



**HAL**  
open science

# Exploration du rôle du récepteur purinergique P2RY1 dans le risque et la physiopathologie du diabète de type 2 : perspectives de la génomique fonctionnelle humaine

Arnaud Dance

## ► To cite this version:

Arnaud Dance. Exploration du rôle du récepteur purinergique P2RY1 dans le risque et la physiopathologie du diabète de type 2 : perspectives de la génomique fonctionnelle humaine. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS072 . tel-04498297

**HAL Id: tel-04498297**

**<https://theses.hal.science/tel-04498297v1>**

Submitted on 11 Mar 2024

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

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

**Université du Droit et de la Santé de Lille Ecole Doctorale  
Biologie - Santé de Lille**

Année universitaire 2022 – 2023

**Thèse soutenue en vue de l'obtention du titre de Docteur de  
l'Université de Lille**

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie -  
MEDECINE

**Exploration du rôle du récepteur  
purinergique P2RY1 dans le risque et la  
physiopathologie du diabète de type 2 :  
perspectives de la génomique  
fonctionnelle humaine.**

**Par Arnaud DANCE**

**Sous la direction du Docteur Amélie BONNEFOND**

**Thèse soutenue le 13 décembre 2023 devant le jury composé de :**

**Dr Jerome EECKHOUTE**

**Président du jury**

**Pr Hervé LE STUNFF**

**Rapporteur**

**Pr Bertrand BLONDEAU**

**Rapporteur**

**Dr Julie DAM**

**Examinatrice**

**Dr Amélie BONNEFOND**

**Directrice de thèse**



## Table des matières

REMERCIEMENTS .....	4
RÉSUMÉ .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	11
I.    Le diabète de type 2, une pandémie mondiale encore mal traitée .....	11
II.   Implication du récepteur purinergique P2RY1 dans la régulation de la sécrétion d'insuline.....	52
III.   Objectifs de la thèse.....	61
MATERIEL ET METHODES.....	62
I.    Cohortes – définition des cas et témoins.....	62
II.   Séquençage de l'ADN haut débit .....	63
III.   Étude eQTL.....	64
IV.   Activité des mutants .....	65
V.    Localisation et expression des mutants .....	70
VI.   Effet de l'agoniste de P2RY1 sur la sécrétion d'insuline .....	71
VII.  Séquençage d'ARN des cellules bêta pancréatiques humaines .....	72
RESULTATS .....	75
I.    Détection des mutations par séquençage d'ADN.....	75
II.   Génétique fonctionnelle des variants rares de <i>P2RY1</i> .....	78
III.  Effet des polymorphismes fréquents au locus <i>P2RY1</i> sur l'expression de <i>P2RY1</i> dans les îlots pancréatiques humains. ....	85
IV.   Effet de l'activation du récepteur P2RY1 sur la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques humaines .....	87
DISCUSSION.....	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
ANNEXES.....	115

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Tout d'abord, je souhaite remercier sincèrement ma directrice de thèse, Amélie BONNEFOND, pour son encadrement attentif, sa patience et son expertise inestimable. Ses conseils avisés, ses discussions stimulantes et son soutien constant ont été essentiels pour la réussite de ce travail.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les membres de mon jury de thèse, le Dr Julie DAM, le Pr Hervé LE STUNFF, le Pr Bertrand BLONDEAU ainsi que le Dr Jérôme EECKHOUTE, pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers le Pr Philippe FROGUEL de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire et pour l'aide qu'il m'a apportée tout au long de ma thèse.

Je suis reconnaissant envers mes collègues de laboratoire, notamment Justine, Hélène et Jessica pour leur aide précieuse à la paillasse, ainsi que Frederik et Yasmina. Je tiens également à remercier toutes les équipes aussi bien Fonctionnelle, NGS que BioInfo/BioStat.

Je souhaite bonne chance à mes co-doctorants, Lucas, Vincent et Maxime, pour la fin de leur thèse qui approche à grands pas. Mes remerciements vont aussi à Nicolas, Raphy et Constance pour leur soutien et leurs bonnes humeurs.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers le Dr Eric HAJDUCH et le Dr Madia CHARLIER, mes directeurs de stage lors de mon master, qui m'ont inspiré pour la suite de mes études et ont confirmé mon choix d'entreprendre une thèse en biologie.

Enfin, je suis profondément reconnaissant envers ma famille, mes amis et surtout Oliva pour leur soutien indéfectible tout au long de ce parcours. Leur encouragement a été une source d'inspiration constante. Ce travail n'aurait pas été possible sans vous tous, et je vous en suis profondément reconnaissant.

## RÉSUMÉ

Les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) ont montré que le locus *P2RY1* est associé au risque de diabète de type 2 (DT2) et aux traits glycémiques associés. *P2RY1* est un récepteur couplé à une protéine G (GPCR), activé par l'ATP et l'ADP, qui est fortement exprimé dans les îlots pancréatiques, en particulier dans les cellules bêta, où l'ATP/ADP stimule la sécrétion d'insuline en activant les canaux potassiques dépendants de l'ATP. À travers la génétique fonctionnelle, nous avons cherché à analyser les contributions potentielles des variants génétiques de *P2RY1* au risque de DT2 et à d'autres caractéristiques métaboliques. Nous avons ensuite caractérisé les voies de signalisation en aval de *P2RY1* dans les cellules bêta pancréatiques humaines et déchiffré son rôle potentiel dans la sécrétion d'insuline.

*P2RY1* a été séquencée chez 9,266 adultes, y compris des cas de DT2 et des témoins à glycémie normale. Pour évaluer l'effet fonctionnel de chaque variant identifié, nous avons réalisé 1) des expériences de luciférase (système NFAT-RE) sur des cellules HEK293 surexprimant chaque variant, suivies de l'activation de *P2RY1* par des doses croissantes de MRS2365 (méthanocarba-2MeSADP), qui est un agoniste spécifique de *P2RY1*, et 2) une immunofluorescence pour évaluer la localisation cellulaire et l'expression de chaque mutant. Nous avons également effectué une analyse de locus de caractères quantitatifs (eQTL) chez 103 donneurs, basée sur la séquence d'ARN dans les îlots pancréatiques et le génotypage par microarray d'ADN. Dans les cellules bêta pancréatiques humaines (EndoCBH5), nous avons réalisé des expériences de sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) couplés à l'activation de *P2RY1* par MRS2365 ou son inhibition par MRS2500.

Nous avons identifié 22 variants faux-sens rares dans *P2RY1* (dont 10 nouveaux variants). Nos analyses *in vitro* ont mis en évidence 7 mutations de perte de fonction. 87 % des porteurs de mutations présentaient un DT2. Les analyses eQTL ont montré qu'un groupe de polymorphismes nucléotidiques (SNP ; n=63) situé dans une région *enhancer* était significativement associé à une augmentation de l'expression de *P2RY1* dans les îlots et à une diminution du risque de DT2, tandis qu'un autre groupe de SNP (n=51) était significativement associé à une diminution de l'expression de *P2RY1* dans les îlots humains et à une augmentation du risque de DT2. Dans des cellules bêta Humaine (EndoCBH5), des expériences de sécrétion d'insuline (GSIS) ont montré que l'agoniste spécifique de *P2RY1*, MRS2365, entraînait une augmentation de 40 % de la sécrétion d'insuline lorsque les cellules étaient stimulées par 20 mM de glucose. Alors que l'inhibition de *P2RY1* entraînait une diminution de 25% de la sécrétion d'insuline. Une analyse transcriptomique (par séquençage d'ARN) de la voie *P2RY1* dans les cellules EndoCBH5 en réponse à l'agoniste MRS2365 a démontré que l'activation de *P2RY1* entraînait une diminution de l'expression de *TXNIP*.

Nos études génétiques, génomiques fonctionnelles et pharmacologiques suggèrent que la dysfonction de *P2RY1* est causalement associée au risque de DT2 et que *P2RY1* contribue à l'activation de la voie de sécrétion d'insuline. Des agonistes spécifiques et puissants de *P2RY1* qui ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique sont disponibles et pourraient être testés en tant que nouvelle classe potentielle d'insulinosécréteurs.

## ABSTRACT

Genome-wide association studies (GWAS) have shown that the P2RY1 locus is associated with type 2 diabetes (T2D) risk and with glucose levels. P2RY1 is a G-protein coupled receptor (GPCR) activated by ATP and ADP, which is highly expressed in pancreatic islets, particularly in  $\beta$  cells where, ATP/ADP stimulate insulin secretion by activating the ATP-dependent potassium channels. Through functional genetics, we aimed to analyze the putative contributions of genetic variants of P2RY1 to T2D risk and to other metabolic traits. We then characterized the downstream signaling pathways of P2RY1 in human pancreatic beta cells and deciphered its putative role in insulin secretion.

P2RY1 was sequenced in 9,266 adults including cases with T2D and normal glucose controls. To assess the functional effect of each identified variant, we performed 1) luciferase assays (NFAT-RE system) on HEK293 cells overexpressing each variant, followed by P2RY1 activation by increasing doses of MRS2365 (methanocarpa-2MeSADP) that is a specific agonist of P2RY1, and 2) immunofluorescence to assess cellular localization and expression of each mutant. We also performed expression quantitative trait loci (eQTL) analysis in 103 donors based on RNA-seq of pancreatic islets and DNA microarrays genotyping. In human pancreatic  $\beta$  cells (EndoCBH5), we performed glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) assays coupled to P2RY1 activation by MRS2365 or inhibition by MRS2500.

