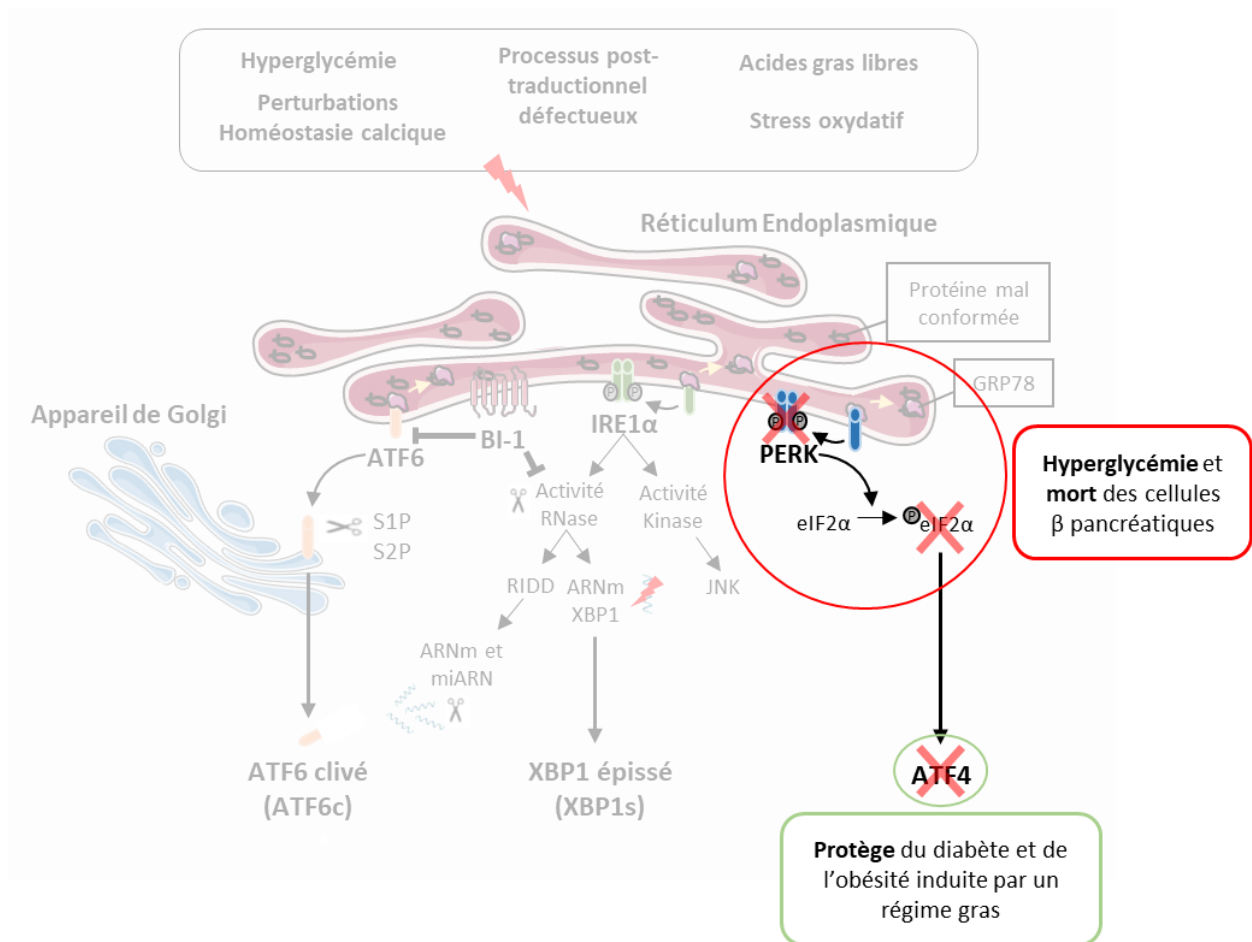
### b. PERK

L'implication de PERK dans les diabètes est fortement décrite. Le syndrome de Wolcott-Rallison est un diabète néonatal rare accompagné d'une dysplasie squelettique et d'un retard de croissance, dû à des mutations perte de fonction de l'activité kinase de PERK (Delépine et al., 2000). D'ailleurs, une étude a mené à l'identification de polymorphismes de PERK liés au diabète de type 1 dans une population du Sud de l'Inde (Allotey et al., 2004). Malgré le développement embryonnaire normal des souris déficientes pour PERK, ces souris présentent

des défauts similaires aux patients atteints d'un syndrome de Wolcott-Rallison (dysplasie squelettique, retard de développement post-natal). En revanche, la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques s'effectue en post-natal, à cause de défauts dans la machinerie de sécrétion du RE et du repliement de la proinsuline (*Harding et al., 2001 ; Zhang et al., 2002*). Le RE des cellules  $\beta$  pancréatiques déficientes pour PERK est gonflé en raison d'une augmentation excessive de la présence de proinsuline dans sa lumière. Ces cellules présentent un défaut de transport du RE vers le Golgi et de la dégradation protéasomale (*Gupta et al., 2010*). En condition basale, la délétion inductible et spécifique de PERK au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques mène à une hyperglycémie associée à une perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Gao et al., 2012*). De façon intéressante, les souris mutantes hétérozygotes pour la protéine eIF2 $\alpha$  sur la sérine 51, l'un des effecteurs directs de l'activité kinase de PERK, deviennent obèses et diabétiques en réponse à un régime riche en graisse. Ces souris présentent une intolérance au glucose, accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline en raison d'une atteinte du transport de la proinsuline et d'une diminution de la quantité de granules d'insuline au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. Ainsi, le contrôle de la traduction permet de maintenir l'intégrité du RE au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Scheuner et al., 2005*).

En revanche, les souris ATF4 déficientes ne présentent pas de défaut au niveau de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Yoshizawa et al., 2009*). Par conséquent, les effets observés dans les souris PERK déficientes ou hétérozygotes pour eIF2 $\alpha$  seraient indépendants du facteur de transcription ATF4.

Ces études démontrent le rôle vital de la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  par PERK afin de maintenir la physiologie et la survie de la cellule  $\beta$  pancréatique.



**Figure 13 :** Délétion génique de *PERK*, *eIF2α* ou *ATF4*.

La délétion génique de *PERK* ou la mutation sur le site de phosphorylation de *eIF2α* (entourées en rouge) conduisent à une hyperglycémie, une diminution de la sécrétion d'insuline et une mort des cellules  $\beta$  pancréatiques.

En revanche, la délétion génique de *ATF4* (entourée en vert) protège du diabète et de l'obésité induite par un régime gras.

### c. *IRE1α*

*IRE1α* est unique dans l'évolution par sa double activité enzymatique.

Comme mentionné précédemment, en conditions physiologiques, *IRE1α* est impliquée dans la biosynthèse de l'insuline lors d'une réponse au glucose (Lipson et al., 2006). En effet, au sein d'îlots isolés de souris et d'une lignée de cellules  $\beta$  pancréatiques de rat (INS-1), l'exposition aiguë ou chronique à une forte concentration de glucose induit une augmentation de l'activation d'*IRE1α* et de la sécrétion de l'insuline. L'exposition aiguë à une forte concentration de glucose mime l'hyperglycémie postprandiale, donc physiologique. Cette stimulation aiguë au glucose

conduit à une augmentation de la forme phosphorylée d'IRE1 $\alpha$ , ne coïncidant pas avec une augmentation de l'épissage de XBP1. Ainsi, la stimulation au glucose de manière physiologique des cellules  $\beta$  pancréatiques induit une activation d'IRE1 $\alpha$ , sans induction de son activité RNase suggérant l'implication de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$  dans la biosynthèse de l'insuline. L'expression d'un dominant négatif d'IRE1 $\alpha$ , muté sur son activité kinase, cause une diminution de l'expression de l'insuline (*Lipson et al., 2006*). En revanche, lors d'une hyperglycémie chronique, mimant des conditions physiopathologiques, la suractivation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  conduit à une dégradation de l'ARNm de l'insuline (*Lipson et al., 2008*) diminuant la surcharge en insuline néosynthétisée pour soulager le RE. Lors d'une stimulation physiologique au glucose, la protéine RACK1 permettrait le recrutement de PP2A auprès d'IRE1 $\alpha$ , afin d'inhiber son activité. Effectivement, PP2A déphosphoryle IRE1 $\alpha$ , évitant ainsi une suractivation incontrôlée d'IRE1 $\alpha$  et une production accrue d'insuline dépendante de son activation, lors de la réponse au glucose. Lors d'une stimulation chronique physiopathologique au glucose, RACK1 interagit toujours avec IRE1 $\alpha$  mais ne recrute plus PP2A. Ainsi, IRE1 $\alpha$  reste constitutivement actif en réponse à une hyperglycémie chronique (*Qiu et al., 2010*).

En conclusion, les activités kinase et RNase d'IRE1 $\alpha$  semble essentielles à la réponse au glucose et la synthèse de la proinsuline. La réponse au glucose physiologique permet une activation ciblée de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$ , induisant une synthèse régulée de l'insuline, indépendamment de son activité RNase et de sXBP1. En conditions physiopathologiques, lors d'une hyperglycémie chronique, l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  prend le relais, permettant donc la dégradation de l'ARNm de l'insuline, pour empêcher une surcharge du RE (*Corbett, 2006*).

Hassler *et al* ont développé des souris déficientes pour IRE1 $\alpha$  spécifiquement au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques de souris adultes. En condition basale, ces souris présentent une hyperglycémie ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les cellules  $\beta$  pancréatiques IRE1 $\alpha$  déficientes présentent une diminution de la quantité d'insuline intracellulaire mais aussi de la proinsuline. La diminution de la quantité de proinsuline et d'insuline dans les cellules  $\beta$  pancréatiques déficientes pour IRE1 $\alpha$  est due à une diminution de la synthèse de la proinsuline. En basale, aucune différence n'est observée entre les cellules IRE1 $\alpha$  déficientes et sauvages. En revanche, lors d'une stimulation au glucose, la délétion d'IRE1 $\alpha$  engendre la perte de l'expression de gènes associés à la traduction de l'ARNm de la proinsuline, du recrutement des ribosomes, du clivage du peptide signal et de la réponse anti-oxydante. Ainsi, IRE1 $\alpha$  joue un rôle dans l'augmentation de l'expression des gènes

responsables de la synthèse de la proinsuline, en réponse au glucose (*Hassler et al., 2015 ; Xu et al., 2014*). La délétion de IRE1 $\alpha$  dans les cellules  $\beta$  pancréatiques diminuent l'expression de protéines chaperonnes impliquées dans la formation des ponts disulfures (PDI, P5, PDIR, ERp44 et ERp46). D'ailleurs, l'effecteur de IRE1 $\alpha$ , sXBP1, possède des sites de fixation sur les promoteurs de ces différents gènes. Ainsi, l'axe IRE1 $\alpha$  - sXBP1 est impliqué dans le repliement oxydatif de la proinsuline au sein du RE (*Tsuchiya et al., 2018*).

La délétion spécifique d'IRE1 $\alpha$  au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques à des stades embryonnaires empêchent la prolifération compensatoire de ces cellules lorsque les souris sont soumises à un régime gras (*Xu et al., 2014*). Cette observation va dans le sens des données sur la prolifération induite par les cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse à l'UPR suite à une haute demande en insuline (*Sharma et al., 2015*). Cette étude montre une prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques dépendantes de ATF6. Or, lors d'une inhibition d'IRE1 $\alpha$  et de XBP1, la prolifération induite en réponse à une demande accrue en insuline est inhibée. Paradoxalement, la surexpression de XBP1 ainsi que d'IRE1 $\alpha$  inhibe également cette prolifération.

L'implication d'IRE1 $\alpha$  dans l'inflammation et la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques est davantage décrite. L'invalidation génique d'IRE1 $\alpha$  dans un modèle de souris non obèses diabétiques (souris NOD, modèle de diabète de type 1), induite à des stades précoces, avant l'installation de l'« insulitis », permet de protéger les îlots pancréatiques et de prévenir la mort des cellules  $\beta$ . Effectivement, dans ce modèle, les cellules  $\beta$  pancréatiques perdent leurs marqueurs spécifiques (comme MAFA, Ins1 et Ins2) et la perte d'IRE1 $\alpha$  engendre une dédifférenciation de la cellule  $\beta$ , les protégeant ainsi de la mort induite par les cellules immunitaires, puisque ces cellules  $\beta$  IRE1 $\alpha$  délétées ne présentent plus d'antigènes (*Lee et al., 2020*).

#### *Le rôle de XBP1.*

La délétion de XBP1 spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques mènent à une hyperglycémie et une intolérance au glucose, en condition basale. Ces souris sécrètent moins d'insuline que les souris sauvages. Ces observations s'accompagnent d'une diminution de l'aire des îlots ainsi qu'une diminution de la quantité d'insuline au sein des îlots. L'utilisation d'ARN interférents dirigés contre XBP1 dans les MIN6 démontre une augmentation de la dégradation de l'ARNm de l'insuline, corrélant avec une augmentation de la phosphorylation d'IRE1 $\alpha$ , via la perte du rétrocontrôle négatif de XBP1 sur l'activité d'IRE1 $\alpha$ . Ainsi, la délétion de XBP1



mène à une suractivation d'IRE1 $\alpha$ , responsable de la perte de sécrétion d'insuline, via une augmentation de la dégradation de l'ARNm de l'insuline (A.-H. Lee *et al.*, 2011). Récemment, une étude a démontré l'implication de XBP1 dans le maintien de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques et la survie de ces cellules. Dans des modèles de délétion de XBP1 au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques dans un modèle induit d'obésité (régime riche en graisse) et un modèle génétique (ob/ob), les souris XBP1 déficientes présentent une perte de la prolifération compensatoire des cellules  $\beta$  pancréatiques, une augmentation de la mort de ces cellules, accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes de la fonction des cellules sécrétrices d'insuline et une diminution de la sécrétion d'insuline. En revanche, cette étude ne rapporte pas d'augmentation de la signalisation d'IRE1 $\alpha$ , due à une perte du rétrocontrôle négatif de XBP1 (Lee *et al.*, 2022).

Enfin, la sous-unité p85 $\alpha$  de PI3K se lie à sXBP1 et facilite sa translocation nucléaire (Winnay and Kahn, 2011). Ainsi, Winnay *et al* ont développé des souris p85 $\alpha$  déficientes spécifiquement au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques de souris Akita. Paradoxalement, ces souris sont plus tolérantes au glucose que les Akita contrôles. Cette observation est due à une diminution de la réponse UPR ainsi qu'une augmentation de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques, due à une diminution de la mort induite par le stress du RE. De manière intéressante, les souris Akita déficientes pour p85 $\alpha$  ont une diminution de l'activité d'IRE1 $\alpha$  en comparaison avec les souris Akita contrôles, qui présentent à *contrario* une hyperactivation d'IRE1 $\alpha$ , associée avec une augmentation de la mort au sein des îlots pancréatiques (Winnay *et al.*, 2014). Ces données sont en accord avec une autre étude effectuée *in vitro* sur des lignées de cellules  $\beta$  pancréatiques ou des îlots isolés. La surexpression de XBP1 diminue la sécrétion d'insuline et augmente la mort par apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques (Allagnat *et al.*, 2010).

Aux vues du rôle essentiel de XBP1 dans le maintien de la fonction et la physiologie de la cellule  $\beta$  pancréatique, en basale ou en conditions physiopathologiques, la délétion ou la surexpression de XBP1 semblent délétères.

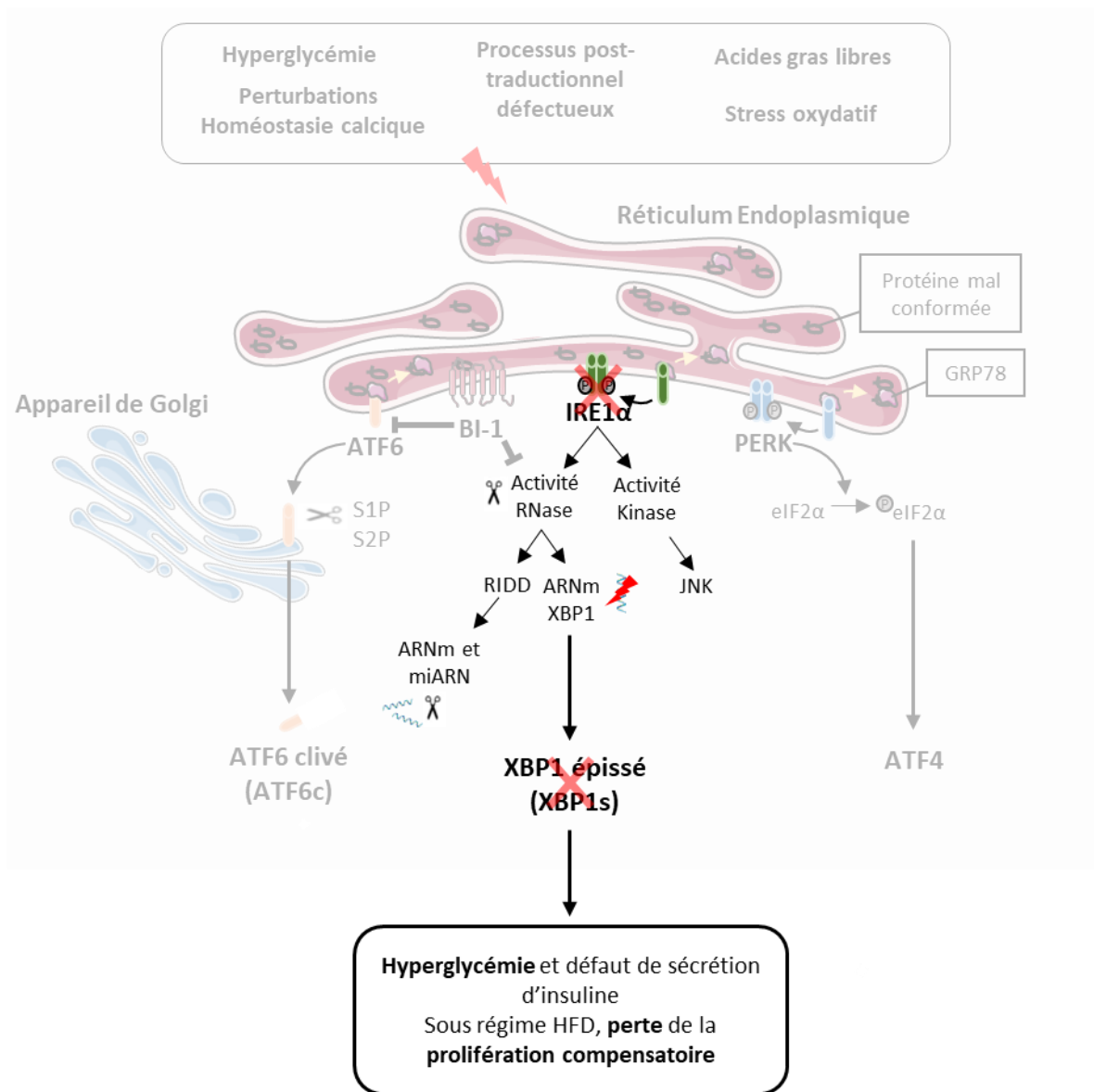
Distinguer les implications de sXBP1 ou de IRE1 $\alpha$  reste encore un défi et doit être élucidé pleinement, au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique. Ainsi, l'axe IRE1 $\alpha$ /sXBP1 présente une signalisation finement régulée dans la cellule  $\beta$  pancréatique, responsable de la réponse au glucose, de la synthèse de l'insuline ainsi que de la prolifération et le maintien de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique.

*L'axe IRE1 $\alpha$  – XBP1-RIDD dans l'inflammation des îlots.*

Une étude a mis en évidence le rôle d'IRE1 $\alpha$  et de XBP1 dans la mise en place de l'inflammation au sein des îlots de Langerhans. Via l'inactivation génique de XBP1 par un ARN interférent, cette étude démontre que sXBP1 permet une inhibition de FOXO1, une protéine responsable de l'inhibition de NF $\kappa$ B. Ainsi, l'axe IRE1 $\alpha$  - sXBP1 permet une augmentation de l'activité de NF $\kappa$ B et ainsi une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement de l'îlot de Langerhans (*Miani et al., 2012*). De plus, comme décrit précédemment, IRE1 $\alpha$ , par son activité kinase, augmente aussi l'activité de NF $\kappa$ B, via l'activation des JNKs, qui pourrait ainsi être responsable de l'environnement pro-inflammatoire de l'îlot.

IRE1 $\alpha$  augmente l'expression de TXNIP en clivant le microARN miR17 via son activité RNase, responsable de la dégradation de l'ARNm de TXNIP. L'augmentation de l'expression de TXNIP induit une activation de NLRP3 et ainsi de l'IL-1 $\beta$ . En conclusion, IRE1 $\alpha$  participe à l'inflammation au sein de l'îlot de Langerhans (*Osowski et al., 2012*).

Enfin, chez l'Homme, des polymorphismes d'IRE1 $\alpha$  et de BI-1 n'ont pas été associés au diabète. En revanche, des polymorphismes dans le promoteur de XBP1 ont été associés à une prédisposition à l'obésité et au diabète de type 2. (*Feng et al., 2014 ; Liu et al., 2016 ; Yilmaz et al., 2010*).



**Figure 14 :** Délétion génique de *IRE1α* et *XBP1* au stade embryonnaire et chez l'adulte.

La délétion génique d'*IRE1α* et de *XBP1* conduisent à un phénotype similaire. Les souris *IRE1α* déficientes présentent une hyperglycémie, une perte de la sécrétion d'insuline due à un défaut de synthèse de l'insuline. Les souris délétée pour *XBP1* présentent le même phénotype. De plus, sous régime cétogène, les cellules  $\beta$  pancréatiques *IRE1α* délétées ou *XBP1* délétées perdent leur capacité proliférative.

## B. Les inhibiteurs pharmacologiques de l'UPR et le Diabète

L'importance du stress du RE dans la perte de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique en fait une cible de choix afin de corriger les défauts associés au diabète.

Certaines molécules utilisées actuellement dans le traitement du diabète de type 2 présentent des effets bénéfiques sur le stress du RE. Effectivement, à contrario des sulfonyles, qui

augmentent le stress du RE et la réponse UPR au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique sur le long terme, les analogues du GLP1 diminuent la réponse au stress du RE au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique et empêchent la mort induite par le stress du RE (*Cunha et al., 2014, 2009 ; Kim et al., 2012 ; Yamane et al., 2011 ; Yusta et al., 2006*). De manière intéressante, une étude clinique est menée sur un analogue du GLP1, Liraglutide, sur le stress du RE au sein de patients obèses atteints d'un diabète de type 2 (ClinicalTrial : NCT02344186).

#### i. Les chaperonnes chimiques

Parmi les molécules utilisées afin de diminuer le stress du RE et la réponse UPR, le TUDCA et le 4PBA sont les molécules ayant eu des effets positifs sur les modèles de diabète de type 1 et de type 2. Ces molécules sont des chaperonnes pharmacologiques ou aussi nommées chaperonnes chimiques. Ces molécules pharmacologiques permettent une stabilisation de la conformation des protéines et ainsi une amélioration de la capacité de repliement du RE (*Welch and Brown, 1996*). Au sein de modèles de diabète de type 1 et de diabète de type 2, ces chaperonnes pharmacologiques normalisent la glycémie, améliorent la sécrétion d'insuline mais aussi préviennent la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Cadavez et al., 2014 ; Engin et al., 2013 ; Ozcan et al., 2006 ; Xiao et al., 2011*). D'ailleurs, le TUDCA est actuellement en essai clinique pour le diabète de type 1 et des résultats ont été publiés sur le diabète de type 2 et plus particulièrement sur l'insulino-résistance périphérique (*Kars et al., 2010 ; Rosa et al., 2021*). Cette étude montre une re-sensibilisation à l'insuline du foie et des muscles lors d'un traitement au TUDCA, en comparaison avec les patients contrôles.

#### ii. Les inhibiteurs spécifiques des voies de l'UPR

Les études des bénéfices des traitements avec les chaperonnes chimiques dans différentes pathologies, mais aussi leurs limitations, ont conduit au développement d'inhibiteurs dédiés aux senseurs de la réponse UPR, afin d'être davantage spécifique dans le ciblage pharmacologique (*Grandjean and Wiseman, 2020*). Effectivement, la réponse UPR et l'activation des différents senseurs semblent primordiales dans l'installation de nombreuses pathologies dont le diabète. De plus, chaque senseur est potentiellement activé, à des moments différents, en fonction de la pathologie et de l'individu. Ainsi, ces différents inhibiteurs auraient une portée pharmacologique large pour toutes les pathologies associées au stress du RE et à la

réponse UPR. Certains inhibiteurs des senseurs de l'UPR ont été testés dans différents modèles murins de diabète et sont décrits ci-dessous.

#### *a. ATF6*

ATF6 est la voie de l'UPR, qui reste la moins étudiée, par le fait qu'elle soit la dernière des voies de l'UPR à avoir été découverte et que peu d'outils spécifiques d'ATF6 (anticorps, activateurs, inhibiteurs) ont pu être développés. Récemment l'équipe de Peter Walter a pu développer des composés inhibiteurs relativement spécifiques d'ATF6 : les Ceapins, permettant l'inhibition des protéases responsables de son clivage au niveau de l'appareil de Golgi, sans impacter les voies IRE1 $\alpha$  et PERK. En termes de limitation, notons que ces nouveaux inhibiteurs pourraient aussi interférer avec d'autres protéines, dont la signalisation dépend de ces protéases. Enfin, une seule étude montre l'utilisation d'AEBSF, un inhibiteur de protéases, utilisé préalablement dans le domaine pour inhiber ATF6, dans un contexte du pancréas (*Sharma et al., 2015*). Effectivement, grâce à cette étude et l'utilisation de cette inhibiteur, le rôle d'ATF6 dans la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques à la suite d'une demande accrue en insuline a été mis en évidence.

#### *b. PERK*

Certains inhibiteurs de PERK, surtout le GSK2606414, ont été étudiés afin de diminuer la mort induite par la signalisation de PERK, qui augmente l'expression de CHOP (*Axten et al., 2012*). Ainsi, ces inhibiteurs ont été testés en premier lieu dans les maladies à prion, maladies dues à une accumulation de protéines prions mal conformées, responsables de l'activation de l'UPR et de l'apoptose (*Moreno et al., 2013*). Dans ce modèle, le traitement avec le GSK2606414 conduit à une hyperglycémie ainsi qu'une destruction du pancréas exocrine. Cette observation rappelle le phénotype induit par la délétion génique de PERK dans les modèles murins. Paradoxalement, la littérature rapporte également que l'utilisation de doses faibles du GSK2606414 permet une correction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, *in vitro*. *In vivo*, l'utilisation du GSK2656157, un autre inhibiteur de PERK, corrigent l'hyperglycémie et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, dans des souris soumises à un régime riche en graisse et injectées à la streptozotocine, une molécule induisant la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Kim et al., 2019, 2018*). En conclusion, ces données montrent que l'inhibition excessive de PERK peut être délétère, puisque cela conduit à une déphosphorylation excessive

de eIF2 $\alpha$  maintenant la traduction des protéines et la surcharge du RE en protéines mal repliées. Ainsi, des études supplémentaires devront être réalisées pour définir précisément les posologies des inhibiteurs de PERK à administrer afin d'induire une sécrétion d'insuline sans conduire à la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques. Également, l'utilisation d'inhibiteurs de la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$ , le guanabenz et le salubrinal, peut être à la fois toxique mais également protecteur contre le stress du RE au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique (*Abdulkarim et al., 2017 ; Cnop et al., 2007*).

### c. *IRE1 $\alpha$*

Des stratégies visant à cibler soit l'activité kinase soit l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  ont été développées. Les inhibiteurs, dernière génération, de l'activité kinase sont les KIRAs pour **K**inase **I**nhibitor **R**Nase **A**ttenuator (*Mahameed et al., 2019*). Au sein des souris Akita, présentant un stress du RE induisant une mort des cellules  $\beta$  pancréatiques, le KIRA6 permet de normaliser l'hyperglycémie en augmentant la quantité d'insuline sérique. L'augmentation de la quantité d'insuline sérique est corrélée à une augmentation de l'aire des îlots, via une diminution de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Ghosh et al., 2014*). Similairement au KIRA6, le KIRA8, possédant une meilleure pharmacocinétique, permet une diminution de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques induites par le stress du RE. Cette même molécule bloque la progression du diabète au sein des souris NOD (*Morita et al., 2017*). Dans cette étude, l'inhibition de la famille des ABL kinases permet aussi de contre-carrer l'oligomérisation d'IRE1 $\alpha$  et de corriger le diabète. Effectivement, la famille des ABL kinases interagit avec IRE1 $\alpha$  et la maintient dans un état hyperactivé, sous forme d'oligomères. L'inhibition de cette famille de protéines, via l'imatinib, permet de corriger le diabète et de diminuer la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques, en inhibant la suractivation d'IRE1 $\alpha$  (*Morita et al., 2017*). L'imatinib est d'ailleurs en essai clinique, en phase 2, pour le diabète de type 1 (*Gitelman et al., 2021*).

L'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  peut être également ciblée pharmacologiquement. Récemment, une étude a montré l'implication de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  dans le développement du diabète mais aussi la possibilité de corriger ce dernier en inhibant IRE1 $\alpha$  et son activité RNase (*Herlea-Pana et al., 2021*). Au sein d'un modèle de souris Akita, présentant une mutation sur le gène *INS2*, deux inhibiteurs spécifiques de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  permettent de corriger l'hyperglycémie de ces souris et d'améliorer la réponse au glucose, ainsi que d'augmenter la quantité d'insuline sérique. Pour conclure, l'inhibition de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , via le STF-

083010 et le 4 $\mu$ 8c, limite la progression du diabète en diminuant la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques, au sein des souris Akita.

Ces effets bénéfiques au sein de ce modèle pourraient aussi venir de l'inhibition indirecte de TXNIP. Effectivement, comme dit précédemment, TXNIP est induit par l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  qui clive miR17 (*Oslowski et al., 2012*). Or, l'inhibition de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  permettrait d'inhiber l'augmentation de l'expression de TXNIP, inhibant l'inflammasome NLRP3 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et *in fine* bloquant la pyroptose des cellules  $\beta$  pancréatiques. D'ailleurs, des inhibiteurs de TXNIP ont été développés afin d'identifier de nouvelles molécules pouvant devenir des thérapies pour le diabète (*Thielen et al., 2020*).

Pour conclure, dans la prise en charge du diabète, l'inhibition de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  semblerait pertinente afin de diminuer les différents facteurs responsables de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques : le stress du RE et l'inflammation, ainsi que les désordres métaboliques associés (dont l'insulino-résistance).

## OBJECTIFS

---

Le diabète est une pathologie en continuelle expansion à l'échelle mondiale, en raison de l'augmentation de la prévalence de l'obésité. L'obésité est associée à une insulino-résistance périphérique favorisant le développement de maladies métaboliques, dont le diabète de type 2. Sur le long terme, le diabète de type 2 mène à une perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques. Les mécanismes sous-jacents restent encore peu compris. De plus, aucun traitement du diabète de type 2 ne permet de prévenir à la fois la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques et améliorer la sensibilité à l'insuline.

Lors de l'obésité, la réponse du réticulum endoplasmique (RE) contribue à la résistance périphérique à l'insuline, à la perte prématurée des cellules  $\beta$  pancréatiques et au diabète précoce chez l'Homme et dans les modèles animaux.

En effet, lors des perturbations métaboliques associées à l'obésité, le RE engage la réponse aux protéines mal-conformées (UPR), pour préserver l'homéostasie cellulaire. L'UPR est médiée par trois protéines transmembranaires : IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6. L'UPR peut induire l'apoptose et l'inflammation des cellules  $\beta$  pancréatiques grâce à la protéine homologue C/EBP (CHOP). Les études montrent que des mutations dans des gènes critiques pour la fonction du RE entraînent une défaillance des cellules  $\beta$ , des perturbations des métabolismes du glucose et des lipides, avec l'apparition de syndromes diabétiques chez l'Homme et dans des modèles murins.

Les cellules  $\beta$  pancréatiques sont responsables de la synthèse, du stockage et de la sécrétion de l'insuline. L'induction physiologique de l'UPR est bénéfique pour l'adaptation des cellules  $\beta$  face à la demande constante de sécrétion d'insuline en réponse aux nutriments. Par conséquent, les cellules  $\beta$  sont intrinsèquement plus sensibles à toute pression supplémentaire exercée potentiellement au sein du RE.

Un rôle majeur de l'UPR dans le contexte de la perte des cellules  $\beta$  pancréatiques conduisant au diabète a été suggéré. En effet, dans des conditions d'obésité induite pathologiquement, l'activation prolongée du stress du RE entraverait la fonction des cellules  $\beta$ , entraînant une perte progressive de la sécrétion et leur mort par apoptose.

Nous avons postulé que Bax Inhibitor-1 (BI-1), une protéine transmembranaire du RE conservée dans l'évolution et un suppresseur de mort cellulaire, pourrait jouer un rôle dans la



physiopathologie du diabète (Bailly-Maitre et al., 2010). Étant donné que BI-1 est un régulateur négatif de l'activité endoribonucléase (RNase) d'IRE1 $\alpha$ , le senseur de l'UPR le plus conservé, la suppression génique de *BI-1* pourrait sensibiliser le pancréas à la mort des cellules  $\beta$ , à des perturbations de la fonctionnalité des cellules  $\beta$  (maturation, sécrétion de l'insuline) et contribuer au DT2.

En combinant des approches complémentaires, à la fois : *i) in vivo* au sein d'un modèle de souris déficientes pour *BI-1*, en conditions physiologiques et d'obésité induite par un régime hyperlipidique, *ii) ex vivo* au sein d'îlots pancréatiques isolés à partir des souris citées, et *iii) in vitro* au sein de lignées de cellules  $\beta$  pancréatiques d'origine murine et humaine, nos objectifs ont été de :

- 1- *Caractériser les rôles de BI-1 dans la mort cellulaire programmée des cellules  $\beta$  pancréatiques et son impact potentiel sur les fonctions physiologiques de la cellule  $\beta$  (maturation et sécrétion d'insuline), l'inflammation et l'homéostasie du glucose.*
- 2- *Caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents régulés par BI-1.*
- 3- *Évaluer une approche thérapeutique ciblant la voie IRE1 $\alpha$  suractivée, chez la souris déficiente pour BI-1, visant à améliorer à la fois la souffrance pancréatique et les désordres métaboliques.*

## RÉSULTATS

---

### **Bax Inhibitor 1 protects against pancreatic beta cell death and metabolic disorders**

**Marina Blanc<sup>1</sup>, Peng Xiao<sup>2</sup>, Cynthia Lebeaupin<sup>3</sup>, Marion Janona<sup>1</sup>, Lama Habbouche<sup>1</sup>, Nathalie Vaillant<sup>1</sup>, Marie Hironnelle<sup>1</sup>, Jérôme Gilleron<sup>4</sup>, Florent Murcy<sup>1</sup>, Déborah Rousseau<sup>5</sup>, Carmelo Luci<sup>5</sup>, Sandra Lacas-Gervais<sup>6</sup>, Laurent Yvan-Charvet<sup>1</sup>, Philippe Gual<sup>5</sup>, Alessandra K. Cardozo<sup>2</sup>, Béatrice Bailly-Maitre<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur (UCA), Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France (MB, MJ, B.B.M., L.Y.C.) Team "Metainflammation, Metabolic Diseases and Cancers", France.

<sup>2</sup> Inflammation and Cell Death Signalling group, Laboratory of Gastroenterology & Endotoxins, Medical Faculty, Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgique.

<sup>3</sup> Degenerative Diseases Program, SBP Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037, USA. Division of Metabolism and Endocrinology, Department of Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA.

<sup>4</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team « Cellular and Molecular Physiopathology of Obesity », France.

<sup>5</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Team « Chronic Liver Diseases Associated with Obesity and Alcohol », France.

<sup>6</sup> Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée, CCMA, France.

Address correspondence to BBM: [beatrice.bailly-maitre@unice.fr](mailto:beatrice.bailly-maitre@unice.fr)

## ***Introduction***

The prevalence of obesity steadily increases worldwide. Obesity leads to insulin resistance favouring the development of metabolic diseases including type 2 diabetes (T2D). According to the World Health Organisation (WHO), T2D affects 380 million individuals worldwide and is predicted to double by 2030. Increasing our understanding of the molecular pathways behind the loss of functional  $\beta$  cell mass and the inhibition of insulin signal transduction remains a crucial challenge to define new therapeutic strategies. Growing experimental evidence suggests that during obesity the endoplasmic reticulum (ER) responses contribute to peripheral insulin resistance, premature loss of pancreatic  $\beta$  cells, and early-onset diabetes in humans and in animal models<sup>1</sup>.

Indeed, upon obesity-associated metabolic perturbation, the ER engages an evolutionarily conserved unfolded protein response (UPR) to preserve cellular homeostasis. The UPR is mediated by three transmembrane sensors: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 $\alpha$ ), PKR-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6). Chronically activated ER stress shifts the UPR from an adaptive to a “terminal” signaling cascade that can induce pancreatic  $\beta$  cell apoptosis and inflammation through C/EBP homologous protein (CHOP). Mutations in genes critical for ER function result in  $\beta$  cell failure and diabetes syndromes in humans and mice<sup>2,3</sup>.

Pancreatic  $\beta$  cells, as the guardians of glucose homeostasis, are responsible for insulin synthesis, storage, and secretion. Physiological induction of the UPR is beneficial for  $\beta$  cell adaptation to ever-changing demand for insulin secretion in response to nutrient stimulation. Consequently,  $\beta$  cells are intrinsically more sensitive to additional ER pressure and a major role of the UPR in the context of  $\beta$  cell loss leading to diabetes has been suggested. Indeed, under pathological obese-conditions (e.g glucose, lipids) prolonged activation of ER stress hinders  $\beta$  cell function, leading to a progressive loss of insulin secretion by pancreatic  $\beta$  cells due to apoptosis<sup>4</sup>. Interestingly, misfolded insulin alone can provoke diabetes in both mice and humans. For example, in the Akita mouse, the Ins<sup>2C96Y</sup> mutation results in misfolded insulin accumulation in the pancreatic  $\beta$  cell ER, that triggers in turn ER stress activation and  $\beta$  cell apoptosis, specifically by CHOP<sup>5</sup>. Since then, studies have strengthened the causal role of ER-mediated cell death and inflammation in diabetes<sup>6,7</sup>. Discovering new key links in the switching process

from adaptative to terminal UPR resulting in pancreatic  $\beta$  cell death during ER stress, may be major inroads into diabetes treatment.

We postulated that Bax Inhibitor-1 (BI-1), an evolutionary conserved ER-transmembrane protein and cell death suppressor, could play a role into the pathophysiology of diabetes<sup>8</sup>. BI-1 deletion could sensitize the pancreas to  $\beta$  cell death and contribute to T2D, given that BI-1 is a negative regulator of IRE1 $\alpha$ , the most conserved UPR sensor. IRE1 $\alpha$  is endowed with serine/threonine kinase and endoribonuclease (RNase) activities. Through its RNase activity, IRE1 $\alpha$  leads to the unconventional splicing of XBP1 mRNA, translated into a transcription factor, sXBP1, that promotes ER protein folding and the adaptative UPR. Under chronic ER stress, sXBP1 can activate the expression of target genes implicated in inflammation and apoptosis, including CHOP. The IRE1 $\alpha$ 's RNase activity also cleaves mRNAs and miRNA through regulated IRE1 $\alpha$ -dependent decay (RIDD) contributing to inflammation, metabolic perturbations, and programmed cell death<sup>9</sup>. Recently, IRE1 $\alpha$  was reported to cleave miR17, a miRNA directed against TXNIP. miR17 cleavage leads to thioredoxin-interacting protein (TXNIP) accumulation, the activation of the NLRP3 inflammasome, a major contributor of pro-inflammatory and pro-diabetic pathways notably through the caspase-1- or -11-dependent proteolytic maturation of the proinflammatory cytokines, interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-18. Under IRE1 $\alpha$  and PERK signaling, sustained activation of NLRP3 inflammasome triggers pyroptosis, another form of programmed cell death that contributes to diabetes progression in humans and mice<sup>10,11</sup>.

We reported that the UPR, in particular, IRE1 $\alpha$  and PERK branches activate the NLRP3 inflammasome and induce hepatocyte death through CHOP activation in steatohepatitis<sup>12</sup>. We next found that BI-1 protects from an IRE1 $\alpha$ -dependent metabolic derailment coupled to activation of the NLRP3 inflammasome, liver injury with hepatocyte loss attributed to programmed cell death in steatohepatitis<sup>13</sup>. Since the liver and pancreas are both professional secretor organs, we here reasoned that BI-1 deficiency might aggravate the pancreatic  $\beta$  cell sensitivity toward unrestricted IRE1 $\alpha$  signaling-induced NLRP3 inflammasome activation, programmed cell death,  $\beta$ -cell dysfunction and metabolic dysfunction contributing to the onset of type 2 diabetes. Our results reveal an important role for BI-1 in the adaptation of secretory cells from ER stress in the context of supraphysiological loads of insulin production.

## **Results**

*BI-1 deficiency causes ER stress in islets, resulting in a reduction in serum insulin levels and hyperglycaemia in physiological conditions.*

We reported that BI-1 deletion in mice render the liver more vulnerable to injury induced by ER stress. BI-1 deficient (*BI-1<sup>-/-</sup>*) mice developed non-alcoholic steatohepatitis (NASH) after acute ER stress induced by tunicamycin injection or chronically by a long-term High Fat Diet (9 months of HFD) feeding, due to enhanced IRE1 $\alpha$  RNase activity and accumulation of its product, sXBP1<sup>13</sup>.

As sXBP1 is a transcription factor that plays a crucial role in the development of professional secretory cells, we here hypothesized that *BI-1* deficiency could also predispose to pancreatic disorders, resulting in altered insulin secretion, impairment in glucose homeostasis through the hyperactivation of the IRE1 $\alpha$ /sXBP1 pathway in  $\beta$ -cells.

We sought to examine the phenotypic consequences of the presumed increased in ER stress marker sXBP1 in the pancreas of *BI-1<sup>-/-</sup>* mice in physiological conditions. We first studied the regulation of blood glucose, which depends on the ability of the endocrine portion of the pancreas to secrete insulin appropriately.

To that end, we followed the occurrence of hyperglycaemia in random fed young and adult male mice lacking *BI-1* (*Figure 1A*). Between birth and 4 weeks of age, we did not observe any variations in blood glucose levels between *BI-1<sup>-/-</sup>* and *BI-1<sup>+/+</sup>* mice. Between 4 and 8 weeks of age, *BI-1<sup>-/-</sup>* male mice exhibited a significant deterioration in glycemic control. After 8 weeks and until at least 24 weeks of age, all *BI-1<sup>-/-</sup>* mice animals had markedly elevated blood glucose levels (*Figure 1A*).

The increase in blood glucose levels was independent of body weight gain. No differences were observed between normal diet-fed *BI-1* WT and *BI-1*<sup>-/-</sup> littermates mice sacrificed at 6 months of age under steady-state conditions (*Figure 1B*).

However, *BI-1*<sup>-/-</sup> mice had significantly less serum insulin levels compared to wild-type littermates (*Figure 1C*) suggesting that *BI-1*-deficient  $\beta$ -cells may secrete insufficient amounts of insulin required to maintain normal glucose levels.

Insulin synthesis and secretion from pancreatic  $\beta$ -cells are dynamically regulated by environmental changes that may impose burdens on the islet cell. Interestingly, we did not observe any differences in triglycerides, cholesterol, and free fatty acid levels in the sera from those mice (*Figure 1SA, 1SB, 1SC*). These results indicate that the hyperglycemia in *BI-1*<sup>-/-</sup> male mice may be primarily due to the failure of the endocrine pancreas to secrete adequate amounts of insulin, rather than a consequence of peripheral resistance to the action of the hormone.

To explore this idea further, we performed histological analysis of the pancreatic sections. Hematoxylin eosin staining analysis confirmed significant reduction of pancreatic islet mass in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice, while no differences were observed in the exocrine pancreas structure between WT and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice (*Figure 1D*). In line with this observation, *BI-1*<sup>-/-</sup> mice exhibited a statistically significant reduction in glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and loss of first phase insulin release compared to WT mice (*Figure 1D*). We also compared blood glucose levels in wild-type and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice following an intraperitoneal glucose injection. Wild-type mice cleared the glucose load more rapidly than the *BI-1*<sup>-/-</sup> mice, indicating a defect in glycemic control in the *BI-1*<sup>-/-</sup> mice. Thus, *BI-1* deficiency leads to glucose intolerance (*Figure 1SD-E*) and a reduced response to insulin (*Figure 1SF-G*). Measuring energy expenditure in male *BI-1*<sup>-/-</sup> mice did not reveal any differences compared to WT controls (*Data not shown*).

Concerning ER stress pathways, we confirmed significant increase in the *XBPI* mRNA levels in isolated  $\beta$ -cells from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice compared to WT controls, reflecting overactive IRE1 $\alpha$

RNase (*Figure 1E*). We also observed an increased in pro-apoptotic *CHOP* levels with unchanged *BIP* mRNA levels that could favor apoptosis in these  $\beta$ -cells.

Hence, a deficiency in BI-1, resulting in unrestrained IRE1 $\alpha$ /XBP1 signaling, may predispose to the progressive beta-cell dysfunction, a hallmark of diabetes.

*BI-1 deletion leads to a reduction in the number of pancreatic islets, impairs insulin maturation and packaging.*

To examine further the anatomic basis for the hyperglycemia phenotype of *BI-1*<sup>-/-</sup> mice, we performed immuno-staining of the pancreatic sections with insulin and glucagon, in comparison to WT mice. Correlating with our previous H&E analysis, glucagon immuno-staining revealed no differences on pancreatic  $\alpha$  cells mass, location, and repartition (*Figure 2A*) between WT and *BI-1*<sup>-/-</sup> deficient mice, suggesting no glucagon insufficiency in the endocrine pancreas of *BI-1*<sup>-/-</sup> mice.

Taking advantage of insulin staining, we quantified the pancreatic islet size ( $\mu\text{m}^2$ ) and the number of islets per  $\text{mm}^2$ . *BI-1* deletion does not alter islet size compared to WT controls (*Figure 2B*). However, *BI-1* deficiency did affect functional  $\beta$ -cell mass in pancreatic sections, with fewer islets per  $\text{mm}^2$  compared to WT mice (*Figure 2C*).

These results are in accordance with the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (*Figure 1D*) and with the reduced serum insulin levels in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice (*Figure 1C*). Importantly, alteration in pancreatic  $\beta$ -cell mass is a major component of impaired glucose homeostasis and overt diabetes.

To further explore the pancreatic  $\beta$ -cell phenotype, we performed transmission electron microscopy (TEM). Interestingly, TEM revealed that pancreatic sections from *BI-1*-deficient mice presented signs of stress, deterioration, and apoptotic features in  $\beta$  cells, with chromatin

and cytosol condensation, altered mitochondria (*Figure 2D*). Importantly, apoptosis and mitochondrial dysfunction of  $\beta$ -cell are hallmarks of T2D. In addition, the presence of lipofuscin granules, a marker of senescence was also observed only in *BI-1*<sup>-/-</sup>  $\beta$ -cells (*Figure 2D*). Remarkably, the physiology of the  $\alpha$  cell looks well-preserved in the pancreatic sections from *BI-1* deficient mice. Together, these results suggest that BI-1 expression might confer cytoprotection against intracellular stresses to preserve  $\beta$ -cell mass from both apoptosis and senescence.

In T2D patients and in animal models of diabetes (*db/db*), increasing evidence indicates that over-stimulating proinsulin synthesis can cause proinsulin misfolding, impairs both insulin maturation and storage in  $\beta$ -cell causing  $\beta$ -cell dysfunction. From our TEM images, we then quantified the total insulin granules per mm<sup>2</sup> and the percentage of immature granules. Insulin granule morphology was next assessed by quantitative analysis of islet electron microscopic images. Typical mature insulin granules were defined exactly according to previously published protocols and exhibited a dense homogenous core with a clear halo, whereas immature granules exhibited an empty or lighter core and the absence of a defined halo (*Figure 2E*). No differences in the number of total insulin granules per mm<sup>2</sup> were observed between *BI-1*<sup>-/-</sup> and WT  $\beta$ -cells (*Figure 2F*), while the quantification of the percentage of immature insulin granules revealed a significant nearly two-fold increase in *BI-1*<sup>-/-</sup>  $\beta$ -cells compared to *BI-1*<sup>+/+</sup> controls (*Figure 2G*). This observation was confirmed by an insulin immunogold staining experiment. Indeed, the staining looks stronger in BI-1 deficient mice insulin granules (b, d) than in WT (a, c), particularly in immature granules (IG) which clearly appear more numerous (surrounded by a line in BI-1 deficient mice) (*Figure 2I*).

Importantly, the presence of rod-like granules (*Figure 2H*), a TEM-structure resulting from a default in insulin crystallisation and packaging was specifically detected, and significantly more abundant in *BI-1*<sup>-/-</sup>  $\beta$ -cells. To conclude, *BI-1* deletion seems to decrease the total number of pancreatic islets, correlating with enhanced immature insulin granules content in  $\beta$ -cells, defects in insulin crystallisation and packaging, associated with ultra-structural features of apoptosis and senescence. These results suggest a protective role for BI-1 in the pancreatic  $\beta$  cells survival and physiology.