We identified 22 rare missense variants in P2RY1 (including 10 novel variants). Our in vitro analyses highlighted 7 loss-of-function mutations. 87% of the mutation carriers presented with T2D. Expression QTL analyses showed that a block of single nucleotide polymorphisms (SNPs;  $n=63$ ) located in an enhancer of human islets was significantly associated with increased islet expression of P2RY1 and decreased T2D risk while another block of SNPs ( $n=51$ ) was significantly associated with decreased expression of P2RY1 in human islets and increased T2D risk. In EndoCBH5, the GSIS assay showed that the P2RY1 specific agonist MRS2365 led to a 30% increase of insulin secretion when stimulated with 20mM of glucose. A transcriptomic analysis (through RNA sequencing) of the P2RY1 pathway in the EndoCBH5 cells in response to MRS2365 agonist revealed that the activation of P2RY1 led to a decrease in the expression of TXNIP.

Our genetic, functional genomic and pharmacological studies suggest that P2RY1 dysfunction is causatively associated with T2D risk and that P2RY1 contributes to the activation of the insulin secretion pathway. P2RY1 potent and selective agonists that cannot cross the blood-brain barrier are available, and could be tested as a potential new class of insulin secretagogues.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABCC8 : ATP binding cassette subfamily C member 8

ACC : Acétyl-CoA carboxylase

ADA : American Diabetes Association

ADIPOQ : Adiponectine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein kinase

apoB : apolipoprotéine B

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATGL : Lipase adipeuse

ATP : Adénosine triphosphate

BDM : Tampon de déssalage

BSA : Albumine de sérum bovin

C/EBP $\alpha$  : *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

CHOP : C/EBP homologous protein

ChREBP : carbohydrate-responsive element-binding protein

CoA : Coenzyme A

DAG : Diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : Désoxyribonucléotide

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de typ

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

FAS : Fatty acid synthase

FoxO : Forkhead box O

G-6-Pase : Glucose-6-phosphatase

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase



GCK : Glucokinase  
GIP : Glucose-dependent insulintropic polypeptide  
GIPR : Récepteur au GIP  
GLP-1 : Glucagon-like peptide 1  
GLP1R : Récepteur au GLP-1  
GLUT2 : Transporteur de glucose 2  
GLUT4 : Transporteur de glucose 4  
gnomAD : Genome Agregation Database Browser  
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G  
GS : Glycogène Synthase  
GSK3 : Glycogène synthase kinase 3  
GWAS : Genome-wide association studies, études d'association pangénomiques  
HbA1c : Hémoglobine glyquée  
VLDL : Very low density lipoproteins, lipoprotéines de très basse densité  
HEK293 : Human Embryonic Kidney 293  
HK2 : hexokinase II  
HNF1A/HNF-1 $\alpha$  : Hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$   
HNF1B/HNF-1 $\beta$  : Hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$   
HNF4A/HNF-4 $\alpha$  : Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$   
HSL : Lipase hormonosensible  
HSV-1 : Thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1  
hTERT : Transcriptase inverse de la télomérase humaine  
IMC : indice de masse corporelle  
INS : gène de l'insuline  
INS1 : Rat Insulinoma cell line  
IL-1 $\beta$  : interleukine-1 $\beta$   
IR : Récepteur à l'insuline  
IP3 : Inositol-1,4,5-trisphosphate  
IRS1 : Insulin receptor substrate 1  
KATP : Canal potassique ATP-dépendant  
KCNJ11 : Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11  
Kir6.2 : Inward-rectifier potassium channel 6.2

LB : Lysogeny broth  
MAFA : MAF BZIP transcription factor A  
MIN6 : Mouse Insulinoma 6 cell line  
MODY : Maturity-Onset Diabetes of the Young  
MRS2365 : (N)-methanocarba-2MeSADP  
MRS2500 : 2-iodo-N6-methyl-(N)-methanocarba-2deoxyADP  
mTORC1 : mammalian target of rapamycin complex 1  
MTP : Microsomal triglyceride Transfer Protein  
MUNC13-1 : Mammalian uncoordinated 13-1  
MUNC18-1 : Mammalian uncoordinated 18-1  
NEUROD1 : Neuronal differentiation 1  
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells  
NGS : Next-generation sequencing, séquençage de nouvelle génération  
NSF : N-ethylmaleimide sensitive fusion  
OGTT : Oral glucose tolerance test, test d'hyperglycémie par voie orale  
PBS : Phosphate buffered saline  
PC1/3 : Prohormone convertase 1/3  
PCR : Polymerase chain reaction  
PDK-1 : Phosphoinositide-dependent kinase-1  
PDX1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1  
PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxykinase  
PFK-1 : phosphofructokinase-1  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate  
PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate  
PKA : Protéine kinase A  
PKB/AKT : Protéine kinase B  
PKC : Protéine kinase C  
PLC : Phospholipase C  
PPAR $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$   
PPAR $\gamma$  : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
RaDiO : Rare variants involved in diabetes and obesity

RAB : GTPase Ras-related protein  
REVEL : Rare exome variant ensemble learner  
RPKM : Reads per kilobase million  
SDS : Sodium dodécyl sulfate  
SGLT2 : Cotransporteur sodium-glucose de type 2  
SH2 : Src homology 2  
SNAP-25 : Synaptosomal nerve-associated protein 25  
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor  
SNC : Système nerveux central  
SNP : Single-nucleotide polymorphism, polymorphisme d'un seul nucléotide  
SOC : Super optimal broth  
SREBP-1c : Sterol regulatory element binding protein 1  
SUR1 : Sulfonylurea receptor-1  
SV40LT : Simian vacuolating virus 40 large T antigen  
TBC1D1 : TRE-2/BUB2/CDC16 domain family member 1  
TBC1D4/AS160 : TRE-2/BUB2/CDC16 domain family member 4  
TCF7L2 : Transcription factor 7-like 2  
TMB : 3, 3', 5, 5'-tétraméthylbenzidine  
TNF- $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale-alpha  
TPM : Transcripts per million  
t-SNARE : Target SNARE  
TZD : Thiazolidinediones  
TXNIP : gène de la Thioredoxine  
UPR : unfolded protein response  
v-SNARE : Vesicular SNARE  
WT : Wild-type  
XBP1 : X-box binding protein 1

# INTRODUCTION


## I. LE DIABETE DE TYPE 2, UNE PANDEMIE MONDIALE ENCORE MAL TRAITEE

### A. Les différents types de diabète

Le diabète est une maladie métabolique chronique qui affecte la façon dont le corps métabolise le glucose. Il se caractérise par une élévation durable de la glycémie, ce qui peut entraîner divers problèmes de santé s'il n'est pas correctement contrôlé. D'après l'association américaine du diabète (ADA)<sup>1</sup>, le diabète existe sous plusieurs formes, les types les plus courants sont le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2) mais il existe aussi le diabète MODY et le diabète gestationnel. Ces différents types de diabète ont une cause et des conséquences qui leurs sont propres toutefois ils peuvent être diagnostiqués grâce à des marqueurs communs<sup>1</sup> (Figure 1):

- Glycémie à jeun élevée : un taux de sucre dans le sang supérieur à la normale après une période de jeûne. En général, une glycémie à jeun supérieure à 7 mmol/L à deux reprises confirme le diagnostic de diabète.
- Test de tolérance au glucose oral (OGTT) : ce test mesure la réaction du corps à une dose précise de glucose ingéré. Un résultat de glycémie supérieur à 11,1 mmol/l deux heures après la prise de glucose, peut indiquer un diabète.
- Hémoglobine A1c (HbA1c) élevée : l'HbA1c est une mesure qui reflète les niveaux moyens de glucose sanguin sur une période de 2 à 3 mois. Un taux d'HbA1c supérieur à 6,5 % est généralement utilisé pour diagnostiquer le diabète.

Pour une meilleure précision de diagnostic, ces différents marqueurs sont en général utilisés conjointement.

Test	Diabetes Should be diagnosed if ONE OR MORE of the following criteria are met	Impaired Glucose Tolerance (IGT) Should be diagnosed if BOTH of the following criteria are met	Impaired Fasting Glucose (IFG) Should be diagnosed if THE FIRST OR BOTH of the following are met
 Fasting plasma glucose	$\geq 7.0$ mmol/L (126 mg/dL)	$< 7.0$ mmol/L (126 mg/dL)	$6.1 - 6.9$ mmol/L (110 - 125 mg/dL)
or		and	
 Two-hour plasma glucose after 75g oral glucose load (oral glucose tolerance test (OGTT))	$\geq 11.1$ mmol/L (200 mg/dL)	$\geq 7.8$ and $< 11.1$ mmol/L (140-200 mg/dL)	$< 7.8$ mmol/L (140 mg/dL)
or		and if measured	
 HbA1c	$\geq 48$ mmol/mol (equivalent to 6.5%)		
or			
 Random plasma glucose in the presence of symptoms of hyperglycaemia	$\geq 11.1$ mmol/L (200 mg/dL)		

**Figure 1. Diagnostic du diabète selon les critères établis par l'ADA.**

- Le jeûne est défini comme l'absence d'apport calorique pendant au moins huit heures.
- Le test de glycémie postprandiale de deux heures doit être effectué en utilisant une dose de glucose contenant l'équivalent de 75 g de glucose anhydre dissous dans de l'eau.
- En l'absence de symptômes d'hyperglycémie, deux tests anormaux sont nécessaires pour le diagnostic du diabète sucré.
- L'Association américaine du diabète (ADA) recommande de diagnostiquer la "prédiabète" avec des valeurs d'HbA1c comprises entre 39 et 47 mmol/mol (5,7 à 6,4 %) et une glycémie à jeun altérée lorsque la glycémie à jeun est comprise entre 5,6 et 6,9 mmol/L (100 à 125 mg/dL).

Source : *International Diabetes Federation Atlas 10th edition 2021*

#### a. Le diabète de type 1 :

Le DT1 est une maladie auto-immune chronique dans laquelle le système immunitaire attaque et détruit les cellules bêta du pancréas responsables de la production d'insuline. L'insuline est une hormone essentielle à la régulation de la glycémie, car elle permet au glucose de pénétrer dans les cellules pour être utilisé comme source d'énergie. Sans insuline, le glucose s'accumule dans le sang, ce qui peut entraîner des complications.

L'étiologie précise du DT1 n'est pas complètement déterminée, toutefois il semblerait que des facteurs génétiques et environnementaux contribuent à son développement.

Le DT1 se manifeste généralement pendant l'adolescence, bien qu'il puisse survenir plus tardivement. Les symptômes courants comprennent une polyurie-polydipsie (une soif excessive ainsi qu'une miction fréquente), une perte de poids inexplicée, une fatigue excessive et une perte progressive de l'acuité visuelle. L'absence de production d'insuline par le pancréas nécessite un apport externe sous forme d'injections quotidiennes ou par l'utilisation d'une pompe à insuline pour maintenir la glycémie dans une fourchette standard.

La surveillance constante de la glycémie est essentielle pour les personnes atteintes de DT1 afin de s'assurer un apport en insuline correspondant aux besoins. Cela peut être effectué en utilisant des lecteurs de glycémie ou des systèmes de surveillance du glucose en continu<sup>2,3</sup>.

Outre la gestion de la glycémie, il est important de prendre en compte d'autres aspects du traitement du DT1, tels que l'adoption d'un régime alimentaire équilibré et l'activité physique régulière<sup>4,5</sup>. Le DT1 nécessite une attention constante et une prise en charge multidisciplinaire.

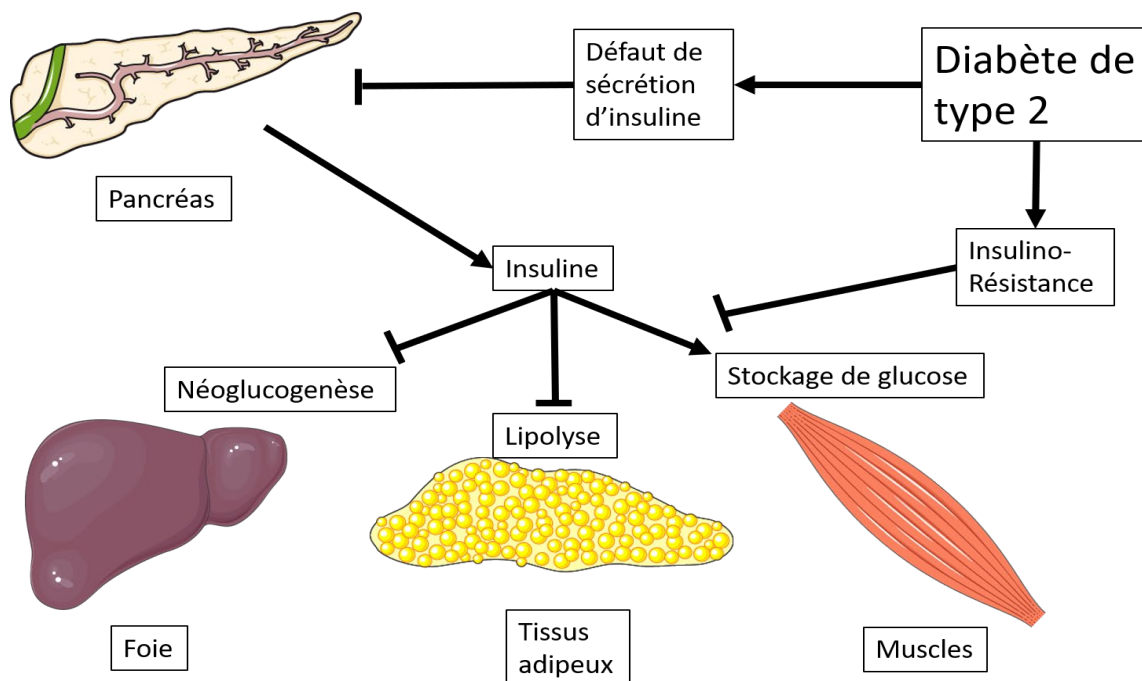
#### b. Le diabète de type 2 :

Le DT2 est une maladie métabolique complexe caractérisée par une élévation chronique de la glycémie. Cette condition se produit principalement en raison de deux facteurs interdépendants : une résistance à l'insuline et un défaut de sécrétion d'insuline (Figure 2).

La résistance à l'insuline est une situation dans laquelle les cellules deviennent moins sensibles à l'insuline. L'insuline est normalement responsable de la régulation de la glycémie en permettant aux cellules d'absorber le glucose circulant dans le sang. Lorsque les cellules deviennent résistantes à l'insuline, elles ne réagissent pas efficacement à cette hormone, ce qui entraîne une accumulation de glucose dans le sang.

En parallèle, le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline pour répondre à la demande accrue résultant de la résistance à l'insuline. Cette diminution de la sécrétion d'insuline est due à des changements au niveau des cellules bêta. Ces cellules sont responsables de la production d'insuline, mais elles peuvent devenir moins actives au fil du temps, réduisant ainsi la quantité d'insuline disponible pour réguler la glycémie (cf page 30).

Contrairement au DT1, le DT2 est souvent associé à des facteurs de risque tels que l'obésité et un mode de vie sédentaire, mais il est aussi dû à une prédisposition génétique (cf page 39). On estime que cette forme de diabète représente 90% des cas de diabète dans le monde. Le DT2 est en constante augmentation dans de nombreux pays, en particulier en raison de l'augmentation de l'obésité et du vieillissement de la population<sup>6</sup>. La prévention et le contrôle de cette maladie revêtent donc une importance cruciale. Généralement, le DT2 est dans un premier temps asymptomatique, ce qui entraîne une difficulté à le diagnostiquer. Mais au fil du temps, l'hyperglycémie peut entraîner des symptômes tels que la polyurie-polydipsie. Si la maladie n'est toujours pas diagnostiquée, alors d'autres symptômes comme des problèmes rénaux ou rétinien peuvent apparaître. Les traitements et la prise en charge du DT2 sont éayés ci-dessous (cf page 41).



**Figure 2. Étiologie du diabète : Insulino-résistance et Défaut de sécrétion**

*Il existe différents types de diabète mais le diabète de type 2 est de loin le plus représenté, puisqu'il concerne 90% des personnes diabétiques. Le diabète de type 2 est une maladie complexe et multifactorielle. Il se caractérise par un défaut de sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots de Langerhans d'une part, et par l'apparition d'une résistance à l'insuline des tissus périphériques d'autre part. Ces phénomènes ont pour effet d'inhiber le contrôle de la glycémie normalement géré par l'insuline. Au niveau des tissus périphériques, l'insulinorésistance a pour effet de lever l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique et de la lipolyse au niveau du tissu adipeux. Dans le muscle, l'insulinorésistance a pour effet d'inhiber le stockage du glucose.*

### c. Le diabète MODY :

Le diabète MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) est une forme rare de diabète qui se caractérise par une hyperglycémie due à une altération génétique. Contrairement au DT2, le diabète MODY se manifeste généralement chez les jeunes et peut être hérité de manière autosomique dominante.

Le diabète MODY présente des caractéristiques distinctives qui le différencient des autres formes de diabète. Les patients atteints de MODY présentent généralement un poids corporel normal ou légèrement élevé<sup>7</sup>.

Différents sous-types de MODY ont été identifiés, chacun étant associé à une mutation spécifique dans un gène lié à la fonction des cellules bêta du pancréas (Figure 3).

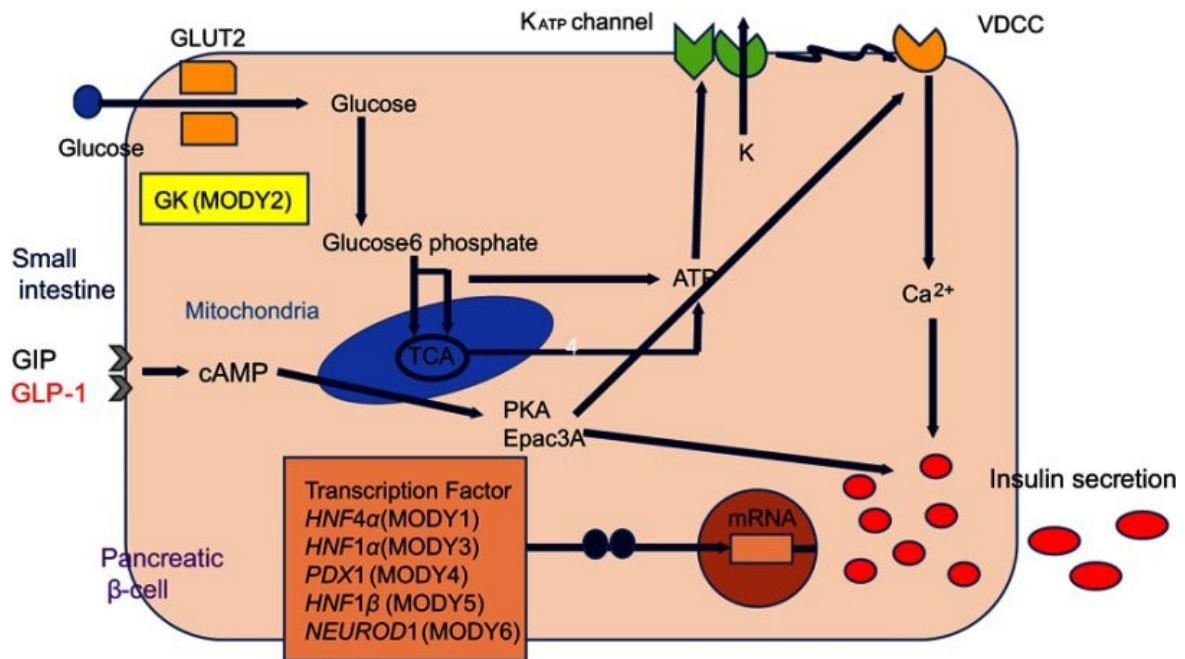
Le MODY2 est le type le plus courant et est causé par des mutations dans le gène *GCK*<sup>8</sup> qui code la Glucokinase, enzyme qui joue un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline par la cellule bêta en tant que senseur du glucose (cf page 25). Ces mutations entraînent une sécrétion réduite d'insuline, ce qui conduit à des niveaux de glucose légèrement élevés mais stables. Les personnes atteintes de MODY2 ne développent souvent pas de complications graves.