*Lack of BI-1 induces ER stress in  $\beta$ -cells, increases UPR signalling and activates NLRP3 inflammasome leading to pancreatic injury.*

Classical TEM-morphological features of  $\beta$ -cell apoptosis were previously detected in pancreatic sections from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice (*Figure 2D*). It is well established that ER stress contributes to  $\beta$ -cell loss. We also observed during our TEM analysis that *BI-1*<sup>-/-</sup>  $\beta$ -cells presented important signs of ER stress, with swollen and fragmented ER morphology. This suggests that loss of BI-1 may render  $\beta$ -cells more vulnerable to ER stress and apoptosis (*Figure 3A*).

BI-1 is an anti-apoptotic protein exclusively anchored in the ER membrane. Notably, BI-1 physically binds to IRE1 $\alpha$ , conferring protection against its RNase activity. We hypothesized that loss of BI-1 expression would alter the UPR response in  $\beta$  cells when facing abnormal accumulation of immature insulin. Indeed, abnormal accumulation of immature insulin has been associated with higher levels of ER stress and UPR activation in several studies<sup>14</sup>.

Immunoblotting analysis revealed that protein levels of phosphorylated-IRE1 $\alpha$ , sXBP1 and ATF4 were highest in pancreas isolated from *BI-1*<sup>-/-</sup> compared to WT mice (*Figure 3B*). The level of phosphorylated PERK (*Figure 2SA*) was similar in both genotypes. Thus, *BI-1* deficiency favours enhanced ER stress, particularly through IRE1 $\alpha$  branch in the pancreas.

Inflammation is important in the development of diabetes associated with  $\beta$ -cell apoptosis. The UPR can trigger the activation of NLRP3 inflammasome contributing to the pro-inflammatory response and induction of programmed cell death (pyroptosis) in the development of diabetes. We next investigated whether loss of BI-1 would favour NLRP3 inflammasome activation. Pancreas from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice presented a stronger expression of active-caspase-1 levels than WT pancreas, correlating with increased IL-1 $\beta$  and NLRP3 (*Figure 3C*). In parallel, pancreatic sections from *BI-1*-deficient mice had more MPO-positive cells compared to WT mice, reflecting abnormal neutrophil infiltration, as observed in diabetic patients (*Figure 3D*). Accordingly, serum levels of MCP1 were highest in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice (*Figure 3E*). Similarly, serum levels of inflammatory markers IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 and IL-10 were significantly increased in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice compared to WT controls (*Figure 3E*). Consistent with these observations,

serum from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice presented significantly elevated pancreatic lipases (*Figure 3F*) reflecting more pancreas injury in those mice compared to WT controls. To conclude, *BI-1*-deficient mice exhibit higher levels of ER stress, inflammasome markers in the pancreas correlating with pancreas injury. These results highlight the protective role of BI-1 against ER stress-induced inflammation and pancreatic injury.

*BI-1 deletion results in increased  $\beta$ -cell death and enhances autophagic flux.*

Here we evaluated the impact of BI-1 deficiency on programmed cell death in pancreatic islets. In  $\beta$  cells, ER stress can lead to apoptosis and pyroptosis, two forms of programmed cell death. As in apoptotic cell death, cells undergoing pyroptosis incur DNA damage and become positive in the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. *Figure 4A and 4B* show that pancreatic sections from *BI-1*-deficient mice had a greater number of TUNEL-positive- $\beta$ -cells compared to WT mice. No difference in  $\beta$ -cell proliferation (revealed by Ki-67 staining) was found between either genotype (*data not shown*). In agreement with these results, immunoblotting analysis revealed increased expression of activated caspase-3 and pro-apoptotic Puma, a BH3-only protein that inhibits the anti-apoptotic BCL-2 in *BI-1*<sup>-/-</sup>, favouring apoptosis (*Figure 4C*). These observations correlate with the activation of NLRP3-inflammasome markers (*Figure 3C*) suggesting activation of both apoptosis and pyroptosis in our *BI-1*-deficient mice.

Programmed cell death and autophagy are interconnected to maintain cellular homeostasis. Autophagy has a relevant role in maintaining basal pancreatic function. IRE1 $\alpha$  and Xbp1 have been reported to regulate autophagy flux levels during ER stress, notably in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice livers<sup>15</sup>. TEM analysis revealed increased accumulation of autophagosomes (encapsulation of cargoes into double-membrane vesicles) and lysosomes in pancreatic  $\beta$ -cell in *BI-1*-deficient cells. Interestingly, we observed ultra-structure features of ER-phagy (*Figure 4Dabci*), mitophagy (*Figure 4Dh*) and crinophagy (*Figure 4Ddh*) highlighting a strong mobilization of several quality control mechanisms in these cells to cope with ER stress. The insulin immunogold staining also confirms specific location of stained insulin granules in autolysosomes, but not in the ER (*Figure 4Eab*).

A key event in autophagosome formation is the conversion of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-I) into the LC3-II form through its lipidation. Monitoring LC3 flux through the autophagolysosomal pathway is the current gold standard to monitor autophagy activity<sup>16,17</sup>. We then analyzed the levels of autophagic flux markers in pancreatic lysates derived from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice. Analysis of the extent of LC3-II degradation revealed higher amplitude of LC3-II degradation in the *BI-1*-deficient mice (*Figure 4F*). In agreement with this observation, a higher expression of the Atg5-Atg12 complex was observed in *BI-1*<sup>-/-</sup> pancreas sample. We also observed a stronger accumulation of total ubiquitinated proteins Lysin 63 (K63) in *BI-1*<sup>-/-</sup> pancreas (*Figure 4G*). A slight increase in basal p62/SQSTM1 expression was also observed in *BI-1* KO mice by western-blot analysis (*Figure 4F*). In line with those results, *BI-1*<sup>-/-</sup> mice exhibited less Parkin and COX4 protein levels, which are mitophagy markers (*Figure 4H*). A decreased levels of those proteins indicate more mitochondria degradation through mitophagy. These results correlate with the anti-apoptotic BCL-2 protein levels that negatively regulate autophagy by binding to and inhibiting Beclin-1<sup>18</sup> (*Figure 4C*). These results suggest a dual role for BI-1 in maintaining  $\beta$ -cell homeostasis through the modulation of programmed cell deaths (apoptosis, pyroptosis) and autophagy in physiological conditions.

*BI-1 deletion increases ER-stress induced cell death and inflammasome activation in human  $\beta$  cell.*

The relevance of *BI-1* loss on IRE1-dependent cell death and inflammasome activation was investigated in EndoC $\beta$ H1, a human  $\beta$  cell line. *BI-1*-silenced human  $\beta$  cells exhibited increased ER stress-induced cell death in response to chemical ER stress agents, *i.e.*, tunicamycin and thapsigargin, compared to control  $\beta$  cells (*Figure 5A*). *BI-1*-silenced  $\beta$  cells exhibited consequences of activated IRE1 $\alpha$  signaling with specific accumulation of phospho-IRE1 $\alpha$  and sXBP1 protein (*Figure 5B*). Compared to control  $\beta$  cells, *BI-1*-silenced cells also displayed significantly active higher caspase-1 and IL-1 $\beta$  protein levels when treated with tunicamycin or thapsigargin (*Figure 5B*).

Because it is well documented that cytokines can trigger ER stress-driven  $\beta$ -cell death in humans with diabetes and diabetic animal models<sup>19,20</sup>, we next investigated this hypothesis. We performed IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF $\alpha$  well-established stimulations in our experimental conditions. *BI-1* silencing in human  $\beta$  cells did not affect the response to cytokine-induced cell death compared to the control  $\beta$  cells (*Figure 3SA, 3SB*).

It appears that a  $\beta$ -cell-specific role of BI-1 may be to protect against IRE1 $\alpha$ -dependent NLRP3 inflammasome activation in humans with  $\beta$  cell dysfunction. Inhibiting IRE1 $\alpha$  activity could be an attractive strategy to treat pancreatic  $\beta$  cell failure and diabetes.

*IRE1 $\alpha$  inhibition corrects metabolic disorders and pancreatic injuries in BI-1 WT and KO mice.*

We reasoned that *BI-1* deficiency might aggravate  $\beta$  cell vulnerability toward 3-month HFD-induced ER stress, overwhelming IRE1 $\alpha$  RNase activity and causing pancreatic injury and associated hallmarks of diabetes. We evaluated the potential of treating mice with an inhibitor of IRE1 $\alpha$  RNase activity, STF-083010, twice a week over the last two weeks of a 3-month HFD (*Figure 6A*).

We observed that, by 3 months of HFD, *BI-1*<sup>-/-</sup> mice exhibited aggravated hyperglycemia (*Figure 6B, Figure 4SA*) impaired glucose tolerance (*Figures 4SB-C*), reduced serum insulin levels (*Figure 4SD*) and insulin sensitivity compared to WT-HFD-mice (*Figures 4SE-F*).

Targeting IRE1 $\alpha$  RNase activity normalized blood glucose concentrations in both *BI-1*<sup>-/-</sup> and WT mice fed HFD (*Figure 6B*) and tended to improve insulin sensitivity as reflected by correlated serum insulin levels (*Figure 6C*). Limiting IRE1 $\alpha$  RNase activity in HFD-fed mice confirmed protection from pancreatic injury in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice, shown by a significant reduction in pancreatic lipases (*Figure 6D*). Body weight gain and pancreata weight respectively were similar in both *BI-1*<sup>-/-</sup> and WT mice (*Figure 6E and Figure 4SH*), independently of STF-083010 or vehicle treatment.

As expected, when challenging mice with a HFD, hematoxylin eosin staining analysis confirmed a tendency to increase islet size in both WT- and *BI-1*<sup>-/-</sup>-HFD-fed mice compared to normal diet conditions (*Figure 4SG, 4SI*). Interestingly, STF-083010 treatment induced a statistically significant increase in islet size in WT-HFD mice (*Figure 6G*). HFD feeding increased the number of islets in pancreata of *BI-1*<sup>-/-</sup>, but not WT mice (*Figure 4SJ*). We speculate that the increase in islet size might be sufficient to increase insulin production when faced with HFD-induced obesity. Interestingly, after challenge with the HFD, *BI-1* deficient mice remain glucose intolerant despite the increased levels of number of islets. The treatment with STF-083010 strengthened this positive effect on the number of islets (*Figure 6H*) in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice decreasing pancreatic dysfunction in these mice.

Analysis of pancreatic sections by TEM confirmed these previous observations. Indeed, STF-083010 treatment decreased the ultra-structural evidence of  $\beta$  cell apoptosis (chromatin condensation, cell shrinkage) and reduced the presence of altered mitochondria and autophagolysosomes (*Figure 7A*). Importantly, the STF-083010 treatment normalized the ultra-structural signs of ER stress, with the observation of a regularly spaced stacks of ER sheets.

Correlating with the development of glucose intolerance under HFD (*Figures 4SA-F*), we observed that the number of total granules increased in both genotypes, reflecting the need for insulin biosynthesis in  $\beta$ -cells to face the nutritional challenge (*Figure 5SA*). STF-083010 also promotes insulin granules production in HFD-*BI-1* deficient mice (*Figure 7B and 7C*). The percentage of immature insulin granules remains unchanged between HFD-WT and KO mice (*Figure 5SB*). Interestingly, there was a larger area of granules in *BI-1* KO- compared to WT-HFD mice (*Figure 5SC*). It has been reported that increased insulin granule size impairs their membrane trafficking at the trans-Golgi network (TGN)<sup>21,22</sup> contributing to metabolic disorders. The increase in insulin granule size may then be a deleterious event in the *BI-1*-deficient  $\beta$ -cell/mice, aggravating obesity-related diseases. Importantly, the therapeutic effect of STF-083010 in partially rescuing the phenotype of  $\beta$ -cells in HFD-fed *BI-1* KO mice also decreases the size of these granules (*Figure 7D*). We here uncovered a potential new role for *BI-1* in insulin trafficking.

A significant decrease in MPO-positive cells was apparent between untreated and STF-083010-treated mice fed an HFD (*Figure 7E*), correlating with less proinflammatory cytokine levels in

sera (*Figure 7F*). This suggests that pharmacologically inhibiting the IRE1 $\alpha$  RNase activity limits pancreatic injury and associated inflammation.

To conclude, pharmacological inhibition of IRE1 $\alpha$ 's RNase activity in HFD-fed *BI-1*-deficient mice improves  $\beta$  cell function and reduces pancreatic injury, associated with a reduction in inflammation and improvement associated metabolic conditions such as hyperinsulinemia and hyperglycaemia.

## ***Discussion***

Hence, the results in this article reveal that *BI-1* deletion in physiological and pathophysiological conditions leads to the development of ER stress in  $\beta$ -cell, predisposes to over-active IRE1 $\alpha$  RNase activity, coupled with  $\beta$ -cell dysfunction, glucose intolerance, stronger accumulation of immature insulin granules in  $\beta$ -cells, defects in insulin crystallisation and packaging with Rod-like granules. Increased IRE1 $\alpha$  RNase activity correlated with the activation of NLRP3 inflammasome and associated pyroptotic cell death. This paralleled induction of autophagy, increasing LC3 flux and autophagosome formation. These results strongly identify a novel protective role for BI-1 in pancreatic  $\beta$  cell physiology and suggest a critical role of BI-1 as a stress integrator in  $\beta$  cell function to modulate the UPR response, autophagic levels and other interconnected homeostasis processes.

We first observed that *BI-1*-deficient mice experience progressive decline in endocrine pancreatic function in both physiological conditions and pathophysiological conditions (HFD-induced obesity). Histological analysis and immunochemical markers revealed that both the endocrine and exocrine pancreases develop normally in *BI-1*-deficient mice. The data indicated that pancreatic dysfunction is acquired postnatally. As in aging *BI-1* mice, we observed a close correlation between the development of hyperglycemia, reduced serum insulin levels and the loss of  $\beta$  cell mass. As a secretory endocrine cell, the  $\beta$ -cell relies on a highly developed and active endoplasmic reticulum (ER) to ensure notably insulin production, efficient folding in native conformation and secretion. The inability to properly fold large secretory loads causes accumulation of unfolded proteins within the ER.

We observed that in *BI-1*-deficient  $\beta$  cells, a heavy load seems to be placed on the ER, explaining the conspicuous vulnerability to ER stress-induced programmed cell death. Indeed, ultrastructural analysis of the *BI-1*<sup>-/-</sup> pancreas revealed striking changes in the morphology of the ER. While  $\alpha$ -cells look morphologically normal, the population of  $\beta$ -cells present massive dilation of the ER lumen and accumulation of large quantities of electron-dense material observed in all pancreases from *BI-1*<sup>-/-</sup> mice. Sustained ER stress triggers activity of IRE1 $\alpha$ -XBP1-CHOP signaling in the pancreas of *BI-1*-deficient mice that may promote programmed cell death leading to pancreatic injury<sup>23</sup>. Herein, we demonstrated that CHOP expression correlated with Puma induction and with decreased BCL2 protein. These results are in line with the concept that ER-stress-induced apoptosis, can be linked to the activation of BH3-only protein Puma triggering mitochondrial dysfunction as a downstream consequence of ER stress. The induction of JNKs, mediated by IRE1 $\alpha$ <sup>24</sup>, may be an important contributor to the death

process, and to the activation of autophagy<sup>15</sup>. We cannot exclude an activation of PERK as we observed an accumulation of ATF4 protein, nor ATF6, which was undetected. Besides its cytoprotective role upon ER stress<sup>13</sup>, our results suggest that BI-1 confers protection against IRE1 $\alpha$ -induced caspase-1 dependent pyroptosis in  $\beta$ -cells. Further experiments are needed to evaluate whether other genes are affected by the RNase activity of IRE1 $\alpha$  (such as TXNIP, a major contributor to proinflammatory and prodiabetic pathways<sup>25</sup> in the  $\beta$ -cells of *BI-1*-deficient mice. Hyperactivated IRE1  $\alpha$  or irremediable ER stress may spontaneously generate ROS, which would also increase NLRP3-inflammasome amplifying the effects of IRE1-PERK-CHOP axes to increase pyroptosis in our experimental conditions.

The IRE1 $\alpha$  RNase inhibitor, STF-083010, improved pancreatic injury of the *BI-1*<sup>-/-</sup> mice and their metabolic disorders. The increased pancreatic inflammation observed in ND- and HFD-challenged *BI-1*<sup>-/-</sup> mice could be a consequence of extensive-tissue injury, giving the release of pancreatic lipase, necrosis and TUNEL-positive- $\beta$  cells. Sustained NLRP3-inflammasome activation with a suitable infiltration of neutrophils has been reported in diabetes, in line with the observation that *BI-1*<sup>-/-</sup> mice presented more MPO-positive cells in pancreatic sections that was corrected with the STF-083010 treatment, targeting IRE1 $\alpha$  RNase activity.

In addition, it appears that in *BI-1*-deficient  $\beta$  cells, the secretory pathway quickly becomes overwhelmed, experiencing high levels of ER stress. Interestingly, genetic mutation can also cause improper folding of insulin and ER stress. In the Akita mouse, the Ins<sup>2C96Y</sup> mutation results in misfolded insulin accumulation in the pancreatic  $\beta$  cell ER, that leads to ER stress activation and  $\beta$  cell apoptosis, specifically by CHOP<sup>5</sup>. *PERK*<sup>-/-</sup> transgenic mice have been reported to develop a close-phenotype with hyperglycemia, hypoinsulinemia, ER stress in  $\beta$  cells,  $\beta$  cell loss, misfolded insulin, and defects in insulin secretion. In humans, a closed phenotype is the Wolcott-Rallison syndrome<sup>26</sup>, the characteristic feature of which is severe diabetes mellitus developing in infancy, associated with an alteration in insulin secretion and folding<sup>27,28</sup>. Mutations in the human PERK-encoding *EIF2AK3* gene have been reported in two families with the syndrome; however, the pathophysiological basis for the phenotype was not addressed<sup>26</sup>. *Xbp1* deficiency was reported to decrease the number of insulin granules in  $\beta$ -cell, impaired proinsulin processing, blunted glucose-stimulated insulin secretion, but also caused constitutive hyperactivation of its upstream activator, IRE1 $\alpha$ <sup>29</sup>.

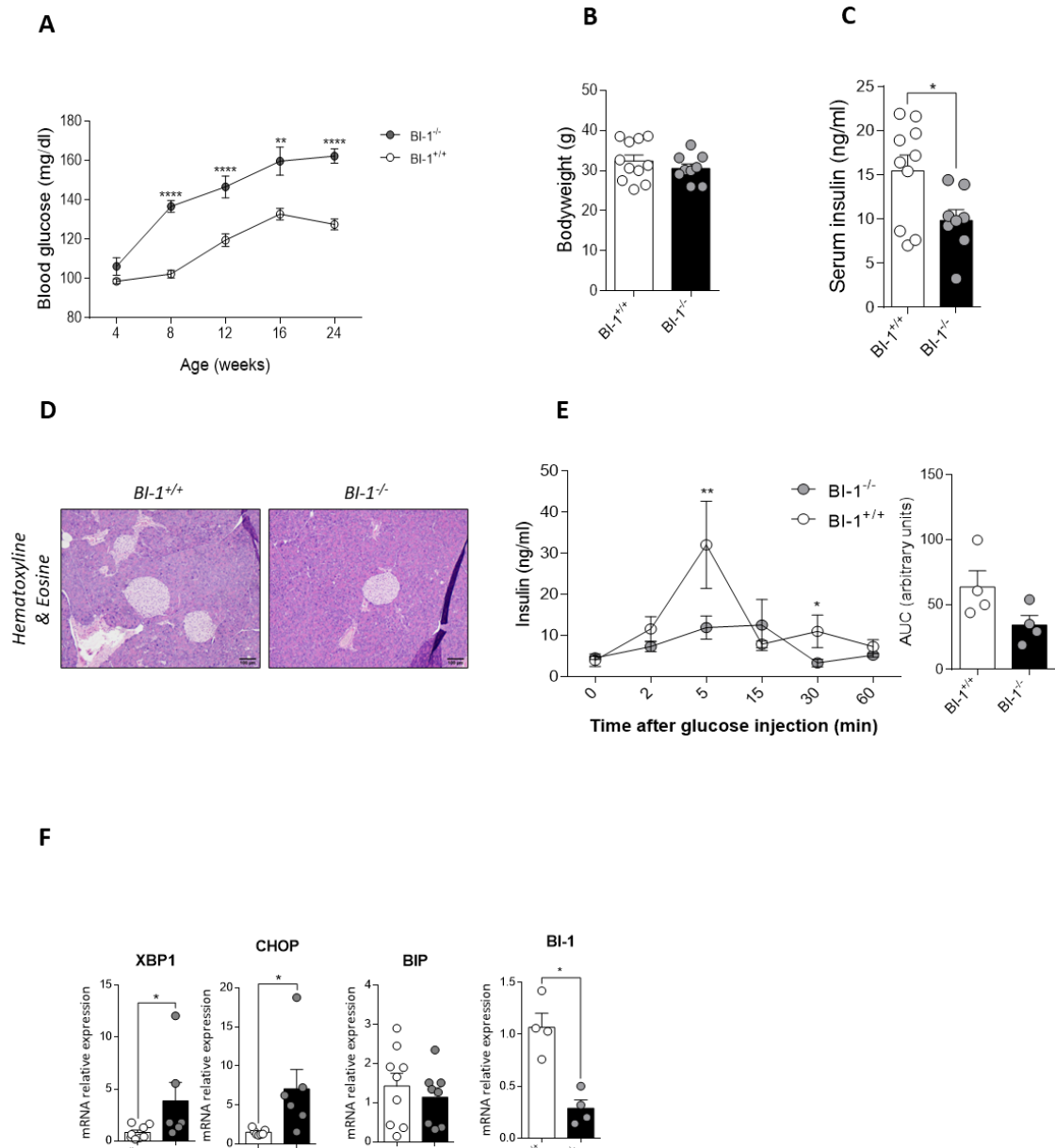
These observations suggest that transgenic mice with genetic ablation or mutation of ER stress sensors share common sensitivity of their  $\beta$ , insulin-producing cells, with increased misfolded



insulin, which induces ER stress, alters metabolic function and may be relevant to the development of diabetes mellitus.

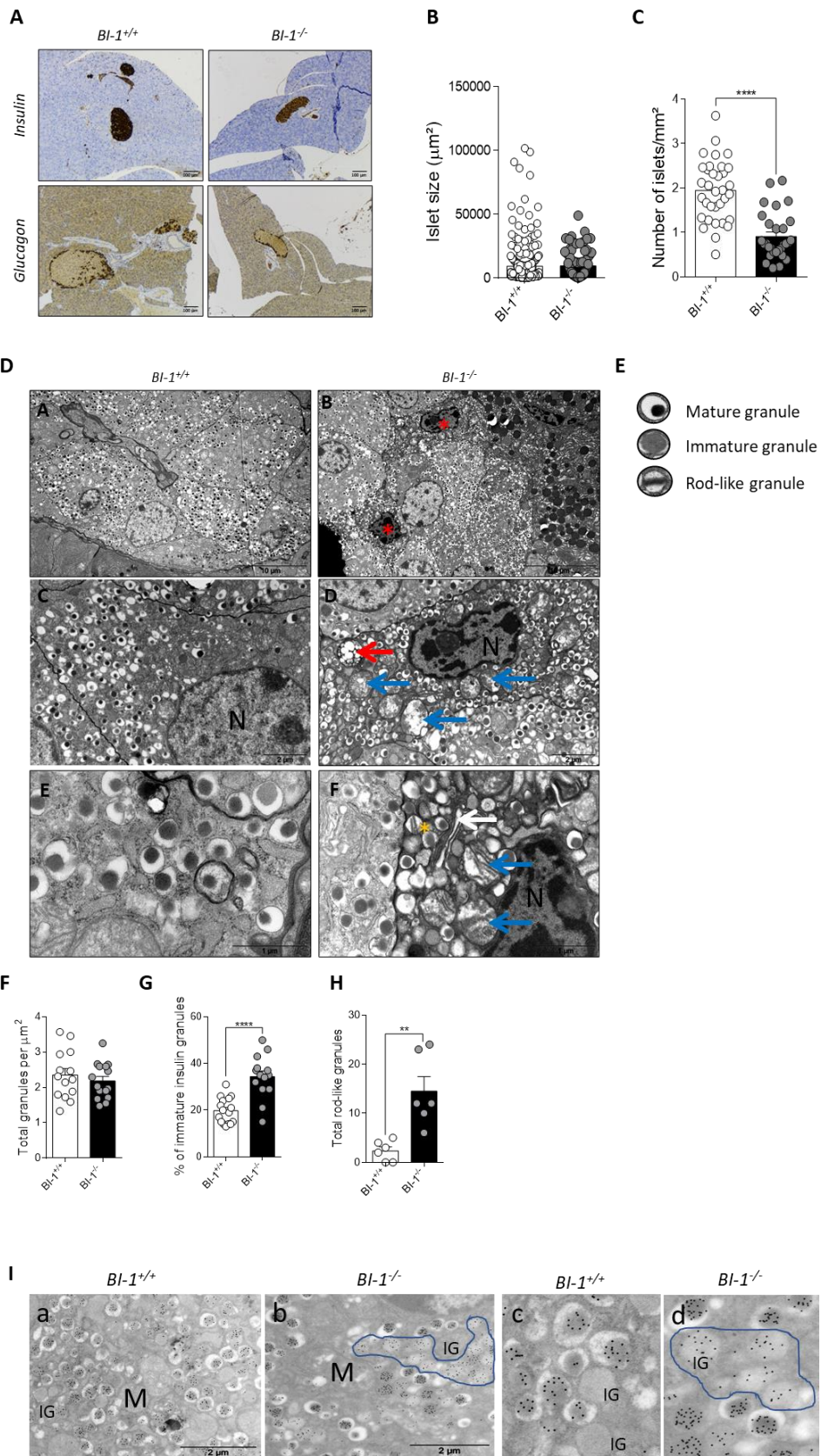
Overall, pharmacological targeting of the NLRP3 inflammasome alleviates pancreatic inflammation and  $\beta$ -cell death in pre-clinical models of diabetes<sup>30-33</sup>. We observed that blocking the IRE1 $\alpha$ -dependent NLRP3 inflammasome activation improves inflammation, cell injury and glucose metabolism in *BI-1*-deficient mice that recapitulate features of diabetes. We propose that small molecules targeting the RNase activity of IRE1 $\alpha$  and the NLRP3 inflammasome alone or combined could be attractive strategy in diabetes and chronic metabolic diseases.

**Figure 1**



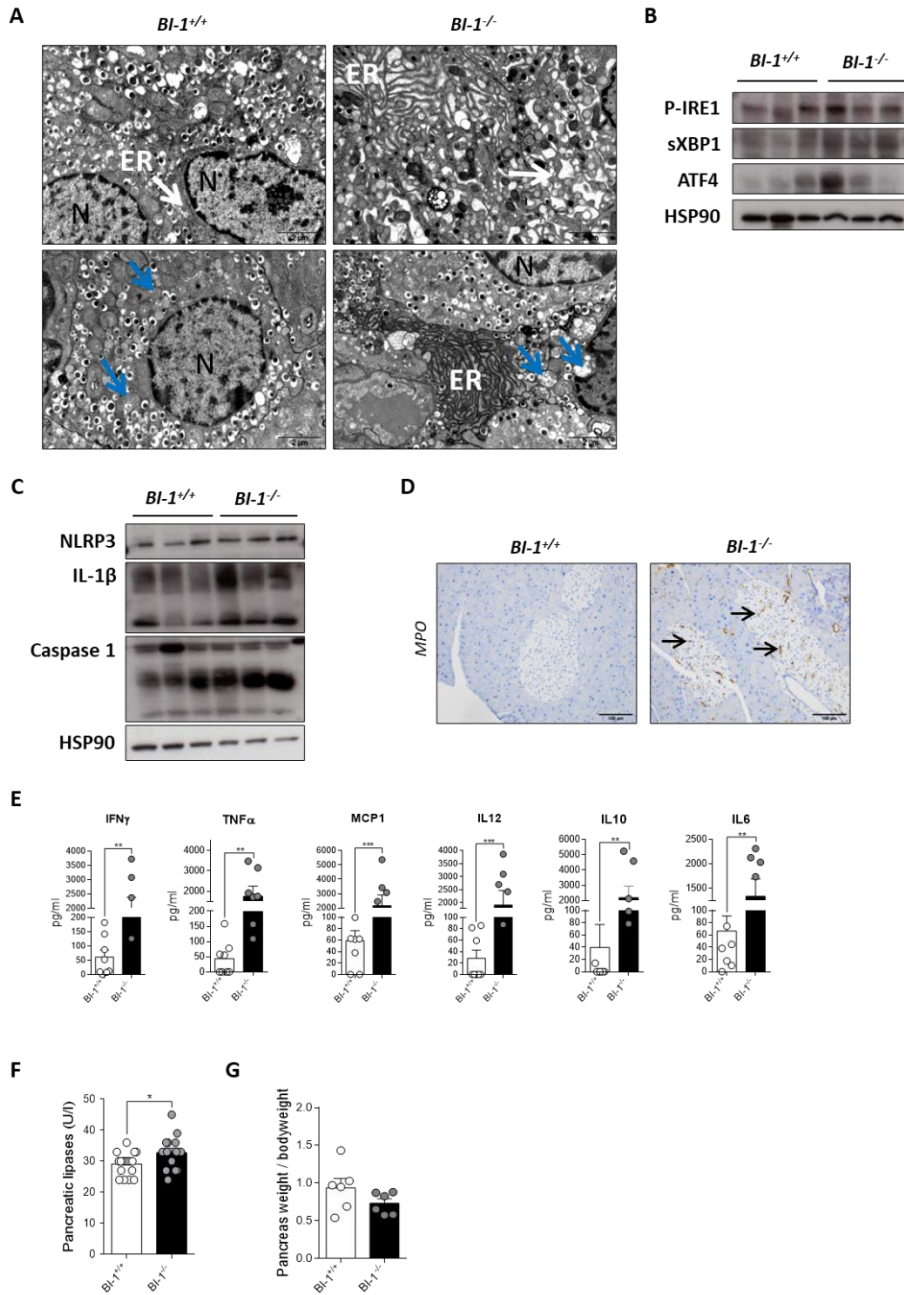
**Fig.1. BI-1 deficient mice exhibit ER stress in pancreatic islets, resulting in hyperglycemia and reduced serum insulin levels in basal conditions.** *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice were fed a normal diet (ND) for 6 months (A) Fed-state blood glucose levels were measured. The results are means and SEM of *n* = 4 - 8 mice per group. At the end of the normal diet, (B) bodyweight were measured. Results are given as the means and SEM of *n* = 9 - 11 mice. (C) Serum insulin levels were quantified from respective genotype and age. Shown are means and SEM of *n* = 8 mice per group. (D) Representative hematoxylin and eosin staining of pancreatic sections are shown [Scale bar, 100 μm]. (*n* = 8 - 10 mice per group). (E) Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) and Area Under the Curve (AUC) were performed. (*n* = 3 - 4 mice per group). (F) Q-PCR analysis of pancreatic ER stress markers from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> isolated islets. (*n* = 8 - 9 mice). \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001.

**Figure 2**



**Fig.2. BI-1 deletion impairs pancreatic islets quantity and insulin secretion.** (A) Representative immunostaining of insulin and glucagon of pancreatic sections from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice fed normal diet (ND). [Scale bar, 100 $\mu$ m]. (*n* = 8 - 10 mice per group). (B) Quantification of pancreatic islet size. (*n* = 8 - 10 mice per genotype). (C) Quantification of the number of islets per mm<sup>2</sup>. (*n* = 8 - 10 mice per group). (D) Representative TEM images of pancreatic sections with  $\beta$  cells and insulin granules morphology are shown [Scale bar, 10 $\mu$ m, 2 $\mu$ m, 1 $\mu$ m]. Red asterisks indicate the pancreatic  $\beta$  cells. N: nucleus. Red arrows indicate the lipofuscin granules. White arrows indicate swelled and fragmented ER. Blue arrows indicate altered mitochondria. Orange asterisks designate the rod like granules. (*n* = 4 mice per group). (E) TEM representative images of mature, immature insulin granules and rod like insulin granules are shown. Respective quantification of (F) total mature insulin granules, (G) % of immature insulin granules, (H) total rod like granules. Quantification was performed from 10 to 15 images per *n* ; *n* = 4 mice per genotype. (I) The immunogold staining looks stronger in *BI-1* deficient mice insulin granules (b, d) than in WT (a, c), particularly in immature granules (IG) which clearly appear more numerous (surrounded by a line in *BI-1* deficient mice). The Rod-shaped granules also showed a good staining \**P*  $\leq$  0,05 ; \*\**P*  $\leq$  0,01 ; \*\*\**P*  $\leq$  0,001. \*\*\*\* *P*  $\leq$  0,0001.

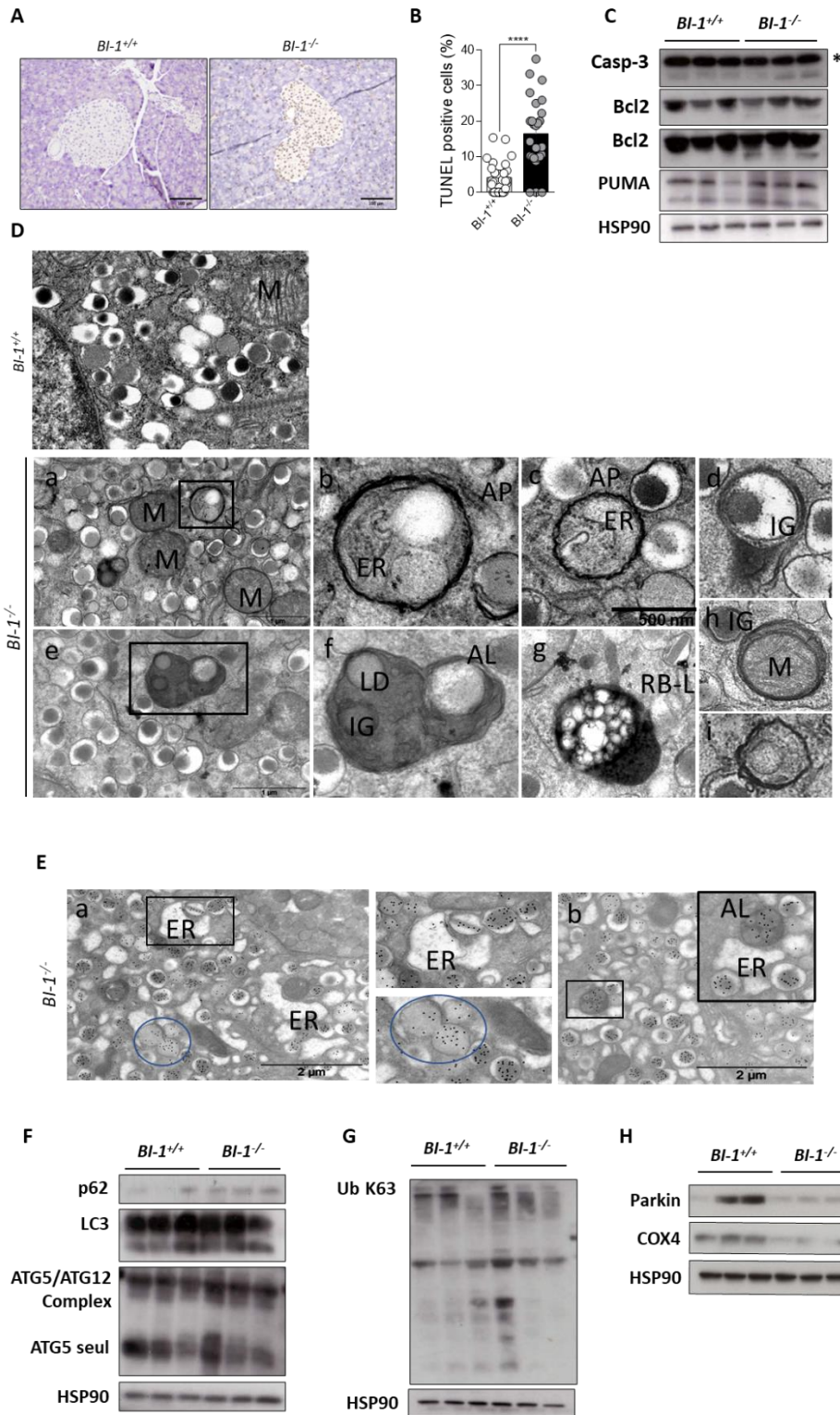
**Figure 3**



**Fig.3.** BI-1 deletion increases ER stress and UPR correlating with increased inflammation and NLRP3 inflammasome levels in vivo. (A) TEM images of pancreatic sections from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice under ND. The nucleus is marked “N”. White arrows point to the ER. Note the swelled and fragmented ER *BI-1*<sup>-/-</sup> compared to normal *BI-1*<sup>+/+</sup> and the increased density of the ER content in the mutant [Scale bar, 2 $\mu$ m]. (B) Immunoblotting analysis of ER stress markers and (C) NLRP3 inflammasome from total pancreatic protein lysates. (n = 3 mice per group). (D) Representative myeloperoxidase (MPO) staining for neutrophil infiltration (arrows) of pancreatic sections are shown [Scale bar, 100 $\mu$ m]. (n = 3 – 5 mice per group). (E) Relative serum cytokines levels evaluated by flow cytometry analysis. (n = 7 – 8 mice per group). (F) Serum pancreatic lipases levels are presented (n = 10 – 12 mice per group). (G) The ratio Pancreas weight/body weight is shown. (n = 6 mice per group). \*P  $\leq$  0,05 ; \*\*P  $\leq$  0,01 ; \*\*\*P  $\leq$  0,001. \*\*\*\* P  $\leq$  0,0001.



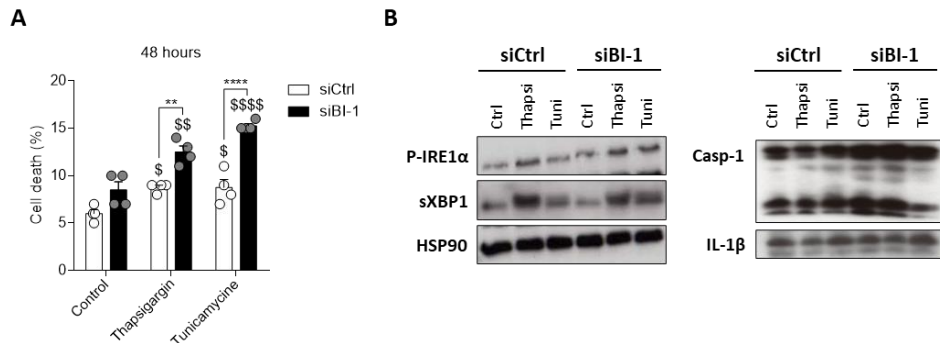
**Figure 4**



**Fig.4. BI-1 deletion results in pancreatic  $\beta$  cell death and enhances autophagy.** (A) Representative picture of TUNEL staining from *BI-1<sup>+/+</sup>* and *BI-1<sup>-/-</sup>* pancreatic sections. ( $n = 3$  mice per group). (B) Number of apoptotic TUNEL positive  $\beta$ -cell. ( $n = 3$  mice per group). (C) Western blotting analysis of apoptotic markers namely cleaved Caspase 3, Bcl2 and PUMA, in total pancreatic protein lysates ( $n = 3$  mice per group). (D) Analysis of vesicular structures by EM with morphologies resembling autophagy vesicles [Scale bar,  $1\mu\text{m}$ ]. Pictures (a, b, c, i) *BI-1<sup>-/-</sup>*

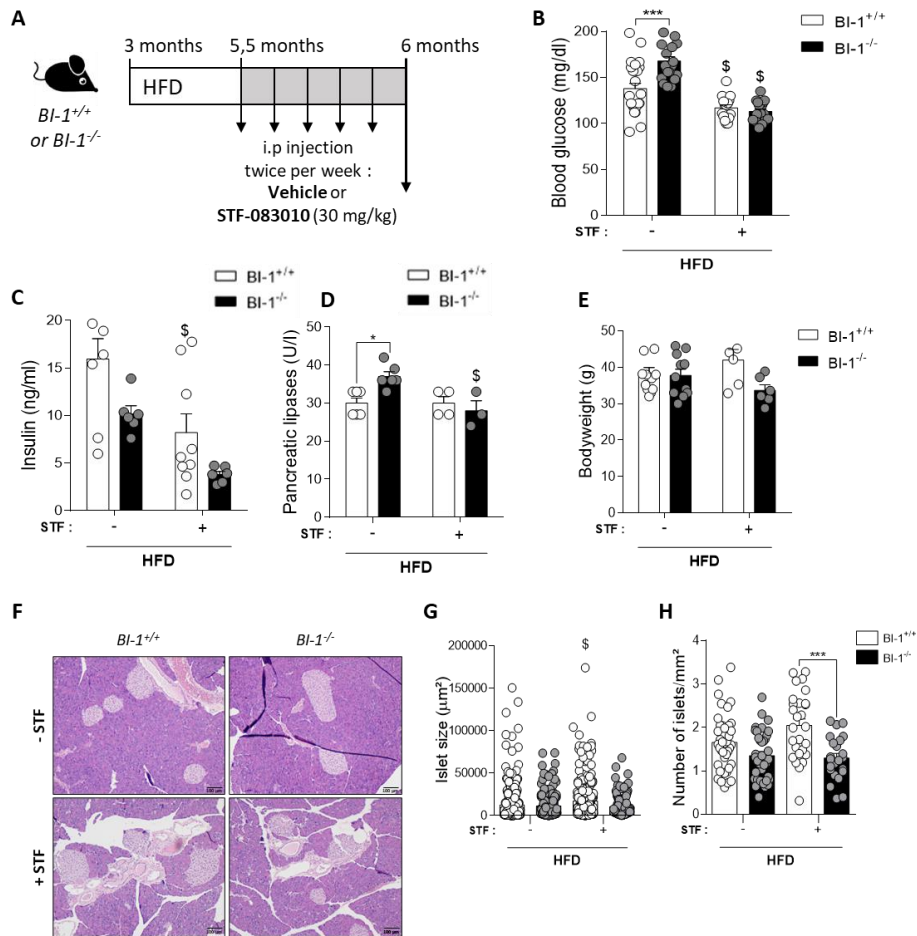
pancreatic sections showing autophagic vesicles (AP, autophagosome, and AL, autolysosome) containing ER (a, b, c, i), insulin granules (d, f, h), mitochondria (h), lipid droplets (LD). (g) RB-L residual body or Lipofuscin lysosomal granule. M = mitochondria. (E) On insulin immunogold staining, we observed stained granules in autolysosomes (in b, AL). ER does not show gold particles even if the antibody stain immature insulin. (F) Western blotting analysis of pancreatic autophagy protein readouts from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup>. (*n* = 3 mice per group). (G) Immunoblotting analysis of K63 ubiquitination in total pancreas. (*n* = 3 mice per group). (H) Immunoblotting analysis of Parkin and COX4 in total pancreas. (*n* = 3 mice per group) \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001.

**Figure 5**



**Fig.5. BI-1 deletion increases cell death and leads to enhanced ER stress and inflammasome markers in EndoCBH1.** (A) Cell death was quantified in EndoCBH1 in response to chemical ER stress (Thapsigargin 1 uM; Tunicamycine 5ug/ml stimulation) compared to normal media. (*n* = 4). (B) Western blotting analysis of phospho-IRE1α, sXBP1, active-caspase-1 and IL-1β protein levels assessed from EndoCBH1 pre-treated with *BI-1* siRNA before stimulations (*n* = 4). \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001. \$ represents differences in the same phenotype with their own control.

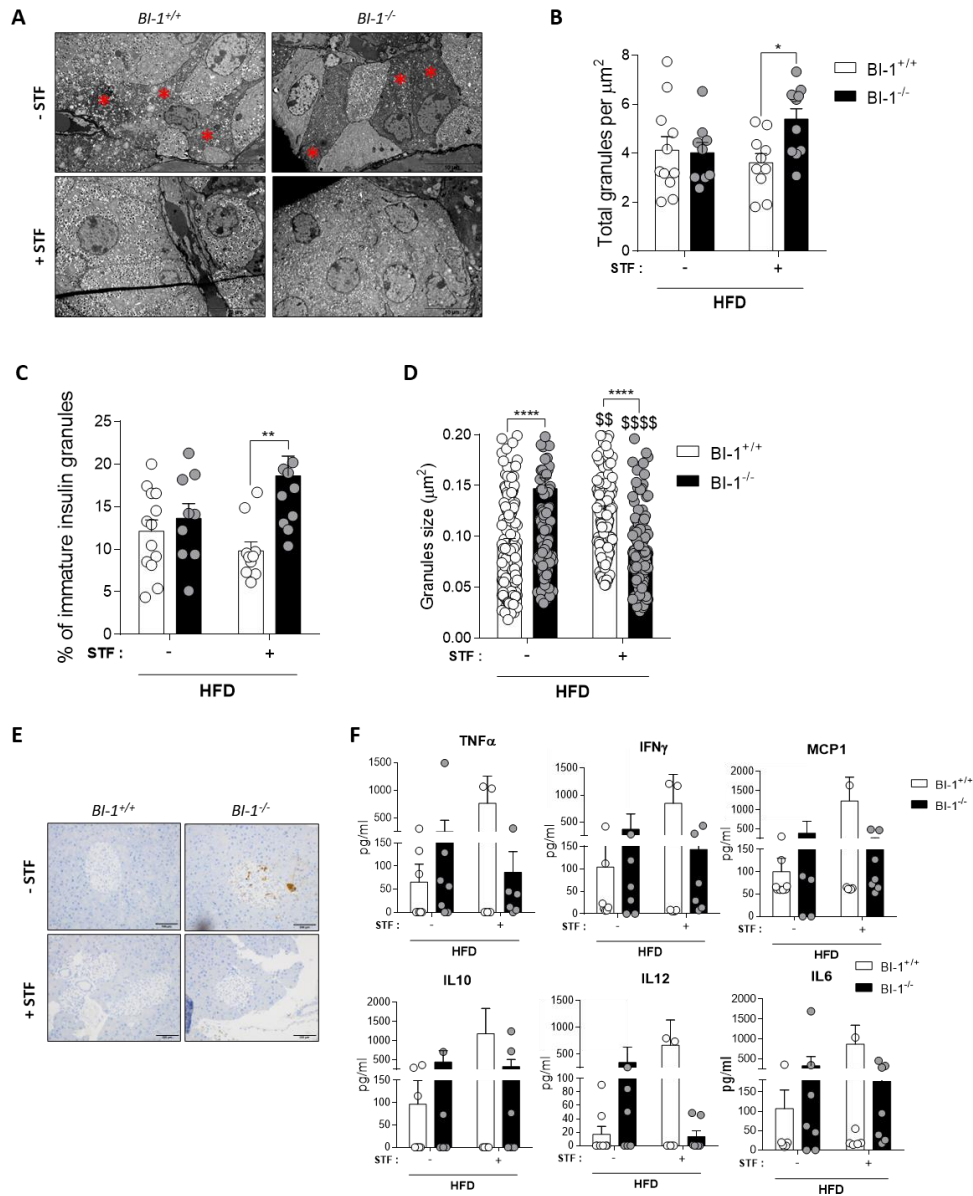
**Figure 6**



**Fig.6. IRE1 $\alpha$  inhibition corrects metabolic disorders and pancreatic injuries in BI-1 WT and KO mice.** (A) Protocol timeline for vehicle (kolliphor 16%) or STF-083010 injection (30mg/kg) in *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice after a 3-months HFD, twice a week for 2 weeks before sacrifice. (B) Blood glucose levels in fed-HFD-*BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice injected with STF-083010 or not (vehicle). (*n* = 15 – 25 mice per group). (C) Relative insulin levels in the sera are shown. (*n* = 8 mice per group). (D) Serum pancreatic lipases levels from HFD-*BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice injected with STF-083010 or not (vehicle) at the end of the HFD-diet. (*n* = 3 – 6 mice per group). (E) The bodyweight weight gain is shown at the end of the HFD-diet. (*n* = 6 – 12 mice per group). (F) Representative image of hematoxylin eosin staining from HFD-*BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> pancreatic sections [Scale bar, 100µm]. (*n* = 6 – 8 mice per group). (G) Islet size was quantified. (*n* = 6 – 8 mice.) (H) Quantification of number of islets per mm<sup>2</sup>. (*n* = 6 – 8 mice per group). \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001. \$ represents differences in the same phenotype with their own control.



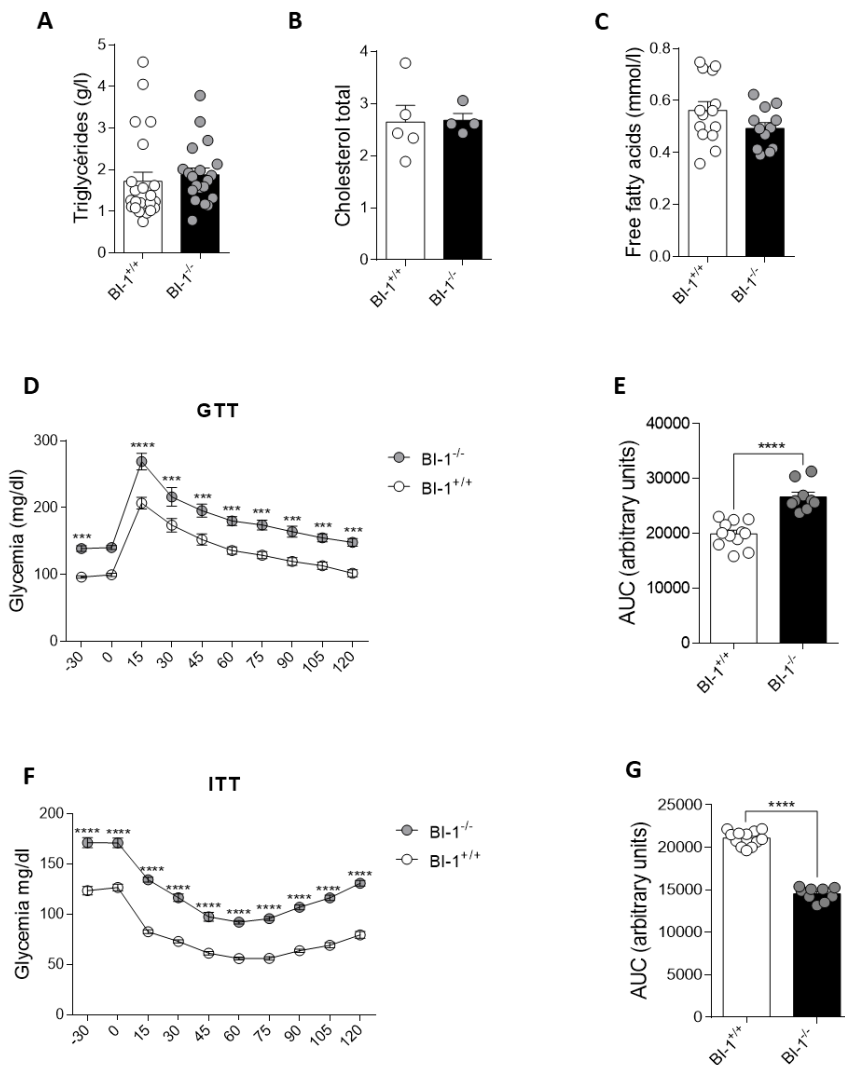
**Figure 7**



**Fig.7. STF treatments corrects inflammation in BI-1 deficient mice and pancreatic injuries.** (A) Representative TEM images of pancreatic sections from HFD-*BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> injected with STF-083010 or not (vehicle). (n = 3 – 4 mice per group). [Scale bar, 10 μm] (B) Quantification of the total granules per μm<sup>2</sup> is quantified from TEM images from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice pancreatic sections treated with STF-083010 or vehicle. (n = 3 – 4 mice per group). (C) Quantification of the percentage of immature insulin granules from pancreatic sections is shown. (n = 3 – 4 mice per group). (D) Insulin granules size was measured from representative TEM images, respectively in ND and HFD conditions, with STF-083010 or vehicle (10-15 pictures per n, n = 3 – 4 mice per group). (E) Representative images of myeloperoxidase (MPO) staining from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> pancreatic sections injected with STF-083010 or vehicle. (n = 3 mice per group). [Scale bar, 100 μm] (F) Relative serum cytokines levels evaluated by flow cytometry analysis. (n = 8 mice per group). \*P ≤ 0,05 ; \*\*P ≤ 0,01 ; \*\*\*P ≤ 0,001. \*\*\*\* P ≤ 0,0001. \$ represents differences in the same phenotype with their own control.

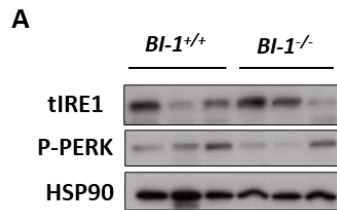
## Supplemental Figures

**Figure 1S**



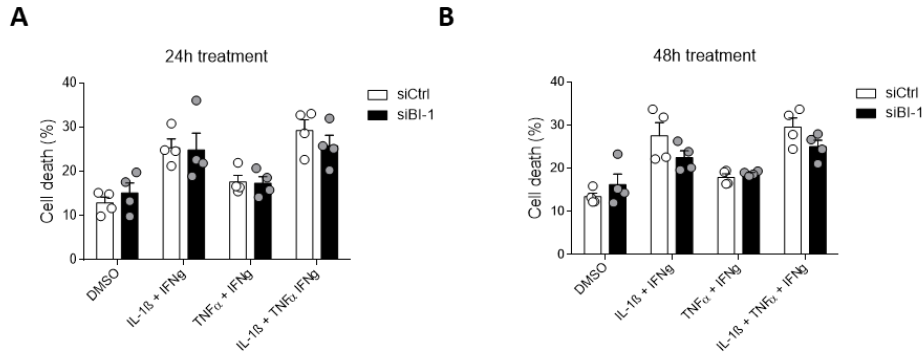
**Fig.1S. BI-1 deletion leads to glucose intolerance and insulino-resistance but does not affect circulating lipids levels and energy expenditure.** *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice were fed a normal diet (ND) for 6 months. At the end of the diet, (A) serum triglycerides levels were measured. ( $n = 20$  mice per group). (B) Serum cholesterol levels are shown. ( $n = 4 - 5$  mice per group). (C) Serum free fatty acids levels were analyzed ( $n = 12 - 14$  mice per group). (D) Glucose Tolerance Test (GTT) of fasted *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice were performed, (E) Area Under the Curve (AUC) is presented. ( $n = 9 - 12$  mice per group). (F) Insulin Tolerance Test (ITT) were performed, (G) Area Under the Curve (AUC) is quantified. ( $n = 9 - 12$  mice per group). \* $P \leq 0,05$  ; \*\* $P \leq 0,01$  ; \*\*\* $P \leq 0,001$ . \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

**Figure 2S**



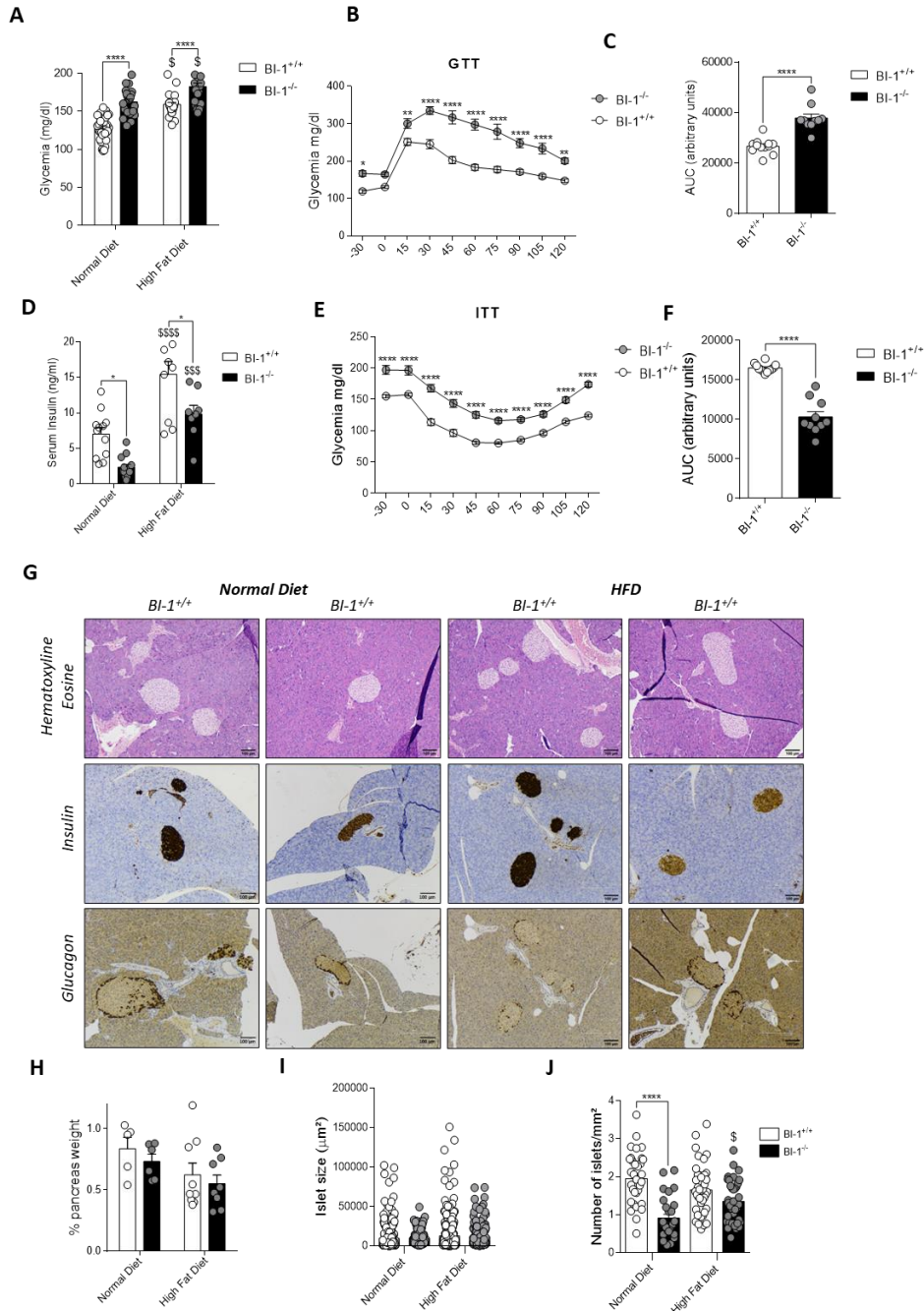
**Fig.2S.** (A) Immunoblotting analysis of total-IRE1 $\alpha$  and phosphorylated-PERK from total pancreatic protein lysates. ( $n = 3$  mice per group).

**Figure 3S**



**Fig.3S. Cytokines do not increase cell death in BI-1 deficient EndoCBH1.** (A) In response to 24 hours cytokines stimulations, cell death was quantified in EndoCBH1 pre-treated with *BI-1* siRNA or control (Ctrl) siRNA before stimulations. ( $n = 4$ ). (B) Cell death was also measured after 48 hours cytokines stimulations. ( $n = 4$ ). \* $P \leq 0,05$  ; \*\* $P \leq 0,01$  ; \*\*\* $P \leq 0,001$ . \*\*\*\* $P \leq 0,0001$

**Figure 4S**

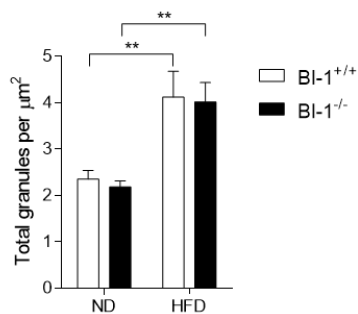


**Fig.4S. *BI-1* deficient mice exhibit glucose intolerance and insulino-resistance under a 3 months HFD.** (A) Fed-blood glucose levels of WT and BI-1 KO in  $BI-1^{+/+}$  and  $BI-1^{-/-}$  mice after a 3-months ND or HFD. ( $n = 25 - 30$  mice per group). (B) Glucose Tolerance Test (GTT) and (C) Area Under the Curve (AUC) were performed in HFD- $BI-1^{+/+}$  and  $BI-1^{-/-}$  mice ( $n = 10 - 12$  mice per group). (D) Quantification of serum insulin levels from  $BI-1^{+/+}$  and  $BI-1^{-/-}$  mice, under ND or after a 3-months HFD. ( $n = 8 - 12$  mice per group). (E) Insulin Tolerance Test (ITT) were performed and (F) Area Under the Curve are shown (AUC) at the end of the HFD diet. ( $n = 10 - 12$  mice per group). (G) Representative haematoxylin eosin staining, insulin and glucagon immuno-staining of pancreatic sections are shown [Scale bar, 100 $\mu$ m]. ( $n = 8 - 10$  mice per group). (H) Pancreas weight (%) from  $BI-1^{+/+}$  and  $BI-1^{-/-}$  mice under ND and HFD conditions. ( $n = 6 - 8$  mice per group). (I) Quantification of islet size

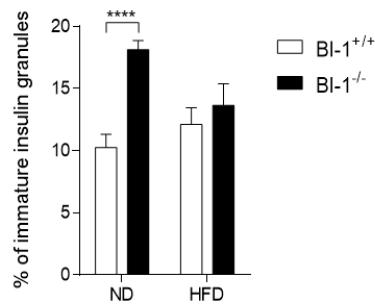
on insulin staining pancreatic sections from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice under ND and HFD conditions. (*n* = 8 – 10 mice per group). (J) Quantification of number of islets per mm<sup>2</sup> from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice in response to ND or HFD conditions. (*n* = 8 – 10 mice per group). \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001. \$ represents differences in the same phenotype with their own control.

**Figure 5S**

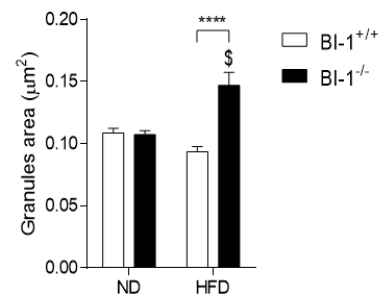
**A**



**B**



**C**



**Fig.5S. Insulin granules quantification from *BI-1*<sup>+/+</sup> and *BI-1*<sup>-/-</sup> mice under basal conditions or after a 3 months HFD.** (A) The total granules per μm<sup>2</sup> per pancreatic sections is quantified from TEM images in both genotypes. (*n* = 3 – 4 mice per group.) (B) The percentage of immature insulin granules is shown. (*n* = 3 – 4 mice per group). (C) The size of the insulin granules size was analysed from TEM images in both genotypes after ND and HFD. (*n* = 3 – 4 mice per group). \**P* ≤ 0,05 ; \*\**P* ≤ 0,01 ; \*\*\**P* ≤ 0,001. \*\*\*\* *P* ≤ 0,0001. \$ represents differences in the same phenotype with their own control.

## **Material and Methods**

### **Animal experimentation**

Animal procedures were conducted in compliance with the French guidelines for the humane care and use of experimental animals. *BI-1<sup>+/+</sup>* (WT) and *BI-1<sup>-/-</sup>* were obtained from Dr. John C. Reed (SBMRI, La Jolla, CA, USA) on a C57BL/6 background by disruption of the *bi-1* gene. Experiments were done on male mice at 8-week-old, 12-week-old and 24-week-old mice. Mice were submitted to a Normal Diet (ND, A04 – SafeDiet, Augy, France) or High Fat Diet (HFD, 60% kJ fat, D12492 – sniff, Soest, Germany) feeding and intraperitoneal injections with STF-083010 (30mg/kg) or vehicle injections. Mice were housed in a controlled environment with 12h light/dark cycles, water available *ad libitum*.

### **Histological evaluation**

Pancreas tissue was fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned (7 µm thick) and stained with H&E, Insulin, Glucagon, MPO or TUNEL (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Sections were evaluated with bright-field microscopy.

### **Electron microscopy**

Pancreas were dissected, immersed in fixative 1,6% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and stored overnight at 4°C. Samples were rinsed in the same buffer, post-fixed for 1h in 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide on 0.1M cacodylate buffer to enhance the staining of membranes. Cells were then rinsed in distilled water, dehydrated in acetone at low temperature to preserve lipids and lastly embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analysed under a JEOL 1400 transmission electron microscope equipped with a Morada Olympus CCD camera. IMOD software was used to analyse images and delineate major cellular structures.

### **Cellular models**

#### **Islet isolation, Glucose stimulated insulin secretion and islet viability**

For islet isolation, mouse pancreases were digested by collagenase and incubated in a water bath at 37°C. The islets were handpicked under a stereomicroscope. The isolated islets were cultured and treated as described. Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was performed in freshly isolated islets Insulin was quantified using the Ultra-Sensitive Mouse Insulin ELISA

Kit (Crystal Chem, Downers Grove, USA). The GSIS experiments were performed and measured in triplicates.

The percentages of viable cells were determined using the DNA-binding dyes Propidium Iodide (PI, 5 µg/mL, Sigma-Aldrich) and Hoechst 33342 (HO, 5 µg/mL, Sigma-Aldrich), as described. The percentages of dead islets cells were evaluated in a minimum of 10 islets per condition. All assessments were performed by two independent researchers one of whom was unaware of the identity of the samples.

### **Culture and transfection of EndoC-βH1 and cell viability**

EndoC-βH1 cells were purchased from UNIVERCELL-BIOSOLUTIONS (MTA BH1-201601171) and cultured in low-glucose DMEM supplemented with 2% BSA fraction V, β-mercaptoethanol 50 µM, L-glutamine 1%, penicillin/streptomycin 2%, nicotinamide 10 mM, human transferrin 5.5 µg/ml and sodium selenite 6.7 ng/ml (all from Sigma Aldrich, Diegem, Belgium)<sup>34,35</sup>. Transfections of small interfering (si)RNAs (30 nmol/L, siBI-1 : HSS110620 *Invitrogen*) were performed using lipofectamine RNAimax (Fisher Scientific, Aalst, Belgium) as described.

EndoC-βH1 cell viability was measured by integration of viability dye (SYTOX™ Green, Invitrogen) on a Perkin Elmer VICTOR X3. The cells were treated as described. 5 mM SYTOX Green was added to cells and the induced intensity was measured. The maximal fluorescence is obtained by full permeabilization of the cells by using Triton X-100 at a final concentration of 0.1%. This allowed the expression of cell death as a percent of the control of maximal SYTOX Green fluorescence (excitation 485 nm, emission 520 nm). Percentage of cell death was calculated as (induced fluorescence - background fluorescence) / (maximal fluorescence – background fluorescence) x 100.

### ***Real-time qPCR***

Total RNA was extracted from isolated pancreatic islets or cell lines (Endo-βH1 and MIN-6), then reverse-transcribed for real-time quantitative PCR. Real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7500/Step-One Fast Real Time PCR System following the manufacturer's protocols. Taqman gene expression assays purchased from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France)

*Mouse* : RPLP0 Mm99999223\_gH ; BI-1 Mm00509863\_m1 ; BIP Mm00517691\_m1 ; CHOP Mm00492097\_m1 ; XBP1 Mm00457359\_m1

*Human* : RPLP0 Hs99999902\_m1 ; BI-1 Hs00162661\_m1 ; BIP Hs99999174\_m1 ; CHOP Hs01090850\_m1 ; XBP1 Hs00231936\_m1

### ***Immunoblot analysis***

Total protein was isolated from snap-frozen pancreas, isolated pancreatic islets or cell lines homogenized in detergent-containing buffer, normalized for protein content (30 µg/tissue and 20 µg/cell sample), and analysed by SDS-PAGE (8-15% gels).

Antibodies references: p-IRE1 : NB100-2323 ; sXBP1 (mouse) : 7160s ; sXBP1 (human) : CS127825 ; ATF4 : sc200 ; HSP90 : 4877S ; NLRP3 : AG-20B-0014 ; IL-1b : 2021S ; Caspase 1 : sc-514 ; tIRE1 CS-23945 ; p-PERK : cs-3179 ; Caspase 3 : cs96625 ; Bcl2 : cs2870 ; PUMA : ab-54288 ; LC3 : NB100-220 ; p62 : 5114S ; ATG5/ATG12 complex : 26305 ; Ub K63 : ab179434 ; Parkin : CS-2132 ; COX4 : CS-4844.

Antibody detection was accomplished using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies: Anti-Rabbit: 711-035-152 (Jackson) ; Anti-Mouse: 715-035-150 (Jackson).

Immunoblots were scanned with signals quantified using ImageJ software.

### ***Biochemical analysis and cytokine measurement***

The BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit was used to quantitatively measure cytokines by flowcytometry as described previously <sup>8</sup>.

Serum triglyceride and cholesterol levels were determined by enzymatic colorimetric assay (Roche – Hitachi analyser Cobas 8000, Meylan, France).

NEFA were measured using the Kit NEFA-HR (2) R1 Set (434-91795 from Fujifilm).

### ***Statistical Analysis***

Statistical significance of differential gene expression between the two study groups was determined using the non-parametric Mann Whitney test, with the  $\Delta$ Ct of each group. Other data from mice and cells were statistically analysed by Student's t test, Mann Whitney or ANOVA and *post hoc* analysis for multiple group comparison. Data are expressed as mean +/- SEM. Statistical significance from control is denoted by \*P ≤ 0,05 ; \*\*P ≤ 0,01 ; \*\*\*P ≤ 0,001.



\*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ . Following the same pattern, \$ denotes statistical significance between specified groups.

## REFERENCES

1. Fernandes-da-Silva, A., Miranda, C.S., Santana-Oliveira, D.A., Oliveira-Cordeiro, B., Rangel-Azevedo, C., Silva-Veiga, F.M., Martins, F.F., and Souza-Mello, V. (2021). Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur. J. Nutr.* *60*, 2949–2960. 10.1007/s00394-021-02542-y.
2. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* *313*, 1137–1140. 10.1126/science.1128294.
3. Papa, F.R. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic  $\beta$ -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a007666. 10.1101/cshperspect.a007666.
4. Scheuner, D., and Kaufman, R.J. (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr. Rev.* *29*, 317–333. 10.1210/er.2007-0039.
5. Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* *109*, 525–532. 10.1172/JCI14550.
6. Fonseca, S.G., Burcin, M., Gromada, J., and Urano, F. (2009). Endoplasmic reticulum stress in  $\beta$ -cells and development of diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 763–770. 10.1016/j.coph.2009.07.003.
7. Shrestha, N., De Franco, E., Arvan, P., and Cnop, M. (2021). Pathological  $\beta$ -Cell Endoplasmic Reticulum Stress in Type 2 Diabetes: Current Evidence. *Front. Endocrinol.* *12*, 650158. 10.3389/fendo.2021.650158.
8. Bailly-Maitre, B., Belgardt, B.F., Jordan, S.D., Coornaert, B., von Freyend, M.J., Kleinridders, A., Mauer, J., Cuddy, M., Kress, C.L., Willmes, D., et al. (2010). Hepatic

- Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.* 285, 6198–6207. 10.1074/jbc.M109.056648.
9. Hollien, J., Lin, J.H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., and Weissman, J.S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 186, 323–331. 10.1083/jcb.200903014.
  10. Lebreton, F., Berishvili, E., Parnaud, G., Rouget, C., Bosco, D., Berney, T., and Lavallard, V. (2018). NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. *Cell Death Dis.* 9, 726. 10.1038/s41419-018-0764-x.
  11. Osowski, C.M., Hara, T., O’Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L.J., Hayashi, E., Hui, S.T., et al. (2012). Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced  $\beta$  cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 16, 265–273. 10.1016/j.cmet.2012.07.005.
  12. Lebeaupin, C., Proics, E., de Bievilte, C.H.D., Rousseau, D., Bonnafous, S., Patouraux, S., Adam, G., Lavallard, V.J., Rovere, C., Le Thuc, O., et al. (2015). ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis.* 6, e1879. 10.1038/cddis.2015.248.
  13. Lebeaupin, C., Vallée, D., Rousseau, D., Patouraux, S., Bonnafous, S., Adam, G., Luciano, F., Luci, C., Anty, R., Iannelli, A., et al. (2018). Bax inhibitor-1 protects from nonalcoholic steatohepatitis by limiting inositol-requiring enzyme 1 alpha signaling in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 68, 515–532. 10.1002/hep.29847.
  14. Arunagiri, A., Haataja, L., Pottekat, A., Pamenan, F., Kim, S., Zeltser, L.M., Paton, A.W., Paton, J.C., Tsai, B., Itkin-Ansari, P., et al. (2019). Proinsulin misfolding is an early event in the progression to type 2 diabetes. *eLife* 8, e44532. 10.7554/eLife.44532.
  15. Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B., Nassif, M., Court, F.A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., et al. (2011). BAX inhibitor-1 regulates autophagy by

- controlling the IRE1 $\alpha$  branch of the unfolded protein response. *EMBO J.* 30, 4465–4478. 10.1038/emboj.2011.318.
16. Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151–175. 10.4161/auto.5338.
  17. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 445, 77–88. 10.1007/978-1-59745-157-4\_4.
  18. Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939. 10.1016/j.cell.2005.07.002.
  19. Brozzi, F., Nardelli, T.R., Lopes, M., Millard, I., Barthson, J., Igoillo-Esteve, M., Grieco, F.A., Villate, O., Oliveira, J.M., Casimir, M., et al. (2015). Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia* 58, 2307–2316. 10.1007/s00125-015-3669-6.
  20. Cardozo, A.K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y.-M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Van Eylen, F., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A., and Eizirik, D.L. (2005). Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca<sup>2+</sup> ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 452–461. 10.2337/diabetes.54.2.452.
  21. Bogan, J.S., Xu, Y., and Hao, M. (2012). Cholesterol Accumulation Increases Insulin Granule Size and Impairs Membrane Trafficking: Cholesterol in Insulin Granule Regulation. *Traffic* 13, 1466–1480. 10.1111/j.1600-0854.2012.01407.x.

22. Chen, C.-W., Guan, B.-J., Alzahrani, M.R., Gao, Z., Gao, L., Bracey, S., Wu, J., Mbow, C.A., Jobava, R., Haataja, L., et al. (2022). Adaptation to chronic ER stress enforces pancreatic  $\beta$ -cell plasticity. *Nat. Commun.* *13*, 4621. 10.1038/s41467-022-32425-7.
23. Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* *17*, 5708–5717. 10.1093/emboj/17.19.5708.
24. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* *287*, 664–666. 10.1126/science.287.5453.664.
25. Lerner, A.G., Upton, J.-P., Praveen, P.V.K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., et al. (2012). IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* *16*, 250–264. 10.1016/j.cmet.2012.07.007.
26. Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., and Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* *25*, 406–409. 10.1038/78085.
27. Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* *7*, 1153–1163. 10.1016/s1097-2765(01)00264-7.
28. Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., and Cavener, D.R. (2002). The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and

- the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3864–3874. 10.1128/MCB.22.11.3864-3874.2002.
29. Lee, A.-H., Heidtman, K., Hotamisligil, G.S., and Glimcher, L.H. (2011). Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 $\alpha$  and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8885–8890. 10.1073/pnas.1105564108.
30. Hu, C., Ding, H., Li, Y., Pearson, J.A., Zhang, X., Flavell, R.A., Wong, F.S., and Wen, L. (2015). NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11318–11323. 10.1073/pnas.1513509112.
31. Kim, Y., Wang, W., Okla, M., Kang, I., Moreau, R., and Chung, S. (2016). Suppression of NLRP3 inflammasome by  $\gamma$ -tocotrienol ameliorates type 2 diabetes. *J. Lipid Res.* 57, 66–76. 10.1194/jlr.M062828.
32. Youm, Y.-H., Adijiang, A., Vandanmagsar, B., Burk, D., Ravussin, A., and Dixit, V.D. (2011). Elimination of the NLRP3-ASC Inflammasome Protects against Chronic Obesity-Induced Pancreatic Damage. *Endocrinology* 152, 4039–4045. 10.1210/en.2011-1326.
33. Larsen, C.M., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehres, J.A., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T., and Donath, M.Y. (2007). Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 356, 1517–1526. 10.1056/NEJMoa065213.
34. Dondelinger, Y., Delanghe, T., Priem, D., Wynosky-Dolfi, M.A., Sorobetea, D., Rojas-Rivera, D., Giansanti, P., Roelandt, R., Gropengiesser, J., Ruckdeschel, K., et al. (2019). Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nat. Commun.* 10, 1729. 10.1038/s41467-019-09690-0.
35. Xiao, P., Takiishi, T., Violato, N.M., Licata, G., Dotta, F., Sebastiani, G., Marselli, L., Singh, S.P., Sze, M., Van Loo, G., et al. (2022). NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) is activated

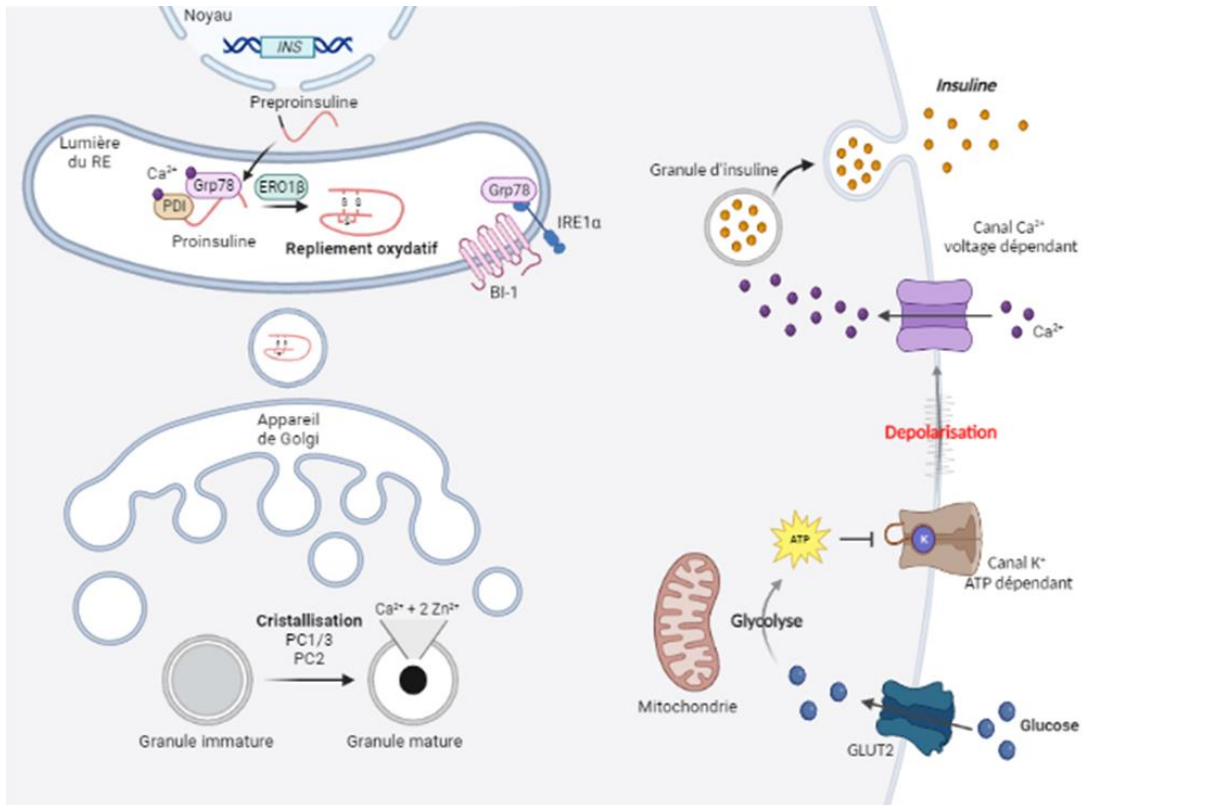
in pancreatic  $\beta$ -cells but does not contribute to the development of diabetes. *Cell Death Dis.* 13, 476. 10.1038/s41419-022-04931-5.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Le pancréas est à l'origine du maintien de l'homéostasie glucidique. La fonction et le maintien des cellules  $\beta$  pancréatiques est essentielle pour prévenir et guérir les différents diabètes. La souris BI-1 déficiente présente une hyperglycémie et une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans cette partie, nous allons discuter des résultats physiopathologiques obtenus chez la souris BI-1 déficiente en focalisant d'un point de vue mécanistique sur les fonctions primaires de la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques présentes au sein des îlots de Langerhans et d'un point de vue anatomique sur le maintien de la masse de cellules  $\beta$  pancréatiques (*Figure 15*).





**Figure 15 :** De la synthèse à la sécrétion d'insuline au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique de la souris sauvage.

Dans la cellule  $\beta$  pancréatique, le gène de l'insuline mène à l'expression de la préproinsuline. La préproinsuline possède un peptide signal permettant sa translocation au sein du RE. Le clivage de ce peptide signal permet la production de la proinsuline. Au sein du RE, la proinsuline subit des modifications post-traductionnelles. Ensuite, la proinsuline passe dans l'appareil de Golgi et dans des vésicules nommées granules immatures d'insuline. Dans le granule immature, la proinsuline est clivée par les enzymes PC1/3 et PC2 en insuline. La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Zn}^{2+}$  cristallise l'insuline, formant ainsi un corps dense au centre du granule mature d'insuline. Le glucose entre dans la cellule  $\beta$  pancréatique par GLUT2. La glycolyse et le cycle de Krebs mènent à la production d'ATP, inhibant les canaux potassiques ATP dépendant. Cela engendre une dépolarisation de la membrane plasmique, activant les canaux calciques voltage dépendant. Le  $\text{Ca}^{2+}$  entre dans la cellule  $\beta$  pancréatique et permet la sécrétion d'insuline.

## I. Fonction et maintien de la cellule $\beta$ pancréatique au sein des souris BI-1 déficientes

### A. De la synthèse à la sécrétion d'insuline

- i. Rôle du stress oxydant dans les défauts de sécrétions d'insuline liés au stress du RE

La fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique est de maintenir l'homéostasie glucidique, en synthétisant, stockant et sécrétant l'insuline face aux variations en nutriments. L'insuline est

synthétisée sous forme de préproinsuline, à partir du gène *INS1* et *INS2* chez la souris (**Figure 15**). Au sein des souris BI-1 déficientes, nous n'avons observé aucune modification du niveau d'expression de l'ARNm des *INSs*, suggérant qu'il n'y a pas d'atteinte de leur expression au niveau génique, ni de dégradation de l'ARNm, responsable de la perte de la sécrétion d'insuline. Ensuite, la préproinsuline transloque dans le RE via un peptide signal. Au sein de la lumière du RE, le signal peptide est clivé, produisant la proinsuline. Dans le RE, la proinsuline subit des modifications post-traductionnelles via la formation de trois ponts disulfures. Le repliement oxydatif permet la formation des ponts disulfures. Ainsi, l'environnement oxydatif du RE permet un repliement correct de la proinsuline dans sa lumière (**Figure 15**). Au sein des coupes pancréatiques des souris BI-1 déficientes, **nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de granules immatures et de granules de type « rod – like »**. La littérature rapporte que BI-1 possède un rôle anti-oxydant au sein du RE. Effectivement, l'expression de BI-1 augmenterait l'expression de gènes associés à la réponse anti-oxydante, dont NRF2 et son gène cible HO-1, diminuant ainsi la production de ROS (*Chae et al., 2003 ; Lee et al., 2007*). Nous pouvons donc supposer que la délétion de BI-1 peut conduire à une perturbation de l'équilibre oxydatif au sein du RE via une augmentation de la production de ROS. Ce stress oxydatif pourrait engendrer une perturbation des modifications post-traductionnelles de la proinsuline au sein du RE, responsable de son accumulation sous forme mal-conformée et engendrant un stress du RE. En raison de la présence d'un RE dilaté, signe d'un stress du RE, dans nos coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes analysées en microscopie électronique et de l'augmentation de l'expression des marqueurs associés à la réponse UPR au sein des îlots pancréatiques, il serait intéressant d'isoler ces îlots des souris BI-1 déficientes et de mesurer la production de ROS, en comparaison avec les îlots de Langerhans des souris sauvages. Dans un deuxième temps, nous pourrions tester la présence de ponts disulfures au sein de la proinsuline en réalisant des gels non dénaturant par western blot en présence ou absence d'agents de réduction comme le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothréitol (DTT). Cela nous permettrait de savoir si un stress oxydatif accru serait associé à une accumulation de protéines mal repliées au sein du RE des souris BI-1 déficientes.

La formation des ponts disulfures de la proinsuline au sein du RE dépend du repliement oxydatif, via la protéine ERO1 $\beta$  (ER oxidoreductin-1-like  $\beta$ ) et les Protein Disulfide Isomerase (PDI). Ces chaperonnes impliquées dans le repliement oxydatif de la proinsuline sont aussi sous le contrôle d'IRE1 $\alpha$  et sXBP1 (*Tsuchiya et al., 2018*). Nous avons pu mettre en évidence que IRE1 $\alpha$  et son effecteur étaient suractivés au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques déficientes pour

BI-1. Ainsi, explorer l'expression génique et protéique de ERO1 $\beta$  et des PDI, des protéines associées au repliement oxydatif de la proinsuline dans ce modèle, pourraient permettre non seulement de mieux comprendre les mécanismes potentiels liant le stress du RE dépendant de l'invalidation de BI-1 et la suractivation d'IRE1 $\alpha$  au mauvais repliement de la proinsuline mais également donner une explication à l'augmentation du nombre de granules immatures.

Le lien entre le stress du RE et le stress oxydatif dans la cellule  $\beta$  pancréatique a précédemment été illustré de manière indirecte par l'invalidation génique du co-facteur de la Grp78, p58<sup>IPK</sup>. En effet, cette délétion conduit une augmentation du stress oxydatif et de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques accompagnée d'un défaut de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique via une diminution de la sécrétion d'insuline. L'inhibition de la production de ROS dans ce modèle permet de corriger le phénotype associé à la délétion génique de p58<sup>IPK</sup>, dont la sécrétion d'insuline (*Han et al., 2015*). Ainsi, nous pourrions envisager l'utilisation d'inhibiteurs des ROS pour rétablir le phénotype des souris BI-1 déficientes.

En revanche, au sein des coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes analysées en microscopie électronique avec un anticorps dirigé contre l'insuline (anticorps secondaire couplé à l'or colloïdal), nous n'avons pas observé de marquage de l'insuline au sein du RE, suggérant qu'il n'y aurait pas d'accumulation de proinsuline mal-repliée dans le RE. La proinsuline mal-repliée pourrait être adressée soit au Golgi, soit à des mécanismes de dégradation dépendantes du RE tels que l'ERAD ou l'autophagie, dont nous parlerons plus bas dans cette discussion. Ou bien, nous pouvons supposer que l'accumulation de proinsulines mal-repliées dans le RE soit un phénotype précoce des souris BI-1 déficientes. En effet, dans notre étude, nous avons analysé les coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes et sauvages âgées de 6 mois. Le phénotype hyperglycémique apparaissant vers l'âge de 8 semaines, l'analyse de coupes pancréatiques de souris BI-1 déficientes et sauvages à cette âge (ou entre 4 et 8 semaines) pourrait mettre en évidence la présence d'une accumulation de proinsulines mal-conformées dans le RE. Nous avons effectué des colorations à la thioflavin (marqueur d'agrégats protéiques) au sein des coupes pancréatiques de souris BI-1 déficientes et sauvages. Malheureusement, nous n'avons observé aucun marquage suggérant une augmentation de l'accumulation de protéines mal repliées. Certainement que les agrégats protéiques sont peu présents et difficilement décelables en raison des limites des techniques présentes au sein du laboratoire.

D'une manière globale, le rôle du stress oxydatif dans la réponse au stress du RE reste mal défini et ces perspectives d'études pourraient permettre de mieux préciser cette connexion au sein de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatique.

## ii. Rôle du calcium dans les défauts de sécrétion d'insuline liés au stress du RE

Rappelons que BI-1 possède un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique du RE. La délétion de BI-1 pourrait engendrer des perturbations de l'homéostasie calcique au sein du RE (**Figure 16**). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est essentiel au bon fonctionnement des chaperonnes et foldases, qui sont  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes, dont la Grp78, connue pour se lier à la proinsuline afin de faciliter sa maturation (*Scheuner et al., 2005*).

Ainsi, la maturation de la proinsuline peut être affectée à différents niveaux au sein du RE.

Il est bien établi que les modifications post-traductionnelles de la proinsuline permettent sa translocation dans l'appareil de Golgi et ensuite dans les granules (**Figure 15**). Au sein du granule, la proinsuline est clivée en insuline par les PC1/3, PC2 et la carboxypeptidase E. Cette insuline est cristallisée, résultant en un corps dense dans le granule, grâce à la présence de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) et de  $\text{Ca}^{2+}$ . Puisque nous avons observé une augmentation de la quantité de granules immatures et de granules de type « rod - like », résultant d'un défaut de cristallisation de l'insuline, nous pouvons émettre l'hypothèse que la délétion de BI-1 conduit à des défauts de la maturation de l'insuline au sein du granule d'insuline.

Dans un modèle murin hétérozygote pour la pompe SERCA2b soumis à un régime cétogène, il a été mis en évidence une augmentation de la quantité de granules de type « rod – like » ainsi que de granules immatures d'insuline (*Tong et al., 2016*). Ces données s'accompagnent d'une augmentation de l'expression des marqueurs associés à la réponse UPR (Grp78 et sXBP1) et de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques. Cette étude montre une diminution de l'expression de PC1/3, qui pourrait être responsable du défaut de cristallisation de l'insuline au sein du granule d'insuline. Au sein de ce modèle murin, l'homéostasie calcique du RE est fortement perturbée. De plus, notons que le  $\text{Ca}^{2+}$  est un co-facteur des PC1/3 et 2. Le  $\text{Ca}^{2+}$  résident au sein du granule dépend de l'homéostasie calcique au sein du RE. Etant donné le rôle de BI-1 dans l'homéostasie calcique au sein du RE, il serait pertinent de regarder les niveaux d'expression et l'activité enzymatique des PC1/3 et PC2 au sein des îlots pancréatiques des souris BI-1 déficientes.

## B. Dialogue entre le RE, la mitochondrie et la voie lysosomale au sein des cellules $\beta$ pancréatiques BI-1 déficientes

Les images de microscopie électronique au sein des pancréas de souris BI-1 déficientes confirment la présence d'une souffrance des cellules  $\beta$  pancréatiques, présentant une altération des mitochondries et la présence d'autophagolysosomes, accompagnées d'une dilatation du RE, signe d'un stress du RE.

### i. Mitochondrie

La littérature rapporte que BI-1 serait impliquée dans la bioénergétique de la mitochondrie. La surexpression de BI-1 conduit à une augmentation de la communication entre le RE et la mitochondrie via l'augmentation des MAM. En revanche, malgré l'augmentation des interactions entre le RE et la mitochondrie, la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie est diminuée dans les modèles de surexpression de BI-1 (*Kim et al., 2021 ; Sano et al., 2012*). La concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondriale est essentielle à la synthèse de l'ATP, à travers l'activation du cycle de Krebs. Les cellules  $\beta$  au sein des sections pancréatiques des souris BI-1 déficientes présentent des altérations mitochondriales. De plus, la littérature suggère que IRE1 $\alpha$  et son activité RNase sont impliquées dans la formation des MAM (*Carreras-Sureda et al., 2019 ; Mori et al., 2013*). Une suractivation prolongée de son activité RNase pourrait être responsable de dysfonctionnements au sein de la mitochondrie. Ainsi, étant donné que la fonction mitochondriale et la production d'ATP sont essentielles pour la sécrétion d'insuline via les canaux potassiques ATP dépendant, la quantification de l'ATP et/ou de l'activité mitochondriale pourrait être pertinente, dans les cellules  $\beta$  BI-1 déficientes présentant un défaut de sécrétion d'insuline.

Une perturbation mitochondriale peut être à l'origine d'une reprogrammation métabolique cellulaire. Nous avons en effet observé une tendance à la diminution de l'expression génique de GLUT2, au sein des EndoC $\beta$ H1 transfectées avec un ARN interférent dirigé contre BI-1. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la cellule  $\beta$  pancréatique déficiente pour BI-1 pourrait être métaboliquement moins active et donc générer moins d'ATP. De manière remarquable, nous pouvons faire un parallèle avec les souris déficientes pour un autre acteur de la réponse au stress du RE, PERK. Bien que l'expression des ARNm de GLUT2 n'ait pas été mesurée, les souris déficientes pour PERK à l'âge adulte présentent une accumulation de GLUT2 dans la lumière du RE associée à une accumulation de proinsuline (*Gao et al., 2012*).

Ainsi, le métabolisme du glucose et la production d'ATP au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique déficiente pour BI-1 sont des nouvelles voies à explorer, en particulier en lien avec l'expression et la localisation subcellulaire de GLUT2. Une diminution dans la production d'ATP associée à un défaut dans le métabolisme du glucose pourraient expliquer la perte de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose des souris BI-1 déficientes, *in vivo*. En revanche, cette hypothèse ne corrèle pas avec les données observées *ex vivo* et *in vitro*. En effet, les îlots pancréatiques isolés à partir des souris BI-1 déficientes ne présentent pas de différence dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, en absence de leur environnement (dans la limite de nos conditions expérimentales). Il serait donc intéressant de réaliser des approches plus globales pour mieux comprendre l'adaptation des cellules  $\beta$  pancréatiques déficientes pour BI-1, d'une part en réalisant une approche globale de transcriptomique (RNaseq) à partir d'îlots pancréatiques fraîchement isolés et d'autre part des approches métaboliques (mesure d'ATP, mesure de flux de glucose marqué et de respirométrie avec l'Oroboros ou le Seahorse).

Le rôle de l'interaction entre le RE et la mitochondrie, appelé MAM a été découvert ces dix dernières années et est devenu un sujet de haut intérêt pour la communauté scientifique, en particulier en essayant de mieux comprendre sa physiologie sur les flux de calcium mais également de manière plus globale sur l'homéostasie de la cellule et son métabolisme. Le rôle de la réponse au stress du RE dépendant de BI-1 dans la cellule  $\beta$  pancréatique pourrait donc permettre de nouvelles avancées dans ce domaine.

## ii. Autophagie

Les données de la littérature indiquent aussi que le stress du RE et la réponse UPR seraient responsables d'une augmentation de l'autophagie et de la réticulophagie, afin de dégrader les protéines mal conformées au sein du RE. En l'occurrence, au sein du pancréas, l'autophagie est un mécanisme de survie essentiel à la cellule  $\beta$  pancréatique.

Dans notre modèle, nous observons une augmentation de la réponse UPR et donc un stress du RE au sein de ces cellules  $\beta$  pancréatiques. La réponse UPR pourrait contribuer à l'augmentation du flux autophagique, et particulièrement via l'activation soutenue d'IRE1 $\alpha$ . De plus, l'accumulation de protéines mal repliées, dont la proinsuline elle-même, au sein du RE, augmenterait le flux autophagique, dans l'optique de dégrader ces protéines mal repliées au sein du RE.

Dans ce sens, une étude présente un rôle de BI-1 dans l'autophagie hépatique et rénale à travers son rôle inhibiteur d'IRE1 $\alpha$ . La délétion génique de *BI-1* mène à une augmentation de l'activation des JNKs sous IRE1 $\alpha$  au sein du foie et des reins des souris BI-1 déficientes. L'activation des JNKs permet ensuite l'induction de l'autophagie en phosphorylant Bcl-2, permettant la libération de Beclin (*Castillo et al., 2011*). *Castillo et al* présentent une augmentation du flux autophagique et une accumulation de LC3-II ainsi qu'une augmentation de la présence du complexe ATG5/ATG12. Le rôle de BI-1 dans le flux autophagique est documenté mais reste encore sujet à débat. De manière similaire, lors de nos analyses, nous avons pu observer une augmentation de la quantité d'autophagolysosomes au sein des coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes analysées en microscopie électronique. Cette donnée s'accompagne d'une augmentation des marqueurs de l'autophagie (LC3-II, p62, du complexe ATG5 – ATG12 et des ubiquitines liées à la lysine 63) au sein des pancréas de souris BI-1 déficientes, au niveau protéique. En revanche, contrairement à l'étude de *Castillo et al*, nous n'avons pas observé d'augmentation de la phosphorylation des JNKs au sein des pancréas des souris BI-1 déficientes. Ainsi, notre étude démontre une augmentation du flux autophagique dans les pancréas des souris BI-1 déficientes. En revanche, il semblerait que les mécanismes sous-jacents puissent être différents selon les types cellulaires et les organes analysés.

En raison de l'augmentation de la mort par apoptose au sein de l'îlots de Langerhans, il est possible que la période d'activation de l'autophagie soit plus précoce au sein des îlots pancréatiques des souris BI-1 déficientes. L'analyse des îlots pancréatiques à des stades plus précoces pourrait déterminer si nous observons un switch d'un mécanisme, en premier lieu, dépendant de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$ , à un mécanisme dépendant ensuite de son activité RNase. Au sein de l'étude de *Castillo et al*, XBP1 n'est pas induit par IRE1 $\alpha$  contrairement à notre modèle BI-1 déficient. Or, la littérature rapporte aussi le rôle de sXBP1 dans l'autophagie (*Zhang et al., 2021*). sXBP1 peut activer directement le facteur de transcription TFEB (Transcription Factor EB), indispensable pour l'induction de l'expression de gènes associés à l'autophagie (*Kim et al., 2021*). Dans les souris BI-1 déficientes, nous observons une augmentation de la présence protéique et génique de sXBP1. Nous pouvons supposer que l'augmentation de l'autophagie puisse passer par l'axe IRE1 $\alpha$  / sXBP1 dans les souris BI-1 déficientes.

La surexpression de BI-1 a été décrite pour augmenter la concentration calcique au sein du lysosome. En augmentant les points de contacts entre les organelles et le RE, BI-1 permettrait d'augmenter l'autophagie via le lysosome. Dans ce contexte, l'augmentation de la



concentration calcique au sein du lysosome permet une activation de la calcineurine, déphosphorylant le facteur de transcription TFEB (Transcription Factor EB) et augmentant ensuite l'expression de gènes associés à l'autophagie (*Kim et al., 2021*). Il serait donc intéressant de mesurer la phosphorylation de TFEB, utilisé comme marqueur d'activation, dans le pancréas des souris BI-1 déficientes.