Une autre catégorie de MODY est représentée par des mutations dans des gènes de facteurs de transcription. Le MODY1 est causé par des mutations dans le gène *HNF4A*<sup>8</sup>, le MODY3 dans le gène *HNF1A*<sup>9</sup>, le MODY4 dans le gène *PDX1*<sup>10</sup>, en enfin le MODY5 dans le gène *HNF1B*<sup>11</sup>. Tous ses facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans le développement du pancréas et de la cellule bêta en particulier. *HNF4A* (MODY1) par exemple, induit notamment la transcription du gène de l'insuline et du transporteur de glucose GLUT2 qui est essentiel pour la fonction des cellules bêtas. Les individus atteints de ces types de MODY présentent une production d'insuline altérée. Ils ont souvent une glycémie élevée dès l'enfance et sont plus susceptibles de développer des complications rénales et hépatiques.

Il existe toutefois d'autres types de MODY plus rares. Le diagnostic précis du MODY nécessite des tests génétiques spécifiques pour identifier la mutation responsable. La connaissance du type de MODY dont une personne est atteinte est essentielle pour déterminer le traitement approprié. Les patients atteints d'un MODY1 ou MODY3 pourront par exemple être traités avec des sulfonylurées (cf page 42)<sup>12</sup>.

De nouvelles formes de diabète monogénique ont émergés récemment grâce aux progrès réalisés dans le diagnostic des pathologies génétiques. Certains gènes, tels que *KCNJ11*<sup>13</sup>, *ABCC8*<sup>14</sup>, et *ONECUT1*<sup>15</sup>, illustrent des exemples de gènes dont les mutations peuvent être responsables, de manière dominante ou récessive, de formes atypiques de diabète, notamment le diabète néonatal et les diabètes syndromiques.





**Figure 3. Expression des gènes responsables du diabète de type MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) dans les cellules bêtas du pancréas et mécanisme de sécrétion d'insuline.**

*Différents sous-types de MODY sont associés à des mutations spécifiques dans des gènes liés à la fonction des cellules bêta du pancréas. Le MODY2, le plus courant, est causé par des mutations dans le gène GCK, affectant la sécrétion d'insuline. D'autres types de MODY résultent de mutations dans des gènes de facteurs de transcription essentiels au développement du pancréas.*

Abréviations : ATP, adénosine triphosphate ; cAMP, adénosine 3',5'-monophosphate cyclique ; PKA, protéine kinase A ; Epac, protéine d'échange directement activée par le cAMP ; canal K<sub>ATP</sub>, canal potassique sensible à l'ATP ; VDCC, canal calcique dépendant du voltage ; GCK, glucokinase ; HNF4α, facteur nucléaire hépatocytaire 4α ; HNF1α, facteur nucléaire hépatocytaire 1α ; PDX1, pancréatique et duodéal homeobox 1 ; HNF1β, facteur nucléaire hépatocytaire 1β ; NEUROD1, différenciation neurogénique 1.

Source : Urakami, T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes* 12, 1047–1056 (2019).

#### d. Le diabète gestationnel :

Le diabète gestationnel est une forme de diabète qui se développe pendant la grossesse. Il est caractérisé par une hyperglycémie, et survient généralement entre la 24<sup>e</sup> et la 28<sup>e</sup> semaine de grossesse. Le diabète gestationnel est un problème de santé courant et il est important de le dépister et de le prendre en charge correctement pour prévenir les complications pour la mère et le bébé à naître. Le diabète gestationnel est répandu dans le monde entier et est associé à des facteurs de risque tels que l'obésité, l'âge avancé, les antécédents familiaux de diabète et l'hypertension<sup>16</sup>.

Le diabète gestationnel peut avoir des conséquences pour la mère et le fœtus. Les femmes atteintes de diabète gestationnel ont un risque accru de développer un DT2 plus tard dans la vie. De plus, le diabète gestationnel peut entraîner des complications pendant la grossesse, telles que l'hypertension artérielle, la prééclampsie et un accouchement prématuré. Pour le bébé, le diabète gestationnel peut entraîner une macrosomie (c'est-à-dire un bébé de poids élevé à la naissance), un risque accru de traumatisme à la naissance, d'hypoglycémie néonatale et de développement ultérieur de l'obésité et du DT2<sup>17,18</sup>.

La prise en charge du diabète gestationnel implique généralement des modifications du mode de vie, telles qu'une alimentation saine et équilibrée et l'augmentation de l'activité physique. Dans certains cas, l'insuline ou d'autres médicaments antidiabétiques peuvent être nécessaires pour maintenir la glycémie sous contrôle, toutefois dans d'autres cas, l'adoption d'un régime alimentaire spécifique peut aider à contrôler la glycémie chez les femmes atteintes de diabète gestationnel.

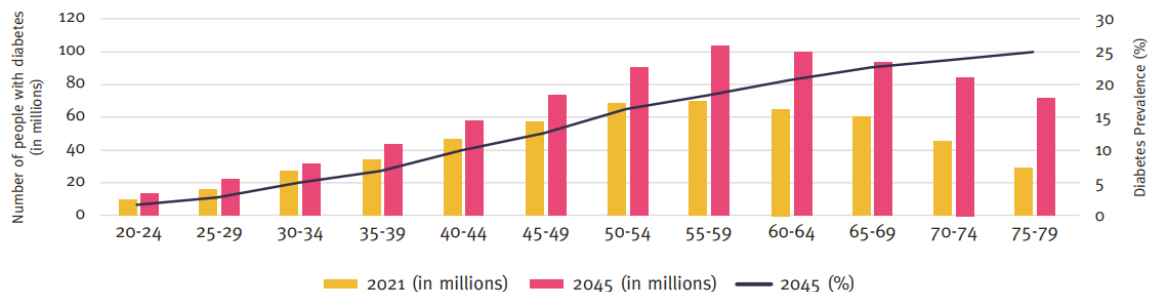
La thématique de mon sujet de thèse portant uniquement sur le DT2, les détails de cette maladie seront spécifiquement approfondis dans la suite de l'introduction.

## B. Épidémiologie du diabète de type 2

Le DT2 est devenu un problème de santé publique mondial. Cette maladie métabolique chronique, est en constante augmentation en raison de facteurs tels que l'obésité et le mode de vie moderne. Comprendre son épidémiologie est crucial pour mettre en place des stratégies de prévention et de gestion efficaces.

### a. Prévalence du diabète de type 2 :

Le DT2 est une maladie chronique qui représente une préoccupation majeure de santé publique à l'échelle mondiale. Depuis 1980, le nombre de personnes atteintes de DT2 dans le monde a considérablement augmenté, passant de 108 millions à 507 millions en 2021<sup>19-21</sup>. Cette augmentation significative de la prévalence est principalement attribuée à des facteurs tels que l'obésité, le vieillissement de la population, l'urbanisation et le mode de vie sédentaire. De plus, les tendances de prévalence du DT2 ont évolué au fil du temps, avec une augmentation observée chez les adultes de tous les groupes d'âge, notamment chez les jeunes adultes<sup>22,23</sup> (Figure 4).



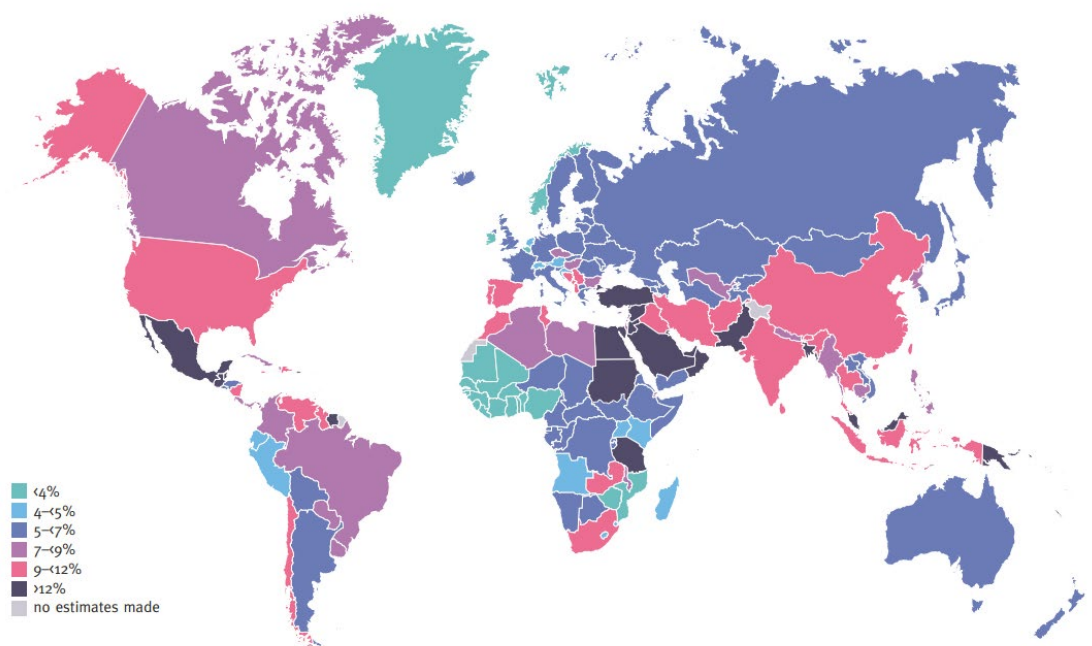
**Figure 4. Nombre de personnes atteintes de diabète chez les adultes (20-79 ans) par groupe d'âge en 2021 (colonnes) et prévalence estimée selon les groupes d'âge en 2045 (ligne noire).**