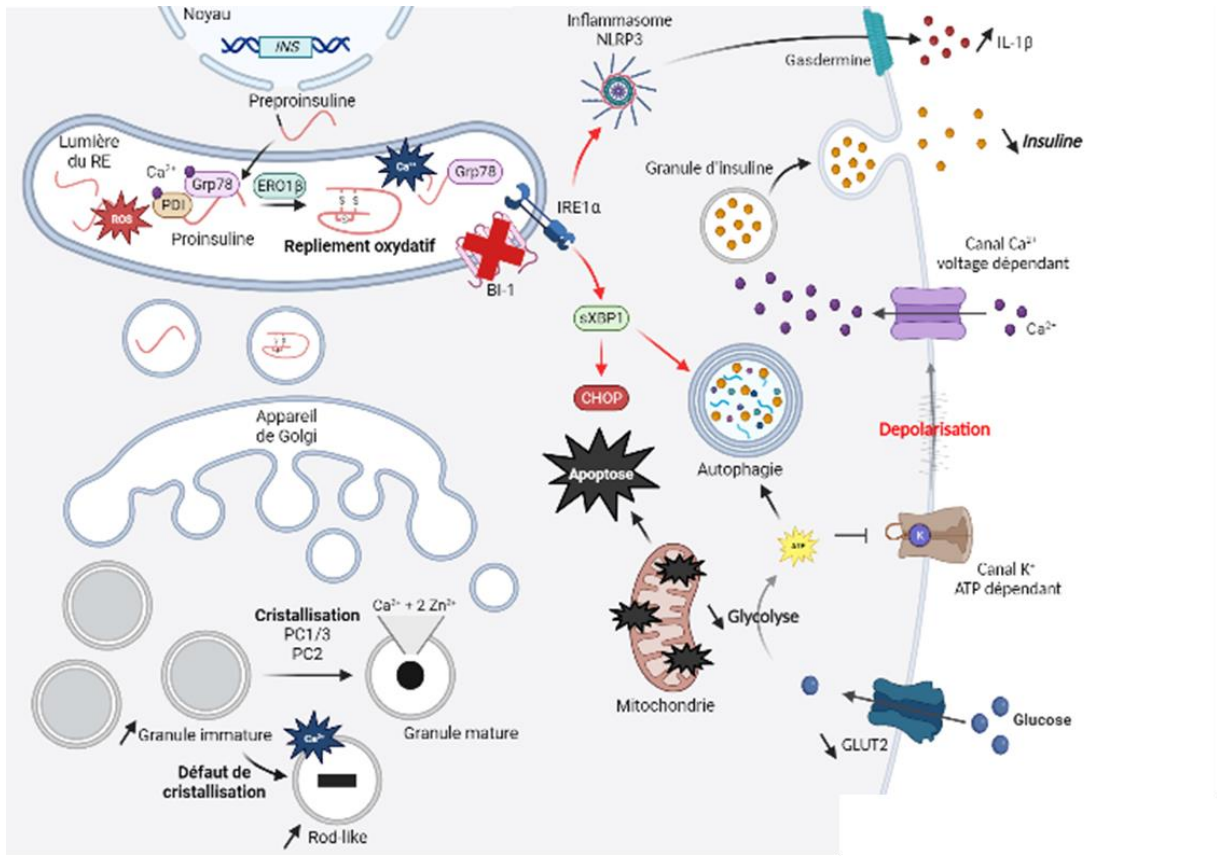
Un autre mécanisme proposé est, réciproquement, la diminution de la concentration calcique au sein du RE par BI-1. Dans ce contexte, BI-1 diminuerait donc la capture du  $Ca^{2+}$  par la mitochondrie et mènerait à une diminution de la production d'ATP au sein de la mitochondrie (*Sano et al., 2012*). La baisse en production énergétique dans la mitochondrie conduirait à une augmentation du flux autophagique au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques, en raison de l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) et l'inhibition de mTOR. Les études du métabolisme mitochondrial proposé plus haut pourrait permettre d'appréhender le rôle de BI-1 dans cet aspect de la régulation de l'autophagie, et plus précisément sur la mitophagie. Ainsi, à travers sa fonction calcique, BI-1 semblerait augmenter l'autophagie par au moins deux mécanismes indépendants mais probablement complémentaires. Le rôle de BI-1 dans l'autophagie reste cependant controversé

Les souris PERK déficientes au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques présentent une augmentation de la quantité de vésicules autophagiques (*Gao et al., 2012*). Ces souris ont également une accumulation de protéines mal repliées dans le RE. La littérature rapporte que l'autophagie serait un mécanisme mis en place par la cellule  $\beta$  pancréatique visant à éliminer la proinsuline (*Riahi et al., 2016*). Nous avons pu observer la présence de marquages d'insuline (révélés par l'utilisation d'anticorps couplés à l'or colloïdale) au sein des autophagolysosomes en microscopie électronique. La présence de granules d'insuline, au sein des organelles autophagiques, suggère une augmentation de leur dégradation via cette voie intra-cellulaire. Malheureusement, en raison de la reconnaissance non-spécifique de l'anticorps, dirigé à la fois contre l'insuline et la proinsuline, nous ne pouvons conclure si les granules dégradés par l'autophagie sont des granules matures ou immatures. Cependant, ces marquages d'insuline au sein d'autophagolysosomes révèlent clairement une augmentation de la crinophagie. De plus, nous avons pu observer une augmentation des mécanismes de réticulophagie et de mitophagie via la présence de RE et de mitochondries dans les vésicules autophagiques, chez la souris BI-1 déficientes.

Ainsi, la machinerie autophagique au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques *BI-1* déficientes apparaît mobilisée, pour protéger la cellule  $\beta$ , en éliminant l'excédent de granules d'insuline immatures



accumulés. Notons que dans une cellule  $\beta$  pancréatique saine, environ 20% de la proinsuline néosynthétisée ne parvient pas à effectuer un repliement correct, conduisant à une activation des mécanismes de dégradation, tels que l'ERAD et l'autophagie (*Liu et al., 2005 ; Wang and Osei, 2011*). Dans le modèle BI-1 déficient, l'augmentation de l'autophagie semblerait être un système compensatoire, afin de prévenir la mort par apoptose des cellules  $\beta$  pancréatiques, en raison de l'augmentation de la quantité excessive d'insuline immature et de la réponse UPR due à un stress du RE (**Figure 16**).



**Figure 16 :** De la synthèse à la sécrétion d'insuline au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique de la souris BI-1 déficiente.

Dans la cellule  $\beta$  pancréatique BI-1 déficientes, la synthèse et la sécrétion d'insuline peuvent être affectées à différents niveaux. Au sein du RE, la proinsuline subit des modifications post-traductionnelles. La délétion génique de BI-1 peut conduire à des perturbations de l'environnement oxydatif du RE, altérant le repliement oxydatif de la proinsuline. De plus, des perturbations de l'homéostasie calcique peut conduire à une diminution de l'activité des chaperonnes au sein du RE. La délétion de BI-1 engendre une suractivation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , pouvant perturber l'expression des gènes associés au repliement de la proinsuline.

Ensuite, la proinsuline passe dans l'appareil de Golgi et dans des vésicules nommées granules immatures d'insuline. Dans le granule immature, la proinsuline est clivée par les enzymes PC1/3 et PC2 en insuline. La présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Zn}^{2+}$  cristallise l'insuline, formant ainsi un corps dense au centre du granule mature d'insuline. Des perturbations de l'homéostasie calcique peut conduire à un défaut de cristallisation de l'insuline.

Les altérations de la mitochondrie au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques peuvent conduire à une diminution de la production d'ATP, augmentant possiblement l'autophagie et perturbant ainsi la sécrétion d'insuline.

Enfin, la suractivation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  conduit à une augmentation de l'expression de sXBP1 et de CHOP, qui sont responsables de l'augmentation de l'autophagie et de l'apoptose.

## II. Entre survie et mort cellulaire des cellules $\beta$ pancréatiques au sein de l'îlot de Langerhans des souris BI-1 déficientes

### A. Perte d'identité et de prolifération des cellules $\beta$ pancréatiques délétées pour BI-1 ?

#### i. Identité de la cellule $\beta$ pancréatique

Les publications de la littérature décrivent une potentielle perte d'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique en réponse au stress du RE. Le stress du RE et la réponse UPR diminueraient l'expression de marqueurs associés à l'identité de la cellule  $\beta$  pancréatique, une stratégie ultime pour échapper à la mort induite par l'UPR terminale (*Groen et al., 2021 ; Sharma et al., 2015 ; Xin et al., 2018*). Par ailleurs, la littérature rapporte que les cellules  $\beta$  pancréatiques MAFA<sup>high</sup>/PDX1<sup>high</sup> présentent des défauts de réponse aux désordres métaboliques (*Nasteska et al., 2021*). Comme décrit précédemment, cette étude met en évidence l'importance de l'hétérogénéité d'identité des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein d'un même îlot. La perte de cet équilibre conduit à des défauts de réponse aux désordres métaboliques. Il serait donc intéressant de mesurer des marqueurs identitaires de la cellule  $\beta$  pancréatique, tels que PDX1, MAFA et NKX6.1 dans les îlots pancréatiques de souris BI-1 déficientes et les lignées cellulaires EndoC $\beta$ H1 transfectées avec un ARN interférent dirigé contre BI-1. Au sein des coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes, nous avons testé des immunomarquages de MAFA et PDX1. Malheureusement, ces marquages en immunofluorescence n'ont pas fonctionné, malgré les changements de conditions de saturation et de concentration d'anticorps primaires et secondaires. En complément, nous pourrions tester ces anticorps sur des coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes, fixés dans un autre antigène fixateur. Néanmoins, nous avons observé une augmentation de l'expression de MAFA dans les souris BI-1 déficientes par immunoempreintes. Une analyse complémentaire en immunofluorescence des coupes pancréatiques de souris BI-1 déficientes permettrait d'observer une potentielle délocalisation nucléaire du facteur de transcription MAFA, essentiel au maintien de la fonction de la cellule  $\beta$  pancréatique. C'est pourquoi il serait intéressant d'explorer ces aspects moléculaires au sein des souris BI-1 déficientes.

#### ii. Prolifération de la cellule $\beta$ pancréatique

La réponse UPR, en particulier ATF6 mais aussi IRE1 $\alpha$  et sXBP1, est impliquée dans la prolifération des cellules  $\beta$  pancréatiques, à la suite d'une demande accrue en insuline (*Sharma*

*et al.*, 2015 ; *Xin et al.*, 2018). Les îlots pancréatiques des souris BI-1 déficientes soumises à un régime gras ne perdent pas leur capacité proliférative. Les îlots des souris BI-1 déficientes sous régime cétogène présentent une augmentation de leur taille et du nombre des îlots par mm<sup>2</sup> en comparaison avec les souris BI-1 déficientes en condition basale. En revanche, les îlots des souris BI-1 déficientes semblent proliférer moins que les îlots pancréatiques des souris sauvages. Bien que les îlots des souris BI-1 déficientes présentent une augmentation d'IRE1 $\alpha$ , la délétion génique de ce dernier au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques conduit à une perte de prolifération des îlots sous régime cétogène (*Xu et al.*, 2014). Cependant, l'inhibition pharmacologique et spécifique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  induit une augmentation de la taille des îlots au sein des souris sauvages soumises à un régime cétogène. A la vue de ces différents résultats, nous avons effectué un marquage de prolifération (Ki67) au sein de nos coupes de pancréas de souris BI-1 déficientes et sauvages. Malheureusement, le marquage n'a pas fonctionné mais au vu du peu de pourcentage de cellules Ki67 dans un tissu isolé *in vivo*, cela n'est pas forcément lié à un problème technique. Nous ne pouvons donc pas complètement exclure l'hypothèse d'une différence de prolifération entre les cellules  $\beta$  pancréatiques sauvages et BI-1 déficientes existe. Des études parallèles à l'identité des cellules  $\beta$  pancréatiques pourraient donc s'avérer intéressante d'autant plus que la prolifération est souvent en balance avec la mort des cellules comme discuté après.

## B. La mort induite par le stress du RE dans les cellules $\beta$ pancréatiques

### i. Lipotoxicité et suractivation d'IRE1 $\alpha$

Etant donné les liens reportés entre IRE1 $\alpha$  / sXBP1 et le métabolisme des lipides (*Hamid et al.*, 2020 ; *Lee et al.*, 2008, 2005), nous avons émis l'hypothèse que la lipotoxicité puisse être responsable de la mort des cellules  $\beta$  observée dans les îlots de Langerhans issus des souris BI-1 déficientes. Au sein des souris BI-1 déficientes, nous n'avons tout d'abord observé aucune différence dans les niveaux de lipides circulants (triglycérides, cholestérol et acides gras libres), limitant cette hypothèse. En revanche, nous n'avons pas analysé la composition lipidique des membranes au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. La littérature rapporte un cercle vicieux entre la composition membranaire -lipidique- *per se* et l'activation d'IRE1 $\alpha$  (*Halbleib et al.*, 2017). Dans notre modèle déficient pour BI-1, il serait intéressant d'analyser la composition membranaire en lipides au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques et si des différences étaient observées d'en déterminer l'origine. D'autre part, la littérature rapporte que la taille des

granules diffère en fonction de la composition membranaire en cholestérol (*Bogan et al., 2012*) et les souris BI-1 déficientes soumises à un régime riche en graisse présentent une augmentation de l'aire des granules d'insuline. Ces résultats suggèrent donc qu'il serait intéressant de pousser l'hypothèse que les îlots de souris BI-1 déficientes sont soumises à des changements de composition membranaire en lien avec l'activation de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  et de son effecteur sXBP1.

Enfin, les données de la littérature suggèrent qu'IRE1 $\alpha$  participerait à la formation d'une structure nommée « UPRosome » : une plateforme protéique permettant l'intégration/activation de diverses voies de signalisations cellulaires (*Belyy et al., 2022, 2020 ; Urra et al., 2020*). La formation d'oligomères d'IRE1 $\alpha$  pourrait être particulièrement intéressante à étudier au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique déficiente pour BI-1. Effectivement, la cinétique d'activation et d'inactivation d'IRE1 $\alpha$  dans un modèle BI-1 déficient pourrait mettre en évidence les différents acteurs de l'« UPRosome ». La formation de ces clusters oligomériques d'IRE1 $\alpha$  ainsi que la cinétique d'activation et le maintien dans le temps de cette plateforme protéique pourraient être la raison de l'augmentation de la mort en réponse au stress du RE dans les souris BI-1 déficientes et plus particulièrement dans la cellule  $\beta$  pancréatique (*Carreras-Sureda et al., 2019 ; Castillo et al., 2011 ; Lipson et al., 2008, 2006*).

## ii. Apoptose

L'apoptose des cellules  $\beta$  est la mort cellulaire programmée la plus largement étudiée au sein des îlots de Langerhans au cours du diabète. Au sein de nos souris BI-1 déficientes, nous avons mis en évidence une diminution du nombre d'îlots par mm<sup>2</sup> accompagnée d'une augmentation significative du nombre de cellules  $\beta$  positives au marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labelling). Ces résultats corrélerent à une augmentation de sXBP1 et de CHOP au niveau génique et à l'activation de la Caspase -3 et de PUMA, au niveau protéique. Nos modèles *in vitro* et *ex vivo* nous ont également permis de mettre en évidence que la délétion de BI-1 sensibiliserait les cellules  $\beta$  pancréatiques à la mort induite par le stress du RE (thapsigargine, tunicamycine) en lien avec l'activation de l'axe IRE1 $\alpha$  et sXBP1. *In vivo*, les images des sections pancréatiques des souris BI-1 déficientes analysées en microscopie électronique présentent davantage de cellules  $\beta$  pancréatiques en souffrance et de corps apoptotiques. Les cellules  $\beta$  pancréatiques BI-1 déficientes en souffrance présentent une augmentation du nombre de mitochondries altérées. Comme discuté en amont,

l'altération des mitochondries chez des souris BI-1 déficientes pourrait venir du rôle tampon de la mitochondrie lors de la fuite massive de  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance du RE. Les modèles de surexpression de BI-1 présentent une fuite calcique du RE qui pourrait contribuer à une diminution de la production d'ATP et *in fine* à des perturbations du potentiel de membrane ou une perméabilisation de la membrane mitochondriale, libérant notamment le cytochrome C à l'origine d'une apoptose mitochondriale programmée. A l'aide des images en microscopie électronique, nous avons pu voir que les interactions entre la mitochondrie et le RE (donc les MAM) sont augmentées dans les souris BI-1 déficientes appuyant l'hypothèse d'une libération accrue du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers la mitochondrie et donc le rôle potentiel de la mitochondrie dans les îlots BI-1 déficients. Il serait donc intéressant d'étudier ce phénomène en relation avec le métabolisme mitochondrial, la production de ROS et la mitophagie pour unifier ces mécanismes et montrer comment la mitochondrie est sous le contrôle du stress du RE.

Ainsi, la perte de sécrétion d'insuline peut donc venir de la perte progressive du nombre d'îlots de Langerhans au sein des souris BI-1 déficientes, due à une augmentation accrue du stress du RE et de l'activité d'IRE1 $\alpha$  et sXBP1 à l'origine d'une mort mitochondriale programmée. Au sein de nos souris BI-1 déficientes soumises à un régime riche en graisse, l'inhibition pharmacologique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  conduit à une amélioration de la morphologie des cellules  $\beta$  pancréatiques (moins de cellules en souffrance, correction de la morphologie des mitochondries et correction du RE dilaté vers une morphologie régulière observée sous la forme de tubules aplatis et non gonflés). Ces résultats démontrent donc l'implication de l'axe IRE1 $\alpha$  et sXBP1 dans la mort induite par le stress du RE des cellules  $\beta$  pancréatiques BI-1 déficientes (Hassler et al., 2015 ; Lee et al., 2020 ; Xu et al., 2014). Dans la logique de nos résultats, une étude montre au sein d'un modèle murin pré-clinique de diabète, les souris Akita, que l'inhibition de l'activité RNase limite la progression du diabète en diminuant la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques (Herlea-Pana et al., 2021). De plus, des études contradictoires ont montré que la surexpression ou la délétion de XBP1 mèneraient à la mort de la cellule  $\beta$  pancréatique rendant compte de la complexité des mécanismes régulés (Allagnat et al., 2010 ; G.-H. Lee et al., 2011 ; Lee et al., 2022). Ainsi, la régulation fine de l'axe IRE1 $\alpha$  / sXBP1 est essentielle pour le maintien de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques.

D'autres part, la perte de la sécrétion d'insuline peut s'expliquer par la perte des connexions entre les cellules  $\beta$  pancréatiques au sein d'un îlot. Plusieurs études montrent l'importance de la synchronisation des cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse au glucose pour la sécrétion d'insuline (Almaça et al., 2015). D'après les observations en microscopie électronique, la perte

des cellules  $\beta$  pancréatiques est hétérogène au sein de l'îlot de Langerhans des souris BI-1 déficientes. Certaines cellules  $\beta$  pancréatiques sont davantage en souffrance que d'autres cellules, au sein d'un même îlot. Ces cellules perdent alors leurs contacts cellule-cellule, empêchant la synchronisation des cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse au glucose au sein d'un même îlot. Cette observation permet d'argumenter sur les différences que nous observons *in vitro* et *ex vivo*.

En conclusion, une des conséquences de la mort des cellules  $\beta$  au sein des îlots pancréatiques des souris BI-1 déficientes serait la perte des jonctions cellulaires entre les cellules, conduisant ainsi à une diminution de la sécrétion d'insuline par rapport aux souris contrôles.

### iii. Inflammation

En parallèle de l'apoptose, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la signalisation de l'inflammasome NLRP3, avec une augmentation du clivage de la Caspase -1 et de l'IL-1 $\beta$  au sein des pancréas des souris BI-1 déficientes. Ce résultat est confirmé au sein de modèles *in vitro* (MIN6 et EndoC $\beta$ H1) délétés pour BI-1. L'augmentation de l'inflammasome NLRP3 corrèle avec plus d'infiltration de neutrophiles au sein des îlots pancréatiques déficients pour BI-1 et une augmentation du niveau de cytokines circulantes. La littérature décrit que l'infiltration de neutrophiles et de macrophages facilitent la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques (Yang *et al.*, 2022). Dans cette étude, la présence de TNF $\alpha$  engendre une augmentation de l'expression de CXCL8 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 8), dépendante du stress du RE et permet le recrutement de neutrophiles. Le recrutement de neutrophiles que nous observons dans notre modèle pourrait venir de l'augmentation de l'inflammation au sein de l'îlot pancréatique des souris BI-1 déficientes. Il serait donc intéressant d'identifier la présence relative de macrophages dans les îlots de ces souris à l'aide d'un anticorps dirigé contre CD68 (Cluster of Differentiation 68). Les souris BI-1 déficientes présentent une augmentation de la réponse UPR, qui pourrait induire ainsi l'augmentation de l'expression de CXCL8. Cela expliquerait la présence de neutrophiles au sein des îlots des souris BI-1 déficientes. De plus, ces neutrophiles peuvent être en partie responsables de la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein des îlots pancréatiques de souris BI-1 déficientes.

Enfin, la présence élevée de cytokines circulantes peut être un paramètre important dans la mort et le stress du RE au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques déficientes pour BI-1. Comme décrit précédemment, les cytokines sont responsables d'une augmentation de la réponse UPR dans les



cellules  $\beta$  pancréatiques (*Brozzi et al., 2015 ; Cardozo et al., 2005*). Ainsi, dans nos souris BI-1 déficientes, les cellules  $\beta$  pancréatiques présentent une augmentation de la réponse UPR, qui pourrait être médiée par les cytokines pro-inflammatoires présentes dans l'environnement de l'îlot de Langerhans. En revanche, les lignées humaines EndoC $\beta$ H1 délétées pour BI-1 ne sont pas davantage vulnérables à la mort induite par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ). Par conséquent, le dialogue entre le système immunitaire et les cellules  $\beta$  au sein des îlots pancréatiques de souris BI-1 déficientes restent à explorer.

### III. Perspectives thérapeutiques

#### A. Le modèle d'induction de la mort des cellules $\beta$ pancréatiques

La streptozotocine est une molécule induisant spécifiquement la mort des cellules  $\beta$  pancréatiques. La streptozotocine est une molécule chimique, rentrant spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques via le transporteur de glucose GLUT2. Cette molécule permet d'induire des dommages à l'ADN et la production de ROS au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique. L'injection de streptozotocine à faible dose quotidiennement conduit à des dommages de la cellule  $\beta$  pancréatique et l'installation progressive d'un environnement inflammatoire, mimant l'« insulinitis », stade précoce du diabète de type 1. Progressivement, la streptozotocine conduit à une perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques, résultant en une perte de la sécrétion de l'insuline et par conséquent, à une hyperglycémie. Ce modèle permet de produire des animaux atteints d'un diabète de type 1 (*Furman, 2021*).

Ici, nous proposons d'effectuer des faibles injections quotidiennes de streptozotocine au sein des souris BI-1 déficientes et sauvages, en présence ou non de l'inhibiteur spécifique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ .

En premier lieu, cette étude nous permettrait d'étudier spécifiquement le rôle de BI-1 dans la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Dans un second temps, l'utilisation des inhibiteurs de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  nous permettrait de mettre en évidence que l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  est une potentielle cible thérapeutique pour les diabètes dus à une perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques (diabète de type 1 et diabète monogénique).



## B. Le modèle de diabète de type 2

Les modèles de souris génétiquement modifiées ob/ob et db/db sont des modèles d'obésité et de diabète de type 2. Ces modèles murins présentent des mutations génétiques les prédisposant à l'obésité. Les souris ob/ob sont déficientes pour la leptine (hormone de la satiété), tandis que les souris db/db sont déficientes pour le récepteur de la leptine. Les souris ob/ob sont obèses et insulino-résistantes, alors que les souris db/db sont obèses et diabétiques, avec une défaillance des cellules  $\beta$  pancréatiques (*Shafrir et al., 1999*).

A la lumière de nos résultats, nous ne pouvons exclure les effets de l'inhibiteur de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  sur l'insulino-résistance en périphérique. Par conséquent, l'utilisation de ces deux modèles murins nous permettrait d'étudier l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  dans l'insulino-résistance et la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques, associées à l'obésité.

Les souris db/db présentent une perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques aux alentours de 4 mois, en raison d'une hyperglycémie chronique. Ainsi, dans ce modèle, il serait intéressant d'inhiber l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  avant et après 4 mois, afin de voir si nous pouvons prévenir et guérir la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Ces études permettraient donc de mettre en évidence le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  dans le diabète de type 2.

D'ailleurs, ces expériences pourraient être reproduites au sein des souris BI-1 déficientes à l'âge de 4 et 8 semaines, donc avant et après l'installation du phénotype hyperglycémique. L'utilisation des inhibiteurs de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  pourraient protéger de la perte des cellules  $\beta$  pancréatiques observée dans les souris BI-1 déficientes.

## C. L'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , une potentielle cible thérapeutique ?

La grande question de notre étude est de comprendre le rôle de BI-1 dans la mort et la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques. Les différents rôles de BI-1 soulignent la complexité de cette protéine régulatrice, à l'interconnexion de différentes voies de signalisations intracellulaires, qui pourraient être responsables de la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques dans les souris BI-1 déficientes.

Par conséquent, afin de savoir si l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  est responsable de la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques dans le modèle BI-1 déficient, il serait intéressant d'utiliser des souris dont le site génique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  est flanquée entre deux

domaines lox-P (RNase<sup>fl/fl</sup>). Ces souris seront croisées avec des souris présentant une Cre-recombinase inducible au tamoxifène sous le promoteur de l'insuline (Ins1-CreERT2), au préalable croisées avec des souris BI-1 déficientes (*Thorens et al., 2015*). Ce modèle de souris (BI-1 déficient et RNase déficiente spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques) est un modèle inducible. L'intérêt de ce modèle est l'induction de l'enzyme Cre recombinase spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques à différents stades du développement de la souris, à l'aide du tamoxifène. En présence de tamoxifène, la Cre recombinase permet d'enlever les sites lox-P autour de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  engendrant une délétion de cette activité spécifiquement dans les cellules  $\beta$  pancréatiques. Puisque l'hyperglycémie des souris BI-1 déficientes s'installent à 8 semaines, nous pouvons envisager d'effectuer des injections au tamoxifène dans ces souris à différents âges (4, 8, 10 et 12 semaines). Ce modèle nous permettra d'identifier si l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  est essentielle à l'installation de l'hyperglycémie et la perte des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein des souris BI-1 déficientes.

Dans un second temps, il serait intéressant d'utiliser les modèles de souris dont le gène XBP1 est flanqué entre deux sites lox-P (*Lee et al., 2008, 2022*). L'utilisation de ces souris, croisées avec les souris Ins1-CreERT2 BI-1 déficientes, nous permettrait d'identifier le rôle de l'activité de XBP1 dans l'installation du diabète au sein des souris BI-1 déficientes.

De plus, en comparant nos deux modèles murins, cette étude nous permettrait d'identifier le rôle de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  dans le développement du diabète, en distinguant le rôle de sXBP1 et le rôle du RIDD, dans la mort et la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques au sein de la souris BI-1 déficiente.

## CONCLUSION

---

Cette thèse permet de souligner le rôle crucial de la réponse UPR et plus particulièrement de l'axe IRE1 $\alpha$  / sXBP1 dans la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques au cours du développement du diabète. Les souris BI-1 déficientes sont un intéressant modèle d'étude récapitulant les caractéristique d'un diabète de type 2, avec l'insulino-résistance périphérique et la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques. Au sein de ce modèle, nous avons pu mettre en évidence le lien entre l'axe IRE1 $\alpha$  / sXBP1 et l'inflammasome NLRP3 au sein des cellules  $\beta$  pancréatiques. L'étude des interconnexions entre la réponse au stress du RE et l'inflammation est essentielle afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les pathologies métaboliques.

L'utilisation de différents modèles, allant de l'*in vitro* à l'*in vivo*, nous a permis de mettre en évidence le rôle cytoprotecteur de BI-1 au sein de la cellule  $\beta$  pancréatique. La relevance clinique pourrait être un grand avantage pour cette étude, afin d'identifier les niveaux d'expression de BI-1 dans des coupes et/ou pancréas de patients atteints de diabète.

A l'heure actuelle, les traitements anti-diabétiques ne permettent pas de corriger la perte des cellules  $\beta$  pancréatiques, ce qui en fait un enjeu majeur de santé publique. A l'aide de cette thèse, nous avons pu identifier une nouvelle cible thérapeutique modulant à la fois la perte progressive des cellules  $\beta$  pancréatiques, la sécrétion et la réponse à l'insuline. L'inhibition pharmacologique d'IRE1 $\alpha$ , plus particulièrement de son activité RNase, corrige l'inflammation et la mort au sein de l'îlot de Langerhans, ainsi que les désordres métaboliques au sein d'un modèle de diabète de type 2.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats a permis d'identifier l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  comme une potentielle cible thérapeutique dans les maladies métaboliques et plus particulièrement le diabète de type 2.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Abdulkarim, B., Hernangomez, M., Igoillo-Esteve, M., Cunha, D.A., Marselli, L., Marchetti, P., Ladriere, L., Cnop, M., 2017. Guanabenz Sensitizes Pancreatic  $\beta$  Cells to Lipotoxic Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis. *Endocrinology* 158, 1659–1670. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1773>
- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., 2008. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 75–89. <https://doi.org/10.1247/csf.07044>
- Adams, B.M., Oster, M.E., Hebert, D.N., 2019. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum. *Protein J.* 38, 317–329. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09831-w>
- Ahn, T., Yun, C.-H., Chae, H.Z., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2009.  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter-like activity of human recombinant Bax inhibitor-1 reconstituted into liposomes. *FEBS J.* 276, 2285–2291. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06956.x>
- Ahn, T., Yun, C.-H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2010. Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter activity of human Bax inhibitor-1. *Cell Calcium* 47, 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.02.003>
- Allagnat, F., Christulia, F., Ortis, F., Pirot, P., Lortz, S., Lenzen, S., Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., 2010. Sustained production of spliced X-box binding protein 1 (XBP1) induces pancreatic beta cell dysfunction and apoptosis. *Diabetologia* 53, 1120–1130. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1699-7>
- Allotey, R.A., Mohan, V., McDermott, M.F., Deepa, R., Premalatha, G., Hassan, Z., Cassell, P.G., North, B.V., Vaxillaire, M., Mein, C.A., Swan, D.C., O’Grady, E., Ramachandran, A., Snehalatha, C., Sinnot, P.J., Hemmatpour, S.K., Froguel, P., Hitman, G.A., 2004. The

- EIF2AK3 gene region and type I diabetes in subjects from South India. *Genes Immun.* 5, 648–652. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364139>
- Almaça, J., Liang, T., Gaisano, H.Y., Nam, H.G., Berggren, P.-O., Caicedo, A., 2015. Spatial and temporal coordination of insulin granule exocytosis in intact human pancreatic islets. *Diabetologia* 58, 2810–2818. <https://doi.org/10.1007/s00125-015-3747-9>
- Amar-Costesec, A., Dublet, B., Beaufay, H., 1989. Translocation and proteolytic processing of nascent secretory polypeptide chains: two functions associated with the ribosomal domain of the endoplasmic reticulum. *Biol. Cell* 65, 99–108.
- Ameri, K., Harris, A.L., 2008. Activating transcription factor 4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.01.020>
- American Diabetes Association, 2021. 6. Glycemic Targets: *Standards of Medical Care in Diabetes—2021*. *Diabetes Care* 44, S73–S84. <https://doi.org/10.2337/dc21-S006>
- and the WHO Multinational Study Group, Morrish, N.J., Wang, S.-L., Stevens, L.K., Fuller, J.H., Keen, H., 2001. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. *Diabetologia* 44, S14–S21. <https://doi.org/10.1007/PL00002934>
- Andralojc, K.M., Mercalli, A., Nowak, K.W., Albarello, L., Calcagno, R., Luzi, L., Bonifacio, E., Doglioni, C., Piemonti, L., 2009. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* 52, 486–493. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1238-y>
- Arakawa, S., Tsujioka, M., Yoshida, T., Tajima-Sakurai, H., Nishida, Y., Matsuoka, Y., Yoshino, I., Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2017. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. *Cell Death Differ.* 24, 1598–1608. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.84>

- Arunagiri, A., Haataja, L., Pottekat, A., Pamenan, F., Kim, S., Zeltser, L.M., Paton, A.W., Paton, J.C., Tsai, B., Itkin-Ansari, P., Kaufman, R.J., Liu, M., Arvan, P., 2019. Proinsulin misfolding is an early event in the progression to type 2 diabetes. *eLife* 8, e44532. <https://doi.org/10.7554/eLife.44532>
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G., Fafournoux, P., 2004. Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 279, 5288–5297. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311862200>
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., Ktistakis, N.T., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 182, 685–701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>
- Axten, J.M., Medina, J.R., Feng, Y., Shu, A., Romeril, S.P., Grant, S.W., Li, W.H.H., Heering, D.A., Minthorn, E., Mencken, T., Atkins, C., Liu, Q., Rabindran, S., Kumar, R., Hong, X., Goetz, A., Stanley, T., Taylor, J.D., Sigethy, S.D., Tomberlin, G.H., Hassell, A.M., Kahler, K.M., Shewchuk, L.M., Gampe, R.T., 2012. Discovery of 7-methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J. Med. Chem.* 55, 7193–7207. <https://doi.org/10.1021/jm300713s>
- Bailly-Maitre, B., Belgardt, B.F., Jordan, S.D., Coornaert, B., von Freyend, M.J., Kleinridders, A., Mauer, J., Cuddy, M., Kress, C.L., Willmes, D., Essig, M., Hampel, B., Protzer, U., Reed, J.C., Brüning, J.C., 2010. Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J. Biol. Chem.* 285, 6198–6207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056648>

- Bailly-Maitre, B., Fondevila, C., Kaldas, F., Droin, N., Luciano, F., Ricci, J.-E., Croxton, R., Krajewska, M., Zapata, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., Farmer, D., Reed, J.C., 2006. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2809–2814. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506854103>
- Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319, 916–919. <https://doi.org/10.1126/science.1141448>
- Basuli, D., Stevens, R.G., Torti, F.M., Torti, S.V., 2014. Epidemiological associations between iron and cardiovascular disease and diabetes. *Front. Pharmacol.* 5, 117. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00117>
- Beger, H.G., Warshaw, A.L., Hruban, R.H., Büchler, M.W., Lerch, M.M., Neoptolemos, J.P., Shimosegawa, T., Whitcomb, D.C., Groß, C. (Eds.), 2018. *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9781119188421>
- Behnke, J., Mann, M.J., Scruggs, F.-L., Feige, M.J., Hendershot, L.M., 2016. Members of the Hsp70 Family Recognize Distinct Types of Sequences to Execute ER Quality Control. *Mol. Cell* 63, 739–752. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.012>
- Belyy, V., Tran, N.-H., Walter, P., 2020. Quantitative microscopy reveals dynamics and fate of clustered IRE1 $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 1533–1542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915311117>
- Belyy, V., Zuazo-Gaztelu, I., Alamban, A., Ashkenazi, A., Walter, P., 2022. Endoplasmic reticulum stress activates human IRE1 $\alpha$  through reversible assembly of inactive dimers into small oligomers. *eLife* 11, e74342. <https://doi.org/10.7554/eLife.74342>

- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 4, e423. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040423>
- Berridge, M.J., 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 32, 235–249. <https://doi.org/10.1016/s0143416002001823>
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* 2, 326–332. <https://doi.org/10.1038/35014014>
- Bhattarai, K.R., Kim, H.-K., Chaudhary, M., Ur Rashid, M.M., Kim, J., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2021. TMBIM6 regulates redox-associated posttranslational modifications of IRE1 $\alpha$  and ER stress response failure in aging mice and humans. *Redox Biol.* 47, 102128. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102128>
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., De Waard, M., 2000. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177–190. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80881-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80881-8)
- Bogan, J.S., Xu, Y., Hao, M., 2012. Cholesterol Accumulation Increases Insulin Granule Size and Impairs Membrane Trafficking: Cholesterol in Insulin Granule Regulation. *Traffic* 13, 1466–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01407.x>
- Boise, L.H., Collins, C.M., 2001. Salmonella-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death? *Trends Microbiol.* 9, 64–67. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01937-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01937-5)
- Bommasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., Brewer, J.W., 2009. ATF6 $\alpha$  induces XBP1-



- independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* 122, 1626–1636.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Böni-Schnetzler, M., Thorne, J., Parnaud, G., Marselli, L., Ehses, J.A., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Halban, P.A., Weir, G.C., Donath, M.Y., 2008. Increased Interleukin (IL)-1 $\beta$  Messenger Ribonucleic Acid Expression in  $\beta$ -Cells of Individuals with Type 2 Diabetes and Regulation of IL-1 $\beta$  in Human Islets by Glucose and Autostimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 4065–4074. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0396>
- Brozzi, F., Nardelli, T.R., Lopes, M., Millard, I., Barthson, J., Igoillo-Esteve, M., Grieco, F.A., Villate, O., Oliveira, J.M., Casimir, M., Bugliani, M., Engin, F., Hotamisligil, G.S., Marchetti, P., Eizirik, D.L., 2015. Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia* 58, 2307–2316.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-015-3669-6>
- Buchberger, A., Bukau, B., Sommer, T., 2010. Protein Quality Control in the Cytosol and the Endoplasmic Reticulum: Brothers in Arms. *Mol. Cell* 40, 238–252.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.001>
- Buitinga, M., Callebaut, A., Marques Câmara Sodré, F., Crèvecoeur, I., Blahnik-Fagan, G., Yang, M.-L., Bugliani, M., Arribas-Layton, D., Marré, M., Cook, D.P., Waelkens, E., Mallone, R., Piganelli, J.D., Marchetti, P., Mamula, M.J., Derua, R., James, E.A., Mathieu, C., Overbergh, L., 2018. Inflammation-Induced Citrullinated Glucose-Regulated Protein 78 Elicits Immune Responses in Human Type 1 Diabetes. *Diabetes* 67, 2337–2348.  
<https://doi.org/10.2337/db18-0295>
- Buja, L.M., Eigenbrodt, M.L., Eigenbrodt, E.H., 1993. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117, 1208–1214.
- Bultynck, G., Kiviluoto, S., Henke, N., Ivanova, H., Schneider, L., Rybalchenko, V., Luyten, T., Nuyts, K., De Borggraeve, W., Bezprozvanny, I., Parys, J.B., De Smedt, H., Missiaen,

- L., Methner, A., 2012. The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca<sup>2+</sup>-permeable channel pore. *J. Biol. Chem.* 287, 2544–2557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.275354>
- Bultynck, G., Kiviluoto, S., Methner, A., 2014. Bax inhibitor-1 is likely a pH-sensitive calcium leak channel, not a H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Sci. Signal.* 7, pe22. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005764>
- Cadavez, L., Montane, J., Alcarraz-Vizán, G., Visa, M., Vidal-Fàbrega, L., Servitja, J.-M., Novials, A., 2014. Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with human islet amyloid polypeptide overexpression. *PloS One* 9, e101797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101797>
- Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D., 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Cardozo, A.K., Ortis, F., Storling, J., Feng, Y.-M., Rasschaert, J., Tonnesen, M., Van Eylen, F., Mandrup-Poulsen, T., Herchuelz, A., Eizirik, D.L., 2005. Cytokines downregulate the sarcoendoplasmic reticulum pump Ca<sup>2+</sup> ATPase 2b and deplete endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>, leading to induction of endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 452–461. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.2.452>
- Carrara, G., Saraiva, N., Gubser, C., Johnson, B.F., Smith, G.L., 2012. Six-transmembrane topology for Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and Bax inhibitor 1 (BI-1) provides model for the transmembrane Bax inhibitor-containing motif (TMBIM) family. *J. Biol. Chem.* 287, 15896–15905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.336149>
- Carreras-Sureda, A., Jaña, F., Urrea, H., Durand, S., Mortenson, D.E., Sagredo, A., Bustos, G., Hazari, Y., Ramos-Fernández, E., Sassano, M.L., Pihán, P., van Vliet, A.R., González-Quiroz, M., Torres, A.K., Tapia-Rojas, C., Kerkhofs, M., Vicente, R., Kaufman, R.J., Inestrosa, N.C., Gonzalez-Billault, C., Wiseman, R.L., Agostinis, P., Bultynck, G., Court,

- F.A., Kroemer, G., Cárdenas, J.C., Hetz, C., 2019. Non-canonical function of IRE1 $\alpha$  determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nat. Cell Biol.* 21, 755–767. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0329-y>
- Carreras-Sureda, A., Pihán, P., Hetz, C., 2018. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: fine-tuning stress responses. *Cell Calcium* 70, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.004>
- Castillo, K., Rojas-Rivera, D., Lisbona, F., Caballero, B., Nassif, M., Court, F.A., Schuck, S., Ibar, C., Walter, P., Sierralta, J., Glavic, A., Hetz, C., 2011. BAX inhibitor-1 regulates autophagy by controlling the IRE1 $\alpha$  branch of the unfolded protein response. *EMBO J.* 30, 4465–4478. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.318>
- Chae, H.-J., Ke, N., Kim, H.-R., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M., Reed, J.C., 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2003.09.011>
- Chae, H.-J., Kim, H.-R., Xu, C., Bailly-Maitre, B., Krajewska, M., Krajewski, S., Banares, S., Cui, J., Digicaylioglu, M., Ke, N., Kitada, S., Monosov, E., Thomas, M., Kress, C.L., Babendure, J.R., Tsien, R.Y., Lipton, S.A., Reed, J.C., 2004. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell* 15, 355–366. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.038>
- Chan, J.Y., Cooney, G.J., Biden, T.J., Laybutt, D.R., 2011. Differential regulation of adaptive and apoptotic unfolded protein response signalling by cytokine-induced nitric oxide production in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 54, 1766–1776. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2139-z>

- Chan, J.Y., Luzuriaga, J., Bensellam, M., Biden, T.J., Laybutt, D.R., 2013. 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* 62, 1557–1568. <https://doi.org/10.2337/db12-0701>
- Chan, J.Y., Luzuriaga, J., Maxwell, E.L., West, P.K., Bensellam, M., Laybutt, D.R., 2015. The balance between adaptive and apoptotic unfolded protein responses regulates  $\beta$ -cell death under ER stress conditions through XBP1, CHOP and JNK. *Mol. Cell. Endocrinol.* 413, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.06.025>
- Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W.A., Liu, Q., 2014. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science* 344, 1131–1135. <https://doi.org/10.1126/science.1252043>
- Chen, C., Ma, X., Yang, C., Nie, W., Zhang, J., Li, H., Rong, P., Yi, S., Wang, W., 2018. Hypoxia potentiates LPS-induced inflammatory response and increases cell death by promoting NLRP3 inflammasome activation in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 2512–2518. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.134>
- Chen, C.-W., Guan, B.-J., Alzahrani, M.R., Gao, Z., Gao, L., Bracey, S., Wu, J., Mbow, C.A., Jobava, R., Haataja, L., Zalavadia, A.H., Schaffer, A.E., Lee, H., LaFramboise, T., Bederman, I., Arvan, P., Mathews, C.E., Gerling, I.C., Kaestner, K.H., Tirosh, B., Engin, F., Hatzoglou, M., 2022. Adaptation to chronic ER stress enforces pancreatic  $\beta$ -cell plasticity. *Nat. Commun.* 13, 4621. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32425-7>
- Chen, J., Saxena, G., Mungrue, I.N., Lusic, A.J., Shalev, A., 2008. Thioredoxin-interacting protein: a critical link between glucose toxicity and beta-cell apoptosis. *Diabetes* 57, 938–944. <https://doi.org/10.2337/db07-0715>

- Chen, X., Karnovsky, A., Sans, M.D., Andrews, P.C., Williams, J.A., 2010. Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies. *Proteomics* 10, 4040–4052. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000234>
- Chino, H., Mizushima, N., 2020. ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol.* 30, 384–398. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.001>
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clauss, I.M., Chu, M., Zhao, J.-L., Glimcher, L.H., 1996. The Basic Domain/Leucine Zipper Protein hXBP-1 Preferentially Binds to and Transactivates CRE-Like Sequences Containing an ACGT Core. *Nucleic Acids Res.* 24, 1855–1864. <https://doi.org/10.1093/nar/24.10.1855>
- Cnop, M., Ladriere, L., Hekerman, P., Ortis, F., Cardozo, A.K., Dogusan, Z., Flamez, D., Boyce, M., Yuan, J., Eizirik, D.L., 2007. Selective Inhibition of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 $\alpha$  Dephosphorylation Potentiates Fatty Acid-induced Endoplasmic Reticulum Stress and Causes Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction and Apoptosis\*. *J. Biol. Chem.* 282, 3989–3997. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607627200>
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Eizirik, D.L., 2005. Many Differences, Few Similarities 54, 11.
- CONTRERAS, C.J., LIN, L., HOGAN, M.F., OBERST, A., KAHN, S.E., TEMPLIN, A.T., 2021. 294-OR: RIPK3-Mediated Necroptosis Is an Alternative Form of TNF $\alpha$ -Induced  $\beta$ -Cell Death. *Diabetes* 70, 294-OR. <https://doi.org/10.2337/db21-294-OR>
- Cook, D.L., Hales, N., 1984. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271–273. <https://doi.org/10.1038/311271a0>
- Cooksey, R.C., Jouihan, H.A., Ajioka, R.S., Hazel, M.W., Jones, D.L., Kushner, J.P., McClain, D.A., 2004. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity

- in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* 145, 5305–5312.  
<https://doi.org/10.1210/en.2004-0392>
- Copeland, D.E., Dalton, A.J., 1959. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 393–396. <https://doi.org/10.1083/jcb.5.3.393>
- Corbett, E.F., Oikawa, K., Francois, P., Tessier, D.C., Kay, C., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y., Krause, K.H., Michalak, M., 1999. Ca<sup>2+</sup> regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J. Biol. Chem.* 274, 6203–6211.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6203>
- Corbett, J.A., 2006. Insulin biosynthesis: the IRE $\alpha$  of it all. *Cell Metab.* 4, 175–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.08.007>
- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., Walter, P., 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18773–18784. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509487102>
- Cullinan, S.B., Diehl, J.A., 2006. Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 317–332.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.09.018>
- Cullinan, S.B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R.J., Diehl, J.A., 2003. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7198–7209. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7198-7209.2003>
- Cunha, D.A., Gurzov, E.N., Naamane, N., Ortis, F., Cardozo, A.K., Bugliani, M., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2014. JunB protects  $\beta$ -cells from lipotoxicity via the XBP1-AKT pathway. *Cell Death Differ.* 21, 1313–1324. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.53>
- Cunha, D.A., Ladrière, L., Ortis, F., Igoillo-Esteve, M., Gurzov, E.N., Lupi, R., Marchetti, P., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2009. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-

- cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes* 58, 2851–2862. <https://doi.org/10.2337/db09-0685>
- Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., Julier, C., 2000. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat. Genet.* 25, 406–409. <https://doi.org/10.1038/78085>
- Ding, S., Xu, S., Ma, Y., Liu, G., Jang, H., Fang, J., 2019. Modulatory Mechanisms of the NLRP3 Inflammasomes in Diabetes. *Biomolecules* 9, E850. <https://doi.org/10.3390/biom9120850>
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., Morrison, B., Stockwell, B.R., 2012. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149, 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dolenšek, J., Rupnik, M.S., Stožer, A., 2015. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets* 7, e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Dolma, S., Lessnick, S.L., Hahn, W.C., Stockwell, B.R., 2003. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 3, 285–296. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00050-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00050-3)
- Dondelinger, Y., Delanghe, T., Priem, D., Wynosky-Dolfi, M.A., Sorobetea, D., Rojas-Rivera, D., Giansanti, P., Roelandt, R., Gropengiesser, J., Ruckdeschel, K., Savvides, S.N., Heck, A.J.R., Vandenabeele, P., Brodsky, I.E., Bertrand, M.J.M., 2019. Serine 25 phosphorylation inhibits RIPK1 kinase-dependent cell death in models of infection and inflammation. *Nat. Commun.* 10, 1729. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09690-0>

- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., Samali, A., 2013. The eIF2 $\alpha$  kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 3493–3511. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1252-6>
- Dowling, P., O’Driscoll, L., O’Sullivan, F., Dowd, A., Henry, M., Jeppesen, P.B., Meleady, P., Clynes, M., 2006. Proteomic screening of glucose-responsive and glucose non-responsive MIN-6 beta cells reveals differential expression of proteins involved in protein folding, secretion and oxidative stress. *Proteomics* 6, 6578–6587. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600298>
- DuRose, J.B., Tam, A.B., Niwa, M., 2006. Intrinsic Capacities of Molecular Sensors of the Unfolded Protein Response to Sense Alternate Forms of Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell* 17, 3095–3107. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-01-0055>
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., Watada, H., 2008. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 8, 325–332. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.009>
- Eizirik, D.L., Mandrup-Poulsen, T., 2001. A choice of death – the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115–2133. <https://doi.org/10.1007/s001250100021>
- Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., Eizirik, D.L., Mathis, D., Hotamisligil, G.S., 2013. Restoration of the Unfolded Protein Response in Pancreatic  $\beta$  Cells Protects Mice Against Type 1 Diabetes. *Sci. Transl. Med.* 5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006534>
- Feng, N., Ma, X., Wei, X., Zhang, J., Dong, A., Jin, M., Zhang, H., Guo, X., 2014. Common variants in PERK, JNK, BIP and XBP1 genes are associated with the risk of prediabetes



- or diabetes-related phenotypes in a Chinese population. *Chin. Med. J. (Engl.)* 127, 2438–2444.
- Fernandes-da-Silva, A., Miranda, C.S., Santana-Oliveira, D.A., Oliveira-Cordeiro, B., Rangel-Azevedo, C., Silva-Veiga, F.M., Martins, F.F., Souza-Mello, V., 2021. Endoplasmic reticulum stress as the basis of obesity and metabolic diseases: focus on adipose tissue, liver, and pancreas. *Eur. J. Nutr.* 60, 2949–2960. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02542-y>
- Flamment, M., Hajduch, E., Ferré, P., Foufelle, F., 2012. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.003>
- Floyd, J.C., 1979. 9 Human pancreatic polypeptide. *Clin. Endocrinol. Metab.* 8, 379–399. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(79\)80048-1](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(79)80048-1)
- Fonseca, S.G., Burcin, M., Gromada, J., Urano, F., 2009. Endoplasmic reticulum stress in  $\beta$ -cells and development of diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.07.003>
- Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Lu, S., Lipson, K.L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M.A., Urano, F., 2010. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J. Clin. Invest.* 120, 744–755. <https://doi.org/10.1172/JCI39678>
- Fontés, G., Zarrouki, B., Hagman, D.K., Latour, M.G., Semache, M., Roskens, V., Moore, P.C., Prentki, M., Rhodes, C.J., Jetton, T.L., Poitout, V., 2010. Glucolipototoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia* 53, 2369–2379. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1850-5>
- Friedman, J.R., Voeltz, G.K., 2011. The ER in 3-D: a multifunctional dynamic membrane network. *Trends Cell Biol.* 21, 709–717. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.07.004>

Furman, B.L., 2021. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc.* 1, e78. <https://doi.org/10.1002/cpz1.78>

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A.V., Arama, E., Baehrecke, E.H., Barlev, N.A., Bazan, N.G., Bernassola, F., Bertrand, M.J.M., Bianchi, K., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F.K.-M., Chandel, N.S., Cheng, E.H., Chipuk, J.E., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J.R., Czabotar, P.E., D'Angiolella, V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K.-M., DeBerardinis, R.J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F., Dixit, V.M., Dixon, S.J., Duckett, C.S., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Elrod, J.W., Fimia, G.M., Fulda, S., García-Sáez, A.J., Garg, A.D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D.R., Greene, L.A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J.M., Harris, I.S., Hengartner, M.O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P.J., Juin, P.P., Kaiser, W.J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R.N., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kumar, S., Lee, S.W., Lemasters, J.J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S.A., Lockshin, R.A., López-Otín, C., Lowe, S.W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J.-C., Martin, S.J., Martinou, J.-C., Medema, J.P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E.A., Molkenin, J.D., Moll, U.M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J.M., Pereira, D.M., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Ryan, K.M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H.-U., Sistigu, A., Stockwell, B.R.,

- Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S.W.G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M.G., Villunger, A., Virgin, H.W., Vousden, K.H., Vucic, D., Wagner, E.F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J.A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G., 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, R., Yang, T., Zhang, Q., 2021.  $\delta$ -Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. *Biology* 10, 74. <https://doi.org/10.3390/biology10020074>
- Gao, Y., Sartori, D.J., Li, C., Yu, Q.-C., Kushner, J.A., Simon, M.C., Diehl, J.A., 2012. PERK is required in the adult pancreas and is essential for maintenance of glucose homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* 32, 5129–5139. <https://doi.org/10.1128/MCB.01009-12>
- Gardner, B.M., Walter, P., 2011. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891–1894. <https://doi.org/10.1126/science.1209126>
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E.S., Perera, B.G.K., Igbaria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K.F., Gliedt, M.J., Alavi, M.V., Hari, S.B., Mitra, A.K., Bhatarai, B., Schürer, S.C., Snapp, E.L., Gould, D.B., German, M.S., Backes, B.J., Maly, D.J., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2014. Allosteric Inhibition of the IRE1 $\alpha$  RNase Preserves Cell Viability and Function during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell* 158, 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.002>
- Gilchrist, A., Au, C.E., Hiding, J., Bell, A.W., Fernandez-Rodriguez, J., Lesimple, S., Nagaya, H., Roy, L., Gosline, S.J.C., Hallett, M., Paiement, J., Kearney, R.E., Nilsson, T., Bergeron, J.J.M., 2006. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127, 1265–1281. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.036>

Gitelman, S.E., Bundy, B.N., Ferrannini, E., Lim, N., Blanchfield, J.L., DiMeglio, L.A., Felner, E.I., Gaglia, J.L., Gottlieb, P.A., Long, S.A., Mari, A., Mirmira, R.G., Raskin, P., Sanda, S., Tsalikian, E., Wentworth, J.M., Willi, S.M., Krischer, J.P., Bluestone, J.A., Barr, M., Blanchfield, J.L., Bluestone, J.A., Buchanan, J., Bundy, B.N., Cabbage, J., Coleman, P., De La Vega, M., DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C., Felner, E.I., Ferrannini, E., Ferrara, C., Gaglia, J.L., Gitelman, S.E., Gottlieb, P.A., Healy, F., Higgins, L., Hildinger, M., Jenkins, M., Kayton Bryant, N., Kinderman, A., Koshy, N., Kost, B., Krischer, J.P., Krishfield, S., Kucheruk, O., Lim, N., Lindsley, K., Long, S.A., Mantravadi, M., Mari, A., Mesfin, S., Michels, A., Migre, M.E., Minnock, P., Mirmira, R.G., Mohammed-Nur, E., Nelson, J., Nursing, A., O'Donnell, R., Olivos, D., Parker, M., Raskin, P., Redl, L., Reed, N., Resnick, B., Sanda, S., Sayre, P., Serti, E., Sims, E., Smith, K., Soppe, C., Stuart, F., Szubowicz, S., Tansey, M., Terrell, J., Tersey, S., Torok, C., Tsalikian, E., Watson, K., Wentworth, J.M., Wesch, R., Willi, S., Woerner, S., 2021. Imatinib therapy for patients with recent-onset type 1 diabetes: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 9, 502–514. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00139-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00139-X)

Goginashvili, A., Zhang, Z., Erbs, E., Spiegelhalter, C., Kessler, P., Mihlan, M., Pasquier, A., Krupina, K., Schieber, N., Cinque, L., Morvan, J., Sumara, I., Schwab, Y., Settembre, C., Ricci, R., 2015. Insulin granules. Insulin secretory granules control autophagy in pancreatic  $\beta$  cells. *Science* 347, 878–882. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2628>

Goh, T.T., Mason, T.M., Gupta, N., So, A., Lam, T.K.T., Lam, L., Lewis, G.F., Mari, A., Giacca, A., 2007. Lipid-induced beta-cell dysfunction in vivo in models of progressive beta-cell failure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E549-560. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00255.2006>

- Gómez-Sánchez, R., Rose, J., Guimarães, R., Mari, M., Papinski, D., Rieter, E., Geerts, W.J., Hardenberg, R., Kraft, C., Ungermann, C., Reggiori, F., 2018. Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J. Cell Biol.* 217, 2743–2763. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710116>
- Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., Nunnari, J., 2013. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell* 24, 2918–2931. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-07-0381>
- Grandjean, J.M.D., Wiseman, R.L., 2020. Small molecule strategies to harness the unfolded protein response: where do we go from here? *J. Biol. Chem.* 295, 15692–15711. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010218>
- Grapin-Botton, A., 2005. Ductal cells of the pancreas. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 504–510. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.010>
- Groen, N., Leenders, F., Mahfouz, A., Munoz-Garcia, A., Muraro, M.J., de Graaf, N., Rabelink, Ton.J., Hoeben, R., van Oudenaarden, A., Zaldumbide, A., Reinders, M.J.T., Koning, E.J.P. de, Carlotti, F., 2021. Single-Cell Transcriptomics Links Loss of Human Pancreatic  $\beta$ -Cell Identity to ER Stress. *Cells* 10, 3585. <https://doi.org/10.3390/cells10123585>
- Grzmil, M., Kaulfuss, S., Thelen, P., Hemmerlein, B., Schweyer, S., Obenaus, S., Kang, T.W., Burfeind, P., 2006. Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells. *J. Pathol.* 208, 340–349. <https://doi.org/10.1002/path.1902>
- Guest, P.C., Bailyes, E.M., Hutton, J.C., 1997. Endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  is important for the proteolytic processing and intracellular transport of proinsulin in the pancreatic beta-cell. *Biochem. J.* 323 ( Pt 2), 445–450. <https://doi.org/10.1042/bj3230445>
- Gupta, S., McGrath, B., Cavener, D.R., 2010. PERK (EIF2AK3) regulates proinsulin trafficking and quality control in the secretory pathway. *Diabetes* 59, 1937–1947. <https://doi.org/10.2337/db09-1064>

- Haataja, L., Arunagiri, A., Hassan, A., Regan, K., Tsai, B., Dhayalan, B., Weiss, M.A., Liu, M., Arvan, P., 2021. Distinct states of proinsulin misfolding in MIDY. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 78, 6017–6031. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03871-1>
- Halbleib, K., Pesek, K., Covino, R., Hofbauer, H.F., Wunnicke, D., Hänel, I., Hummer, G., Ernst, R., 2017. Activation of the Unfolded Protein Response by Lipid Bilayer Stress. *Mol. Cell* 67, 673-684.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.012>
- Hamid, S.M., Citir, M., Terzi, E.M., Cimen, I., Yildirim, Z., Dogan, A.E., Kocaturk, B., Onat, U.I., Arditi, M., Weber, C., Traynor-Kaplan, A., Schultz, C., Erbay, E., 2020. Inositol-requiring enzyme-1 regulates phosphoinositide signaling lipids and macrophage growth. *EMBO Rep.* 21, e51462. <https://doi.org/10.15252/embr.202051462>
- Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A., Kaufman, R.J., 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat. Cell Biol.* 15, 481–490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>
- Han, J., Song, B., Kim, J., Kodali, V.K., Pottekat, A., Wang, M., Hassler, J., Wang, S., Pennathur, S., Back, S.H., Katze, M.G., Kaufman, R.J., 2015. Antioxidants Complement the Requirement for Protein Chaperone Function to Maintain  $\beta$ -Cell Function and Glucose Homeostasis. *Diabetes* 64, 2892–2904. <https://doi.org/10.2337/db14-1357>
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., Ron, D., 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* 7, 1153–1163. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00264-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00264-7)
- Hassler, J.R., Scheuner, D.L., Wang, S., Han, J., Kodali, V.K., Li, P., Nguyen, J., George, J.S., Davis, C., Wu, S.P., Bai, Y., Sartor, M., Cavalcoli, J., Malhi, H., Baudouin, G., Zhang, Y., Yates III, J.R., Itkin-Ansari, P., Volkmann, N., Kaufman, R.J., 2015. The

- IRE1 $\alpha$ /XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of  $\beta$  Cells. *PLoS Biol.* 13, e1002277. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002277>
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* 10, 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>
- Hendershot, L.M., 2004. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 71, 289–297.
- Henke, N., Lisak, D.A., Schneider, L., Habicht, J., Pergande, M., Methner, A., 2011. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium* 50, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.005>
- Herlea-Pana, O., Eeda, V., Undi, R.B., Lim, H.-Y., Wang, W., 2021. Pharmacological Inhibition of Inositol-Requiring Enzyme 1 $\alpha$  RNase Activity Protects Pancreatic Beta Cell and Improves Diabetic Condition in Insulin Mutation-Induced Diabetes. *Front. Endocrinol.* 12, 749879. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.749879>
- Hetz, C., Bernasconi, P., Fisher, J., Lee, A.-H., Bassik, M.C., Antonsson, B., Brandt, G.S., Iwakoshi, N.N., Schinzel, A., Glimcher, L.H., Korsmeyer, S.J., 2006. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 $\alpha$ . *Science* 312, 572–576. <https://doi.org/10.1126/science.1123480>
- Hobman, T.C., Zhao, B., Chan, H., Farquhar, M.G., 1998. Immunolocalization and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 9, 1265–1278. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.6.1265>

- 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. *J. Cell Biol.* 186, 323–331. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903014>
- Hoorens, A., Stangé, G., Pavlovic, D., Pipeleers, D., 2001. Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 50, 551–557. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.3.551>
- Hu, C., Ding, H., Li, Y., Pearson, J.A., Zhang, X., Flavell, R.A., Wong, F.S., Wen, L., 2015. NLRP3 deficiency protects from type 1 diabetes through the regulation of chemotaxis into the pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11318–11323. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513509112>
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O’Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691. <https://doi.org/10.1038/nature02026>
- Hui, H., Dotta, F., Mario, U.D., Perfetti, R., 2004. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J. Cell. Physiol.* 200, 177–200. <https://doi.org/10.1002/jcp.20021>
- Imagawa, Y., Hosoda, A., Sasaka, S.-I., Tsuru, A., Kohno, K., 2008. RNase domains determine the functional difference between IRE1alpha and IRE1beta. *FEBS Lett.* 582, 656–660. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.038>
- Ivanova, H., Vervliet, T., Monaco, G., Terry, L.E., Rosa, N., Baker, M.R., Parys, J.B., Serysheva, I.I., Yule, D.I., Bultynck, G., 2020. Bcl-2-Protein Family as Modulators of IP3 Receptors and Other Organellar Ca<sup>2+</sup> Channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 12, a035089. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035089>
- Ivanova, H., Wagner, L.E., Tanimura, A., Vandermarliere, E., Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Alzayady, K.J., Wang, L., Hamada, K., Mikoshiba, K., De Smedt, H., Martens, L., Yule,



- D.I., Parys, J.B., Bultynck, G., 2019. Bcl-2 and IP3 compete for the ligand-binding domain of IP3Rs modulating Ca<sup>2+</sup> signaling output. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 76, 3843–3859. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03091-8>
- Iwawaki, T., Akai, R., Yamanaka, S., Kohno, K., 2009. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16657–16662. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903775106>
- Izumi, T., Yokota-Hashimoto, H., Zhao, S., Wang, J., Halban, P.A., Takeuchi, T., 2003. Dominant negative pathogenesis by mutant proinsulin in the Akita diabetic mouse. *Diabetes* 52, 409–416. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.2.409>
- Jean, J.C., Oakes, S.M., Joyce-Brady, M., 1999. The Bax inhibitor-1 gene is differentially regulated in adult testis and developing lung by two alternative TATA-less promoters. *Genomics* 57, 201–208. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5761>
- Jehn, M., Clark, J.M., Guallar, E., 2004. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care* 27, 2422–2428. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.10.2422>
- Jousse, C., Oyadomari, S., Novoa, I., Lu, P., Zhang, Y., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. *J. Cell Biol.* 163, 767–775. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308075>
- Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.-H., Kim, J.-W., Jeong, Y.T., Han, M.S., Lee, M.-K., Kim, K.-W., Shin, J., Lee, M.-S., 2008. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* 8, 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.013>
- Jurkin, J., Henkel, T., Nielsen, A.F., Minnich, M., Popow, J., Kaufmann, T., Heindl, K., Hoffmann, T., Busslinger, M., Martinez, J., 2014. The mammalian tRNA ligase complex

- mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *EMBO J.* 33, 2922–2936. <https://doi.org/10.15252/emboj.201490332>
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., 2013. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38, 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>
- Kakiuchi, C., Ishiwata, M., Hayashi, A., Kato, T., 2006. XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 97, 545–555. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03772.x>
- Karanasios, E., Walker, S.A., Okkenhaug, H., Manifava, M., Hummel, E., Zimmermann, H., Ahmed, Q., Domart, M.-C., Collinson, L., Ktistakis, N.T., 2016. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat. Commun.* 7, 12420. <https://doi.org/10.1038/ncomms12420>
- Kars, M., Yang, L., Gregor, M.F., Mohammed, B.S., Pietka, T.A., Finck, B.N., Patterson, B.W., Horton, J.D., Mittendorfer, B., Hotamisligil, G.S., Klein, S., 2010. Tauroursodeoxycholic Acid may improve liver and muscle but not adipose tissue insulin sensitivity in obese men and women. *Diabetes* 59, 1899–1905. <https://doi.org/10.2337/db10-0308>
- Kaufman, R.J., Back, S.H., Song, B., Han, J., Hassler, J., 2010. The unfolded protein response is required to maintain the integrity of the endoplasmic reticulum, prevent oxidative stress and preserve differentiation in  $\beta$ -cells. *Diabetes Obes. Metab.* 12 Suppl 2, 99–107. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01281.x>
- Kay, T.W.H., Dudek, N.L., Graham, K., Estella, E., Angstetra, E., McKenzie, M.D., Allison, J., Thomas, H.E., 2008. Cytotoxic T cell mechanisms of beta cell destruction in non-obese diabetic mice. *Novartis Found. Symp.* 292, 68–78; discussion 78-84, 122–129, 202–203. <https://doi.org/10.1002/9780470697405.ch6>

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khanim, F., Kirk, J., Latif, F., Barrett, T.G., 2001. WFS1/wolframin mutations, Wolfram syndrome, and associated diseases. *Hum. Mutat.* 17, 357–367. <https://doi.org/10.1002/humu.1110>
- Kim, H.-K., Lee, G.-H., Bhattarai, K.R., Lee, M.-S., Back, S.H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2021. TMBIM6 (transmembrane BAX inhibitor motif containing 6) enhances autophagy through regulation of lysosomal calcium. *Autophagy* 17, 761–778. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1732161>
- Kim, H.-R., Lee, G.-H., Ha, K.-C., Ahn, T., Moon, J.-Y., Lee, B.-J., Cho, S.-G., Kim, S., Seo, Y.-R., Shin, Y.-J., Chae, S.-W., Reed, J.C., Chae, H.-J., 2008. Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent regulator of Ca<sup>2+</sup> channel activity in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 283, 15946–15955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800075200>
- Kim, H.-R., Lee, G.-H., Yi Cho, E., Chae, S.-W., Ahn, T., Chae, H.-J., 2009. Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1. *J. Cell Sci.* 122, 1126–1133. <https://doi.org/10.1242/jcs.038430>
- Kim, J.-Y., Lim, D.-M., Park, H.-S., Moon, C.-I., Choi, K.-J., Lee, S.-K., Baik, H.-W., Park, K.-Y., Kim, B.-J., 2012. Exendin-4 protects against sulfonylurea-induced  $\beta$ -cell apoptosis. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 65–74. <https://doi.org/10.1254/jphs.11072fp>
- Kim, M.J., Kim, M.N., Min, S.H., Ham, D.-S., Kim, J.-W., Yoon, K.-H., Park, K.S., Jung, H.S., 2019. Specific PERK inhibitors enhanced glucose-stimulated insulin secretion in a mouse model of type 2 diabetes. *Metabolism.* 97, 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.12.007>

- Kim, M.J., Min, S.H., Shin, S.Y., Kim, M.N., Lee, H., Jang, J.Y., Kim, S.-W., Park, K.S., Jung, H.S., 2018. Attenuation of PERK enhances glucose-stimulated insulin secretion in islets. *J. Endocrinol.* 236, 125–136. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0497>
- Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K., 2004. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J. Cell Biol.* 167, 445–456. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405153>
- Kiviluoto, S., Luyten, T., Schneider, L., Lisak, D., Rojas-Rivera, D., Welkenhuyzen, K., Missaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Hetz, C., Methner, A., Bultynck, G., 2013. Bax Inhibitor-1-mediated Ca<sup>2+</sup> leak is decreased by cytosolic acidosis. *Cell Calcium* 54, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2013.06.002>
- Kiviluoto, S., Schneider, L., Luyten, T., Vervliet, T., Missiaen, L., De Smedt, H., Parys, J.B., Methner, A., Bultynck, G., 2012. Bax inhibitor-1 is a novel IP<sub>3</sub> receptor-interacting and -sensitizing protein. *Cell Death Dis.* 3, e367. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.103>
- Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., Bamber, B.A., Bassham, D.C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J.S., Bredesen, D.E., Brodsky, J.L., Brumell, J.H., Brunk, U.T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L.-S., Choi, A., Chu, C.T., Chung, J., Clarke, P.G.H., Clark, R.S.B., Clarke, S.G., Clavé, C., Cleveland, J.L., Codogno, P., Colombo, M.I., Coto-Montes, A., Cregg, J.M., Cuervo, A.M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P.B., Dennis, P.A., Deretic, V., Devenish, R.J., Di Sano, F., Dice, J.F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C.W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F.C., Dröge, W., Dron, M., Dunn, W.A., Duszenko, M., Eissa, N.T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E.-L., Fésüs, L., Finley, K.D., Fuentes, J.M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F.-B., Gewirtz, D.A., Gibson, S.B., Gohla, A., Goldberg, A.L., Gonzalez, R., González-Estévez, C., Gorski, S., Gottlieb, R.A., Häussinger, D., He,

Y.-W., Heidenreich, K., Hill, J.A., Høyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W.-P., Iwasaki, A., Jäättelä, M., Jackson, W.T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J.U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D.H., Kiel, J.A.K.W., Kim, H.P., Kimchi, A., Kinsella, T.J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovács, A.L., Kroemer, G., Kuan, C.-Y., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, H.-Y., Lenardo, M.J., Levine, B., Lieberman, A., Lim, K.-L., Lin, F.-C., Liou, W., Liu, L.F., Lopez-Berestein, G., López-Otín, C., Lu, B., Macleod, K.F., Malorni, W., Martinet, W., Matsuoka, K., Mautner, J., Meijer, A.J., Meléndez, A., Michels, P., Miotto, G., Mistiaen, W.P., Mizushima, N., Mograbi, B., Monastyrska, I., Moore, M.N., Moreira, P.I., Moriyasu, Y., Motyl, T., Münz, C., Murphy, L.O., Naqvi, N.I., Neufeld, T.P., Nishino, I., Nixon, R.A., Noda, T., Nürnberg, B., Ogawa, M., Oleinick, N.L., Olsen, L.J., Ozpolat, B., Paglin, S., Palmer, G.E., Papassideri, I., Parkes, M., Perlmutter, D.H., Perry, G., Piacentini, M., Pinkas-Kramarski, R., Prescott, M., Proikas-Cezanne, T., Raben, N., Rami, A., Reggiori, F., Rohrer, B., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Sadoshima, J., Sakagami, H., Sakai, Y., Sandri, M., Sasakawa, C., Sass, M., Schneider, C., Seglen, P.O., Seleverstov, O., Settleman, J., Shacka, J.J., Shapiro, I.M., Sibirny, A., Silva-Zacarin, E.C.M., Simon, H.-U., Simone, C., Simonsen, A., Smith, M.A., Spanel-Borowski, K., Srinivas, V., Steeves, M., Stenmark, H., Stromhaug, P.E., Subauste, C.S., Sugimoto, S., Sulzer, D., Suzuki, T., Swanson, M.S., Tabas, I., Takeshita, F., Talbot, N.J., Tallóczy, Z., Tanaka, Keiji, Tanaka, Kozo, Tanida, I., Taylor, G.S., Taylor, J.P., Terman, A., Tettamanti, G., Thompson, C.B., Thumm, M., Tolkovsky, A.M., Tooze, S.A., Truant, R., Tumanovska, L.V., Uchiyama, Y., Ueno, T., Uzcátegui, N.L., van der Klei, I., Vaquero, E.C., Vellai, T., Vogel, M.W., Wang, H.-G., Webster, P., Wiley, J.W., Xi, Z., Xiao, G., Yahalom, J., Yang, J.-M., Yap, G., Yin, X.-M., Yoshimori, T., Yu, L., Yue, Z., Yuzaki, M., Zahirnyk, O., Zheng, X., Zhu, X., Deter, R.L., 2008. Guidelines for the use and

- interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151–175. <https://doi.org/10.4161/auto.5338>
- Kopp, M.C., Nowak, P.R., Larburu, N., Adams, C.J., Ali, M.M., 2018. In vitro FRET analysis of IRE1 and BiP association and dissociation upon endoplasmic reticulum stress. *eLife* 7, e30257. <https://doi.org/10.7554/eLife.30257>
- Krebs, J., Agellon, L.B., Michalak, M., 2015. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004>
- Kreibich, G., Ulrich, B.L., Sabatini, D.D., 1978. Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristics of rough microsomes. *J. Cell Biol.* 77, 464–487. <https://doi.org/10.1083/jcb.77.2.464>
- Larsson, L.-I., Sundler, F., Håkanson, R., 1976. Pancreatic polypeptide? A postulated new hormone: Identification of its cellular storage site by light and electron microscopic immunocytochemistry. *Diabetologia* 12, 211–226. <https://doi.org/10.1007/BF00422088>
- Laybutt, D.R., Preston, A.M., Akerfeldt, M.C., Kench, J.G., Busch, A.K., Biankin, A.V., Biden, T.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress contributes to beta cell apoptosis in type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 752–763. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0590-z>
- Lebeaupin, C., Blanc, M., Vallée, D., Keller, H., Bailly-Maitre, B., 2020. Bax Inhibitor-1: between stress and survival. *FEBS J.* 287, 1722–1736. <https://doi.org/10.1111/febs.15179>
- Lebeaupin, C., Proics, E., de Bieville, C.H.D., Rousseau, D., Bonnafous, S., Patouraux, S., Adam, G., Lavallard, V.J., Rovere, C., Le Thuc, O., Saint-Paul, M.C., Anty, R., Schneck, A.S., Iannelli, A., Gugenheim, J., Tran, A., Gual, P., Bailly-Maitre, B., 2015. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis.* 6, e1879. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.248>

- Lebeaupin, C., Vallée, D., Rousseau, D., Patouraux, S., Bonnafous, S., Adam, G., Luciano, F., Luci, C., Anty, R., Iannelli, A., Marchetti, S., Kroemer, G., Lacas-Gervais, S., Tran, A., Gual, P., Bailly-Maitre, B., 2018. Bax inhibitor-1 protects from nonalcoholic steatohepatitis by limiting inositol-requiring enzyme 1 alpha signaling in mice. *Hepatology*. Baltim. Md 68, 515–532. <https://doi.org/10.1002/hep.29847>
- Lebreton, F., Berishvili, E., Parnaud, G., Rouget, C., Bosco, D., Berney, T., Lavallard, V., 2018. NLRP3 inflammasome is expressed and regulated in human islets. *Cell Death Dis.* 9, 726. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0764-x>
- Ledermann, H.M., 1995. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet Lond. Engl.* 345, 648. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90548-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90548-0)
- Lee, A.-H., Chu, G.C., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., 2005. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* 24, 4368–4380. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600903>
- Lee, A.-H., Heidtman, K., Hotamisligil, G.S., Glimcher, L.H., 2011. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8885–8890. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105564108>
- 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. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7448–7459. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003>
- Lee, A.-H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., Glimcher, L.H., 2008. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492–1496. <https://doi.org/10.1126/science.1158042>

- Lee, G.-H., Kim, H.-K., Chae, S.-W., Kim, D.-S., Ha, K.-C., Cuddy, M., Kress, C., Reed, J.C., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2007. Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J. Biol. Chem.* 282, 21618–21628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700053200>
- Lee, G.-H., Kim, H.-R., Chae, H.-J., 2012. Bax inhibitor-1 regulates the expression of P450 2E1 through enhanced lysosome activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 600–611. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.12.017>
- Lee, H., Lee, Y.-S., Harenda, Q., Pietrzak, S., Oktay, H.Z., Schreiber, S., Liao, Y., Sonthalia, S., Cieccko, A.E., Chen, Y.-G., Keles, S., Sridharan, R., Engin, F., 2020. Beta Cell Dedifferentiation Induced by IRE1 $\alpha$  Deletion Prevents Type 1 Diabetes. *Cell Metab.* 31, 822-836.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.03.002>
- Lee, K., Chan, J.Y., Liang, C., Ip, C.K., Shi, Y.-C., Herzog, H., Hughes, W.E., Bensellam, M., Delghingaro-Augusto, V., Koina, M.E., Nolan, C.J., Laybutt, D.R., 2022. XBP1 maintains beta cell identity, represses beta-to-alpha cell transdifferentiation and protects against diabetic beta cell failure during metabolic stress in mice. *Diabetologia* 65, 984–996. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05669-7>
- Lerner, A.G., Upton, J.-P., Praveen, P.V.K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B.J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S.A., Papa, F.R., 2012. IRE1 $\alpha$  induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab.* 16, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.007>
- Lippincott-Schwartz, J., Bonifacino, J.S., Yuan, L.C., Klausner, R.D., 1988. Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins. *Cell* 54, 209–220. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90553-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90553-3)



- Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A., Urano, F., 2006. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab.* 4, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.007>
- 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, e1648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001648>
- Lisak, D.A., Schacht, T., Enders, V., Habicht, J., Kiviluoto, S., Schneider, J., Henke, N., Bultynck, G., Methner, A., 2015. The transmembrane Bax inhibitor motif (TMBIM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER  $Ca^{2+}$ -filling state. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 2104–2114. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.002>
- Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Thielen, P., Zamorano, S., Todd, D., Martinon, F., Glavic, A., Kress, C., Lin, J.H., Walter, P., Reed, J.C., Glimcher, L.H., Hetz, C., 2009. BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha. *Mol. Cell* 33, 679–691. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.017>
- Liu, C.Y., Schröder, M., Kaufman, R.J., 2000. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 275, 24881–24885. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004454200>
- Liu, M., Hodish, I., Haataja, L., Lara-Lemus, R., Rajpal, G., Wright, J., Arvan, P., 2010. Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 21, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.07.001>
- Liu, M., Li, Y., Cavener, D., Arvan, P., 2005. Proinsulin disulfide maturation and misfolding in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 280, 13209–13212. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400475200>

- Liu, S., Ma, G., Yao, S., Chen, Z., Wang, C., Zhao, B., Li, K., 2016. Polymorphism - 116C/G of the human X box binding protein 1 gene is associated with risk of type 2 diabetes in a Chinese Han population. *Gene* 575, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.037>
- Luo, R.Z.-T., Beniac, D.R., Fernandes, A., Yip, C.C., Ottensmeyer, F.P., 1999. Quaternary Structure of the Insulin-Insulin Receptor Complex. *Science* 285, 1077–1080. <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1077>
- Luo, X., Alfason, L., Wei, M., Wu, S., Kasim, V., 2022. Spliced or Unspliced, That Is the Question: The Biological Roles of XBP1 Isoforms in Pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 2746. <https://doi.org/10.3390/ijms23052746>
- Lytrivi, M., Castell, A.-L., Poitout, V., Cnop, M., 2020. Recent insights into mechanisms of  $\beta$ -cell lipo- and glucolipotoxicity in type 2 diabetes. *J. Mol. Biol.* 432, 1514–1534. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.09.016>
- Ma, Y., Hendershot, L.M., 2003. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301107200>
- Mahameed, M., Wilhelm, T., Darawshi, O., Obiedat, A., Tommy, W.-S., Chintha, C., Schubert, T., Samali, A., Chevet, E., Eriksson, L.A., Huber, M., Tirosh, B., 2019. The unfolded protein response modulators GSK2606414 and KIRA6 are potent KIT inhibitors. *Cell Death Dis.* 10, 300. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1523-3>
- Marchetti, P., Bugliani, M., Lupi, R., Marselli, L., Masini, M., Boggi, U., Filipponi, F., Weir, G.C., Eizirik, D.L., Cnop, M., 2007. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 50, 2486–2494. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0816-8>
- Marchetti, P., Del Guerra, S., Marselli, L., Lupi, R., Masini, M., Pollera, M., Bugliani, M., Boggi, U., Vistoli, F., Mosca, F., Del Prato, S., 2004. Pancreatic islets from type 2 diabetic

- patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5535–5541. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0150>
- Marhfour, I., Lopez, X.M., Lefkaditis, D., Salmon, I., Allagnat, F., Richardson, S.J., Morgan, N.G., Eizirik, D.L., 2012. Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 55, 2417–2420. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2604-3>
- Marsh, B.J., Soden, C., Alarcón, C., Wicksteed, B.L., Yaekura, K., Costin, A.J., Morgan, G.P., Rhodes, C.J., 2007. Regulated autophagy controls hormone content in secretory-deficient pancreatic endocrine beta-cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 2255–2269. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0077>
- 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., Kahn, S.E., Lavelle, E.C., 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. *Nat. Immunol.* 11, 897–904. <https://doi.org/10.1038/ni.1935>
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., Gerlo, S., 2014. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L., 1996. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J. Cell Biol.* 132, 291–298. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.291>
- Mezzacasa, A., Helenius, A., 2002. The transitional ER defines a boundary for quality control in the secretion of tsO45 VSV glycoprotein. *Traffic Cph. Den.* 3, 833–849. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31108.x>

- Miani, M., Colli, M.L., Ladrière, L., Cnop, M., Eizirik, D.L., 2012. Mild endoplasmic reticulum stress augments the proinflammatory effect of IL-1 $\beta$  in pancreatic rat  $\beta$ -cells via the IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway. *Endocrinology* 153, 3017–3028. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2090>
- Miller, T.B., Lerner, J., 1973. Mechanism of Control of Hepatic Glycogenesis by Insulin. *J. Biol. Chem.* 248, 3483–3488. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43955-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43955-0)
- Minn, A.H., Hafele, C., Shalev, A., 2005. Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology* 146, 2397–2405. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1378>
- Moreno, J.A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J.M., Ortori, C.A., Willis, A.E., Fischer, P.M., Barrett, D.A., Mallucci, G.R., 2013. Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Sci. Transl. Med.* 5, 206ra138. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006767>
- Mori, T., Hayashi, T., Hayashi, E., Su, T.-P., 2013. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PloS One* 8, e76941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076941>
- Morikawa, S., Kaneko, N., Okumura, C., Taguchi, H., Kurata, M., Yamamoto, T., Osawa, H., Nakanishi, A., Zako, T., Masumoto, J., 2018. IAPP/amylin deposition, which is correlated with expressions of ASC and IL-1 $\beta$  in  $\beta$ -cells of Langerhans' islets, directly initiates NLRP3 inflammasome activation. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 32, 2058738418788749. <https://doi.org/10.1177/2058738418788749>
- Morita, S., Villalta, S.A., Feldman, H.C., Register, A.C., Rosenthal, W., Hoffmann-Petersen, I.T., Mehdizadeh, M., Ghosh, R., Wang, L., Colon-Negron, K., Meza-Acevedo, R., Backes, B.J., Maly, D.J., Bluestone, J.A., Papa, F.R., 2017. Targeting ABL-IRE1 $\alpha$

- Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic  $\beta$  Cells to Reverse Autoimmune Diabetes. *Cell Metab.* 25, 883-897.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.018>
- Nasteska, D., Fine, N.H.F., Ashford, F.B., Cuzzo, F., Vilorio, K., Smith, G., Dahir, A., Dawson, P.W.J., Lai, Y.-C., Bastidas-Ponce, A., Bakhti, M., Rutter, G.A., Fiancette, R., Nano, R., Piemonti, L., Lickert, H., Zhou, Q., Akerman, I., Hodson, D.J., 2021. PDX1LOW MAFALOW  $\beta$ -cells contribute to islet function and insulin release. *Nat. Commun.* 12, 674. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20632-z>
- Nicoletti, F., di Marcou, R., Barcellini, W., Magro, G., Schorlemmer, H.U., Kurrleu, R., Lunettau, M., Grasso, S., Zacconeu, P., Meronif, P., 1994. Protection from experimental autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse with soluble interleukin-1 receptor. *Eur. J. Immunol.* 24, 1843–1847. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240818>
- Nikawa, J., Yamashita, S., 1992. IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 6, 1441–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00864.x>
- Nishimura, T., Tamura, N., Kono, N., Shimanaka, Y., Arai, H., Yamamoto, H., Mizushima, N., 2017. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J.* 36, 1719–1735. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695189>
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H.P., Ron, D., 2003. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J.* 22, 1180–1187. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg112>
- Oakes, S.A., Papa, F.R., 2015. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu. Rev. Pathol.* 10, 173–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2005. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor

- and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 105–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408352102>
- Oikawa, D., Tokuda, M., Hosoda, A., Iwawaki, T., 2010. Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic Acids Res.* 38, 6265–6273. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq452>
- Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Halban, P., Renold, A.E., Perrelet, A., 1984. Insulin, not C-peptide (proinsulin), is present in crinophagic bodies of the pancreatic B-cell. *J. Cell Biol.* 98, 222–228. <https://doi.org/10.1083/jcb.98.1.222>
- Osborn, O., Brownell, S.E., Sanchez-Alavez, M., Salomon, D., Gram, H., Bartfai, T., 2008. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine* 44, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.004>
- Osowski, C.M., Hara, T., O’Sullivan-Murphy, B., Kanekura, K., Lu, S., Hara, M., Ishigaki, S., Zhu, L.J., Hayashi, E., Hui, S.T., Greiner, D., Kaufman, R.J., Bortell, R., Urano, F., 2012. Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced  $\beta$  cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab.* 16, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.005>
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2002. Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 525–532. <https://doi.org/10.1172/JCI14550>
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2001. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10845–10850. <https://doi.org/10.1073/pnas.191207498>
- Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., Hotamisligil, G.S., 2006. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose

- homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137–1140.  
<https://doi.org/10.1126/science.1128294>
- Palade, G.E., 1955. Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 567–582. <https://doi.org/10.1083/jcb.1.6.567>
- Palade, G.E., Porter, K.R., 1954. Studies on the endoplasmic reticulum. I. Its identification in cells in situ. *J. Exp. Med.* 100, 641–656. <https://doi.org/10.1084/jem.100.6.641>
- Papa, F.R., 2012. Endoplasmic Reticulum Stress, Pancreatic  $\beta$ -Cell Degeneration, and Diabetes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a007666.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007666>
- Park, S.-M., Kang, T.-I., So, J.-S., 2021. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* 9, 791. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070791>
- Park, Y.J., Lee, S., Kieffer, T.J., Warnock, G.L., Safikhani, N., Speck, M., Hao, Z., Woo, M., Marzban, L., 2012. Deletion of Fas protects islet beta cells from cytotoxic effects of human islet amyloid polypeptide. *Diabetologia*. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2451-2>
- Pasquier, A., Vivot, K., Erbs, E., Spiegelhalter, C., Zhang, Z., Aubert, V., Liu, Z., Senkara, M., Maillard, E., Pinget, M., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Marciniak, G., Ganzhorn, A., Ronchi, P., Schieber, N.L., Schwab, Y., Saftig, P., Goginashvili, A., Ricci, R., 2019. Lysosomal degradation of newly formed insulin granules contributes to  $\beta$  cell failure in diabetes. *Nat. Commun.* 10, 3312. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11170-4>
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>
- Phillips, B.P., Gomez-Navarro, N., Miller, E.A., 2020. Protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 65, 96–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.04.002>

- Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragón, T., Anken, E. van, Vidal, S.E., El-Samad, H., Walter, P., 2010. BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLOS Biol.* 8, e1000415. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000415>
- Piperi, C., Adamopoulos, C., Papavassiliou, A.G., 2016. XBP1: A Pivotal Transcriptional Regulator of Glucose and Lipid Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 27, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.01.001>
- Pirot, P., Cardozo, A.K., Eizirik, D.L., 2008. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52, 156–165. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000200003>
- Pobre, K.F.R., Poet, G.J., Hendershot, L.M., 2019. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J. Biol. Chem.* 294, 2098–2108. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002804>
- Popgeorgiev, N., Gillet, G., 2022. Bcl-xL and IP3R interaction: Intimate relationship with an uncertain outcome. *Cell Calcium* 101, 102504. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102504>
- Porter, K.R., Claude, A., Fullam, E.F., 1945. A STUDY OF TISSUE CULTURE CELLS BY ELECTRON MICROSCOPY. *J. Exp. Med.* 81, 233–246. <https://doi.org/10.1084/jem.81.3.233>
- Posner, B.I., 2003. Regulation of insulin receptor kinase activity by endosomal processes: possible areas for therapeutic intervention. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 4, 430–434.
- Prischi, F., Nowak, P.R., Carrara, M., Ali, M.M.U., 2014. Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity. *Nat. Commun.* 5, 3554. <https://doi.org/10.1038/ncomms4554>



- Py, B.F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., Yuan, J., 2013. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. *Mol. Cell* 49, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.009>
- Qiu, Y., Mao, T., Zhang, Y., Shao, M., You, J., Ding, Q., Chen, Y., Wu, D., Xie, D., Lin, X., Gao, X., Kaufman, R.J., Li, W., Liu, Y., 2010. A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1alpha activation in pancreatic beta cells. *Sci. Signal.* 3, ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000514>
- Quan, W., Hur, K.Y., Lim, Y., Oh, S.H., Lee, J.-C., Kim, K.H., Kim, G.H., Kim, S.-W., Kim, H.L., Lee, M.-K., Kim, K.-W., Kim, J., Komatsu, M., Lee, M.-S., 2012. Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia* 55, 392–403. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2350-y>
- Rabhi, N., Salas, E., Froguel, P., Annicotte, J.-S., 2014. Role of the Unfolded Protein Response in  $\beta$  Cell Compensation and Failure during Diabetes. *J. Diabetes Res.* 2014, 795171. <https://doi.org/10.1155/2014/795171>
- Reddy, S., Young, M., Ginn, S., 2001. Immunoexpression of interleukin-1beta in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide. *Histochem. J.* 33, 317–327. <https://doi.org/10.1023/a:1012422821187>
- Reimold, A.M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D.S., Zhang, J., Horton, H.F., Scott, A., Orkin, S.H., Byrne, M.C., Grusby, M.J., Glimcher, L.H., 2000. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* 14, 152–157.
- Riahi, Y., Wikstrom, J.D., Bachar-Wikstrom, E., Polin, N., Zucker, H., Lee, M.-S., Quan, W., Haataja, L., Liu, M., Arvan, P., Cerasi, E., Leibowitz, G., 2016. Autophagy is a major

- regulator of beta cell insulin homeostasis. *Diabetologia* 59, 1480–1491.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-016-3868-9>
- Riggs, A.C., Bernal-Mizrachi, E., Ohsugi, M., Wasson, J., Fatrai, S., Welling, C., Murray, J., Schmidt, R.E., Herrera, P.L., Permutt, M.A., 2005. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia* 48, 2313–2321.  
<https://doi.org/10.1007/s00125-005-1947-4>
- Robinson, K.S., Clements, A., Williams, A.C., Berger, C.N., Frankel, G., 2011. Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene* 30, 2391–2400.  
<https://doi.org/10.1038/onc.2010.636>
- Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M.S., Olivar, L.C., Nava, M., Tomey, D., Rojas, M., Salazar, J., Garicano, C., Velasco, M., 2018. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. *J. Diabetes Res.* 2018, 9601801.  
<https://doi.org/10.1155/2018/9601801>
- Rojas-Rivera, D., Hetz, C., 2015. TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene* 34, 269–280. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.6>
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrm2199>
- Rondas, D., Crèvecoeur, I., D’Hertog, W., Ferreira, G.B., Staes, A., Garg, A.D., Eizirik, D.L., Agostinis, P., Gevaert, K., Overbergh, L., Mathieu, C., 2015. Citrullinated glucose-regulated protein 78 is an autoantigen in type 1 diabetes. *Diabetes* 64, 573–586.  
<https://doi.org/10.2337/db14-0621>
- Rong, J., Chen, L., Toth, J.I., Tcherpakov, M., Petroski, M.D., Reed, J.C., 2011. Bifunctional apoptosis regulator (BAR), an endoplasmic reticulum (ER)-associated E3 ubiquitin ligase,

- modulates BI-1 protein stability and function in ER Stress. *J. Biol. Chem.* 286, 1453–1463. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.175232>
- Rorsman, P., Braun, M., 2013. Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Rosa, L.R. de O., Vettorazzi, J.F., Zangerolamo, L., Carneiro, E.M., Barbosa, H.C. de L., 2021. TUDCA receptors and their role on pancreatic beta cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 167, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2021.09.003>
- Rosa, N., Ivanova, H., Wagner, L.E., Kale, J., La Rovere, R., Welkenhuyzen, K., Louros, N., Karamanou, S., Shabardina, V., Lemmens, I., Vandermarliere, E., Hamada, K., Ando, H., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Tavernier, J., Mikoshiba, K., Economou, A., Andrews, D.W., Parys, J.B., Yule, D.I., Bultynck, G., 2022. Bcl-xL acts as an inhibitor of IP3R channels, thereby antagonizing Ca<sup>2+</sup>-driven apoptosis. *Cell Death Differ.* 29, 788–805. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00894-w>
- Saltiel, A.R., n.d. Insulin signaling in health and disease. *J. Clin. Invest.* 131, e142241. <https://doi.org/10.1172/JCI142241>
- Salvador-Gallego, R., Hoyer, M.J., Voeltz, G.K., 2017. SnapShot: Functions of Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites. *Cell* 171, 1224-1224.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.005>
- Sano, R., Hou, Y.-C.C., Hedvat, M., Correa, R.G., Shu, C.-W., Krajewska, M., Diaz, P.W., Tamble, C.M., Quarato, G., Gottlieb, R.A., Yamaguchi, M., Nizet, V., Dahl, R., Thomas, D.D., Tait, S.W., Green, D.R., Fisher, P.B., Matsuzawa, S.-I., Reed, J.C., 2012. Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca<sup>2+</sup>-mediated bioenergetics to promote autophagy. *Genes Dev.* 26, 1041–1054. <https://doi.org/10.1101/gad.184325.111>

- Sarcinelli, C., Dragic, H., Piecyk, M., Barbet, V., Duret, C., Barthelaix, A., Ferraro-Peyret, C., Fauvre, J., Renno, T., Chaveroux, C., Manié, S.N., 2020. ATF4-Dependent NRF2 Transcriptional Regulation Promotes Antioxidant Protection during Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancers* 12, E569. <https://doi.org/10.3390/cancers12030569>
- Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2008. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr. Rev.* 29, 317–333. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0039>
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W.M., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C., Kaufman, R.J., 2005. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat. Med.* 11, 757–764. <https://doi.org/10.1038/nm1259>
- Schindler, A.J., Schekman, R., 2009. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17775–17780. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910342106>
- Schroder, K., Zhou, R., Tschopp, J., 2010. The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger? *Science* 327, 296–300. <https://doi.org/10.1126/science.1184003>
- Schröder, M., Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
- Schuck, S., Gallagher, C.M., Walter, P., 2014. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J. Cell Sci.* 127, 4078–4088. <https://doi.org/10.1242/jcs.154716>
- Segawa, K., Nagata, S., 2015. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* 25, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
- Seo, H.-Y., Kim, Y.D., Lee, K.-M., Min, A.-K., Kim, M.-K., Kim, H.-S., Won, K.-C., Park, J.-Y., Lee, K.-U., Choi, H.-S., Park, K.-G., Lee, I.-K., 2008. Endoplasmic reticulum stress-

- induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology* 149, 3832–3841. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0015>
- Shafir, E., Ziv, E., Mosthaf, L., 1999. Nutritionally Induced Insulin Resistance and Receptor Defect Leading to  $\beta$ -Cell Failure in Animal Models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892, 223–246. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07798.x>
- Shamu, C.E., Walter, P., 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* 15, 3028–3039.
- Shao, C., Lawrence, M.C., Cobb, M.H., 2010. Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) expression by interleukin-1 beta in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 285, 19710–19719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.087486>
- Shao, W., Espenshade, P.J., 2014. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage regulates Golgi-to-endoplasmic reticulum recycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). *J. Biol. Chem.* 289, 7547–7557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545699>
- Sharma, R.B., O'Donnell, A.C., Stamateris, R.E., Ha, B., McCloskey, K.M., Reynolds, P.R., Arvan, P., Alonso, L.C., 2015. Insulin demand regulates  $\beta$  cell number via the unfolded protein response. *J. Clin. Invest.* 125, 3831–3846. <https://doi.org/10.1172/JCI79264>
- Shibata, Y., Voeltz, G.K., Rapoport, T.A., 2006. Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* 126, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.019>
- Shrestha, N., De Franco, E., Arvan, P., Cnop, M., 2021. Pathological  $\beta$ -Cell Endoplasmic Reticulum Stress in Type 2 Diabetes: Current Evidence. *Front. Endocrinol.* 12, 650158. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.650158>

- Sidrauski, C., Walter, P., 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90, 1031–1039. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80369-4)
- Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., Helenius, A., 1995. BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J. Cell Biol.* 130, 41–49. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.1.41>
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39. <https://doi.org/10.1038/35036052>
- Śliwińska-Mossoń, M., Marek, G., Milnerowicz, H., 2017. The role of pancreatic polypeptide in pancreatic diseases. *Adv. Clin. Exp. Med.* 26, 1447–1456. <https://doi.org/10.17219/acem/65094>
- Smith, M.D., Harley, M.E., Kemp, A.J., Wills, J., Lee, M., Arends, M., von Kriegsheim, A., Behrends, C., Wilkinson, S., 2018. CCPG1 Is a Non-canonical Autophagy Cargo Receptor Essential for ER-Phagy and Pancreatic ER Proteostasis. *Dev. Cell* 44, 217-232.e11. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.024>
- Song, N., Liu, Z.-S., Xue, W., Bai, Z.-F., Wang, Q.-Y., Dai, J., Liu, X., Huang, Y.-J., Cai, H., Zhan, X.-Y., Han, Q.-Y., Wang, H., Chen, Y., Li, H.-Y., Li, A.-L., Zhang, X.-M., Zhou, T., Li, T., 2017. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol. Cell* 68, 185-197.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.017>
- Steer, S.A., Scarim, A.L., Chambers, K.T., Corbett, J.A., 2006. Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med.* 3, e17. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030017>
- Tan, G., Huang, C., Chen, J., Chen, B., Zhi, F., 2021. Gasdermin-E-mediated pyroptosis participates in the pathogenesis of Crohn's disease by promoting intestinal inflammation. *Cell Rep.* 35, 109265. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109265>

- Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., 2008. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 445, 77–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4)
- Tengholm, A., Hellman, B., Gylfe, E., 1999. Glucose regulation of free Ca(2+) in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* 274, 36883–36890. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.52.36883>
- Tersey, S.A., Nishiki, Y., Templin, A.T., Cabrera, S.M., Stull, N.D., Colvin, S.C., Evans-Molina, C., Rickus, J.L., Maier, B., Mirmira, R.G., 2012. Islet  $\beta$ -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *Diabetes* 61, 818–827. <https://doi.org/10.2337/db11-1293>
- Thameem, F., Farook, V.S., Bogardus, C., Prochazka, M., 2006. Association of amino acid variants in the activating transcription factor 6 gene (ATF6) on 1q21-q23 with type 2 diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 55, 839–842. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.03.06.db05-1002>
- Thielen, L.A., Chen, J., Jing, G., Moukha-Chafiq, O., Xu, G., Jo, S., Grayson, T.B., Lu, B., Li, P., Augelli-Szafran, C.E., Suto, M.J., Kanke, M., Sethupathy, P., Kim, J.K., Shalev, A., 2020. Identification of an Anti-diabetic, Orally Available Small Molecule that Regulates TXNIP Expression and Glucagon Action. *Cell Metab.* 32, 353-365.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.002>
- Thomas, H.E., Darwiche, R., Corbett, J.A., Kay, T.W.H., 2002. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 51, 311–316. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2.311>
- Thorens, B., Tarussio, D., Maestro, M.A., Rovira, M., Heikkilä, E., Ferrer, J., 2015. Ins1(Cre) knock-in mice for beta cell-specific gene recombination. *Diabetologia* 58, 558–565. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3468-5>