*Le diabète est l'une des maladies dont la prévalence est la plus élevée dans le monde, on estime que d'ici 2050, le diabète sera la maladie la plus répandue. En effet, à l'heure actuelle, la prévalence du diabète dans le monde est de 11%, mais les prévisions indiquent une augmentation de 46% d'ici 2045.*

*Cette tendance est due à plusieurs facteurs, notamment une augmentation de l'obésité à l'échelle mondiale, mais aussi au vieillissement de la population. Les 55-59 ans sont la tranche d'âge la plus touchée à l'heure actuelle, mais les 75-79 ans sont ceux dont la prévalence risque le plus d'augmenter dans les années à venir.*

Source : International Diabetes Federation Atlas 10th edition 2021

La prévalence du DT2 présente des variations significatives d'une région géographique à une autre. La Polynésie affiche la prévalence la plus élevée, tandis que l'Afrique Subsaharienne présente la prévalence la plus faible (Figure 5). Ces variations sont le résultat de l'interaction complexe entre des facteurs génétiques, environnementaux et socio-économiques.



**Figure 5. Prévalence du diabète chez les adultes (20-79 ans) en 2021 dans le monde.**

*La prévalence du diabète de type 2 (DT2) varie significativement d'une région géographique à une autre, la Polynésie affichant la prévalence la plus élevée, tandis que l'Afrique subsaharienne présente la plus faible. Ces disparités résultent d'une interaction complexe entre des facteurs génétiques, environnementaux et socio-économiques.*

Source : *International Diabetes Federation Atlas 10th edition 2021*

Les facteurs génétiques jouent un rôle important dans la prédisposition au DT2. Certaines populations peuvent présenter des prédispositions génétiques qui augmentent leur vulnérabilité à la maladie. Des variations dans les profils génétiques des populations peuvent expliquer en partie les différences de prévalence observées<sup>24</sup>.

De plus, les facteurs environnementaux tels que les différences dans les modes de vie, les pratiques alimentaires et les niveaux d'activité physique entre les régions géographiques, contribuent aux variations observées.

Enfin, les différences socio-économiques jouent un rôle important dans la prévalence du DT2. Les inégalités socio-économiques peuvent avoir un impact sur l'accès aux soins de santé, la disponibilité d'aliments sains et les opportunités d'activité physique<sup>25</sup>. Les régions avec des conditions socio-économiques défavorables peuvent présenter une prévalence plus élevée en raison d'un accès limité aux ressources et aux services nécessaires pour prévenir et gérer le DT2.

Il est essentiel de comprendre la prévalence du DT2 pour mettre en place des politiques de santé appropriées et des programmes de prévention. La prévention du DT2 repose sur des interventions telles que la promotion de modes de vie sains, l'éducation sur la nutrition et l'activité physique, ainsi que la sensibilisation aux facteurs de risque.

b. Facteurs de risque :

Les facteurs de risque jouent un rôle majeur dans le développement du DT2. Par exemple, comme évoqué plus haut, l'obésité et le surpoids sont étroitement liés à l'apparition de cette maladie. Des études ont démontré une augmentation significative du risque de DT2 avec l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC)<sup>26</sup>. L'obésité abdominale, caractérisée par un excès de graisse autour de la taille, est également un facteur de risque indépendant pour le développement du DT2.

Une alimentation déséquilibrée, riche en sucres et en graisses saturées<sup>27</sup>, est également associée à un risque accru de DT2. Les graisses saturées et les acides gras trans peuvent induire une résistance à l'insuline et contribuer au développement de la maladie.

La sédentarité et le manque d'activité physique sont également des facteurs de risque importants du DT2<sup>28</sup>. Une augmentation de l'activité physique est en effet liée à une réduction significative du risque de développer la maladie. L'inactivité physique contribue à la prise de poids, et donc à la résistance à l'insuline.

Par ailleurs, si un individu a des antécédents familiaux de DT2, son risque de développer la maladie est plus élevé de 40 à 75% par rapport à quelqu'un sans antécédents familiaux (dépendamment si un ou deux parents sont atteints)<sup>29,30</sup>. Une pléthore de gènes ont été trouvés associés au risque de DT2<sup>31,32</sup>. Il n'y a pas un seul gène responsable de la maladie, mais plutôt plusieurs gènes contribuant à la susceptibilité globale. Il est important de noter que l'hérédité ne signifie pas que le DT2 est entièrement déterminé par les gènes (cf page 39).

Les facteurs environnementaux, tels que les habitudes alimentaires et l'activité physique influencent également la prévalence du DT2. L'un des facteurs environnementaux les plus importants est le mode de vie. Une alimentation riche en calories, en sucres ajoutés et en graisses saturées peut contribuer à l'obésité, un facteur de risque majeur du DT2. De plus, le manque d'activité physique, liée à des modes de vie de plus en plus sédentaires, favorise la prise de poids et la résistance à l'insuline.

Enfin, l'âge constitue un facteur de risque majeur du DT2. Le vieillissement de la population a un impact direct sur l'augmentation de la prévalence des patients atteints de DT2. Avec l'âge, les individus ont tendance à réduire leur activité physique et à prendre du poids, ce qui est, entre autres associé à des changements hormonaux.

#### c. Prévention et prise en charge :

La prévention et la gestion du DT2 sont des éléments clés pour réduire l'impact de cette maladie chronique.

La prévention du DT2 repose en premier lieu sur la promotion d'un mode de vie sain et la sensibilisation aux facteurs de risque<sup>33</sup>. Adopter une alimentation saine, pratiquer régulièrement une activité physique et maintenir un poids de santé sont des mesures efficaces pour prévenir le DT2<sup>34</sup>.

La prise en charge médicale du DT2 implique souvent un traitement pharmacologique, un régime alimentaire adapté, l'exercice d'une activité physique régulière et un suivi continu. Différentes classes de médicaments, tels que les antidiabétiques oraux et les injections d'insuline, sont utilisées pour contrôler la glycémie<sup>35</sup> (cf page 41).

L'éducation des patients joue un rôle crucial dans la prévention et la prise en charge du DT2. Les programmes d'éducation structurés et personnalisés sont associés à une amélioration significative du contrôle de la glycémie. Le soutien psychosocial et le suivi régulier par des professionnels de la santé sont également importants pour aider les patients à gérer leur DT2 de manière optimale.

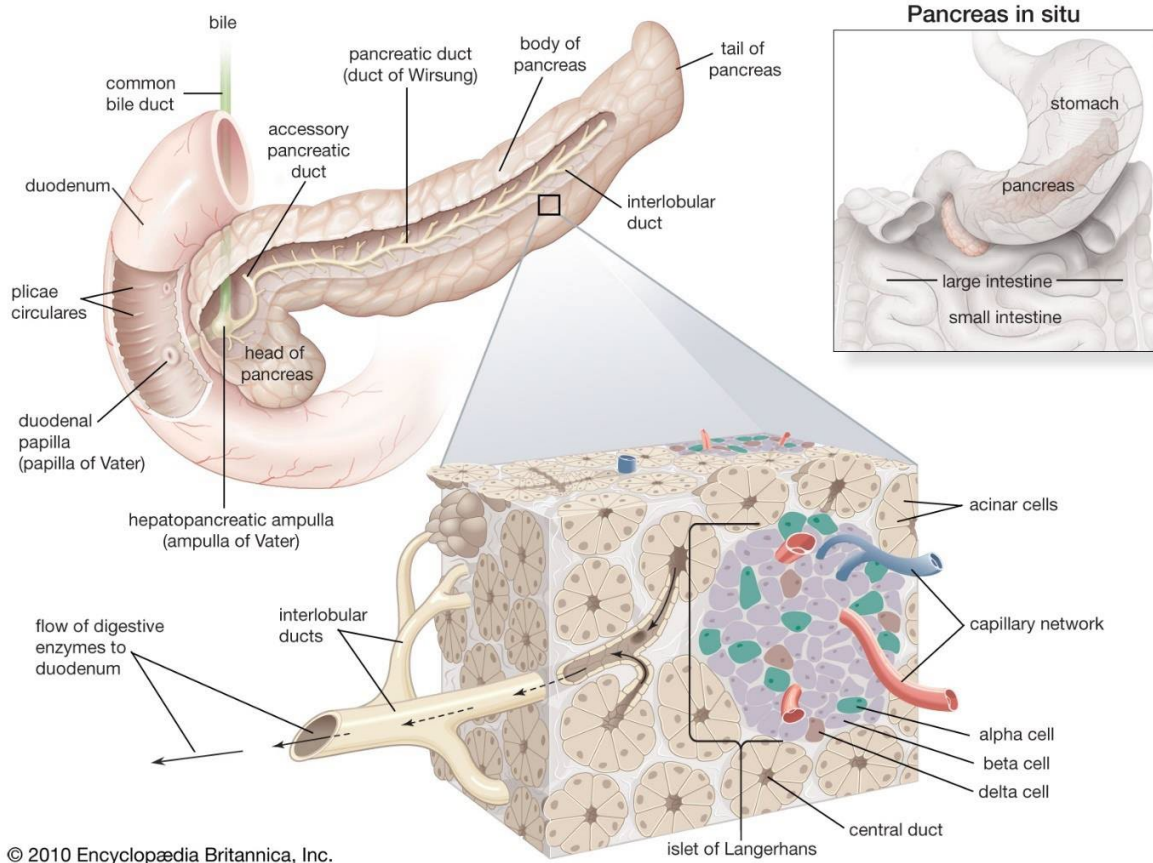
## **C. Physiopathologie du Diabète de Type 2 : rôle crucial de la sécrétion d'insuline dans l'homéostasie glucidique**

### **a. Défaut de sécrétion d'insuline :**

Le défaut de sécrétion d'insuline par les cellules bêta dans les îlots pancréatiques joue un rôle central dans les mécanismes sous-jacents du DT2<sup>36</sup>.