- Tirasophon, W., Lee, K., Callaghan, B., Welihinda, A., Kaufman, R.J., 2000. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. *Genes Dev.* 14, 2725–2736. <https://doi.org/10.1101/gad.839400>
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., Kaufman, R.J., 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 12, 1812–1824. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1812>
- Tong, X., Kono, T., Anderson-Baucum, E.K., Yamamoto, W., Gilon, P., Lebeche, D., Day, R.N., Shull, G.E., Evans-Molina, C., 2016. SERCA2 Deficiency Impairs Pancreatic  $\beta$ -Cell Function in Response to Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 65, 3039–3052. <https://doi.org/10.2337/db16-0084>
- Tsuchiya, Y., Saito, M., Kadokura, H., Miyazaki, J.-I., Tashiro, F., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Kohno, K., 2018. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic  $\beta$  cells. *J. Cell Biol.* 217, 1287–1301. <https://doi.org/10.1083/jcb.201707143>
- Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E.S., Huskey, N.E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M.T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F.R., Oakes, S.A., 2012. IRE1 $\alpha$  cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 338, 818–822. <https://doi.org/10.1126/science.1226191>
- 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* 287, 664–666. <https://doi.org/10.1126/science.287.5453.664>
- Urra, H., Henriquez, D.R., Cánovas, J., Villarroel-Campos, D., Carreras-Sureda, A., Pulgar, E., Molina, E., Hazari, Y.M., Limia, C.M., Alvarez-Rojas, S., Figueroa, R., Vidal, R.L., Rodriguez, D.A., Rivera, C.A., Court, F.A., Couve, A., Qi, L., Chevet, E., Akai, R.,



- Iwawaki, T., Concha, M.L., Glavic, Á., Gonzalez-Billault, C., Hetz, C., 2018. IRE1 $\alpha$  governs cytoskeleton remodelling and cell migration through a direct interaction with filamin A. *Nat. Cell Biol.* 20, 942–953. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0141-0>
- Urrea, H., Pihán, P., Hetz, C., 2020. The UPRosome – decoding novel biological outputs of IRE1 $\alpha$  function. *J. Cell Sci.* 133, jcs218107. <https://doi.org/10.1242/jcs.218107>
- Usui, M., Yamaguchi, S., Tanji, Y., Tominaga, R., Ishigaki, Y., Fukumoto, M., Katagiri, H., Mori, K., Oka, Y., Ishihara, H., 2012. Atf6 $\alpha$ -null mice are glucose intolerant due to pancreatic  $\beta$ -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism* 61, 1118–1128. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.01.004>
- Valverde, D.P., Yu, S., Boggavarapu, V., Kumar, N., Lees, J.A., Walz, T., Reinisch, K.M., Melia, T.J., 2019. ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 218, 1787–1798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201811139>
- van Anken, E., Braakman, I., 2005. Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 191–228. <https://doi.org/10.1080/10409230591008161>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G., 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 700–714. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Vantyghem, M.-C., de Koning, E.J.P., Pattou, F., Rickels, M.R., 2019. Advances in  $\beta$ -cell replacement therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Lancet Lond. Engl.* 394, 1274–1285. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31334-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31334-0)
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A.D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J.-P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., Agostinis, P., 2012. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 19, 1880–1891. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.74>

- Vig, S., Buitinga, M., Rondas, D., Crèvecoeur, I., van Zandvoort, M., Waelkens, E., Eizirik, D.L., Gysemans, C., Baatsen, P., Mathieu, C., Overbergh, L., 2019. Cytokine-induced translocation of GRP78 to the plasma membrane triggers a pro-apoptotic feedback loop in pancreatic beta cells. *Cell Death Dis.* 10, 309. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1518-0>
- Vitale, M., Bakunts, A., Orsi, A., Lari, F., Tadè, L., Danieli, A., Rato, C., Valetti, C., Sitia, R., Raimondi, A., Christianson, J.C., van Anken, E., 2019. Inadequate BiP availability defines endoplasmic reticulum stress. *eLife* 8, e41168. <https://doi.org/10.7554/eLife.41168>
- Voeltz, G.K., Rolls, M.M., Rapoport, T.A., 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 3, 944–950. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf202>
- Vogel, F., Hartmann, E., Görlich, D., Rapoport, T.A., 1990. Segregation of the signal sequence receptor protein in the rough endoplasmic reticulum membrane. *Eur. J. Cell Biol.* 53, 197–202.
- Volmer, R., van der Ploeg, K., Ron, D., 2013. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4628–4633. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217611110>
- Wang, C., Guan, Y., Yang, J., 2010. Cytokines in the Progression of Pancreatic  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Int. J. Endocrinol.* 2010, 515136. <https://doi.org/10.1155/2010/515136>
- Wang, J., Osei, K., 2011. Proinsulin maturation disorder is a contributor to the defect of subsequent conversion to insulin in  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.119>
- Wang, J., Song, M.-Y., Lee, J.Y., Kwon, K.S., Park, B.-H., 2015. The NLRP3 inflammasome is dispensable for ER stress-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage in Akita mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 466, 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.009>

- Wang, J., Takeuchi, T., Tanaka, S., Kubo, S.K., Kayo, T., Lu, D., Takata, K., Koizumi, A., Izumi, T., 1999. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J. Clin. Invest.* 103, 27–37. <https://doi.org/10.1172/JCI4431>
- Wang, Q., Zhang, H., Zhao, B., Fei, H., 2009. IL-1beta caused pancreatic beta-cells apoptosis is mediated in part by endoplasmic reticulum stress via the induction of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 324, 183–190. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-9997-9>
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., Ron, D., 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 17, 5708–5717. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5708>
- Wang, Y., Guan, S., Acharya, P., Koop, D.R., Liu, Y., Liao, M., Burlingame, A.L., Correia, M.A., 2011. Ubiquitin-dependent Proteasomal Degradation of Human Liver Cytochrome P450 2E1: IDENTIFICATION OF SITES TARGETED FOR PHOSPHORYLATION AND UBIQUITINATION\*. *J. Biol. Chem.* 286, 9443–9456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.176685>
- Welch, W.J., Brown, C.R., 1996. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones* 1, 109–115. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1996\)001<0109:iomacc>2.3.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1996)001<0109:iomacc>2.3.co;2)
- Wendt, A., Eliasson, L., 2020. Pancreatic  $\alpha$ -cells – The unsung heroes in islet function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 103, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.01.006>
- Whitcomb, D.C., Lowe, M.E., 2007. Human Pancreatic Digestive Enzymes. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>
- Wierup, N., Sundler, F., Heller, R.S., 2014. The islet ghrelin cell. *J. Mol. Endocrinol.* 52, R35-49. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0122>

- Winnay, J.N., Dirice, E., Liew, C.W., Kulkarni, R.N., Kahn, C.R., 2014. p85 $\alpha$  deficiency protects  $\beta$ -cells from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1192–1197. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322564111>
- Winnay, J.N., Kahn, C.R., 2011. PI 3-kinase regulatory subunits as regulators of the unfolded protein response. *Methods Enzymol.* 490, 147–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00009-X>
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M.D., Pena, C.A., Johnson, C.D., Canbay, A., Hoffman, H.M., Feldstein, A.E., 2014. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*. Baltimore, Md 59, 898–910. <https://doi.org/10.1002/hep.26592>
- Xiao, C., Giacca, A., Lewis, G.F., 2011. Sodium phenylbutyrate, a drug with known capacity to reduce endoplasmic reticulum stress, partially alleviates lipid-induced insulin resistance and beta-cell dysfunction in humans. *Diabetes* 60, 918–924. <https://doi.org/10.2337/db10-1433>
- Xiao, P., Takiishi, T., Violato, N.M., Licata, G., Dotta, F., Sebastiani, G., Marselli, L., Singh, S.P., Sze, M., Van Loo, G., Dejardin, E., Gurzov, E.N., Cardozo, A.K., 2022. NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK) is activated in pancreatic  $\beta$ -cells but does not contribute to the development of diabetes. *Cell Death Dis.* 13, 476. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04931-5>
- Xin, Y., Dominguez Gutierrez, G., Okamoto, H., Kim, J., Lee, A.-H., Adler, C., Ni, M., Yancopoulos, G.D., Murphy, A.J., Gromada, J., 2018. Pseudotime Ordering of Single Human  $\beta$ -Cells Reveals States of Insulin Production and Unfolded Protein Response. *Diabetes* 67, 1783–1794. <https://doi.org/10.2337/db18-0365>

- Xu, C., Xu, W., Palmer, A.E., Reed, J.C., 2008. BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins. *J. Biol. Chem.* 283, 11477–11484. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708385200>
- Xu, Q., Reed, J.C., 1998. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1, 337–346. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80034-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80034-9)
- Xu, T., Yang, L., Yan, C., Wang, Xiaoxia, Huang, P., Zhao, F., Zhao, L., Zhang, M., Jia, W., Wang, Xiangdong, Liu, Y., 2014. The IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway regulates metabolic stress-induced compensatory proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells. *Cell Res.* 24, 1137–1140. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.55>
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., Mori, K., 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem. (Tokyo)* 136, 343–350. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh122>
- Yamamoto, S., Kuramoto, K., Wang, N., Situ, X., Priyadarshini, M., Zhang, W., Cordoba-Chacon, J., Layden, B.T., He, C., 2018. Autophagy Differentially Regulates Insulin Production and Insulin Sensitivity. *Cell Rep.* 23, 3286–3299. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.032>
- Yamane, S., Hamamoto, Y., Harashima, S.-I., Harada, N., Hamasaki, A., Toyoda, K., Fujita, K., Joo, E., Seino, Y., Inagaki, N., 2011. GLP-1 receptor agonist attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated  $\beta$ -cell damage in Akita mice. *J. Diabetes Investig.* 2, 104–110. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00075.x>
- Yang, B., Yang, L., Wang, Y., Maddison, L.A., Tang, Z., Haigh, S., Gong, Y., Zhang, Y., Covington, B.A., Bosma, K.J., Tong, X., Page-McCaw, P., Gannon, M., Deng, Q., Chen,

- W., 2022. Macrophages and neutrophils are necessary for ER stress-induced  $\beta$  cell loss. *Cell Rep.* 40, 111255. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111255>
- Yang, X.-D., Yang, Y.-Y., 2022. Ferroptosis as a Novel Therapeutic Target for Diabetes and Its Complications. *Front. Endocrinol.* 13, 853822. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.853822>
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* 6, 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00133-7)
- Yilmaz, E., Berberoglu, M., Akar, N., 2010. Relationship between functional promoter polymorphism in the XBP1 gene (-116C/G) and obesity. *Clin. Appl. Thromb. Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 16, 99–102. <https://doi.org/10.1177/1076029608323498>
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., Eskelinen, E.-L., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180–1185. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.10274>
- Yong, J., Johnson, J.D., Arvan, P., Han, J., Kaufman, R.J., 2021. Therapeutic opportunities for pancreatic  $\beta$ -cell ER stress in diabetes mellitus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 17, 455–467. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00510-4>
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R.J., Nagata, K., Mori, K., 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell* 4, 265–271. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00022-4)
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881–891. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00611-0)

- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., Mori, K., 2006. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565–575. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508145>
- Yoshioka, M., Kayo, T., Ikeda, T., Koizumi, A., 1997. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 46, 887–894. <https://doi.org/10.2337/diab.46.5.887>
- Yoshizawa, T., Hinoi, E., Jung, D.Y., Kajimura, D., Ferron, M., Seo, J., Graff, J.M., Kim, J.K., Karsenty, G., 2009. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *J. Clin. Invest.* 119, 2807–2817. <https://doi.org/10.1172/JCI39366>
- Yu, Z.-W., Zhang, J., Li, X., Wang, Y., Fu, Y.-H., Gao, X.-Y., 2020. A new research hot spot: The role of NLRP3 inflammasome activation, a key step in pyroptosis, in diabetes and diabetic complications. *Life Sci.* 240, 117138. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117138>
- Yun, C., Chae, H., Kim, H., Ahn, T., 2012. Doxorubicin- and daunorubicin-induced regulation of Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> fluxes through human bax inhibitor-1 reconstituted into membranes. *J. Pharm. Sci.* 101, 1314–1326. <https://doi.org/10.1002/jps.23007>
- Yusta, B., Baggio, L.L., Estall, J.L., Koehler, J.A., Holland, D.P., Li, H., Pipeleers, D., Ling, Z., Drucker, D.J., 2006. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 4, 391–406. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.10.001>
- Z, Z., Q, Q., M, L., F, S., Wx, D., Va, L., Sx, C., Sc, S., Gs, H., H, C., L, Y., 2021. The unfolded protein response regulates hepatic autophagy by sXBP1-mediated activation of TFEB. *Autophagy* 17. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1788889>

- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., Jan, L.Y., 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537–548. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80708-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80708-4)
- Zhang, K., Wong, H.N., Song, B., Miller, C.N., Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2005. The unfolded protein response sensor IRE1alpha is required at 2 distinct steps in B cell lymphopoiesis. *J. Clin. Invest.* 115, 268–281. <https://doi.org/10.1172/JCI21848>
- Zhang, P., McGrath, B., Li, S., Frank, A., Zambito, F., Reinert, J., Gannon, M., Ma, K., McNaughton, K., Cavener, D.R., 2002. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3864–3874. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.11.3864-3874.2002>
- Zhao, L., Ackerman, S.L., 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol., Membranes and organelles* 18, 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.06.005>
- Zhou, H., Shi, C., Hu, S., Zhu, H., Ren, J., Chen, Y., 2018. B11 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways. *Angiogenesis* 21, 599–615. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9611-z>
- Zhou, H., Wang, J., Hu, S., Zhu, H., Toanc, S., Ren, J., 2019. B11 alleviates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury via modifying mitochondrial fission and inhibiting XO/ROS/F-actin pathways. *J. Cell. Physiol.* 234, 5056–5069. <https://doi.org/10.1002/jcp.27308>
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., Tschopp, J., 2010. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat. Immunol.* 11, 136–140. <https://doi.org/10.1038/ni.1831>



Zumsteg, U., Frigerio, S., Holländer, G.A., 2000. Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine beta-cell damage. *Diabetes* 49, 39–47. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.1.39>

Zychlinsky, A., Prevost, M.C., Sansonetti, P.J., 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 358, 167–169. <https://doi.org/10.1038/358167a0>

## ANNEXES

---

**2020**

Le rôle de la réponse au stress du réticulum endoplasmique dans la pathophysiologie des maladies chroniques du foie. Vallée D, *Blanc M*, Lebeaupin C et Bailly-Maitre B. Med Sci (Paris). 2020 Feb ; 36 (2) : 119 – 129.

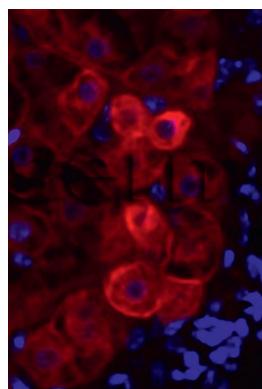
Bax Inhibitor-1: Between stress and survival. Lebeaupin C, *Blanc M*, Vallée D et Bailly-Maitre B. FEBS J. 2020 May ; 287 (9) : 1722 – 1736. doi: 10.1111/febs.15179. Epub 2020 Jan 8.



► La prévalence des maladies chroniques du foie ne cesse d'augmenter, du fait de la pandémie de l'obésité. Ces maladies s'étendent de la bénigne stéatose à la stéatopathie non alcoolique (NASH) qui peut évoluer vers le carcinome hépatocellulaire. Il n'existe pas de traitement pour ces maladies. La transition stéatose-NASH apparaît déterminante dans leur progression. Au cours de l'obésité, l'activation chronique de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) jouerait un rôle crucial dans cette transition, conduisant à la mort cellulaire, à l'inflammation et à l'aggravation des désordres métaboliques. Dans cette revue, nous discutons ces aspects et proposons que le ciblage de cette réponse au stress du RE puisse être pertinent dans la prise en charge thérapeutique de la NASH. ◀

## La réponse au stress du réticulum endoplasmique dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie

Déborah Vallée, Marina Blanc, Cynthia Lebeauvin, Béatrice Bailly-Maitre



Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M), Inserm U1065, 151, Route de St Antoine de Ginestière, 06204 Nice, France. [beatrice.bailly-maitre@unice.fr](mailto:beatrice.bailly-maitre@unice.fr)

### Les maladies chroniques du foie

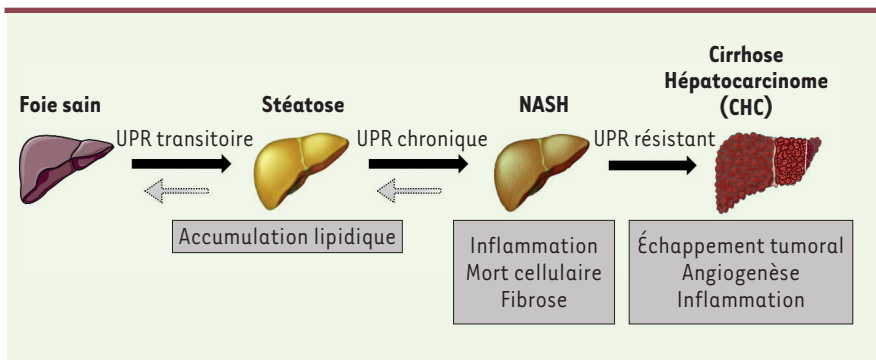
La pandémie de l'obésité et du surpoids constitue un problème mondial de santé publique. En France, plus de 50 % de la population est en surpoids ou obèse<sup>1</sup> [1]. L'obésité est associée aux maladies chroniques du foie non alcooliques (ou, en anglais, NAFLD pour *non alcoholic fatty liver disease*) [2] qui affecteraient 25 % de la population mondiale et entre 85 et 98 % des individus obèses morbides. Le spectre des NAFLD s'étend de la stéatose hépatique (ou « foie gras »), à la stéatohépatite (en anglais, NASH pour *non alcoholic steato-hepatitis*) qui peut progresser vers la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (Figure 1). La prévalence de ces pathologies reste sous-estimée en raison de leur évolution asymptomatique.

La stéatose hépatique, de bon pronostic, est caractérisée par une accumulation de lipides au sein des hépatocytes : majoritairement des triglycérides, des diacylglycérols et des céramides, plus minoritaires. La

stéatose peut progresser vers la stéatohépatite, au pronostic plus sévère. La stéatohépatite est la forme évolutive de la maladie. Elle est définie par la présence d'une stéatose qui conduit progressivement à l'apparition de lésions inflammatoires, à l'activation de processus de mort hépatocytaire (par apoptose et nécrose), puis au développement de la fibrose. L'ensemble de ces caractéristiques physiopathologiques font de la stéatohépatite un facteur de risque de cirrhose, de carcinome hépatocellulaire (CHC) et d'insuffisance hépatique [3]. La prévalence du CHC est plus élevée chez les patients obèses, avec un risque de décès en lien avec une maladie du foie multiplié par 4,5. Les études épidémiologiques indiquent également une augmentation de la mortalité chez les patients atteints de maladies chroniques du foie. La transition entre stéatose et NASH repose sur plusieurs facteurs et est déterminante dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette transition et l'évolution vers des stades plus sévères restent mal compris. Hormis les mesures hygiéno-diététiques (réduction de la prise alimentaire) et des modifications du style de vie (augmentation de l'activité physique), aucun traitement pharmacologique n'est disponible. Il apparaît donc crucial d'élucider les mécanismes participant à la physiopathologie des NAFLD afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques.

Le réticulum endoplasmique (RE) est le compartiment cellulaire qui assure le maintien des homéostasies protéique (synthèse, repliement,

Vignette (Photo © Inserm/Institut clinique de la souris - Éric Robinet).  
<sup>1</sup> Enquête Obépi-Roche 2012 et Cohorte épidémiologique Constances 2016.



**Figure 1. Les complications hépatiques associées à l'obésité.** Le foie sain peut évoluer vers la stéatose, un stade bénin, caractérisée par une accumulation de lipides. La stéatose peut progresser vers un stade plus délétère : la stéatohépatite non alcoolique (NASH), caractérisée par l'apparition d'inflammation, de mort cellulaire et de fibrose. La NASH peut conduire à des stades dramatiques tels que la cirrhose et l'hépatocarcinome (CHC).

modifications post-traductionnelles des protéines sécrétées), calcique (stockage du calcium) et lipidique (biogenèse des lipides : phospholipides, cholestérol, triglycérides). L'obésité s'accompagne de perturbations fonctionnelles du RE qui contribuent à l'activation de voies de signalisation qui prennent leurs origines au sein du RE et qui sont appelées « réponse au stress du RE ». Cette réponse est impliquée dans la physiopathologie des maladies chroniques du foie. Dans cette revue, nous exposerons les causes de cette réponse et ses conséquences dans la physiopathologie de ces maladies, notamment dans l'apparition de la stéatose et dans la transition vers la NASH.

### La réponse au stress du réticulum endoplasmique contribue à la physiologie hépatique

Le foie assure des fonctions métaboliques et sécrétoires qui sont vitales ainsi que des fonctions de détoxification. Il est constitué d'hépatocytes qui représentent environ 80 % des cellules hépatiques. La fraction de cellules restante correspond aux cellules de Kupffer (ou macrophages résidents du foie) et autres cellules immunitaires, aux cellules stellaires (qui sont responsables de la fibrose) et aux cellules endothéliales sinusoidales. Les hépatocytes sont des cellules sécrétrices qui sont responsables de l'assemblage et de l'export des VLDL (*very low density lipoprotein*), de la synthèse des protéines plasmatiques (albumine, facteurs de coagulation, protéines de l'inflammation - CRP [*protéine C réactive*], hepcidine). C'est également dans ces cellules que sont synthétisés les lipides (acides gras, cholestérol, triglycérides), et que sont métabolisés le glucose et les xénobiotiques. Cette myriade de fonctions est assurée par le réticulum endoplasmique de type lisse (siège des enzymes responsables du métabolisme des lipides et des xénobiotiques) et granuleux (siège de la synthèse protéique).

Des modifications de l'environnement extra-hépatique (induits par des virus, des médicaments, une hyperlipidémie ou une inflammation) ou intracellulaires (accumulation de lipides, stress oxydatif) peuvent perturber les fonctions du réticulum endoplasmique. Cela conduit à l'accumulation de protéines mal repliées et enclenche la voie de la réponse au stress du réticulum endoplasmique, une réponse aux protéines mal appariées (UPR, *unfolded protein response*). La première phase de cette réponse est adaptative : une cascade d'événements moléculaires est induite afin de réduire la quantité de protéines mal

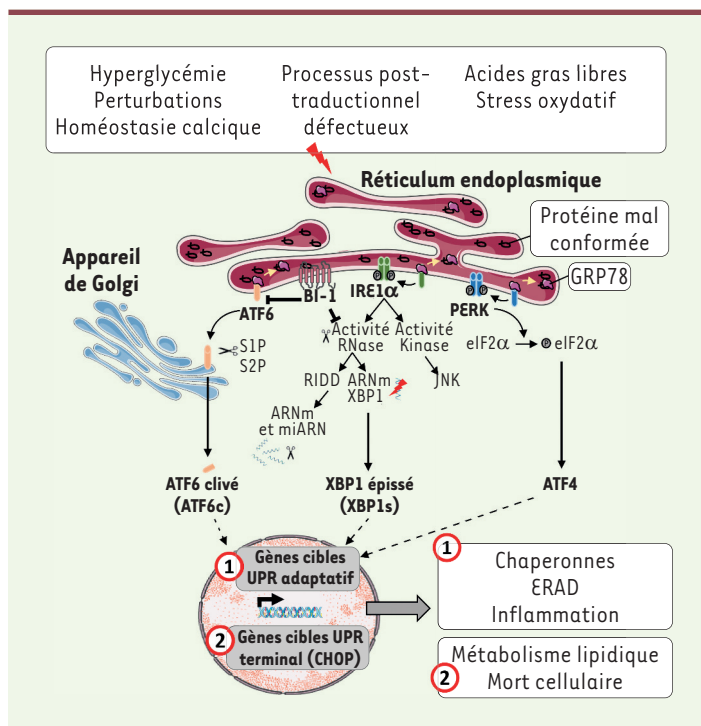
repliées et contrer le stress initial. Ils incluent 1) l'inhibition globale de la synthèse protéique, afin d'éviter l'entrée de nouvelles protéines dans la lumière du RE ; 2) l'augmentation spécifique de la synthèse de protéines chaperonnes et de foldases qui aident au bon repliement des protéines ; 3) l'activation de processus de dégradation des protéines non conformes qui soit dépend du RE (le système ERAD, *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) soit en est indépendant (par autophagie). Si la cellule ne parvient pas à remédier aux conséquences du stress initial (stress intense ou chronique), les mêmes voies moléculaires conduiront alors, dans une seconde phase, à la mort cellulaire par apoptose (Figure 2).

### Les acteurs de la réponse au stress

Trois protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique participent comme *senseur* à sa réponse au stress : IRE1 $\alpha$  (*inositol-required endoribonuclease 1 $\alpha$* ), une sérine/thréonine kinase dotée d'une activité endoribonucléasique ; la kinase PERK (*PKR-like ER kinase*) ; et la protéine ATF6 (*activating-transcription factor 6*) [4]. En l'absence de protéines mal conformées, IRE1 $\alpha$ , PERK et ATF6 sont maintenues inactives par la protéine chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*), également connue sous le nom de GRP78 (*78-kDa glucose regulated protein*). Lorsque la mauvaise conformation des protéines devient trop importante, GRP78 se dissocie des trois senseurs afin d'aider au bon repliement des protéines, ce qui conduit à l'homodimérisation et à l'autophosphorylation de deux d'entre eux, les kinases IRE1 $\alpha$  et PERK, et à l'activation des trois mécanismes de l'UPR.

### IRE1 $\alpha$

La voie reposant sur IRE1 $\alpha$  est la plus conservée des trois voies de l'UPR au cours de l'évolution. Cette protéine présente deux activités enzymatiques : endoribonucléasique (RNase) et, dans son domaine cytosolique, sérine/thréonine kinase. Son activité endoribonucléa-



**Figure 2. La réponse au stress du réticulum endoplasmique.** La réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) est transmise par trois protéines effectrices transmembranaires : IRE1α (*inositol-requiring enzyme 1* α), PERK (*protein kinase r-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 (*activating transcription factor 6*). À l'état basal, ces protéines sont maintenues inactives par leur interaction avec la GRP78 (*glucose-regulated protein 78*). Lors d'un stress, la GRP78 se dissocie de ces trois protéines, conduisant à leur activation. PERK et IRE1α se dimérisent et s'auto-phosphorylent. IRE1α possède à la fois une activité kinase et endoribonucléase (RNase) conduisant à la production du facteur de transcription XBP1s (*Xbox-binding protein 1*). PERK phosphoryle eIF2α (*eukaryotic initiation factor 2*), limitant ainsi la traduction protéique et favorisant la traduction du facteur de transcription ATF4 (*activating-transcription factor 4*). ATF6 migre dans le Golgi où il sera clivé, aboutissant à la production d'un facteur de transcription : ATF6 clivé. Dans un premier temps, ces trois facteurs de transcription (ATF6c, XBP1s, ATF4) visent à rétablir de façon coordonnée l'homéostasie du RE (synthèse de chaperonnes, augmentation de la dégradation des protéines du RE via ERAD [*endoplasmic reticulum-associated degradation*]). Néanmoins, si le stress est chronique ou intense, les mêmes voies enclenchent la mort de la cellule par apoptose, notamment via le facteur de transcription CHOP (*C/EBP homologous protein*) et les kinases JNK (*c-Jun N-terminal kinases*).

sique permet un épissage particulier (excisant 26 nucléotides) de l'ARN messager (ARNm) codant XBP1s, un facteur de transcription clef des gènes de la réponse UPR et de la lipogenèse. Cette activité RNase d'IRE1α est également à l'origine de la dégradation spécifique d'ARNm et de microARN impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires (mort cellulaire, métabolisme, cancer) par un mécanisme appelé RIDD (*regulated-IRE1-dependent decay*) [5] (→).

(→) Voir la Synthèse de M. Boucheareilh et E. Chevet, m/s n° 3, mars 2009, page 281

IRE1α peut également s'associer à de nombreux partenaires par son domaine cytosolique pour induire une cascade d'activation de protéines kinases. TRAF2 (*TNF receptor-associated factor*), une protéine adaptatrice, s'associe en effet au domaine kinase d'IRE1α, formant un complexe (IRE1α/TRAF2) qui interagit avec ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), une protéine impliquée dans la réponse inflammatoire, qui active NFκB (*nuclear factor-kappa B*) en phosphorylant son inhibiteur (IκB), et dans l'apoptose en activant la kinase JNK (*c-Jun N-terminal kinase*).

### PERK

PERK est une protéine transmembranaire du RE qui comporte un domaine *senseur* de stress, localisé dans la lumière du RE (en position N-terminale), et un domaine kinase (en position C-terminale). Activée, PERK phosphoryle eIF2α (*eukaryotic translation initiation factor 2, subunit*) sur sa sérine 51. Ceci conduit à l'arrêt de la traduction des ARNm par empêchement de l'assemblage des ribosomes 80S, et ainsi à la diminution de la synthèse protéique. Paradoxalement, cette voie permet néanmoins la synthèse d'ARNm spécifiques qui possèdent un IRES (*internal ribosomal entry site*) ou présentent un petit uORF (*upstream open reading frame*) comme l'ARNm codant ATF4 (*activating-transcription factor 4*), un facteur de transcription clef impliqué dans la réponse UPR. ATF4 active les gènes de l'UPR « adaptatif » dont les produits participent à l'aide au repliement des protéines (gènes codant les chaperonnes), à leur élimination si nécessaire (gènes de l'autophagie), au maintien de l'homéostasie d'oxydo-réduction – induction d'une forte réponse anti-oxydante *via* la phosphorylation d'un autre substrat de PERK, NRF2 (*nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2*) [6] – et au métabolisme des acides aminés [7]. Si le stress devient chronique ou intense (UPR chronique), ATF4 favorise l'expression du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (*C/EBP homologous protein*), qui augmentera l'expression des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et conduira à l'apoptose de la cellule.

### ATF6

ATF6 est une protéine transmembranaire dont la partie cytosolique est un facteur de transcription possédant un domaine BZIP. Il existe deux isoformes d'ATF6 : ATF6α, exprimé de façon ubiquitaire, et ATF6β présent uniquement au niveau intestinal. À la suite d'un stress, ATF6 se localise au niveau de l'appareil de Golgi dans lequel il est clivé par les protéases résidentes S1P et S2P (*site-1/2-protease*), libérant un fragment cytosolique

« ATF6 clivé » qui, migrant vers le noyau, régule la transcription des gènes de l'UPR [8]. ATF6 clivé ne module pas seulement l'expression des gènes impliqués dans le repliement des protéines et l'ERAD, il peut également activer la transcription de CHOP, induisant alors l'apoptose de la cellule. ATF6 clivé active également l'expression d'XBP1 non épissé, communiquant ainsi avec la voie IRE1 $\alpha$ .

Des études réalisées chez la souris indiquent que la voie IRE1 $\alpha$  est essentielle au développement du foie : la délétion du gène codant IRE1 $\alpha$  conduit à une létalité embryonnaire due à une hypoplasie hépatique. Bien que PERK et ATF6 $\alpha$  ne soient pas indispensables pour le développement du foie, les souris dont les gènes codant PERK et ATF6 $\alpha$  ont été invalidés, ainsi que les souris dont le gène codant IRE1 $\alpha$  a été invalidé spécifiquement au niveau hépatocytaire, sont incapables de résister à un stress hépatique aigu induit par une injection de tunicamycine ou à un stress chronique par exposition à un régime gras [9]. Ces souris développent des maladies hépatiques, ce qui suggère un rôle majeur de ces trois voies de l'UPR dans le maintien de l'homéostasie hépatique.

### **Le rôle ambivalent de l'UPR dans la physiopathologie des NAFLD : ami ou ennemi ?**

La durée et l'intensité de la réponse UPR apparaît déterminante dans l'engagement des mécanismes d'abord protecteurs et qui progressent ensuite vers une réponse qui s'avère délétère. La réponse UPR transitoire est en effet un mécanisme protecteur, gardien de la physiologie hépatique. Elle protège les hépatocytes de l'exposition excessive aux nutriments, aux xénobiotiques ainsi qu'aux stress intracellulaires. Une activation transitoire de l'UPR est ainsi observée en situation post-prandiale. L'activation transitoire du RIDD d'IRE1 $\alpha$  conduit également à la dégradation des ARNm codant pour deux cytochromes P450 responsables de la métabolisation de l'acétaminophène en un métabolite cytotoxique pour le foie. Le RIDD réprime aussi les miR-34 et miR-200, ce qui protège l'homme et la souris exposés à un régime gras de l'apparition de la stéatose [10].

Le foie est donc protégé par cette réponse UPR transitoire protectrice. Son activation chronique contribuera à la transition de la stéatose vers la NASH, en favorisant les désordres inflammatoires, métaboliques et les processus de mort cellulaire [11] (→).

(→) Voir la Synthèse de F. Foufelle et P. Ferré, m/s n° 3, mars 2007, page 291

Son activation soutenue (UPR résistant) contribuerait, elle, à la progression des NAFLD vers les stades dramatiques de la maladie hépatique (cirrhose, CHC) (Figure 1).

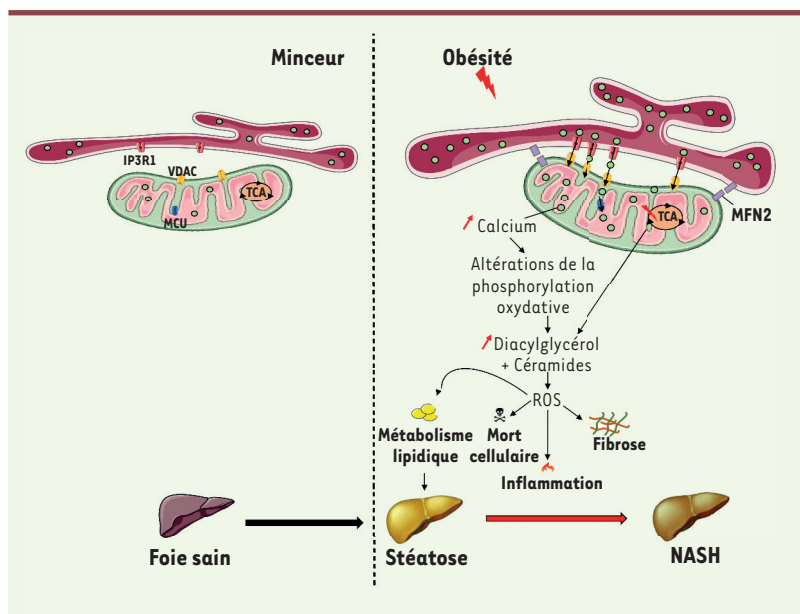
Le premier lien entre l'obésité, l'activation du stress du RE et l'apparition de la stéatose fut mis en évidence par l'équipe du Dr Hotamisligil à Harvard, qui rapporta une augmentation des marqueurs de stress du RE au sein de foies stéatosiques isolés à partir de souris génétiquement obèses (ob/ob et db/db) ou rendues obèses par un régime alimentaire riche en graisses (HFD pour *high fat diet*) [12]. L'activation de l'UPR a également été observée chez les patients présentant une stéatose. Les marqueurs de l'UPR sont en effet amplifiés dans les foies stéatosiques de patients obèses. Leur diminution est corrélée à la perte de poids des

patients ainsi qu'à la réduction de la teneur en lipides hépatiques consécutives à une chirurgie bariatrique [13]. L'activation de l'UPR est également observée dans les foies de patients obèses atteints de NASH. Il en est de même chez des souris nourries avec un régime déficient en méthionine et choline (MCD) qui présentent les caractéristiques physio-pathologiques de la NASH, mais sans obésité [14], et chez des souris nourries avec des régimes HFD/fructose ou HFD/sans choline qui présentent les caractéristiques de la NASH et de l'obésité. Une activation directe de la voie IRE1 $\alpha$ -XBP1 a d'autre part été observée *in vivo* au cours du développement de la résistance à l'insuline dans le foie [15]. De plus, la surexpression hépatique des chaperonnes résidentes du RE, comme GRP78/BiP (78-kDa *glucose-regulated protein*), améliore la sensibilité à l'insuline et normalise la stéatose chez les souris obèses [16] en inhibant le stress du RE, ce qui apporte une preuve directe que le stress du RE dans le foie contribue au développement des NAFLD associées à l'obésité.

### **Le rôle des lipides dans la mise en place de la réponse UPR**

En situation d'obésité, l'activation chronique de la réponse UPR pourrait être enclenchée par des stress à la fois environnementaux extra-hépatiques (acides gras libres, céramides, cytokines) et intracellulaires, tels que l'accumulation de lipides *per se* au sein des hépatocytes, une caractéristique physiopathologique des NAFLD. Bien que les triglycérides soient la catégorie de lipides la plus abondante, les analyses lipidomiques ont révélé la présence de diacylglycérols et de céramides dans des biopsies de foies humains stéatosiques [17]. Ces lipides inhiberaient la voie de signalisation de l'insuline hépatique, contribuant à l'apparition de la résistance à l'insuline et du stress du RE. Savoir si la résistance à l'insuline hépatique ou la stéatose se développent en premier reste débattu. Il est cependant établi que la résistance à l'insuline est un facteur de risque dans la progression des NAFLD [18].

L'accumulation anormale de lipides dans les hépatocytes perturberait l'homéostasie du calcium (Ca<sup>2+</sup>) dans le RE, activant chroniquement le stress du RE dans le foie. En effet, chez les souris obèses, l'accumulation excessive de lipides dans le foie entraîne un déséquilibre dans la composition lipidique de la membrane du RE avec un rapport plus élevé de phosphatidylcholine (PC) par rapport à la phosphatidyléthanolamine (PE), altérant la fluidité de la membrane. Ce changement de ratio PC/PE est à l'origine d'une diminution de l'activité de SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*),



**Figure 3.** Les MAM, un lieu d'échange entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Le réticulum endoplasmique peut former des structures d'échanges avec la mitochondrie, nommées MAM (mitochondria-associated membrane) permettant le passage du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et d'espèces lipidiques de la lumière du RE vers la mitochondrie. Au cours de l'obésité, le nombre de MAM augmente, surchargeant la mitochondrie en calcium. Cette surcharge altère les fonctions mitochondriales, engendrant un défaut de phosphorylation oxydative et du cycle d'acide tricarboxylique, conduisant à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'apparition de la stéatose puis sa transition vers la NASH via l'induction d'inflammation, de mort cellulaire et de fibrose.

la pompe qui permet l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Il s'ensuit une réduction de la concentration de calcium dans le RE, une accumulation de protéines mal repliées, puisque la majorité des chaperonnes sont dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ , et, par conséquent, l'induction de la réponse UPR. Réciproquement, la surexpression de SERCA ou la correction de la composition des membranes en phospholipides dans le RE réduit ce stress et corrige la stéatose chez des animaux obèses. Ainsi, les perturbations lipidiques et de l'homéostasie calcique seraient promotrices du stress du RE hépatique dans l'obésité [19] (→).

Comment l'obésité altère l'activité de la pompe SERCA, reste cependant à explorer. Une récente étude suggère que les lipides peuvent induire directement un stress du RE par l'intermédiaire des senseurs IRE1 $\alpha$  et PERK qui pourraient agir comme des capteurs détectant *via* leur domaine transmembranaire, les caractéristiques biophysiques des membranes lipidiques reposant sur le rapport des chaînes acyle insaturées et saturées qui affectent la fluidité et l'épaisseur de la membrane [20].

Le RE établit des zones de contacts étroits avec les mitochondries : les membranes associées aux mitochondries (MAM) (Figure 3), qui permettent le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  et d'espèces lipidiques entre les 2 organelles. Ainsi, au sein de la membrane du RE, le récepteur de l'inositol triphosphate, IP3R, participe à la libération passive de  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant à la mitochondrie de se charger en calcium d'abord *via* le canal VDAC (voltage-dependent anion-selective channel 1) présent sur sa membrane externe, puis *via* le canal MCU (mitochondrial calcium uniporter) localisé sur sa membrane interne. En situation d'obésité, le nombre de MAM augmente, surchargeant les mitochondries en  $\text{Ca}^{2+}$  et altérant leurs fonctions, notamment la phosphorylation oxydative. Cette altération de la phosphorylation oxydative est associée à l'apparition de la stéatose, à un dysfonctionnement du cycle d'acide tricarboxylique, à l'accumulation d'intermédiaires lipidiques toxiques (céramides, diacylglycérols) conduisant à la production de ROS (*reactive oxygen species*), à l'apparition de l'inflammation, de la fibrose et à la transition stéatose-NASH [21]. Les lipides jouent ainsi un rôle essentiel dans la mise en place de la réponse UPR et de la stéatose, puis dans son maintien vers des stades délétères.

(→) Voir la Nouvelle de M. Flamment et F. Foufelle, *m/s* n° 1, janvier 2012, page 13

### La réponse UPR chronique favorise la transition stéatose-stéatohépatite

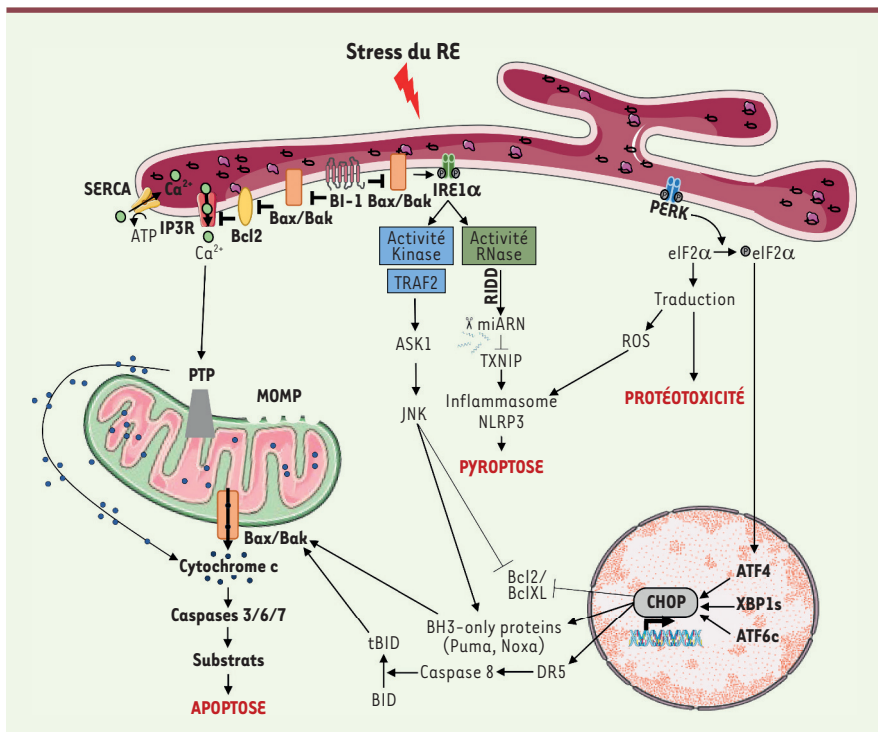
Suite à l'établissement de la stéatose qui vulnérabilise les hépatocytes, la mise en place de l'UPR « chronique » favoriserait la transition vers la stéatohépatite en aggravant les désordres métaboliques et en induisant des processus inflammatoires, de mort cellulaire et de la fibrose, les caractéristiques physiopathologiques de la stéatohépatite. Les patients atteints de NASH présentent en effet une inflammation qui est corrélée à la gravité histologique de leurs atteintes hépatiques [22]. Les biopsies de foie de ces patients révèlent également un nombre significativement plus élevé d'hépatocytes en apoptose (positifs au marquage TUNEL [*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*], activation des caspases exécutrices de l'apoptose – caspases-3 et -7 – et augmentation de l'expression du récepteur de mort Fas) par rapport aux foies de patients minces ou stéatosiques [23].

### La réponse inflammatoire dépendante du stress du RE dans la NASH

#### Le stress du RE active les voies NF $\kappa$ B et JNK

Lors d'un stress chronique, IRE1 $\alpha$  activée peut former un complexe avec TRAF2 activant les protéines kinases





**Figure 4. Mécanismes de mort cellulaire dépendants du stress du réticulum endoplasmique.** Lors d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (RE), un flux calcique de la lumière du RE vers la mitochondrie intervient, entraînant l'ouverture du canal PTP (*permeability transition pore*) mitochondrial, une dérégulation du potentiel membranaire mitochondrial et une perméabilisation de la mitochondrie au niveau de sa membrane externe MOMP (*mitochondrial outer membrane permeabilization*). Ces dérégulations aboutissent à la libération du cytochrome c, l'activation de la caspase-9, puis des caspases-3/ -6/ -7 et à l'apoptose. Les protéines anti- et pro-apoptiques régulent également la libération du cytochrome c au niveau de la mitochondrie, inhibant ou favorisant l'induction de l'apoptose. Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), BclXL (*B-cell lymphoma extra large*), Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bak (*Bcl-2 homologous antagonist killer*) peuvent aussi être ancrés au niveau du réticulum endoplasmique où ils régulent la libération de calcium. L'activation des voies IRE1 $\alpha$  (*inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$* ), PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 (*activating-transcription factor 6*) conduit à l'accumulation d'un facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (*C/EBP homologous protein*), qui augmente l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3-only proteins (PUMA [*p53-upregulated modulator of apoptosis*], NOXA [*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein*], BIM [*Bcl-2 interacting mediator of cell*]) et diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et BclXL.

gous antagonist killer) peuvent aussi être ancrés au niveau du réticulum endoplasmique où ils régulent la libération de calcium. L'activation des voies IRE1 $\alpha$  (*inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$* ), PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*) et ATF6 (*activating-transcription factor 6*) conduit à l'accumulation d'un facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (*C/EBP homologous protein*), qui augmente l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3-only proteins (PUMA [*p53-upregulated modulator of apoptosis*], NOXA [*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein*], BIM [*Bcl-2 interacting mediator of cell*]) et diminue l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et BclXL.

impliquées dans l'inflammation. Le complexe IRE1 $\alpha$ /TRAF2 active ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), puis NF $\kappa$ B et les kinases de la famille JNK impliquées dans l'activation transcriptionnelle de voies pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (Figure 4). L'activation de NF $\kappa$ B conduit dans un premier temps à l'induction de réponses inflammatoires qui favorisent la survie des cellules. Mais, au cours de la NASH, NF $\kappa$ B favorise ensuite les lésions hépatiques, la fibrose et l'évolution vers le CHC. L'activation de PERK réduit également la traduction d'I $\kappa$ B, renforçant l'activité de NF $\kappa$ B [24].

Chez le patient obèse, la perméabilité intestinale est augmentée, ce qui favorise le passage dans le sang de composés bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS), augmentant leurs niveaux circulants (endotoxémie). Dans les hépatocytes, le LPS activerait *via* NF $\kappa$ B une réponse pro-inflammatoire « à bas bruit » et à visée anti-apoptotique. Cette activité légèrement augmentée de NF $\kappa$ B contribuerait à la protection des hépatocytes. Néanmoins, au-delà d'un certain seuil, elle serait à l'origine de la sécrétion de facteurs inflammatoires et chimiotactiques, participant ainsi à l'aggravation de l'inflammation hépatique, l'induction de l'apoptose et l'apparition de fibrose [25]. Dans les foies de souris soumises à un régime déficient en méthionine et choline (induisant la NASH), NF $\kappa$ B serait un médiateur important qui participe au développement des lésions de la NASH. Dans des hépatocytes

primaires humains exposés aux acides gras saturés, l'activation de la signalisation NF $\kappa$ B par CHOP (*CCAAT/enhancer-binding protein [C/EBP] homologous protein*) serait un mécanisme impliqué dans la progression de la stéatose vers la NASH, entraînant la sécrétion de cytokines impliquées dans la mort cellulaire et l'inflammation [26].

### Stress du RE et production de protéines de la phase aiguë de l'inflammation

L'augmentation de la sécrétion de protéines de phase aiguë par les hépatocytes (comme la CRP [*C-reactive protein*]) est un indicateur d'inflammation hépatique qui peut être associé au stress du RE. CREBH (*C-AMP response element-binding protein*) est un facteur de transcription impliqué dans la phase aiguë de l'inflammation qui est exprimé uniquement dans le foie. Suite à un stress du RE dans les hépatocytes, CREBH subit une protéolyse intra-membranaire permettant la transactivation des gènes de l'UPR et des gènes des protéines inflammatoires. Ainsi, comparés aux patients atteints de stéatose, les patients NASH présentent des taux de





CRP sériques significativement plus élevés [27]. L'hepcidine, une hormone peptidique sécrétée par le foie en réponse au stress du RE et à l'inflammation, également induite par CREBH, régule l'homéostasie du fer et une surcharge en fer a été observée chez les patients présentant une NASH avec un risque accru d'aggravation vers la fibrose. Les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) ou l'IL-6 (*interleukine-6*), ou encore le LPS, peuvent induire l'expression de CREBH, perpétuant ainsi un état inflammatoire lors d'un stress du RE.