Localisation des cellules bêtas :

Les îlots de Langerhans sont des agrégats cellulaires dispersés dans le tissu pancréatique. Ils tirent leur nom de l'histologiste allemand Paul Langerhans, qui les a découverts en 1869. Ils constituent le pancréas endocrine représentant 1 à 2% du pancréas total (Figure 6). Chaque îlot de Langerhans est composé de différents types de cellules, dont les principales sont les cellules bêta (50 à 60 %), les cellules alpha (30 à 50 %), et les cellules delta (moins de 5 %)<sup>37</sup> (Figure 7). Parmi ces types cellulaires, les cellules bêta sont les plus abondantes et jouent un rôle crucial dans la régulation de la glycémie. Les cellules bêta sont organisées de manière à faciliter leur fonction hormonale<sup>38</sup>. Elles sont en contact étroit avec les vaisseaux sanguins, ce qui permet une libération rapide de l'insuline dans la circulation sanguine après la sécrétion<sup>39</sup>. Sur le plan structurel, les cellules bêta sont de petites cellules mesurant généralement entre 10 et 15 micromètres de diamètre. Elles possèdent un noyau volumineux et un cytoplasme abondant rempli de granules d'insuline stockées à proximité de la membrane plasmique. Ces granules contiennent de grandes quantités d'insuline, prêtes à être libérées en réponse à une élévation de la glycémie<sup>40</sup>.

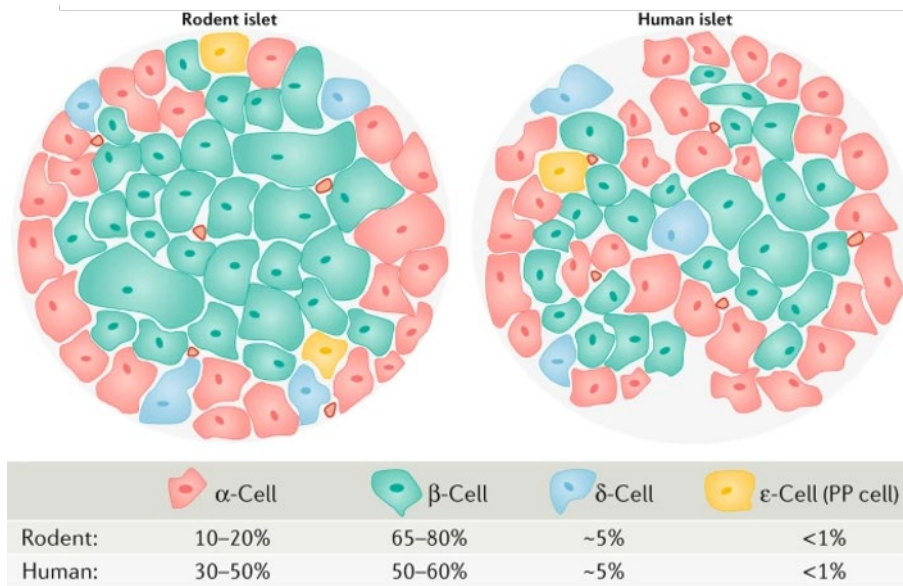


**Figure 6. Structure et organisation du pancréas.**

*Le pancréas humain est un organe situé derrière l'estomac. Sa structure est divisée en deux parties principales : la tête, qui s'articule avec le duodénum, et la queue, qui s'étend vers la rate. Au sein de sa structure, on trouve des cellules exocrines responsables de la production d'enzymes digestives, ainsi que des îlots de Langerhans, qui sécrètent des hormones, dont l'insuline et le glucagon.*

Source : Encyclopædia Britannica 2010





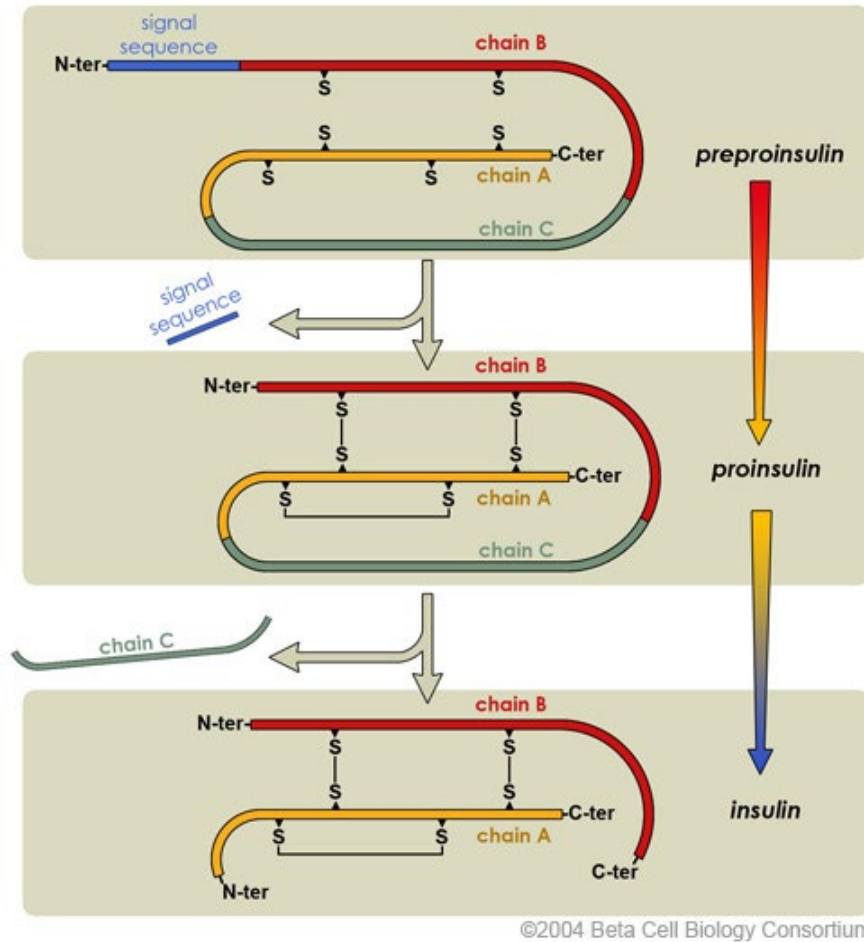
**Figure 7. Structure et composition de l'îlot de langerhans.**

*Les îlots de Langerhans, structures microscopiques nichées au sein du tissu pancréatique, sont composés de différents types de cellules endocrines. Les principales cellules comprennent les cellules alpha, sécrétant le glucagon, les cellules bêta, responsables de la production d'insuline, les cellules delta, produisant la somatostatine, et les cellules PP, qui synthétisent le polypeptide pancréatique.*

*Source : Campbell, J. E. & Newgard, C. B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. Nat Rev Mol Cell Biol 22, 142–158 (2021).*

Production d'insuline par les cellules bêta :

La production et la sécrétion d'insuline est exclusive aux cellules bêta pancréatiques. C'est pour cette raison qu'elles ont un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie. La biosynthèse de l'insuline est stimulée par une augmentation de la concentration en glucose intracellulaire. La préproinsuline est codée par le gène *INS*<sup>41</sup>. Le peptide signal de la préproinsuline est ensuite clivé pour produire la proinsuline qui contient les chaînes A et B reliées par le peptide C. La proinsuline subit ensuite son repliement et la formation des 3 ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique. Dans le Golgi, la proinsuline est clivée par la Proprotein convertase 1 (PC1/3) codée par le gène *PCSK1*<sup>42</sup>, générant l'insuline mature et le peptide C (Figure 8). Ces deux éléments sont stockés ensemble dans les vésicules de sécrétion, présents à la membrane des cellules bêta pancréatiques. L'insuline et le peptide C sont libérés ensemble lors de l'exocytose des vésicules.



**Figure 8. Clivage à partir de la preproinsuline jusqu'à l'insuline.**

La préproinsuline est produite à partir du gène *INS*, puis elle subit des étapes de clivage pour former la proinsuline, qui contient les chaînes A et B reliées par le peptide C. La proinsuline est ensuite repliée, formant des ponts disulfures dans le réticulum endoplasmique. Dans le Golgi, la proinsuline est clivée par la Proprotéin convertase 1 (PC1/3) issue du gène *PCSK1*, générant l'insuline mature et le peptide C. Ces deux composants sont stockés dans les vésicules de sécrétion des cellules bêta pancréatiques et sont libérés ensemble lors de l'exocytose des vésicules.

Sources : Beta Cell Biology Consortium ([http://www.betacell.org/images/CMS/insulin-maturation\\_01\\_w500.jpg](http://www.betacell.org/images/CMS/insulin-maturation_01_w500.jpg))

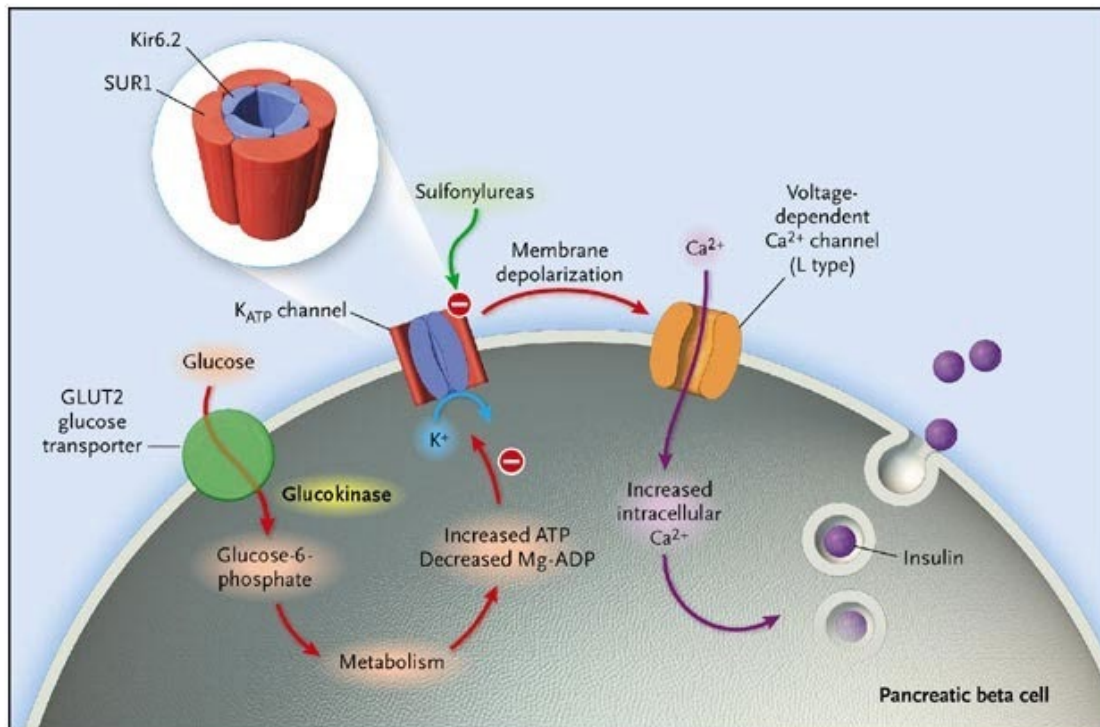
Les différentes phases de la sécrétion d'insuline :

Phase précoce de la sécrétion d'insuline :

La phase précoce de la sécrétion d'insuline est un processus essentiel dans la régulation de la glycémie. Lorsque la concentration de glucose augmente dans le sang, les cellules bêta détectent ce changement et répondent en libérant rapidement de l'insuline.

Lorsque le glucose pénètre dans les cellules bêta via le transporteur du glucose de type 2 (GLUT2)<sup>43,44</sup> codé par le gène *SLC2A2*<sup>43</sup>, il subit une série de réactions métaboliques qui conduisent à la production d'Adénosine triphosphate (ATP) et à la régulation de la sécrétion d'insuline. Dans un premier temps le glucose est phosphorylé par la glucokinase (GCK)<sup>45</sup>, formant ainsi du glucose-6-phosphate. Ce dernier est ensuite converti en fructose-6-phosphate par une réaction d'isomérisation. Le fructose-6-phosphate est ensuite phosphorylé par la phosphofructokinase-1 (PFK-1)<sup>46</sup>, ce qui forme le fructose-1,6-bisphosphate. Cette étape est essentielle pour la glycolyse, une voie métabolique qui aboutit à la production de pyruvate qui est un substrat essentiel du cycle de Krebs. Le cycle de Krebs, permet la production d'ATP à partir du pyruvate et d'autres métabolites issus de la glycolyse. Les niveaux élevés d'ATP induisent la fermeture des canaux potassiques ATP-sensibles ( $K_{ATP}$ ), en particulier le canal Kir6.2 (codé par *KCNJ11*)<sup>47</sup> et ses sous-unités régulatrices SUR1 (codées par *ABCC8*)<sup>48</sup>, qui sont présents sur la membrane plasmique des cellules bêta<sup>49</sup>. Cette fermeture des canaux  $K_{ATP}$  provoque la dépolarisation de la membrane cellulaire. Cela déclenche alors l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage, en particulier les canaux de type P/Q et N<sup>49</sup>. Ces canaux sont sensibles aux changements du potentiel de membrane et permettent une entrée massive de calcium ( $Ca^{2+}$ ) dans la cellule bêta. L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire est un événement clé dans la signalisation intracellulaire qui conduit à la libération des vésicules d'insuline par exocytose<sup>49</sup> (Figure 9). L'insuline est alors libérée dans la circulation sanguine. Outre le calcium, d'autres messagers intracellulaires jouent un rôle essentiel dans la signalisation conduisant à la libération d'insuline. Lorsque le glucose est métabolisé dans les cellules bêta, cela entraîne une augmentation des niveaux d'ATP qui déclenche la production de deux seconds messagers intracellulaires : l'Adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et l'inositol triphosphate (IP3). L'AMPc agit comme un médiateur du signal en activant la protéine kinase A (PKA). Lorsqu'elle est activée, la PKA conduit à la fermeture des canaux potassiques dépendants de l'ATP puis à l'entrée de calcium dans la cellule bêta qui déclenche finalement la libération des vésicules d'insuline par exocytose<sup>50</sup>.

Parallèlement à l'AMPc, l'augmentation des niveaux d'ATP entraîne également la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). Ces deux seconds messagers sont impliqués dans une autre voie de signalisation qui contribue également à la libération d'insuline. L'IP3 stimule la libération du calcium à partir du réticulum endoplasmique, ce qui augmente la concentration de calcium intracellulaire. Le DAG, quant à lui, active la protéine kinase C (PKC), une enzyme qui joue un rôle crucial dans la fusion des vésicules contenant de l'insuline avec la membrane cellulaire, entraînant ainsi la libération de l'insuline<sup>51</sup>.



**Figure 9. Phase précoce de la sécrétion d'insuline.**

*Lorsque la concentration de glucose augmente dans le sang, les cellules bêta réagissent en libérant de l'insuline pour réguler la glycémie. Le glucose qui pénètre dans les cellules bêta est métabolisé par la glucokinase produisant ainsi de l'ATP. Les niveaux élevés d'ATP entraînent la fermeture des canaux potassiques ATP sensibles, provoquant la dépolarisation de la membrane cellulaire. Cela permet l'ouverture des canaux calciques, permettant l'entrée de calcium dans la cellule bêta, processus final déclenchant la libération d'insuline par exocytose.*

*Source : Gloyn, A. L. et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. N Engl J Med 350, 1838–1849 (2004).*

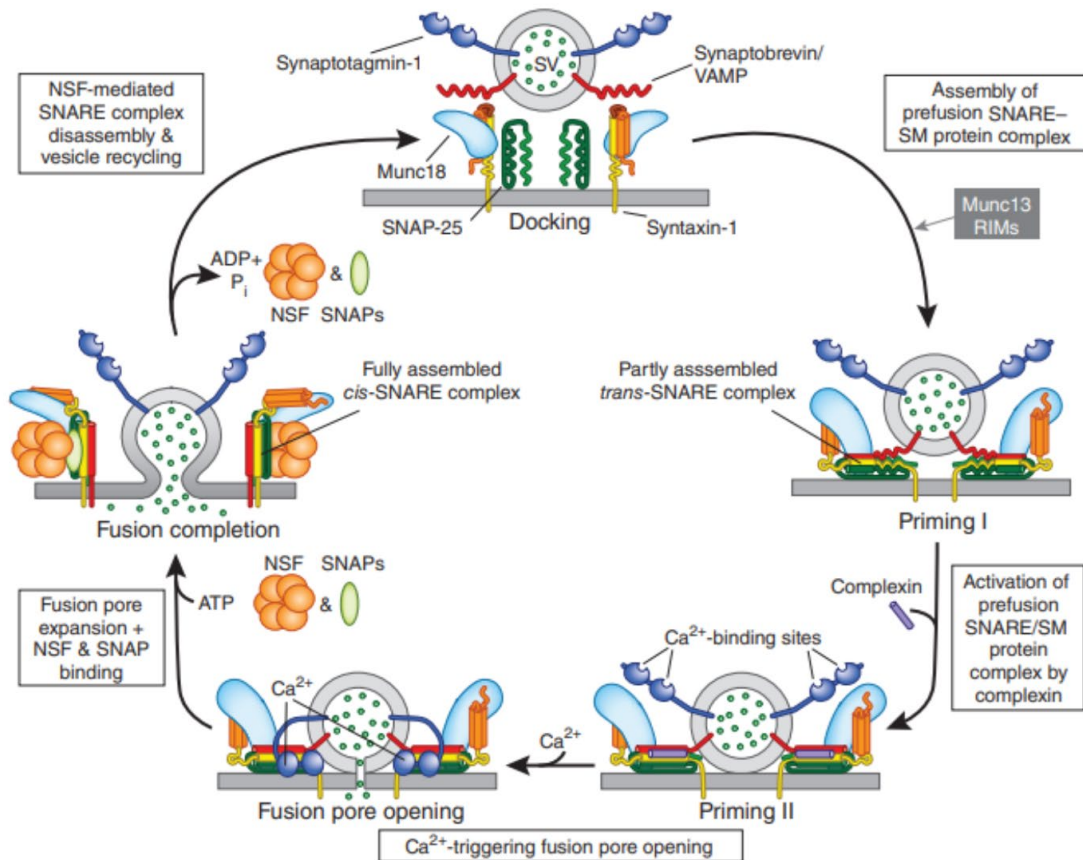
L'élévation de la concentration d'ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracellulaires déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline. Ce processus exploite les protéines *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE).

Les protéines SNARE sont divisées en protéines v-SNARE, présentes sur les vésicules de sécrétion, et en protéines t-SNARE, situées sur la membrane plasmique des cellules bêta. Les protéines SNARE impliquées dans l'exocytose de l'insuline sont la protéine v-SNARE synaptobrevine transmembranaire et les protéines t-SNARE syntaxine-1/4 transmembranaires et synaptosomal nerve-associated protein 25 (SNAP-25). Les protéines accessoires mammalian uncoordinated-18-1 et 13-1 (MUNC18-1 et MUNC13-1) ainsi que la synaptotagmine sont aussi essentielles au processus d'exocytose<sup>52</sup>.