### Le rôle de l'inflammasome

Les inflammasomes sont des complexes multi-protéiques qui détectent des signaux de danger et conduisent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires lors de stress cellulaires. L'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3*), l'un des plus étudiés, est activé dans les foies de patients et de souris NASH [28]. Son activation nécessite deux signaux successifs : un premier, qui induit la transcription et la traduction des cytokines pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 ; et un second, qui sert de médiateur à son assemblage avec la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) et les caspases-1 et -11. Le complexe ainsi formé permettra l'activation des caspases qui y sont associées, conduisant au clivage des pro-cytokines en cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, qui sont des médiateurs pyrogéniques, déclenchant la réponse inflammatoire. L'inflammasome NLRP3 joue un rôle important dans l'apparition de la stéatose. Les souris déficientes pour la caspase-1, la caspase-11, NLRP3 ou ASC (incapables de produire les cytokines) soumises à un régime riche en graisses sont protégées de la stéatose et de la résistance à l'insuline [29]. L'activation soutenue de NLRP3 conduit à la mort cellulaire par pyroptose, une mort cellulaire programmée dépendant de la caspase-1 (ou -11) et conduisant à un gonflement cellulaire, à la formation de pores dans la membrane, par clivage (en N-terminal) de la gasdermine D en un fragment de 31 kDa (gasdermine D-N) à l'origine de cette formation de pores, favorisant la libération de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 [30]. Les souris déficientes en gasdermine D sont résistantes à la NASH et, inversement, la surexpression de la gasdermine D favorise la NASH, chez la souris saine.

Les souris qui expriment une forme constitutivement active de NLRP3 développent rapidement une NASH. Ces souris présentent une augmentation de la mort hépatocytaire par pyroptose, une aggravation de l'inflammation hépatique, une forte activation des cellules stellaires et de la fibrose [31]. Au contraire, l'inhibition de NLRP3 par traitement pharmacologique améliore la physiopathologie des NAFLD et la fibrose chez les souris diabétiques et obèses [32]. De nombreuses études ont établi un lien entre le stress du RE et l'activation de NLRP3 [28]. Ainsi, chez les souris génétiquement obèses, une endotoxémie<sup>2</sup> qui accentue les activités hépatiques d'IRE1 $\alpha$  et de PERK, conduit à la surexpression de CHOP, induisant l'expression à la fois des caspases-1 et -11 et de PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*), un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 déclenchant la pyroptose et

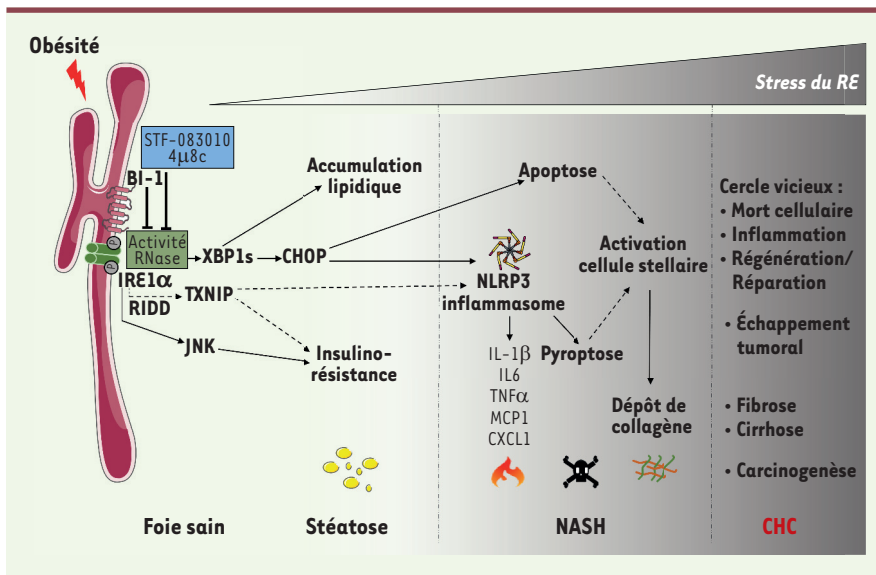
l'apoptose hépatocytaire. L'acide tauroursodéoxycholique (*TUDCA*), qui inhibe le stress du RE, protège contre cette activation de NLRP3 dépendant des caspases et d'IRE1 $\alpha$  et de PERK [28].

L'inflammasome peut également être activé indirectement par IRE1 $\alpha$  et son activité RIDD capable de dégrader le miARN miR-17 qui réprime *TXNIP* (*thioredoxin-interacting protein*). *TXNIP* se lie et active NLRP3. L'accroissement de son expression contribue ainsi à l'activation de l'inflammasome, augmentant la réponse inflammatoire et favorisant la mort cellulaire [33]. *TXNIP* favorise aussi la production des ROS, qui contribuent également à l'activation de l'inflammasome. De même, la sur-activation de la fonction RNase d'IRE1 $\alpha$ , chez des souris déficientes pour BI-1 (*Bax inhibitor 1*) l'inhibiteur endogène de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ , soumises à un régime riche en graisses, conduit à la NASH en lien avec une augmentation de l'expression hépatique de *TXNIP* [34], à l'activation de l'inflammasome et de la pyroptose dans les hépatocytes. L'inflammation et la mort cellulaire dépendant de l'inflammasome (pyroptose, apoptose) jouent un rôle central dans la progression de la stéatose vers la NASH.

### Stress du RE, production de ROS et inflammation

Le stress oxydatif, causé par la surproduction de ROS et de radicaux libres, contribuerait au développement des NAFLD. Au cours de la stéatose, l'accumulation d'acides gras et la surcharge en Ca<sup>2+</sup> altèrent la fonction des mitochondries (oxydation et respiration) entraînant une augmentation de la production de ROS. Des voies oxydatives alternatives sont alors activées dans les peroxysomes ( $\beta$ -oxydation) et les microsomes ( $\omega$ -oxydation), amplifiant les niveaux de radicaux libres, ce qui altère l'oxydation des acides gras, augmente la production de glycérol-3-phosphate et la lipogénèse, aggravant la stéatose [35]. Le stress oxydatif pourrait agir comme un déclencheur dans la transition stéatose-NASH. La réponse anti-oxydante est orchestrée par le facteur nucléaire NRF2, fortement exprimé dans les organes détoxifiants comme le foie. Suite à un stress du RE, PERK phosphoryle NRF2 et le stabilise, ce qui permet de réduire les niveaux élevés de ROS [6]. L'activation de la réponse au stress du RE, jouerait ainsi, *via* NRF2, un rôle cytoprotecteur vis-à-vis de l'inflammation induite par le stress oxydatif. Les souris déficientes pour *NRF2* sous régime déficient en méthionine et choline, présentent une aggravation des caractéristiques de la NASH et de l'inflammation, résultant d'une augmentation significative du stress oxydatif par rapport à des souris sauvages. Inversement, une activation soutenue de NRF2 protège les souris

<sup>2</sup> Présence d'endotoxine (LPS) dans le sang.



**Figure 5. L'inhibition pharmacologique d'IRE1α : une nouvelle piste thérapeutique.**

Lors de l'obésité, la voie de signalisation IRE1α (*inositol-requiring enzyme 1 α*) participe à l'installation de la résistance à l'insuline et à l'accumulation intrahépatique des lipides contribuant à l'apparition de la stéatose. Son activation soutenue conduit à l'inflammation et à des processus de mort cellulaire (apoptose et pyroptose), des caractéristiques physiopathologiques de la NASH (stéatohépatite non alcoolique), un facteur à risque du CHC (hépatocarcinome). Le ciblage pharmacologique de l'activité endoribonucléase d'IRE1α apparaît être une piste thérapeutique pertinente dans le traitement de la NASH.

de la NASH en inhibant le stress oxydatif, la libération de cytokines inflammatoires et les facteurs induisant la fibrose [36]. Chez des rats présentant une NASH, l'activation pharmacologique de NRF2 réduit significativement la fibrose, faisant de NRF2 une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de patients NASH atteints de fibrose hépatique. NRF2 peut également réprimer la transcription de gènes codant des agents pro-oxydants, comme TXNIP qui relie inflammasome et stress oxydatif. Dans l'ensemble, le stress du RE intervient dans la régulation positive ou négative du stress oxydatif renforçant l'inflammation et la mort cellulaire. Le stress du RE coopère donc étroitement avec le stress oxydatif dans la pathophysiologie de la NASH.

### Stress du RE et cellules immunitaires

Le foie est également constitué de cellules de l'immunité innée qui, en constituant sa première ligne de défense, participent au maintien de son homéostasie. Il s'agit des macrophages résidents du foie (ou cellules de Kupffer), des cellules dendritiques et du couple de cellules NK/NKT (*natural killer* et *natural killer T*). Dans la NASH, le nombre de cellules de Kupffer n'est pas modifié mais leur phénotype est altéré. Activées, les cellules de Kupffer s'engagent dans un profil pro-inflammatoire (appelé M1) et il a été montré que la voie de l'UPR, notamment avec IRE1α, joue un rôle dans la polarisation M1 des macrophages [37-40] (→).

De même, une diminution du nombre de cellules NKT est observée au cours de l'obésité et de la NASH, et les cellules présentes montrent un profil pro-inflammatoire (de type Th1). Il a été proposé que lors de l'obésité, l'activation du stress du RE puisse conduire à une diminution de l'expression par les hépatocytes de la molécule CD1d, impliquée dans l'activation des cellules NKT, participant au défaut d'activation de ces cellules [41].

Une diminution du nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de lymphocytes T régulateurs (Treg) est également observée au cours de la NASH, résultant en une perte d'activité régulatrice de la réponse immuni-

taire. Inversement, une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> a été rapportée. La voie IRE1/XBP1 joue un rôle dans l'activation des lymphocytes Treg favorisant l'orientation vers un profil Th17 inflammatoire et elle est impliquée dans l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Des liens existent donc entre l'activation de l'UPR et les perturbations du système immunitaire [42], qui restent encore à explorer dans la NASH.

### Stress du RE et processus de mort cellulaire associés à la NASH

#### L'apoptose dépendant du stress du RE

Lorsque les voies de l'UPR ne parviennent pas à résoudre le stress induit par l'accumulation des protéines, les voies activées conduisent à l'apoptose de la cellule. Les voies de l'UPR convergent vers l'activation du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP, augmentant l'expression des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et conduisant à l'apoptose. CHOP est impliqué dans les mécanismes d'expression de protéines de la famille *BH3-only proteins*, telles que PUMA, NOXA (ou « *dommage* » en latin), BIM (*bcl-2-interacting mediator of cell death*) qui activent directement les membres de la famille Bcl-2 (et/ou répriment les molécules anti-apoptotiques de la même famille) conduisant à l'apoptose. Ces protéines activent, par exemple, directement BAX (*Bcl2-associated X protein*) et BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), contribuent à la formation de pores au niveau de la mitochondrie, induisant la libération du cytochrome c, l'activation des caspases exécutrices de l'apoptose (caspases-3, -6, et -7) et aboutissant à la mort par apoptose [43] (Figure 4). Ainsi, la voie de l'apoptose mitochondriale

(→) Voir la Nouvelle de A. L'Hermitte et al., m/s n° 11, novembre 2016, page 1023

amplifie les mécanismes pro-apoptotiques qui ont été engagés au niveau des voies de l'UPR. BAX et BAK interagissent également avec le domaine cytosolique d'IRE1 $\alpha$ , ce qui conduit à l'apoptose. Cette interaction semble nécessaire à l'activité d'IRE1 $\alpha$ , la liaison de BI-1 (*Bax Inhibitor 1*) sur IRE1 $\alpha$  au site de fixation de BAX et BAK, protégeant de l'apoptose induite par BAX/BAK. La formation du complexe IRE1 $\alpha$ /TRAF2 permettrait également l'activation de la caspase-12 impliquée dans l'initiation de l'apoptose en lien avec le stress du RE.

L'hypothèse que l'apoptose induite par la réponse au stress du RE dans les cellules hépatiques joue un rôle important dans l'apparition de la NASH est renforcée par la mise en évidence de l'augmentation de marqueurs du stress du RE, notamment CHOP, au sein de biopsies hépatiques de patients NASH [44]. Cette observation a été confirmée par une première étude de notre équipe réalisée chez des patients NASH, qui a révélé que l'expression de CHOP était corrélée au score d'activité des NAFLD et des lésions hépatiques [28]. Les résultats d'une seconde étude réalisée sur des biopsies hépatiques de patients et dans des modèles animaux de NASH, ont suggéré que l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  jouerait un rôle central dans l'apparition de la maladie [34].

En effet, les souris déficientes pour *BI-1* [45, 46] développent les caractéristiques physiopathologiques de la NASH sous régime gras, et l'inhibition pharmacologique de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  corrige la NASH (apoptose, nécroptose, inflammation) chez les souris déficientes pour *BI-1*, mettant en évidence un rôle central de l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Une étude réalisée sur des biopsies hépatiques de patients NASH a néanmoins révélé des incohérences quant aux voies de signalisation induites en aval de l'activation de PERK, notamment une activation d'eIF2 $\alpha$  mais non de l'axe ATF4-CHOP. De même, pour IRE1 $\alpha$ , la voie JNK serait activée dans la NASH, et XBP1 ne serait pas modifié. Confirmant un rôle pro-apoptotique des kinases de la famille JNK dans la pathogenèse de la NASH, les souris déficientes pour JNK1, et nourries avec un régime riche en graisses, sont protégées contre le développement de la résistance à l'insuline hépatique et de la stéatohépatite, notamment en raison de la diminution de l'apoptose des cellules [47].

### Lipotoxicité et mort cellulaire

L'accumulation de lipides dans les foies stéatosiques augmente la lipotoxicité et aggrave les symptômes de la NASH. Les analyses lipidomiques réalisées chez des patients atteints de NASH, ont révélé que le taux d'acides gras libres (AGL) sériques qui contribuent davantage aux lésions hépatiques (lipotoxicité) que les triglycérides, était plus important chez ces patients. Chez des souris soumises à un régime riche en graisses, l'inhibition de la synthèse des triglycérides par la DGAT2 (*diglyceride acyltransferase 2*) entraîne une accumulation d'acides gras libres associée à une élévation du cytochrome P4502E1 (CYP2E1), des marqueurs de la peroxydation lipidique/stress oxydatif et de la nécro-inflammation lobulaire et de la fibrose [48]. De nombreuses études ont rapporté que les acides gras libres saturés, comme l'acide palmitique ou l'acide stéarique, par opposition aux acides gras libres insaturés, comme l'acide oléique, sont toxiques pour les hépatocytes, activant l'apoptose dépendant du stress du RE, et qu'ils sont impliqués dans la pathogenèse de la NASH. Les rats nourris avec un régime riche en graisses saturées,

présentent ainsi une augmentation de l'expression de CHOP et de la caspase-3 active [49]. De même, dans des lignées cellulaires hépatocytaires, l'acide palmitique active spécifiquement les voies PERK et IRE1 $\alpha$ , augmentant ainsi l'expression de CHOP, qui à son tour induit l'expression de DR5 (*death receptor 5*) conduisant à l'activation de la caspase-8 et de BID tronquée (tBID). À noter également que l'inactivation de BAX et BAK dans le foie, conduit à l'absence d'apoptose en réponse à un stress du RE, avec une modification de la signalisation de l'UPR [50] (Figure 4). L'activation de la voie IRE1 $\alpha$  par l'acide palmitique via JNK et/ou CHOP favorise l'activation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (et/ou répriment les molécules anti-apoptotiques de la même famille) conduisant à l'apoptose.

### Cibler le stress du RE dans la NASH : une perspective thérapeutique ?

L'utilisation d'inhibiteurs des protéines senseurs pourraient permettre de diminuer l'activation des voies de mort cellulaire, d'inflammation et les perturbations métaboliques. Ces molécules représenteraient ainsi des perspectives thérapeutiques novatrices.

Plusieurs composés pharmacologiques sont disponibles pour inhiber l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$ . Parmi eux, on trouve des inhibiteurs de l'activité RNase, à base de salicyaldéhyde (4 $\mu$ 8c, STF-083010, MKC-3946). Le 4 $\mu$ 8c et le STF-083010 ont donné des résultats prometteurs dans un modèle de NASH [34]. Des composés inhibiteurs de l'activité kinase d'IRE1 $\alpha$  sont également disponibles (Sunitinib, APY29) mais n'ont pas été testés dans la NASH. Récemment, il a été démontré que la fonction RNase d'IRE1 $\alpha$  pouvait être inhibée via sa fonction kinase par une nouvelle classe pharmacologique d'inhibiteurs appelés KIRA (*kinase-inhibiting rnae attenuators*). L'impact de ces composés dans la NASH reste donc à explorer. ASK1 est inhibée par le selonsertib, actuellement en essai clinique de phase II chez les patients NASH.

Des inhibiteurs de PERK ont également été développés. Le GSK-265157, un dérivé du GSK-2606414 compétiteur du domaine de fixation de l'ATP, a donné des résultats encourageants dans des modèles murins de cancer hépatique. Cependant, sa sélectivité est questionnée en raison de sa capacité à inhiber RIPK1 et la nécroptose. Le séquençage à haut débit a permis de détecter de petits inhibiteurs moléculaires d'ATF6 $\alpha$  appelés céapines qui piègent la protéine dans le RE, empêchant ATF6 $\alpha$  de se localiser dans le Golgi, bloquant ainsi son activation protéolytique. Les céapines n'ont pas encore été testés dans des modèles murins de NAFLD.

La sélectivité des nouveaux inhibiteurs d'IRE1 $\alpha$  et PERK nécessite d'être mieux définie. Au vu des rôles cruciaux d'IRE1 $\alpha$  et d'XBP1 dans le métabolisme des lipides hépatiques, des processus de détoxification et de la survie cellulaire, des potentiels effets hépatotoxiques, il est important d'examiner les éventuels effets secondaires de ces molécules.

Une meilleure compréhension des subtilités de la signalisation UPR chez les patients atteints de NAFLD permettra à plus long terme de stratifier les patients pouvant bénéficier d'une intervention thérapeutique ciblée « à la carte » [53] (→).

(→) Voir la Synthèse de S. Taouji et E. Chevet, m/s n° 6-7, juin-juillet 2015, page 667

## Conclusion

L'implication du stress du RE dans la pathophysiologie des complications hépatiques joue un rôle capital, particulièrement dans la transition stéatose-NASH. Étudier le stress du RE permettrait de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques puisqu'il n'existe aucun traitement pharmacologique. Cibler l'activité RNase d'IRE1 $\alpha$  apparaît comme une perspective thérapeutique pertinente (Figure 5). ♦

## SUMMARY

### Endoplasmic reticulum stress response and pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis

The incidence of chronic liver disease is constantly increasing, owing to the obesity epidemic. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently affecting 20-30% of the general population and 75-100% of obese individuals. NAFLD ranges from simple steatosis to damaging non-alcoholic steatohepatitis (NASH), potentially developing into hepatocellular carcinoma. No efficient pharmacological treatment is yet available. During obesity, the hepatic ER stress response can arise from extracellular stress (lipids, glucose, cytokines) and from intracellular stress including lipid buildup in the hepatocyte (steatosis), a hallmark of NAFLD. The chronic activation of the hepatic ER stress response may be a crucial event in the steatosis-NASH transition, triggering cell death, inflammation and accelerating metabolic disorders. We discuss these aspects and we propose that targeting the ER stress response could be effective in treating NAFLD. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016; 64 : 73-84.
2. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: a multicenter prospective study. *Hepatology* 2016; 63 : 827-38.
3. Arrese M, Cabrera D, Kalergis AM, Feldstein AE. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Dig Dis Sci* 2016; 61 : 1294-303.
4. Lebeaupin C, Vallee D, Hazari Y, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018; 69 : 927-47.
5. Bouche-careilh M, Chevet E. Stress du réticulum endoplasmique : une réponse pour éviter le pIRE. *Med Sci (Paris)* 2009; 25 : 281-7.

6. Cullinan SB, Diehl JA. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2004; 279 : 20108-17.
7. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003; 11 : 619-33.
8. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, et al. ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* 2008; 33 : 75-89.
9. Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, et al. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6 $\alpha$ -knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 2010; 21 : 2975-86.
10. Wang JM, Qiu Y, Yang Z, et al. IRE1 $\alpha$  prevents hepatic steatosis by processing and promoting the degradation of select microRNAs. *Sci Signal* 2018; 11
11. Foufelle F, Ferre P. La réponse UPR : son rôle physiologique et physiopathologique. *Med Sci (Paris)* 2007; 23 : 291-6.
12. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306 : 457-61.
13. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; 58 : 693-700.
14. Lake AD, Novak P, Hardwick RN, et al. The adaptive endoplasmic reticulum stress response to lipotoxicity in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Sci* 2014; 137 : 26-35.
15. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka TA, et al. Direct monitoring of in vivo ER stress during the development of insulin resistance with ER stress-activated indicator transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366 : 545-50.
16. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2009; 119 : 1201-15.
17. Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res* 2015; 56 : 722-36.
18. Farese RV, Jr., Zechner R, Newgard CB, Walther TC. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* 2012; 15 : 570-3.
19. Flamment M, Foufelle F. Stéatose hépatique et stress du réticulum endoplasmique : une histoire de phospholipides. *Med Sci (Paris)* 2012; 28 : 13-5.
20. Volmer R, van der Ploeg K, Ron D. Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110 : 4628-33.
21. Patterson RE, Kalavalapalli S, Williams CM, et al. Lipotoxicity in steatohepatitis occurs despite an increase in tricarboxylic acid cycle activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310 : E484-94.
22. Patouraux S, Rousseau D, Bonnafous S, et al. CD44 is a key player in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 2017; 67 : 328-38.
23. Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte apoptosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2003; 125 : 437-43.
24. Deng J, Lu PD, Zhang Y, et al. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* 2004; 24 : 10161-8.
25. Luedde T, Schwabe RF. NF-kappaB in the liver: linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8 : 108-18.
26. Willy JA, Young SK, Stevens JL, et al. CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF-kappaB activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Biol Cell* 2015; 26 : 2190-204.
27. Yoneda M, Mawatari H, Fujita K, et al. High-sensitivity C-reactive protein is an independent clinical feature of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and also of the severity of fibrosis in NASH. *J Gastroenterol* 2007; 42 : 573-82.
28. Lebeaupin C, Proics E, de Bieville CH, et al. ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. *Cell Death Dis* 2015; 6 : e1879.
29. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, et al. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 : 15324-9.
30. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19 : 107-20.
31. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 2014; 59 : 898-910.







# HHS Public Access

Author manuscript

FEBS J. Author manuscript; available in PMC 2021 May 01.

Published in final edited form as:

FEBS J. 2020 May ; 287(9): 1722–1736. doi:10.1111/febs.15179.

## Bax Inhibitor-1: between stress and survival

Cynthia Lebeaupin<sup>1,2,3</sup>, Marina Blanc<sup>1</sup>, Déborah Vallée<sup>1</sup>, Harald Keller<sup>4</sup>, Béatrice Bailly-Maitre<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, INSERM U1065, C3M, 06200 Nice, France;

<sup>2</sup>Degenerative Diseases Program, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, 10901 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA

<sup>3</sup>Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093, USA;

<sup>4</sup>INRA1355-CNRS7254, Université Côte d'Azur, 06903 Sophia Antipolis, France.

### Abstract

Cellular gatekeepers are essential to maintain order within a cell and anticipate signals of stress to promote survival. BAX inhibitor-1 (BI-1), also named transmembrane BAX inhibitor motif containing-6 (TMBIM6), is a highly conserved endoplasmic reticulum (ER) transmembrane protein. Originally identified as an inhibitor of BAX-induced apoptosis, its pro-survival properties have been expanded to include functions targeted against ER stress, calcium imbalance, reactive oxygen species accumulation and metabolic dysregulation. Nevertheless, the structural biology and biochemical mechanism of action of BI-1 are still under debate. BI-1 has been implicated in several diseases, including chronic liver disease, diabetes, ischemia/reperfusion injury, neurodegeneration and cancer. While most studies have demonstrated a beneficial role for BI-1 in the ubiquitous maintenance of cellular homeostasis, its expression in cancer cells seems most often to contribute to tumorigenesis and metastasis. Here we summarize what is known about BI-1 and encourage future studies on BI-1's contribution to cellular life and death decisions to advocate its potential as a target for drug development and other therapeutic strategies.

### Graphical abstract

Disturbances in normal cell function activate evolutionarily conserved stress responses that aim to compensate for damage but can eventually trigger cell death. Bax Inhibitor-1 (BI-1) functions as a molecular rheostat, interacting with a broad range of partners to promote cell survival. Here we review the proposed models and mechanisms of BI-1 and its role in various diseases.

---

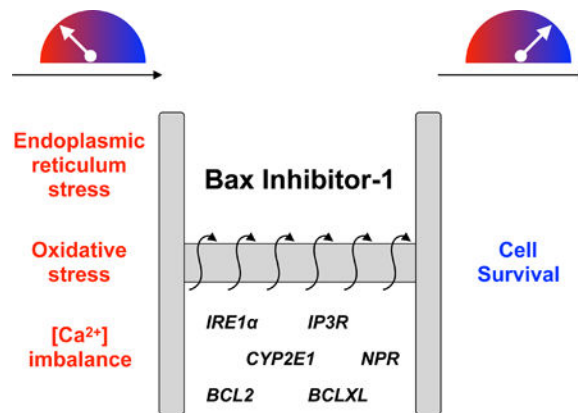
**§Contact information** Address all correspondence to Dr. Bailly-Maitre, Beatrice. Bâtiment Universitaire ARCHIMED, INSERM, U1065, Team 8 "Hepatic complications in obesity and alcohol", 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice Cedex 03, France. [beatrice.bailly-maitre@unice.fr](mailto:beatrice.bailly-maitre@unice.fr) or Tel. +33(0) 489064238 or Fax. +33(0)489064221.

Author Contributions

CL, MB, DV, AK and BBM wrote and edited the manuscript.

Conflicts of Interest

None to declare.



## Keywords

TMBIM6; ER stress; Cell death; Calcium; Disease

## Introduction

A large number of regulatory proteins are involved in the signaling pathways that determine cell fate. BAX Inhibitor-1 (BI-1) is the founding member of the transmembrane BAX Inhibitor-1-containing motif (TMBIM) family, which includes ancestral regulators of cell death due to their high degree of genetic and functional conservation[1, 2]. These hydrophobic TMBIM proteins share a UPF0005 consensus motif in the C-terminus that codifies for six or seven transmembrane-spanning regions and is conserved in several species[2]. The cytoprotective function of the TMBIM family was found to regulate evolutionarily conserved mechanisms of stress resistance in animals, plants and yeast[3, 4]. While all six TMBIM family members seem to protect against apoptosis, as discussed *in extenso* [2, 5, 6], this review will concentrate on the function of TMBIM6, the original BI-1, in the animal kingdom.

Initially, a functional screen for BAX suppressors in yeast identified BI-1 to have a protective functional effect over BAX-induced cell death[7]. While it seemed reasonable to name the protein after its observed function, the cytoprotective function of BI-1 was surprisingly not due to a direct physical interaction with BAX. Rather, BI-1 co-immunoprecipitated with the anti-apoptotic BCL2 family proteins BCL2 and BCL<sub>XL</sub>, but not the pro-apoptotic proteins BAX or BAK due the requirement of a BH4 domain for BI-1 interaction[7]. In mammalian cell lines, *BI-1* overexpression protected against, while its antisense promoted, apoptosis[7].

A recent neuroscience review has provided a brief overview of BI-1-like proteins and focused on the functions of BI-1 to threshold ER stress-induced oxidative damage and inflammation[8]. The present review rather compiles the most recent findings supporting all cytoprotective functions of BI-1 (ER stress and IRE1α signaling, calcium flux, as well as ROS regulation), highlights the implication of BI-1 signaling in disease (i.e. liver,

neurological, immune disorders) and provides a synthesis of the evidence linking BI-1 to cancer.

### I. Structure and distribution of BI-1

BI-1 is a highly hydrophobic protein containing 237 amino acids (~26kDa) located almost exclusively on the ER, as illustrated by immunofluorescence microscopy and fractionation studies[7, 9]. For the most part, BI-1 is characterized to have six fully transmembrane domains, with a cytosolic orientation of both N and C termini, and a C-terminal re-entrant loop[7, 10, 11] (Figure 1). A number of interacting partners bind to increase the anti-apoptotic activity of BI-1, including BCL2 and BCLxL at the N-terminal, and IRE1 $\alpha$ , inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R), NADPH-P450 reductase (NPR) and cytochrome P450 species 2E1 (CYP2E1) at the C-terminal[12]. Indeed, deletion of a C-terminal domain of BI-1 abrogates its cytoprotective activity to suppress BAX-induced cell death in yeast[3]. The first BLAST searches revealed that the human and rat genes of BI-1 were essentially identical to the testis enhanced gene transcript due to its presence in the testis[13, 14]. BI-1 is also abundantly expressed in the liver and kidney, and is detected in the heart, skeletal muscle, spleen, brain, placenta, lung and pancreas[7, 9]. Although BI-1-deficient mice are viable and develop normally, they exhibit increased vulnerability to tissue damage when challenged[15].

### II. The various cytoprotective roles of BI-1

BI-1 interacts with a broad range of partners to protect against many facets of cell death (Figure 2). Nonetheless, apoptosis is initially a defense mechanism. Both physiological and pathological stimuli can trigger apoptosis through caspase activation classified into two main pathways: 1) intrinsic apoptosis engaged by intracellular stress conditions (DNA damage or accumulation of unfolded proteins, cytosolic Ca<sup>2+</sup> or reactive oxygen species); and 2) extrinsic apoptosis that transduces signals from extracellular ligands through death receptors. The activation of either pathway results in mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) and the release of apoptogenic factors, such as cytochrome c, that activate the caspase cascade of apoptosis. Interestingly, fibroblasts, hepatocytes and neurons isolated from *BI-1*-deficient mice are selectively hypersensitive to apoptosis induced by pharmacological ER stress activators such as thapsigargin and tunicamycin, compared to other intrinsic or extrinsic apoptotic stimuli[15].

#### A. Implication of BI-1 in ER stress-induced cell death and the IRE1 $\alpha$ pathway

—The ER functions as a platform, central to several stress signaling pathways. In overwhelming conditions that cause unfolded or misfolded proteins to accumulate in the ER lumen, the ER activates the unfolded protein response (UPR) signaling cascade *via* the transmembrane sensors inositol-requiring enzyme 1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor (ATF6). The UPR first aims to alleviate cellular stress and re-establish proteostasis, but may activate cell death in response to irreversible cell damage.

ER stress-induced apoptosis was shown to require the pro-apoptotic members BAX and BAK of the BCL2 family to initiate mitochondrial dysfunction and cell death[16].

Afterwards, a study reported for the first time that BAX and BAK can colocalize to the



IRE1 $\alpha$  sensor on the ER membrane, uncovering a direct link between an essential gateway for cell death and the most conserved pathway of the UPR. BAX and BAK physically form a protein complex with the cytosolic C-terminal domain of IRE1 $\alpha$  that appears essential for IRE1 $\alpha$  activation and amplified apoptosis[17]. Interestingly, BI-1 binds to this same cytosolic region, directly inhibiting IRE1 $\alpha$  signaling and downstream *XBPI* mRNA splicing[18, 19]. The presence of BI-1 drastically reduces the binding of BAX to IRE1 $\alpha$ , suggesting that BI-1 and BAX/BAK compete for their binding site on IRE1 $\alpha$ [18], with the winner dictating IRE1 $\alpha$  activity and ultimately deciding cell fate. However, *BI-1* knockdown in *BAX/BAK* double-knockout cells did not restore the normal levels of *XBPI* mRNA splicing, suggesting that BI-1 operates upstream of BAX and BAK in the control of the IRE1 $\alpha$ -XBPI pathway[18]. An added foe of BI-1 in IRE1 $\alpha$  regulation is the bifunctional apoptosis regulator (BAR), an ER-associated RING-type E3 ligase that ubiquitinates BI-1 to tag it for subsequent proteosomal-mediated degradation[20]. The dynamic post-translational regulation of BI-1 by BAR at the ER membrane thus impedes the inhibitory influence of BI-1 on IRE1 $\alpha$  signaling. Hence, prolonged activation of IRE1 $\alpha$  during ER stress may promote cell death through the kinase-dependent pathway TRAF2-JNK or the RNase-dependent pathways involving XBPI splicing and RIDD of mRNAs encoding essential cell-survival proteins or miRs[21]. In parallel, CHOP may also direct the subsequent activation of the pro-apoptotic BCL2 family member pathway by the transcriptional induction of BIM[22], inducing cell death[21].

**B. Proposed mechanisms of BI-1-regulated calcium flux**—The ER is the primary cellular store for Ca<sup>2+</sup>. The ER mainly orchestrates Ca<sup>2+</sup> efflux through IP3R channels that passively release Ca<sup>2+</sup> from the ER and Ca<sup>2+</sup> influx through sarcoplasmic/ER calcium ATPase (SERCA) channels that actively pump Ca<sup>2+</sup> into the ER. Due to its location on the ER membrane, BI-1 is involved in [Ca<sup>2+</sup>] regulation in the ER lumen. *BI-1*-overexpressing cells have lower resting ER Ca<sup>2+</sup> levels and higher ER Ca<sup>2+</sup> leakage[23]. An advantage of lower [Ca<sup>2+</sup>] in the ER due to *BI-1* overexpression is the controlled discharge of Ca<sup>2+</sup> from the ER to the cytosol, leading to reduced Ca<sup>2+</sup> uptake by mitochondria[23], thus protecting the cell from Ca<sup>2+</sup> overload that triggers apoptosis. To better study its function, potential membrane topologies of BI-1 have been illustrated but remain controversial. While algorithms seem consistent in predicting the first six transmembrane domains of BI-1 with a cytoplasmic N-terminal, they differ in the structural characterization of the last ~20 residues of the protein that argue for or against the presence of a seventh transmembrane domain. As the HA-tagged C-terminal of BI-1 mapped to the cytosol, this region was suggested to bear a membranous re-entrant loop or a short cytosolic helix tail[10]. While still under debate, several mechanisms have been proposed to explain how BI-1 might mediate Ca<sup>2+</sup> efflux from the ER as a/an: 1) Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter; 2) Ca<sup>2+</sup> leak channel; or 3) IP3R sensitizer (Figure 3). It remains important to note that although these mechanisms have been studied independently, they may not be mutually exclusive.

**i. The first hypothesis -:** states that BI-1 functions as a Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, allowing Ca<sup>2+</sup> release into the cytosol[24, 25] (Figure 3A). To regulate ER Ca<sup>2+</sup> levels, the lysine-rich C-terminal cytosolic domain (EKDKKKEKK) of BI-1 was suggested to mediate Ca<sup>2+</sup> channel gating in a pH-dependent manner, as *BI-1*-overexpressing cells showed increased release of

Ca<sup>2+</sup> in response to acidic conditions[26]. Although most evidence supports a cytoprotective function for BI-1 in fine-tuning the Ca<sup>2+</sup> leak from the ER, a cell death-promoting phenotype for BI-1 was observed under low pH conditions (5.0 – 6.4), since acidification in *BI-1*-overexpressing cultures dangerously increased Ca<sup>2+</sup> release from the ER and dose-dependently reduced cell viability[26].

While resting cells have largely monomeric forms of BI-1, cytosolic acidification in stressed cells induces the oligomerization and antiporter activity of BI-1, whose initial function is to exchange ER-stored Ca<sup>2+</sup> with H<sup>+</sup>, reduce cytosolic acidification and promote cell survival[24]. The Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activities of BI-1 may be stimulated by interaction with BH4 domains (present in BCL2 and BCLxL) through enhanced protein oligomerization[25]. Nevertheless, no direct evidence has been shown for the association of BI-1 with proton ions and Bultynck *et al.* commented that such a Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter function appears unlikely[27]. They claim the C-terminal of BI-1 does not have the biochemical properties to sense acidic pH changes (< 6.8), as its lysine-rich regions might only be adapted to sense more basic pH changes. They further question whether persistent H<sup>+</sup> gradients even occur in physiological conditions, given the high permeability of ER membranes for protons that renders the exchange of Ca<sup>2+</sup> with H<sup>+</sup> futile[27]. In that respect, a pH-sensitive Ca<sup>2+</sup> leak channel function seems more probable.

**ii. The second hypothesis -:** states that the presumed C-terminal ER-membrane dipping domain of BI-1 located after its six transmembrane domains forms a Ca<sup>2+</sup>-channel pore responsible for a Ca<sup>2+</sup> leak from the ER to the cytosol[11] (Figure 3B). To clarify the effect of pH on BI-1 function, Kiviluoto *et al.* optimized pH assays specifically in intact ER of permeabilized cells, as opposed to using artificial microsomal preparations or proteoliposomes. While it was corroborated that the Ca<sup>2+</sup> leak property of BI-1 was pH-dependent, the Ca<sup>2+</sup> flux peaks at a physiological pH and decreases under increasingly acidic conditions[28]. Specifically, BI-1 is less efficient to provoke Ca<sup>2+</sup>-release at pH values < 6.8, with BI-1-mediated Ca<sup>2+</sup> leakage completely blocked at pH 6.0[28]. The examination of the crystal structure of the bacterial homolog of BI-1 from *Bacillus subtilis* (BsYetJ) led to its characterization as a *bona fide* functional bacterial BI-1 homolog of human BI-1 (but with seven transmembrane domains and a luminal N-terminal) with Ca<sup>2+</sup> leak activity dependent on pH-driven conformational changes[29]. This group recently established, with functional and computational data, that the modulation of BsYetJ activity was ion-dependent, with the protonation of its aspartate residues (Asp171–195 dyad) controlling pore opening and pH-dependent Ca<sup>2+</sup> binding[5, 30]. Thus, BI-1-regulated Ca<sup>2+</sup> flux is rather pH dependent in bell-shaped fashion: at pH 6, critical aspartate residues forming the Ca<sup>2+</sup> pore in BI-1 become protonated, resulting in an open structure but loss of negative charges critical for Ca<sup>2+</sup> binding; pH 7 allows for formation of a negatively charged pore for Ca<sup>2+</sup> passage; and at pH 8, BI-1 is closed due to deprotonation of aspartate residues and formation of hydrogen bonds that lock the structure[5, 30]. A simplified illustration of BI-1's pH-dependent pore function features a neutral pore impermeable to Ca<sup>2+</sup> at pH 6, an open electronegative pore permeable to Ca<sup>2+</sup> at pH 7, and a closed pore at pH 8[27] (Figure 3C).

**iii. The third hypothesis -:** states that BI-1 can sensitize IP3R independently of its Ca<sup>2+</sup> channel activity, contributing to reduce steady-state Ca<sup>2+</sup> concentration in the ER[31, 32] (Figure 3D). Purified and ectopically-expressed BI-1 from transfected HeLa cells co-immunoprecipitated with IP3R, further identified to bind at the C-terminal of BI-1[31]. This suggests that BI-1 and IP3R can directly influence each other's channel activity by forming protein complexes. By increasing controlled ER Ca<sup>2+</sup> leakage into the cytosol, BI-1 sensitization of IP3R reduces otherwise-destined Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER into the mitochondria at MAMs[32]. By regulating steady-state levels of ER Ca<sup>2+</sup> via IP3R, BI-1 influences mitochondrial bioenergetics and stimulates autophagy to promote cellular recovery when faced with metabolic stress[32]. Similar to *BI-1*-overexpressing cells, *BAX/BAK* double-knockout cells have reduced steady-state ER Ca<sup>2+</sup> levels due to increased ER Ca<sup>2+</sup> leakage driven by IP3R[33]. On the contrary, BCL2 appears to prevent IP3R-mediated Ca<sup>2+</sup> leakage through the inhibitory binding of its BH4 domain to the regulatory and coupling domain of IP3R[34, 35]. Knowing that BI-1 interacts directly with BCL2 as well as IP3R adds yet another degree of complexity to understanding cellular [Ca<sup>2+</sup>] regulation and anti-apoptotic function (as extensively reviewed in [36, 37]). While small leakage of Ca<sup>2+</sup> is necessary to avoid overload in the ER, too much ER Ca<sup>2+</sup> depletion disturbs protein production and the Ca<sup>2+</sup>-dependent activities of many intraluminal chaperones, suggesting that many actors are certainly at play to fine-tune [Ca<sup>2+</sup>] in fundamental organelles and the cell itself. In certain circumstances, BI-1 may even play both the role of calcium Ca<sup>2+</sup> leak channel itself as well as IP3R sensitizer. Whether BI-1 is able to use both properties at once or chooses to alternate between either mechanism has yet to be determined.

**C. Potential for BI-1 to limit ROS-induced cell death**—If produced in excess, reactive oxygen species (ROS), a natural by-product of metabolic pathways, leads to oxidative stress that can damage cellular architecture and initiate apoptosis. Due to its protein folding function, the ER is closely associated with ROS production. The microsomal monooxygenase (MMO) system of the ER, also called microsomal electron transfer chain, leads to the release of ROS such as O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[38]. BI-1 may protect against ROS accumulation by interacting with the MMO members NPR and CYP2E1 in conditions of ER stress[39–41]. *BI-1* overexpression limited the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a dose-dependent and exponential decaying manner, seemingly due to the direct interaction of BI-1's C-terminal with NPR and CYP2E1 to block electron transfer and ROS production[39]. Likewise, *BI-1* overexpression in ER stress-exposed cells led to reduced CYP2E1 and membrane lipid peroxidation. Enhanced lysosomal activity in *BI-1*-overexpressing cells appears linked to CYP2E1 degradation[41] and BI-1 was reported to maintain high lysosomal activity under ER stress, leading to lysosomal acidification and increased autophagy[42]. Forced expression of *BI-1* in HEK293 cells and MEFs suppressed mitochondria-mediated ROS production and associated apoptosis due to activated ERK signaling[43]. Another possible way for BI-1 to limit ROS production is by stimulating the antioxidant response. Cells overexpressing *BI-1* showed increased levels of the redox-sensitive transcription factor NRF2 and its antioxidant enzyme target heme oxygenase-1 (HO-1), expressed to counteract ROS accumulation[44]. Conversely, siRNA-mediated knockdown of *BI-1* led to reduced HO-1 levels and increased sensitivity to cell death[44]. However, *BI-1*-deficient MEFs were

later shown to exhibit no differences in HO-1 transcription levels[18]. Therefore, more work must be done to clarify this connection.

### III. Implication of BI-1 in disease

Increasing reports investigate the physiopathological role of BI-1 in various contexts, from metabolic diseases affecting the liver[19, 45, 46] or kidneys[47] to lung disease[48], infection [49], neurological disorders[50, 51] and cancer. Most of the literature associates the anti-apoptotic function of BI-1 with cancer development (Table 1). Nevertheless, the expression of BI-1 has yet to be shown to correlate with cancer prognosis. Although seemingly ubiquitous, the endogenous expression of BI-1 may differ among tissues or cell types and at different stages of development, leading to various cell-type and time-specific roles. While non-exhaustive, protein profiling by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry from liver, brain, heart, lung and kidney tissue samples identified altered differential protein expressions of GRP75, peroxiredoxin 6, fumarylacetoacetate hydrolase, selenium-binding protein 2, phosphatidylethanolamine-binding protein 1 and ferritin light chain 1 in tissues from *BI-1*<sup>-/-</sup> compared to *BI-1*<sup>+/+</sup> mice, leaving clues about BI-1 function in those organs[52]. Despite this interest, few researchers have addressed the implication of BI-1 in disease.

**A. Hepatic disorders**—The fact that BI-1 is prominently expressed in the liver has incited scientists to investigate the contribution of BI-1 in hepatic disorders. Studies characterize BI-1 as a hepatoprotective factor in metabolic disorders associated with obesity, ischemia-reperfusion injury and liver regeneration.

**i. Insulin resistance and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease:** BI-1 was identified as a critical regulator of ER stress responses in the development of obesity-associated insulin resistance[19]. *BI-1* mRNA expression was downregulated by at least 30% in livers from *ob/ob*, *db/db* and 12-week high-fat diet (HFD)-fed mice compared to lean controls. Adenoviral transfer to restore hepatic BI-1 expression in these mice severely blunted the IRE1 $\alpha$ -dependent splicing of XBP1 mRNA and improved insulin sensitivity and glucose tolerance due to dramatically reduced expression of G6Pase and PEPCK responsible for gluconeogenesis[19]. Hepatic BI-1 was further demonstrated to protect against insulin resistance by limiting ER stress and CYP2E1-dependent ROS accumulation in livers of mice fed a HFD for 8 weeks[40]. In *BI-1*-deficient hepatocytes, the knockdown of *CYP2E1* significantly reduced fatty acid-induced ROS production and improved insulin signaling as represented by increased phosphorylated AKT, FOXO-1 and GSK3 levels[40].

Hepatic insulin resistance is strongly associated with hepatic lipid accumulation in a pathology called Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, in which patients also exhibit increased expression of ER stress markers[53]. During chronic HFD feeding, BI-1 was proposed to mediate fatty acid synthesis and ApoB lipoprotein secretion associated with the ER oxidative folding environment in the liver[54]. Livers of *BI-1*-deficient mice fed a HFD revealed excessive post-translational oxidation of protein disulfide isomerase and ER stress associated with lipid accumulation[54]. Our results on liver disease progression highlight the important role of BI-1 in limiting IRE1 $\alpha$  activity from driving the transition from steatosis

(fatty liver) to Non-Alcoholic Steatohepatitis characterized by inflammation, hepatocyte apoptosis and often fibrosis. In livers of patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, we found *BI-1* mRNA downregulation to be accompanied by greater IRE1 $\alpha$  RNase signaling[46]. Our current data also reveal that BI-1 confers protection against NLRP3 inflammasome activation and caspase-1 or caspase-11-dependent pyroptosis[46].

**ii. Liver injury inflicted by ischemia-reperfusion or CCl<sub>4</sub> injection:** Hypoxia and ischemia-reperfusion insults activate ER stress-associated cell death. Livers from *BI-1*-deficient mice subjected to ischemia-reperfusion presented greater hepatocellular injury and higher expression of CHOP, spliced XBP1, cleaved ATF6 and phosphorylated JNK compared to control mice[55]. Interestingly after ischemia-reperfusion, livers of wild-type mice contained a significant 2-fold upregulation in *BI-1* mRNA levels, possibly in an effort to limit tissue injury[55]. Similarly, BI-1 protects against microvascular injury and mitochondrial dysfunction due to cardiac ischemia-reperfusion injury[56] and inflammation, ER and oxidative stress in the context of neonatal hypoxic-ischemic injury[57]. The cytoprotective role of BI-1 was also shown to have a detoxifying effect in mice with CCl<sub>4</sub>-induced liver injury and ROS accumulation[58]. The transplantation of mesenchymal stem cells as a therapeutic intervention promoted an antioxidant response and rescued *BI-1* mRNA levels during the recovery from CCl<sub>4</sub>-induced liver injury[58].

**iii. Liver regeneration:** In response to massive hepatocellular injury, the liver demonstrates significant regenerative capacity to restore liver mass, thus providing a context for studying *in vivo* mechanisms of cell growth regulation. Regenerating hepatocytes from *BI-1*-deficient mice subjected to a two-third liver resection entered the cell cycle faster than control mice[45]. This was demonstrated by increased incorporation of BrdUrd, accelerated expression of cyclin family proteins (cyclin D1, cyclin D3, Cdc2, Cdk2 and Cdk4) with hyperphosphorylation of retinoblastoma protein and faster degradation of p27 in regenerating *BI-1*-deficient hepatocytes[45]. Faster regeneration in livers from *BI-1*-deficient mice also correlated with increased dephosphorylation and nuclear translocation of NFAT1, a Ca<sup>2+</sup>-dependent event linked to calcineurin activation that promotes cytokine gene expression and facilitates hepatocyte entry into the cell cycle[45]. This suggests that the effects of *BI-1* deficiency on ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis may account for the accelerated proliferation of hepatocytes.

**B. Immune system regulation and infection—**Lymphocytic BI-1 was suggested to play a key role in the adaptive immune response by regulating intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Splens of *BI-1*-deficient mice presented significant alterations in B-cell maturation due increased ER and cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels that activated NF $\kappa$ B signaling[59]. Purified B cells from *BI-1*-deficient mice were further associated with attenuated function and increased spontaneous cell death[59]. Recently, BI-1 was suggested to protect against influenza virus by inhibiting ROS-mediated cell death[49].

**C. Neurological disorders—**BI-1 has been reported to possess a neuroprotective role, even at the earliest of developmental stages to promote neurogenesis. Mouse embryonic stem cells with ectopic *BI-1* expression were protected from apoptosis, through suppression

of p38 activation, and primed for neuronal differentiation, mediated by the MEK/ERK pathway, towards a neuroectodermal lineage[60]. In mature neurons *in vitro*, BI-1 limited neuronal cell death induced by oxygen-glucose-deprivation or pharmacological ER stress-induced toxicity with thapsigargin[61]. In forms of acute brain injury inflicted by middle cerebral artery occlusion, *BI-1* deficiency in mice increased sensitivity to stroke[15], while enforced neuronal *BI-1* expression reduced CHOP expression and protected against stroke injury[50]. In response to traumatic brain injury delivered by cortical impact, neuronal *BI-1* overexpression protected against impaired motor function, lesion volume and percentage of CHOP-positive and TUNEL-positive cells[50].

BI-1 was also found to promote resilience in animal models of depression. Mice with enforced neuronal expression of *BI-1* exhibited spontaneous recovery from learned helplessness and were protected from developing a depressive-like phenotype induced by serotonin or catecholamine depletion[51]. A possible explanation for improved behavior was altered  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in primary cortical neuron cultures from *BI-1* transgenic mice. Interestingly, neurons with enhanced *BI-1* expression had lower basal cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels and a limited increase in intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  from thapsigargin-induced SERCA inhibition than neurons from wild-type mice[51]. The contribution of *BI-1* in  $\text{Ca}^{2+}$ -related psychiatric conditions was further investigated in *BI-1*<sup>-/-</sup> mice shown to be more vulnerable to chronic mild stress-induced depressive-like behavior than wild-type mice[62]. After 6 weeks of exposure to a variety of unpredictable environmental, social and physical stressors, the brains of *BI-1*-deficient mice exhibited ROS accumulation and slight ER stress with a slight but significant decrease in the levels of the monoamines serotonin, norepinephrine and dopamine compared to wild-type mice[62]. This was proposed to be mediated by *BI-1*-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and associated monoamine oxidase-A activity responsible for regulating serotonin, norepinephrine and dopamine levels[62].

Results have seldom been shown for BI-1 in the context of neurodegenerative diseases. Alzheimer's disease is characterized by hundreds of mutations in presenilin, the catalytic subunit of  $\gamma$ -secretase responsible for the generation of  $\beta$ -amyloid peptides from the amyloid precursor protein[63], and BI-1 was recently reported to be a binding protein of free presenilin 1, independent of intact  $\gamma$ -secretase[63]. While this finding is a first step towards opening investigations on BI-1 implication in neurodegenerative disease, it's a wonder the cytoprotective role for BI-1 has not been explored with greater therapeutic interest in such ER stress-associated diseases characterized by the accumulation of misfolded proteins, protein aggregates and neuronal cell death.

**D. Cancer development and progression**—Cancer results from an imbalance between apoptosis and cell proliferation, fueled by the formation of a microenvironment with hypoxic, nutrient-deprived and acidic conditions. As BI-1 is characterized as an anti-apoptotic protein, it is not surprising that BI-1 is found to be upregulated in numerous different tumor samples (as reviewed in [2, 6, 64, 65]). Besides the frequent upregulation of BI-1 expression, BI-1 downregulation was observed human patients with stomach, colon, kidney, lung and rectal cancers[66]. With the expression of BI-1 in cancer cells depending on tumor type, the relevance of BI-1 expression in clinical outcomes remains to be stated clearly for therapeutic intervention.



**i. Liver cancer:** As mentioned above, the noteworthy ability of the liver to regenerate rapidly may predispose this organ to carcinogenesis. As regenerating hepatocytes in *BI-1*-deficient mice duplicate and proliferate faster[45], one would assume *BI-1* to protect against hepatocellular carcinoma development. The examination of liver biopsies from patients with hepatocellular carcinoma confirmed significantly downregulated *BI-1* mRNA expression in tumoral and surrounding cirrhotic tissues[67].

**ii. Breast cancer:** *BI-1* expression was observed in several human breast cancer cell lines, with highest levels of expression in estrogen-independent MDA-MB-453 compared to HCC70, T-47D, MCF-7, ZR-75-1 and MDA-MB-231 breast carcinoma cells (listed from highest to lowest expression)[66]. A cancer profiling array from different human tumors and corresponding normal tissues from individual female patients revealed upregulated *BI-1* expression in breast cancer, but also in ovarian and cervical cancer[66]. While the expression of *BI-1* in breast cancer was initially observed to be hormone independent, an estrogen-induced Krüppel-like zinc finger transcription factor (*Klf10*) directly suppressed *BI-1* transcription, leading to increased cytosolic  $[Ca^{2+}]$  concentration and apoptosis in breast cancer cells[68]. Treatment with estradiol-17 $\beta$  revealed a dose-dependent decrease in *BI-1* protein levels in estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells, and the knockdown of *Klf10* reversed the effects of estradiol-17 $\beta$ -induced *BI-1* downregulation[68]. *Klf10* overexpression in MCF-7 cells led to lower *BI-1* and higher apoptotic marker protein expression[68], contradicting the previous report of unaffected apoptosis in MCF-7 cells after *BI-1* knockdown[66].

**iii. Prostate and testicular cancer:** Upregulated gene expression of *BI-1* was singled out of a cDNA array analysis comparing a set of capsule-invasive prostate tumor and matched normal prostate tissue and confirmed by quantitative RT-PCR in epithelial tissue samples from prostate cancer patients[69]. Downregulation of *BI-1* in human PC-3, LNCaP, and DU-145 prostate carcinoma cells lowered cell viability attributable to increased apoptosis and possibly necrosis, visible by higher active caspase-3-positive staining and *in situ* end labeling that recognizes DNA strand breaks[69]. Additionally, a study explored the protective function of *BI-1* in the testis against cisplatin, a gold-standard chemotherapy drug for testicular cancer, which can cause reproductive toxicity[70]. Cisplatin-treated *BI-1*-deficient mice presented greater testicular damage and reduced testosterone-synthesis-associated proteins compared to control mice[70]. *BI-1* protection was attributed to the regulation of ROS metabolism by the antioxidant AKT-Nrf2-HO-1 axis and improved ER folding capacitance[70]. While lentivirus-mediated testicular expression of *BI-1* ultimately rescued *BI-1*-deficient mice from testicular injury and reduced testosterone production, experimentation using models of testicular cancer will be needed to further characterize these toxicity mechanisms associated with anticancer therapy.

**iv. Nasopharyngeal carcinoma:** *BI-1* expression was explored in CNE-2Z and CNE-1 human nasopharyngeal carcinoma cell lines[71]. The downregulation of *BI-1* in these cells led to apoptosis triggered by a decrease in the anti-apoptotic/pro-apoptotic ratios of BCL-XL/BAX and BCL2/BAX and subsequent increase in active caspase-3[71]. Subsequently, *BI-1* downregulation as a target for human gene therapy was tested by lentivirus-mediated

RNA interference[72]. Administration of lenti-shBI-1 in a nasopharyngeal carcinoma xenograft model established by inoculating nude mice with was CNE-1 cells led to significantly inhibited tumor growth[72], demonstrating the therapeutic value of BI-1 inhibition in nasopharyngeal carcinoma treatment.

**v. Lung cancer:** The characterization of BI-1 expression in lung cancer remains ambiguous. One study found that BI-1 was positively expressed in all pulmonary adenocarcinomas with a bronchioloalveolar carcinoma (17 of 32 tumors examined), while absolutely no expression was detected in the other histological subtypes classified as papillary, acinar and/or solid tumors[73]. Clinically, bronchioloalveolar carcinoma (now referred to as “lepidic predominant adenocarcinoma”, a subtype of non-small cell lung cancers) is characterized by well-differentiated but noninvasive tumors and a favorable prognosis. Hence, although positive BI-1 expression was present in this type of lung cancer, it is not associated with adenocarcinomas having more aggressive behaviors. More recently, BI-1 expression was detected in primary lesions and metastasis lymph nodes of clinical non-small cell lung cancer samples, although no information on the histological cancer subtype of the samples was provided[74]. Using human lung adenocarcinoma cell lines, BI-1 was less expressed in the highly metastatic Anip973 than in its parental line AGZY83-a associated with low metastatic capacity[74]. Thus, the differential expression of BI-1 in cells with varying metastatic potential and classified into separate subtypes of lung adenocarcinoma requires further investigation.

**vi. Metastasis:** During metastasis, cancer cells may break away from one of the primary cancers aforementioned, travel through the blood or lymph system and form new tumors in other parts of the body. BI-1 may mediate actin polymerization through its dynamic  $\text{Ca}^{2+}$  regulation and actin binding site, promoting cell adhesion[75]. In a vicious cycle, actin polymerization can enhance ER  $\text{Ca}^{2+}$  release[76], while high  $[\text{Ca}^{2+}]$  can drive actin polymerization in a mechanism recently named calcium-mediated actin reset (CaAR)[77]. Varying  $\text{Ca}^{2+}$  levels under cellular stress is hence relevant in conditions ranging from wound healing to cancer progression as it may be responsible for the reorganization of the actin cytoskeleton, cell shape and movement. BI-1 was further found to promote metastasis by altering glucose metabolism through increased glycolysis and activating the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE)[78]. Glycolytic metabolism imposes an increased acid load on tumor cells. The pH of *BI-1* overexpressing cells was lower as cells excreted more  $\text{H}^+$  and increased NHE activity to compensate, leading to enhanced cell invasiveness and mobility as well as acid-sensitive matrix metalloproteinase-2/9 activity[78]. The viability of *BI-1* overexpressing cells was found to be promoted by the intracellular pH regulation through NHE[78]. Furthermore, the interconnection between BI-1, NHE and cancer metastasis was joined by the monoamine carboxylate transporter (MCT) system in the regulation of acidic extracellular pH[79]. Ultimately, blocking NHE or MCT activity inhibited BI-1-induced cellular acidity and cancer metastasis, leading to cell death[79]. Targeting ion exchangers or transporters may provide a therapeutic strategy aimed at limiting BI-1 activity and cancer metastasis.



Understanding the regulatory mechanisms of the BI-1 family in the tumor microenvironment will most surely help to develop and optimize cancer therapy. BI-1 was previously shown to be a pharmacological target of the chemotherapeutic drugs doxorubicin and daunorubicin that lowered cell viability in ER-stressed cells by inhibiting the  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter-like activity of BI-1 recreated in proteoliosomes *in vitro*[80]. An immunotherapeutic approach was also suggested for acute myeloid leukemia, since the HLA-A24-binding peptide derived from BI-1 was identified as a novel immunogenic tumor-associated antigen capable of generating leukemia-specific cytotoxic T lymphocytes[81]. BI-1 may thus be a potential tool for cancer vaccine development. Although the functions of BI-1 in cancer cells should be further investigated, these studies collectively suggest that BI-1 activities are associated with cancer progression and propagation. Importantly, regardless of the type tumor analyzed, it remains unknown how a BI-1 signature would impact a patient's outcome. In addition, no correlations have been reported between the level of BI-1 expression and the clinical response of cancer patients to chemotherapeutic drugs. Future work must be done to define BI-1 as a potentially relevant cancer therapeutic target, and to design specific BI-1-targeted novel strategies.

## Conclusion

BI-1 is the best-characterized member of the TMBIM family and a highly conserved protein. Multiple hypotheses have emerged on the true function of BI-1 as a transmembrane protein but most agree that it acts as a guardian of ER homeostasis, notably bridging UPR functions and  $[\text{Ca}^{2+}]$  regulation. As an anti-apoptotic protein, BI-1 controls ER  $\text{Ca}^{2+}$  as well as ROS production, both potent inducers of cell death if released in excess. That being said, the fact that the structural biochemistry of BI-1 remains to be confirmed may challenge the conclusions made on its alternative functions. The highly hydrophobic nature of BI-1 also makes it difficult to use appropriate antibodies. Mechanistic studies must still be conducted to answer fundamental questions that will pave the way for therapeutic manipulation.

This review has contributed to combine recent progress made to understand the role of BI-1 in cell death and disease. Nevertheless, many questions remain: *“What are the other molecular triggers on the fine line between ER stress-induced adaptation to apoptosis and how do they cooperate with BI-1? Besides IRE1 $\alpha$ , can BI-1 directly affect the two other transmembrane sensors of the UPR and their downstream signaling? How can BI-1 lower  $[\text{Ca}^{2+}]$  in the ER as well in the cytosol if it functions as an ER  $\text{Ca}^{2+}$  leak channel? When does an anti-apoptotic protein like BI-1 protect cancer cells at the expense of normal cells, and is BI-1 able to recognize one from the other? How does BI-1 expression correlate with the various phases of cancer?”* The relatively ubiquitous expression of BI-1 has made it an interesting player in multiple diseases. Future studies and a consolidation of BI-1 function in cellular life and death situations will undeniably lead to novel therapeutic strategies.

## Acknowledgements

We thank Dr. Randal J. Kaufman for helpful discussions. This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice and the French Government (National Research Agency, ANR-18-CE14-0022-01, IRE1inNASH) and through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01, and charities (Societe Francophone du Diabete (MSD, Allocation Exceptionnelle) and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC; #20171206287), La Ligue Contre le Cancer to D.V.). M.B is supported by

the French Government National. C.L. is a member of the UCSD Diabetes Research Center and is supported by the NIH grant T32DK007494.

## Abbreviations

<b>ATF6</b>	activating transcription factor
<b>BI-1</b>	BAX Inhibitor-1
<b>BAR</b>	bifunctional apoptosis regulator
<b>CYP2E1</b>	cytochrome P450 species 2E1
<b>HO-1</b>	heme oxygenase-1
<b>HFD</b>	high-fat diet
<b>IP3R</b>	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
<b>IRE1</b>	inositol-requiring enzyme 1
<b>Klf10</b>	Krüppel-like zinc finger transcription factor
<b>MOMP</b>	mitochondrial outer membrane permeabilization
<b>MCT</b>	monoamine carboxylate transporter
<b>NHE</b>	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger
<b>NPR</b>	NADPH-P450 reductase
<b>PERK</b>	PKR-like ER kinase
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>SERCA</b>	sarcoplasmic/ER calcium ATPase
<b>TMBIM</b>	transmembrane BAX Inhibitor-1-containing motif
<b>UPR</b>	unfolded protein response

## References

1. Henke N, Lisak DA, Schneider L, Habicht J, Pergande M & Methner A (2011) The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1, *Cell Calcium*. 50, 251–60. [PubMed: 21663964]
2. Rojas-Rivera D & Hetz C. (2015) TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death, *Oncogene*. 34, 269–80. [PubMed: 24561528]
3. Chae H-J, Ke N, Kim H-R, Chen S, Godzik A, Dickman M & Reed JC (2003) Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast, *Gene*. 323, 101–113. [PubMed: 14659883]
4. Ishikawa T, Watanabe N, Nagano M, Kawai-Yamada M & Lam E (2011) Bax inhibitor-1: a highly conserved endoplasmic reticulum-resident cell death suppressor, *Cell Death Differ*. 18, 1271–8. [PubMed: 21597463]
5. Liu Q (2017) TMBIM-mediated Ca(2+) homeostasis and cell death, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1864, 850–857. [PubMed: 28064000]

6. Carrara G, Parsons M, Saraiva N & Smith GL (2017) Golgi anti-apoptotic protein: a tale of camels, calcium, channels and cancer, *Open Biol.* 7.
7. Xu Q & Reed JC (1998) Bax Inhibitor-1, a Mammalian Apoptosis Suppressor Identified by Functional Screening in Yeast, *Molecular Cell.* 1, 337–346. [PubMed: 9660918]
8. Doycheva D, Kaur H, Tang J & Zhang JH (2019) The characteristics of the ancient cell death suppressor, TM6IM6, and its related signaling pathways after endoplasmic reticulum stress, *J Neurosci Res.*
9. Lisak DA, Schacht T, Enders V, Habicht J, Kiviluoto S, Schneider J, Henke N, Bultynck G & Methner A (2015) The transmembrane Bax inhibitor motif (TM6IM) containing protein family: Tissue expression, intracellular localization and effects on the ER CA(2)(+)-filling state, *Biochim Biophys Acta.* 1853, 2104–14. [PubMed: 25764978]
10. Carrara G, Saraiva N, Gubser C, Johnson BF & Smith GL (2012) Six-transmembrane topology for Golgi anti-apoptotic protein (GAAP) and Bax inhibitor 1 (BI-1) provides model for the transmembrane Bax inhibitor-containing motif (TM6IM) family, *J Biol Chem.* 287, 15896–905. [PubMed: 22418439]
11. Bultynck G, Kiviluoto S, Henke N, Ivanova H, Schneider L, Rybalchenko V, Luyten T, Nuyts K, De Borggraeve W, Bezprozvanny I, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L & Methner A (2012) The C terminus of Bax inhibitor-1 forms a Ca<sup>2+</sup>-permeable channel pore, *J Biol Chem.* 287, 2544–57. [PubMed: 22128171]
12. Robinson KS, Clements A, Williams AC, Berger CN & Frankel G (2011) Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease, *Oncogene.* 30, 2391–400. [PubMed: 21297665]
13. Walter L, Dirks B, Rothermel E, Heyens M, Szpirer C, Levan G & Günther E (1994) A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis, *Mammalian Genome.* 5, 216–221. [PubMed: 8012111]
14. Walter L, Marynen P, Szpirer J, Levan G & Günther E (1995) Identification of a Novel Conserved Human Gene, TEGT, *Genomics.* 28, 301–304. [PubMed: 8530040]
15. Chae HJ, Kim HR, Xu C, Bailly-Maitre B, Krajewska M, Krajewski S, Banares S, Cui J, Digicaylioglu M, Ke N, Kitada S, Monosov E, Thomas M, Kress CL, Babendure JR, Tsien RY, Lipton SA & Reed JC (2004) BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress, *Mol Cell.* 15, 355–66. [PubMed: 15304216]
16. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB & Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science.* 292, 727–30. [PubMed: 11326099]
17. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH & Korsmeyer SJ (2006) Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha, *Science.* 312, 572–6. [PubMed: 16645094]
18. Lisbona F, Rojas-Rivera D, Thielen P, Zamorano S, Todd D, Martinon F, Glavic A, Kress C, Lin JH, Walter P, Reed JC, Glimcher LH & Hetz C (2009) BAX inhibitor-1 is a negative regulator of the ER stress sensor IRE1alpha, *Mol Cell.* 33, 679–91. [PubMed: 19328063]
19. Bailly-Maitre B, Belgardt BF, Jordan SD, Coornaert B, von Freyend MJ, Kleinriders A, Mauer J, Cuddy M, Kress CL, Willmes D, Essig M, Hampel B, Protzer U, Reed JC & Bruning JC (2010) Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance, *J Biol Chem.* 285, 6198–207. [PubMed: 19996103]
20. Rong J, Chen L, Toth JI, Tchepakov M, Petroski MD & Reed JC (2011) Bifunctional apoptosis regulator (BAR), an endoplasmic reticulum (ER)-associated E3 ubiquitin ligase, modulates BI-1 protein stability and function in ER Stress, *J Biol Chem.* 286, 1453–63. [PubMed: 21068390]
21. Tabas I & Ron D (2011) Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress, *Nat Cell Biol.* 13, 184–90. [PubMed: 21364565]
22. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P & Strasser A (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim, *Cell.* 129, 1337–49. [PubMed: 17604722]

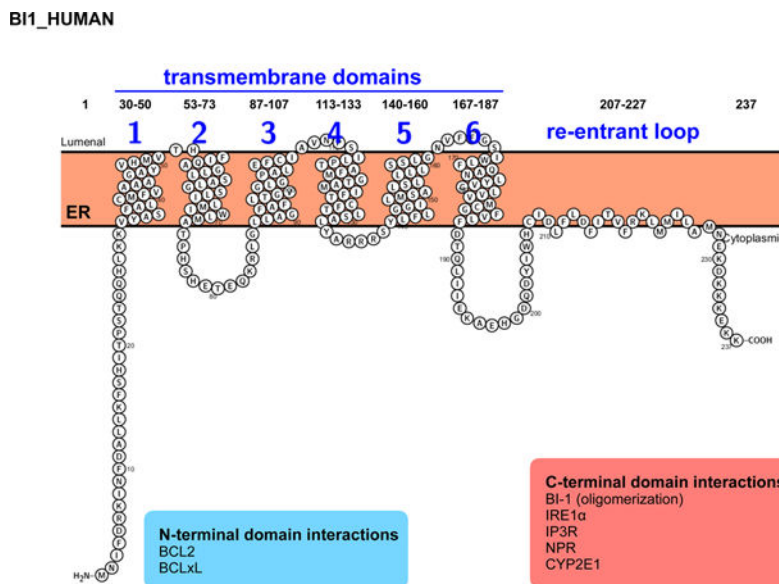
23. Xu C, Xu W, Palmer AE & Reed JC (2008) BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins, *J Biol Chem.* 283, 11477–84. [PubMed: 18299329]
24. Ahn T, Yun CH, Chae HZ, Kim HR & Chae HJ (2009) Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter-like activity of human recombinant Bax inhibitor-1 reconstituted into liposomes, *FEBS J.* 276, 2285–91. [PubMed: 19290886]
25. Ahn T, Yun CH, Kim HR & Chae HJ (2010) Cardiolipin, phosphatidylserine, and BH4 domain of Bcl-2 family regulate Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter activity of human Bax inhibitor-1, *Cell Calcium.* 47, 387–96. [PubMed: 20193962]
26. Kim HR, Lee GH, Ha KC, Ahn T, Moon JY, Lee BJ, Cho SG, Kim S, Seo YR, Shin YJ, Chae SW, Reed JC & Chae HJ (2008) Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent regulator of Ca<sup>2+</sup> channel activity in the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem.* 283, 15946–55. [PubMed: 18378668]
27. Bultynck G, Kiviluoto S & Methner A (2014) Bax Inhibitor-1 Is Likely a pH-Sensitive Calcium Leak Channel, Not a H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger, *Science Signaling.* 7, pe22.
28. Kiviluoto S, Luyten T, Schneider L, Lisak D, Rojas-Rivera D, Welkenhuyzen K, Missaen L, De Smedt H, Parys JB, Hetz C, Methner A & Bultynck G (2013) Bax Inhibitor-1-mediated Ca<sup>2+</sup> leak is decreased by cytosolic acidosis, *Cell Calcium.* 54, 186–92. [PubMed: 23867001]
29. Chang Y, Bruni R, Kloss B, Assur Z, Kloppmann E, Rost B, Hendrickson WA & Liu Q (2014) Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes, *Science.* 344, 1131. [PubMed: 24904158]
30. Guo G, Xu M, Chang Y, Luyten T, Seitaj B, Liu W, Zhu P, Bultynck G, Shi L, Quick M & Liu Q (2019) Ion and pH Sensitivity of a TMBIM Ca(2+) Channel, *Structure.* 27, 1013–1021 e3. [PubMed: 30930064]
31. Kiviluoto S, Schneider L, Luyten T, Vervliet T, Missaen L, De Smedt H, Parys JB, Methner A & Bultynck G (2012) Bax inhibitor-1 is a novel IP(3) receptor-interacting and -sensitizing protein, *Cell death & disease.* 3, e367. [PubMed: 22875004]
32. Sano R, Hou YC, Hedvat M, Correa RG, Shu CW, Krajewska M, Diaz PW, Tamble CM, Quarato G, Gottlieb RA, Yamaguchi M, Nizet V, Dahl R, Thomas DD, Tait SW, Green DR, Fisher PB, Matsuzawa S & Reed JC (2012) Endoplasmic reticulum protein BI-1 regulates Ca(2+)-mediated bioenergetics to promote autophagy, *Genes Dev.* 26, 1041–54. [PubMed: 22588718]
33. Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T & Korsmeyer SJ (2005) Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102, 105–110. [PubMed: 15613488]
34. Rong Y-P, Bultynck G, Aromolaran AS, Zhong F, Parys JB, De Smedt H, Mignery GA, Roderick HL, Bootman MD & Distelhorst CW (2009) The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106, 14397–14402.
35. Monaco G, Decrock E, Akl H, Ponsaerts R, Vervliet T, Luyten T, De Maeyer M, Missaen L, Distelhorst CW, De Smedt H, Parys JB, Leybaert L & Bultynck G (2012) Selective regulation of IP3-receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis by the BH4 domain of Bcl-2 versus Bcl-XL, *Cell Death Differ.* 19, 295–309. [PubMed: 21818117]
36. Ivanova H, Vervliet T, Monaco G, Terry LE, Rosa N, Baker MR, Parys JB, Serysheva II, Yule DI & Bultynck G (2019) Bcl-2-Protein Family as Modulators of IP3 Receptors and Other Organellar Ca(2+) Channels, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*
37. Vervliet T, Parys JB & Bultynck G (2016) Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface, *Oncogene.* 35, 5079–92. [PubMed: 26973249]
38. Davydov DR (2011) Microsomal monooxygenase as a multienzyme system: the role of P450-P450 interactions, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 7, 543–558. [PubMed: 21395496]
39. Kim HR, Lee GH, Cho EY, Chae SW, Ahn T & Chae HJ (2009) Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1, *J Cell Sci.* 122, 1126–33. [PubMed: 19339548]

40. Lee GH, Oh KJ, Kim HR, Han HS, Lee HY, Park KG, Nam KH, Koo SH & Chae HJ (2016) Effect of BI-1 on insulin resistance through regulation of CYP2E1, *Sci Rep.* 6, 32229.
41. Lee GH, Kim HR & Chae HJ (2012) Bax inhibitor-1 regulates the expression of P450 2E1 through enhanced lysosome activity, *Int J Biochem Cell Biol.* 44, 600–11. [PubMed: 22230367]
42. Lee GH, Kim DS, Kim HT, Lee JW, Chung CH, Ahn T, Lim JM, Kim IK, Chae HJ & Kim HR (2011) Enhanced lysosomal activity is involved in Bax inhibitor-1-induced regulation of the endoplasmic reticulum (ER) stress response and cell death against ER stress: involvement of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase), *J Biol Chem.* 286, 24743–53. [PubMed: 21586565]
43. Kim JH, Lee ER, Jeon K, Choi HY, Lim H, Kim SJ, Chae HJ, Park SH, Kim S, Seo YR, Kim JH & Cho SG (2012) Role of BI-1 (TEGT)-mediated ERK1/2 activation in mitochondria-mediated apoptosis and splenomegaly in BI-1 transgenic mice, *Biochim Biophys Acta.* 1823, 876–88. [PubMed: 22309999]
44. Lee GH, Kim HK, Chae SW, Kim DS, Ha KC, Cuddy M, Kress C, Reed JC, Kim HR & Chae HJ (2007) Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression, *J Biol Chem.* 282, 21618–28. [PubMed: 17526500]
45. Bailly-Maitre B, Bard-Chapeau E, Luciano F, Droin N, Bruey JM, Faustin B, Kress C, Zapata JM & Reed JC (2007) Mice lacking bi-1 gene show accelerated liver regeneration, *Cancer Res.* 67, 1442–50. [PubMed: 17308082]
46. Lebeaupin C, Vallee D, Rousseau D, Patouraux S, Bonnafous S, Adam G, Luciano F, Luci C, Anty R, Iannelli A, Marchetti S, Kroemer G, Lacas-Gervais S, Tran A, Gual P & Bailly-Maitre B (2018) Bax inhibitor-1 protects from nonalcoholic steatohepatitis by limiting inositol-requiring enzyme 1 alpha signaling in mice, *Hepatology.* 68, 515–532. [PubMed: 29457838]
47. Yadav RK, Lee GH, Lee HY, Li B, Jung HE, Rashid HO, Choi MK, Yadav BK, Kim WH, Kim KW, Park BH, Kim W, Lee YC, Kim HR & Chae HJ (2015) TMBIM6 (transmembrane BAX inhibitor motif containing 6) enhances autophagy and reduces renal dysfunction in a cyclosporine A-induced nephrotoxicity model, *Autophagy.* 11, 1760–74. [PubMed: 26305401]
48. Lee MR, Lee GH, Lee HY, Kim DS, Chung MJ, Lee YC, Kim HR & Chae HJ (2014) BAX inhibitor-1-associated V-ATPase glycosylation enhances collagen degradation in pulmonary fibrosis, *Cell death & disease.* 5, e1113.
49. Hossain MK, Saha SK, Abdal Dayem A, Kim JH, Kim K, Yang GM, Choi HY & Cho SG (2018) Bax Inhibitor-1 Acts as an Anti-Influenza Factor by Inhibiting ROS Mediated Cell Death and Augmenting Heme-Oxygenase 1 Expression in Influenza Virus Infected Cells, *Int J Mol Sci.* 19.
50. Krajewska M, Xu L, Xu W, Krajewski S, Kress CL, Cui J, Yang L, Irie F, Yamaguchi Y, Lipton SA & Reed JC (2011) Endoplasmic reticulum protein BI-1 modulates unfolded protein response signaling and protects against stroke and traumatic brain injury, *Brain Res.* 1370, 227–37. [PubMed: 21075086]
51. Hunsberger JG, Machado-Vieira R, Austin DR, Zarate C, Chuang DM, Chen G, Reed JC & Manji HK (2011) Bax inhibitor 1, a modulator of calcium homeostasis, confers affective resilience, *Brain Res.* 1403, 19–27. [PubMed: 21718971]
52. Li B, Reed JC, Kim HR & Chae HJ (2012) Proteomic profiling of differentially expressed proteins from Bax inhibitor-1 knockout and wild type mice, *Mol Cells.* 34, 15–23. [PubMed: 22736268]
53. Lebeaupin C, Proics E, de Bievilleville CH, Rousseau D, Bonnafous S, Patouraux S, Adam G, Lavallard VJ, Rovere C, Le Thuc O, Saint-Paul MC, Anty R, Schneck AS, Iannelli A, Gugenheim J, Tran A, Gual P & Bailly-Maitre B (2015) ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death, *Cell death & disease.* 6, e1879.
54. Lee HY, Lee GH, Bhattarai KR, Park BH, Koo SH, Kim HR & Chae HJ (2016) Bax Inhibitor-1 regulates hepatic lipid accumulation via ApoB secretion, *Sci Rep.* 6, 27799.
55. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci J-E, Croxton R, Krajewska M, Zapata JM, Kupiec-Weglinski JW, Farmer D & Reed JC (2006) Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103, 2809–2814. [PubMed: 16478805]

56. Zhou H, Shi C, Hu S, Zhu H, Ren J & Chen Y (2018) B11 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways, *Angiogenesis*. 21, 599–615. [PubMed: 29623489]
57. Doycheva D, Xu N, Tang J & Zhang J (2019) Viral-mediated gene delivery of TMBIM6 protects the neonatal brain via disruption of NPR-CYP complex coupled with upregulation of Nrf-2 post-HI, *J Neuroinflammation*. 16, 174. [PubMed: 31472686]
58. Cho K-A, Woo S-Y, Seoh J-Y, Han H-S & Ryu K-H (2012) Mesenchymal stem cells restore CCl4-induced liver injury by an antioxidative process, *Cell Biology International*. 36, 1267–1274. [PubMed: 23035905]
59. Lisak D, Schacht T, Gawlitza A, Albrecht P, Aktas O, Koop B, Gliem M, Hofstetter HH, Zanger K, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Kindler T, Adams-Quack P, Hahn M, Waisman A, Reed JC, Hovelmeyer N & Methner A (2016) BAX inhibitor-1 is a Ca(2+) channel critically important for immune cell function and survival, *Cell Death Differ*. 23, 358–68. [PubMed: 26470731]
60. Jeon K, Lim H, Kim J-H, Han D, Lee E-R, Yang G-M, Song M-K, Kim J-H & Cho S-G (2012) Bax inhibitor-1 enhances survival and neuronal differentiation of embryonic stem cells via differential regulation of mitogen-activated protein kinases activities, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1823, 2190–2200. [PubMed: 22906541]
61. Dohm CP, Siedenberg S, Liman J, Esposito A, Wouters FS, Reed JC, Bähr M & Kermer P (2006) Bax inhibitor-1 protects neurons from oxygen-glucose deprivation, *Journal of Molecular Neuroscience*. 29, 1–8. [PubMed: 16757804]
62. Lee HY, Lee GH, Marahatta A, Lin SM, Lee MR, Jang KY, Kim KM, Lee HJ, Lee JW, Bagalkot TR, Chung YC, Lee YC, Kim HR & Chae HJ (2013) The protective role of Bax inhibitor-1 against chronic mild stress through the inhibition of monoamine oxidase A, *Sci Rep*. 3, 3398. [PubMed: 24292328]
63. Wu S, Song W, Wong CCL & Shi Y (2019) Bax inhibitor 1 is a gamma-secretase-independent presenilin-binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 116, 141–147. [PubMed: 30559186]
64. Kerstin R, Claudia YUC, Vesna B & Peter MV (2008) The Bax Inhibitor-1 (BI-1) Family in Apoptosis and Tumorigenesis, *Current Molecular Medicine*. 8, 148–156. [PubMed: 18336295]
65. Li B, Yadav RK, Jeong GS, Kim HR & Chae HJ (2014) The Characteristics of Bax Inhibitor-1 and its Related Diseases, *Current Molecular Medicine*. 14, 603–615. [PubMed: 24894176]
66. Grzmil M, Kaulfuss S, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Obenauer S, Kang TW & Burfeind P (2006) Expression and functional analysis of Bax inhibitor-1 in human breast cancer cells, *J Pathol*. 208, 340–9. [PubMed: 16353131]
67. Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, Burra P & Bortolami M (2010) Bax Inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver diseases, *BMC Gastroenterology*. 10, 35–35. [PubMed: 20359348]
68. Hsu CF, Sui CL, Wu WC, Wang JJ, Yang DH, Chen YC, Yu WC & Chang HS (2011) Klf10 induces cell apoptosis through modulation of BI-1 expression and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in estrogen-responder adenocarcinoma cells, *Int J Biochem Cell Biol*. 43, 666–73. [PubMed: 21262377]
69. Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B, Schweyer S, Voigt S, Mury D & Burfeind P (2003) Bax Inhibitor-1 Is Overexpressed in Prostate Cancer and Its Specific Down-Regulation by RNA Interference Leads to Cell Death in Human Prostate Carcinoma Cells, *The American Journal of Pathology*. 163, 543–552. [PubMed: 12875974]
70. Kim HK, Yadav RK, Bhattarai KR, Jung HW, Kim HR & Chae HJ (2018) Transmembrane BAX Inhibitor Motif-6 (TMBIM6) protects against cisplatin-induced testicular toxicity, *Hum Reprod*. 33, 378–389. [PubMed: 29309588]
71. Zhang M, Li X, Zhang Y & Zhou K (2010) Bax inhibitor-1 mediates apoptosis-resistance in human nasopharyngeal carcinoma cells, *Mol Cell Biochem*. 333, 1–7. [PubMed: 19579059]
72. Li XY, Lai YK, Zhang JF, Luo HQ, Zhang MH, Zhou KY & Kung HF (2011) Lentivirus-mediated RNA interference targeting Bax inhibitor-1 suppresses ex vivo cell proliferation and in vivo tumor growth of nasopharyngeal carcinoma, *Hum Gene Ther*. 22, 1201–8. [PubMed: 21545297]
73. Tanaka R, Ishiyama T, Uchihara T, Inadome Y, Iijima T, Morishita Y, Kano J, Goya T & Noguchi M (2006) Expression of the Bax inhibitor-1 gene in pulmonary adenocarcinoma, *Cancer*. 106, 648–53. [PubMed: 16353209]



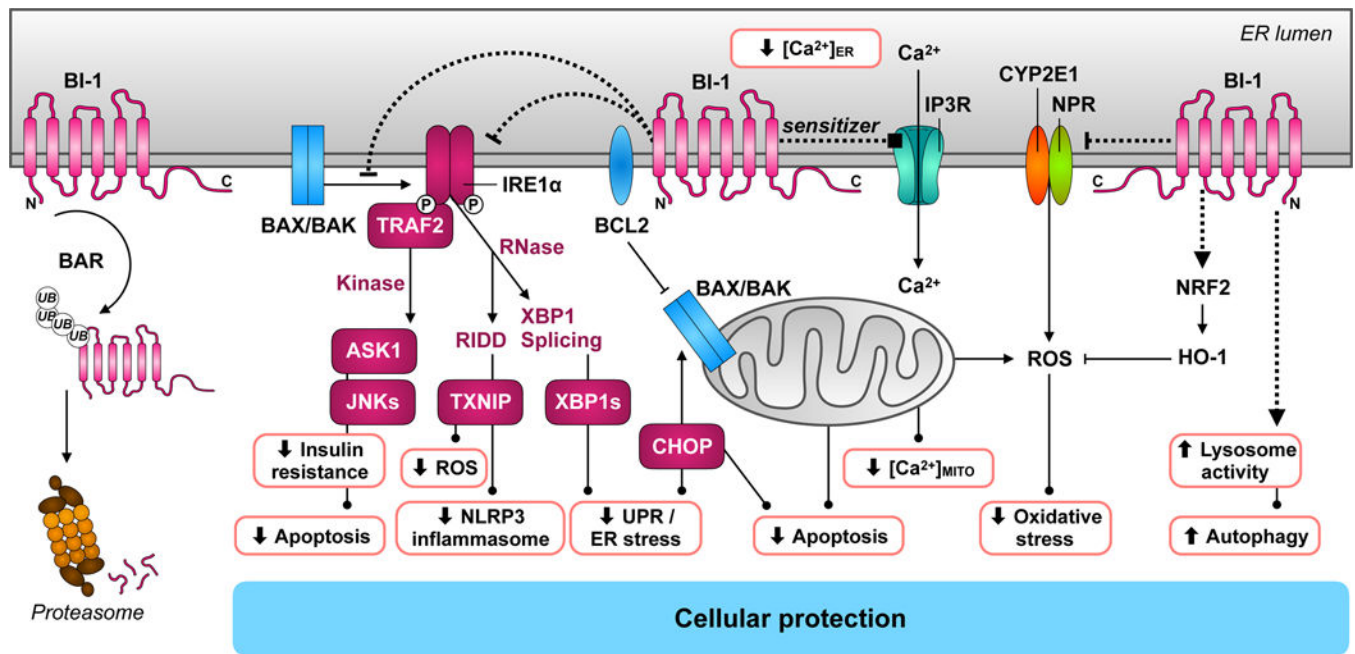
74. Lu B, Li Y, Li H, Zhang Y, Xu J, Ren L, Fu S & Zhou Y (2015) Bax inhibitor-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes its progression and metastasis, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 8, 1411–1418. [PubMed: 25973025]
75. Lee GH, Ahn T, Kim DS, Park SJ, Lee YC, Yoo WH, Jung SJ, Yang JS, Kim S, Muhlrad A, Seo YR, Chae SW, Kim HR & Chae HJ (2010) Bax inhibitor 1 increases cell adhesion through actin polymerization: involvement of calcium and actin binding, *Mol Cell Biol*. 30, 1800–13. [PubMed: 20123969]
76. Wang Y, Mattson MP & Furukawa K (2002) Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization, *Journal of Neurochemistry*. 82, 945–952. [PubMed: 12358800]
77. Wales P, Schubert CE, Aufschnaiter R, Fels J, Garcia-Aguilar I, Janning A, Dlugos CP, Schafer-Herte M, Klingner C, Walte M, Kuhlmann J, Menis E, Hockaday Kang L, Maier KC, Hou W, Russo A, Higgs HN, Pavenstadt H, Vogl T, Roth J, Qualmann B, Kessels MM, Martin DE, Mulder B & Wedlich-Soldner R (2016) Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations, *Elife*. 5.
78. Lee GH, Yan C, Shin SJ, Hong SC, Ahn T, Moon A, Park SJ, Lee YC, Yoo WH, Kim HT, Kim DS, Chae SW, Kim HR & Chae HJ (2010) BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function, *Oncogene*. 29, 2130–41. [PubMed: 20118983]
79. Lee GH, Chae HJ & Kim HR (2011) Monoamine carboxylate transporters are involved in BI-1-associated cancer metastasis in HT1080 colon fibrosarcoma cells, *Int J Oncol*. 39, 209–16. [PubMed: 21537843]
80. Yun CH, Chae HJ, Kim HR & Ahn T (2012) Doxorubicin- and daunorubicin-induced regulation of Ca<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> fluxes through human bax inhibitor-1 reconstituted into membranes, *J Pharm Sci*. 101, 1314–26. [PubMed: 22147501]
81. Schmidt SM, König T, Bringmann A, Held S, von Schwarzenberg K, Heine A, Holderried TA, Stevanovic S, Grunebach F & Brossart P (2009) Characterization of BAX inhibitor-1 as a novel leukemia-associated antigen, *Leukemia*. 23, 1818–24. [PubMed: 19609282]
82. Omasits U, Ahrens CH, Müller S & Wollscheid B (2014) Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data, *Bioinformatics*. 30, 884–6. [PubMed: 24162465]



**Figure 1: Structure of BAX Inhibitor-1 (BI-1)**

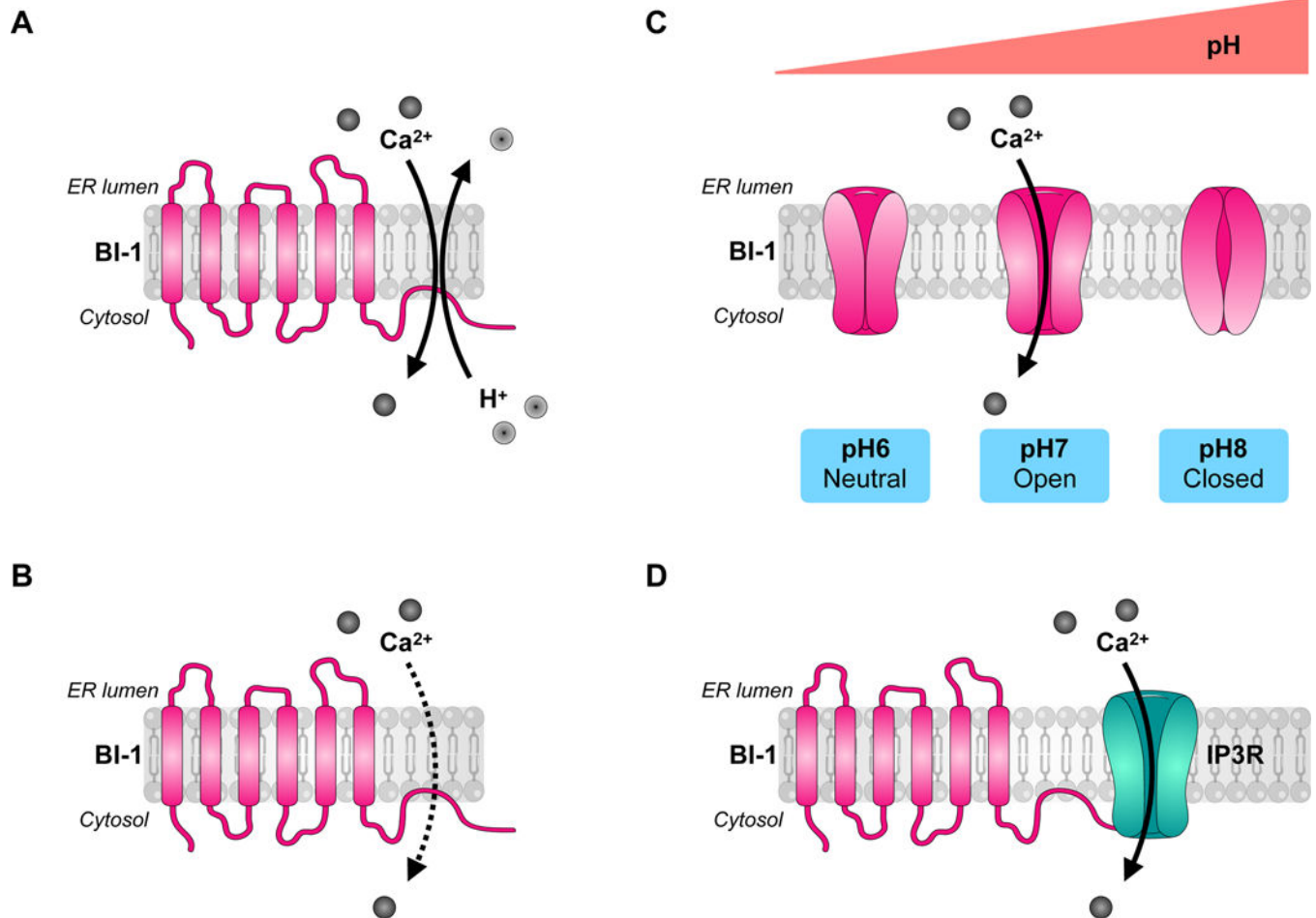
BAX Inhibitor-1 (BI-1) is an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein with six fully transmembrane domains and a C-terminal re-entrant loop. Listed are select interacting partners that bind either to the N- or C-terminal domain of BI-1 (BCL2 apoptosis regulator (BCL2); BCL2 like 1 (BCLxL); inositol-requiring enzyme 1 alpha (IRE1α); inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R); NADPH-P450 reductase (NPR); cytochrome P450 species 2E1 (CYP2E1). The membrane topology model was generated using Protter [82] with the BI1\_Human protein sequence from the UniProt protein knowledgebase.





**Figure 2: Overview of the cytoprotective functions of BI-1**

BI-1 confers cellular protection as an anti-apoptotic protein by limiting multiple stress-inducing pathways surrounding the ER and mitochondria. Nevertheless, BI-1 can be ubiquitinated by the ER-associated RING-type E3 ligase bifunctional apoptosis regulator (BAR) for degradation by the proteasome, thus reducing BI-1 levels in the cell. BI-1 inhibits the activities of the ER stress sensor IRE1 $\alpha$  directly and by blocking BAX/BAK binding. BI-1 can increase its anti-apoptotic function through the association with BCL2, which can inhibit BAX/BAK translocation to the mitochondria. BI-1 can regulate Ca<sup>2+</sup> balance in the ER and mitochondria, notably by sensitizing IP3R function into controlled Ca<sup>2+</sup> release into the cytosol. BI-1 can impact mitochondrial bioenergetics mediated by reduced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub>, reduced reactive oxygen species (ROS) release and oxidative stress. BI-1 can interact with the microsomal monooxygenase system, composed of NADPH-P450 reductase (NPR) and cytochrome P450 member CYP2E1, to limit the harmful conversion of endogenous or exogenous compounds to ROS, which promote cytosolic acidification and oxidative stress. BI-1 can promote an antioxidant response via NRF2 and heme oxygenase-1 (HO-1) that counteracts ROS. Finally, BI-1 expression can reduce pH in lysosomes, consequently increasing lysosome activity and autophagy. (apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1); BCL2 associated X, apoptosis regulator/BCL2 antagonist/killer 1 (BAX/BAK); BCL2 apoptosis regulator (BCL2); DNA damage inducible transcript 3 (CHOP); inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R); JUN N-terminal kinase (JNK); NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3); TNF receptor associated factor 2 (TRAF2); thioredoxin interacting protein (TXNIP); unfolded protein response (UPR); X-box binding protein 1 (XBP1)).



**Figure 3: Proposed models of BI-1  $\text{Ca}^{2+}$  regulation**

The C-terminal of BI-1 may have  $\text{Ca}^{2+}$  channel or sensitizing properties and be regulated by changes in intracellular pH. **A)** BI-1 could function as a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  antiporter. **B)** BI-1 could passively release  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytosol as a  $\text{Ca}^{2+}$  leak channel. **C)** A simplified view of the status of the  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable pore of BI-1 in terms of intracellular pH, endorsing the model in **B)**. **D)** BI-1 could function as an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) sensitizer, directing ER  $\text{Ca}^{2+}$  flux control.

**Table 1:**

Overview of BI-1 expression in diseases referenced.

Disease	BI-1 levels	Observations	Reference
<b>Hepatic disorders</b>			
Insulin resistance	<i>down</i>	BI-1 overexpression improves hepatic insulin signaling.	[19] [40]
Non-Alcoholic Fatty Liver Disease	<i>down</i>	BI-1 KO mice are vulnerable to acute ER stress- and HFD-induced liver injury.	[54] [46]
Hypoxia/ischemia-reperfusion	<i>up</i>	After IR, BI-1 KO mice exhibit ER stress and cell death while BI-1 is upregulated in recovering WT mice.	[55]
CCI4	<i>down</i>	BI-1 levels increase after mesenchymal stem cell transplantation therapy.	[58]
Partial hepatectomy	<i>down</i>	BI-1 KO mice have accelerated liver regeneration.	[45]
<b>Immune system regulation and infection</b>			
Autoimmune encephalomyelitis	?	BI-1 KO mice display later onset of clinical symptoms with attenuated T- and B-cell function.	[59]
Influenza	?	BI-1 overexpression suppresses virus-induced cell death.	[49]
<b>Neurological disorders</b>			
Stroke	?	BI-1 KO mice are vulnerable to cerebral artery occlusion injury. BI-1 transgenic mice have reduced brain injury and better recovery.	[15] [50]
Depression	?	BI-1 transgenic mice are protected against learned helplessness and anhedonia. BI-1 mice are vulnerable to stress-induced depression-like behavior.	[51] [62]
Alzheimer's disease	?	BI-1 is a stable presenilin 1 interacting partner.	[63]
<b>Other disorders</b>			
Cardiac ischemia-reperfusion	<i>down</i>	BI1 transgenic mice are protected from microvascular injury and mitochondrial dysfunction.	[56]
Neonatal hypoxic-ischemic injury	<i>up</i>	BI-1 overexpression increases the production of antioxidant enzymes and attenuates inflammation after injury.	[57]
Nephrotoxicity	<i>down</i>	BI-1 KO mice are vulnerable to cyclosporine A-induced kidney injury.	[47]
Pulmonary fibrosis	?	BI-1 KO mice exhibit high sensitivity and low survival in response to bleomycin-induced lung injury.	[48]
<b>Cancer</b>			
Liver cancer	<i>down</i>	Human BI-1 expression is downregulated as liver damage progresses.	[67]
Breast cancer	<i>up</i>	BI-1 is upregulated in human breast cancer, though to varying degrees in common breast cancer cell lines. High-dose estrogen can induce Klf10 to suppress BI-1 transcription and induce apoptosis.	[66] [68]
Prostate cancer	<i>up</i>	BI-1 downregulation induces prostate carcinoma cell death.	[69]
Testicular cancer	<i>up</i>	BI-1 may serve a protective role against cisplatin-associated reproductive toxicity.	[70]
Nasopharyngeal carcinoma	<i>up</i>	BI-1 downregulation induces cell death, while BI-1 and Bcl-2 family interactions may contribute to apoptosis-resistance. BI-1 downregulation inhibits tumor growth and increases apoptosis.	[71] [72]
Lung cancer	<i>(up)</i>	BI-1 is upregulated in a subtype of non-small cell lung cancers. BI-1 levels vary according to metastatic potential, and patients with BI-1- positive adenocarcinoma have relatively favorable prognoses.	[73] [74]