L'étape d'arrimage est caractérisée par la liaison de la protéine MUNC18-1 à la syntaxine, maintenant cette dernière en position fermée et empêchant la formation du complexe SNARE. L'étape d'amorçage implique l'interaction entre MUNC13-1 et MUNC18-1, permettant à la syntaxine de passer de l'état fermé à l'état ouvert. Une fois ouverte, la syntaxine se lie à la protéine SNAP-25 et à la synaptobrevine, formant un complexe trans-SNARE composé de 4 hélices  $\alpha$ . Le resserrage de ce complexe SNARE rapproche la membrane de la vésicule et la membrane plasmique en générant de l'énergie<sup>52</sup>.

L'influx massif d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  active la synaptotagmine, une protéine sensible au  $\text{Ca}^{2+}$ . Celle-ci entre en compétition avec la complexine pour se lier au complexe SNARE, favorisant ainsi la formation du pore de fusion entre les membranes. Après la fusion membranaire, le complexe SNARE se retrouve sur une seule membrane. Il est ensuite désassemblé à l'aide de l'ATPase N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) et de la protéine SNAP- $\alpha$ , permettant le recyclage des protéines SNARE pour les futures exocytoses<sup>52</sup> (Figure 10).

Ce mécanisme d'exocytose des vésicules d'insuline par les cellules bêta est crucial pour la régulation précise de la glycémie dans l'organisme car elle est l'étape qui va permettre à l'insuline de pénétrer dans la circulation sanguine.



**Figure 10. Mécanisme de fusion des vésicules d'insuline à la membrane plasmique.**

*L'augmentation du calcium intracellulaire déclenche l'utilisation de protéines SNARE pour fusionner les vésicules d'insuline avec la membrane cellulaire. Les étapes impliquent l'arrimage, l'amorçage, la fusion membranaire, et le désassemblage du complexe SNARE. Ce mécanisme a pour effet de libérer l'insuline dans la circulation sanguine.*

Source : Südhof, T. C. A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat Med* 19, 1227–1231 (2013).

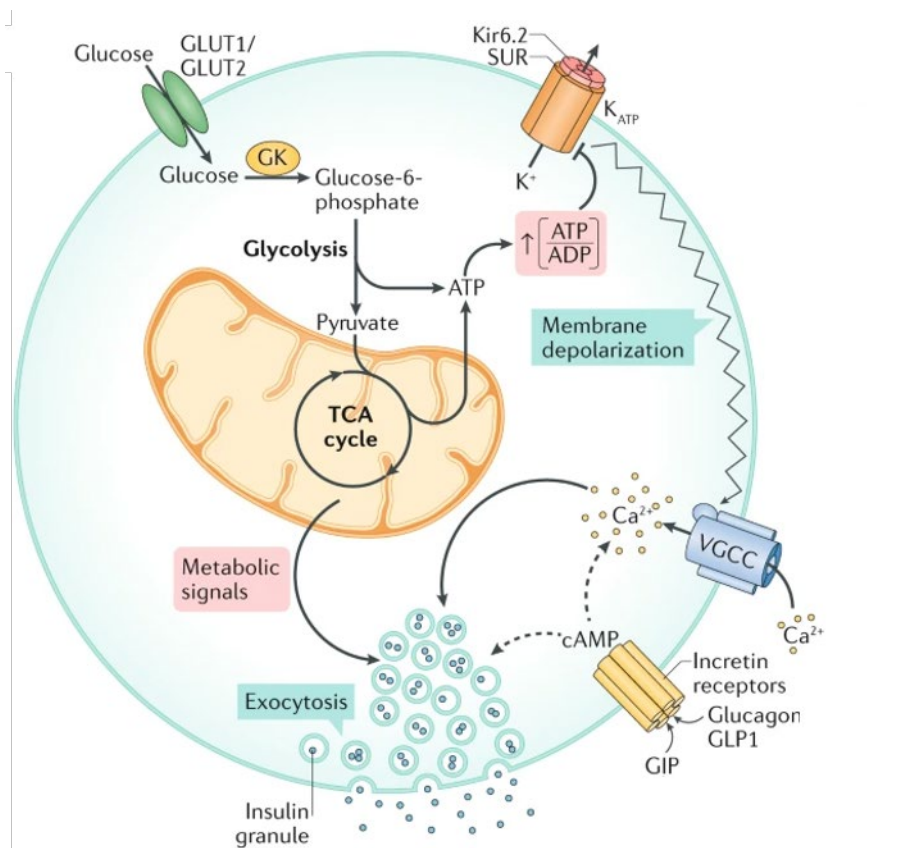
Phase tardive de la sécrétion d'insuline :

La phase tardive de la sécrétion d'insuline est une composante importante du maintien de la glycémie à un niveau basal, c'est-à-dire entre les repas et pendant les périodes de jeûne. Contrairement à la phase précoce de la sécrétion d'insuline, qui est déclenchée par l'augmentation rapide de la concentration de glucose dans le sang, la phase tardive repose sur un mécanisme plus complexe et subtil pour assurer que le taux de glucose reste stable entre les repas.

Les incrétines, notamment le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)<sup>53,54</sup> et le Peptide insulino-dépendant du glucose (GIP)<sup>55,56</sup>, jouent un rôle essentiel dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse à l'ingestion de nutriments, en particulier de glucose (Figure 11).

Lorsque nous consommons des aliments, le glucose présent dans notre système digestif stimule les cellules endocrines à sécréter à la fois le GLP-1 et le GIP. Ces hormones sont ensuite transportées dans le sang jusqu'au pancréas, où elles exercent leurs effets sur les cellules bêta.

Le récepteur du GLP-1 est un récepteur couplé à une protéine G (GPCR) de type Gs. Une fois le récepteur activé, la protéine Gs stimule une enzyme appelée adénylate cyclase, qui joue un rôle crucial dans la régulation de la sécrétion d'insuline qui entraînera la conversion de l'ATP en AMPc. L'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaires étant un signal clé qui déclenche une série d'événements intracellulaires aboutissant à la sécrétion des vésicules d'insuline.



**Figure 11. Phase tardive de la sécrétion d'insuline.**

*La sécrétion d'insuline est un processus finement régulé, et d'autres facteurs que ceux utilisés dans la phase précoce entrent en jeu. Parmi eux, les récepteurs couplés aux protéines G sont apparus comme un moyen supplémentaire d'induire la sécrétion d'insuline en réponse à la production d'incrétine, par exemple.*

*Source : adaptée de : Campbell, J. E. & Newgard, C. B. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. Nat Rev Mol Cell Biol 22, 142–158 (2021).*

La phase céphalique de la sécrétion d'insuline :



La phase céphalique de la sécrétion d'insuline joue un rôle essentiel dans la régulation précoce de la glycémie avant même que les nutriments issus de l'alimentation soient absorbés dans le sang. Le système nerveux autonome et les signaux neurologiques sont au cœur de cette régulation fine de la sécrétion d'insuline.

Lorsque nous anticipons un repas ou que nous commençons à manger, des signaux neurologiques sont transmis depuis le cerveau vers le pancréas par le biais du système nerveux autonome. Le système sympathique et le système parasympathique ont des effets opposés sur la sécrétion d'insuline par les cellules bêta.

Le système parasympathique est principalement responsable de la stimulation de la sécrétion d'insuline pendant la phase céphalique<sup>57,58</sup>. Lorsque nous anticipons un repas, les nerfs parasympathiques transmettent des signaux vers le pancréas, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline indépendamment de la glycémie. Cette stimulation précoce de la sécrétion d'insuline prépare l'organisme à l'absorption des nutriments et à la régulation de la glycémie.

En revanche, le système sympathique exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion d'insuline pendant la phase céphalique<sup>59,60</sup>. Dans des situations de stress ou d'activité physique intense, le système sympathique est activé, et cela entraîne une libération d'adrénaline. L'adrénaline inhibe la sécrétion d'insuline, ce qui permet une augmentation de la glycémie pour répondre à une demande énergétique accrue.

La réponse insulinaire anticipée, peut être activée en réponse à la simple anticipation visuelle, olfactive ou gustative des aliments. La vue, l'odeur et le goût des aliments peuvent influencer la sécrétion d'insuline avant même que les aliments ne soient consommés.

La défaillance pancréatique au cours du diabète de type 2 :

Les mécanismes moléculaires en jeu dans le développement de la pathologie au niveau pancréatique sont complexes et variés, et peuvent toucher toutes les voies indiquées ci-dessus<sup>61,62</sup>. De manière frappante, la majorité des gènes de susceptibilité du DT2 identifiés par les études d'association pangénomique (GWAS) ainsi les gènes impliqués dans les formes monogéniques de diabète touchent ces voies cruciales de la cellule bêta pancréatique<sup>63</sup>. De plus le diabète est souvent associé à des conditions lipotoxiques dans plusieurs tissus notamment les cellules bêta, elles sont sensibles aux taux élevés de lipides et à la lipotoxicité<sup>64</sup> qui en résulte et ceux particulièrement en condition de glycémie élevée conduisant à un effet toxique synergique appelé glucolipotoxicité<sup>65</sup> entraînant plusieurs facteurs<sup>66,67</sup>, notamment le stress du réticulum endoplasmique<sup>68</sup>, les altérations des voies de signalisation, l'inflammation etc.. Ce qui mène à la défaillance pancréatique en induisant une baisse de la quantité de cellules bêta mais aussi une perte de leur fonction sécrétrice.

Par ailleurs, il a été démontré que la dédifférenciation des cellules bêta était impliquée dans le DT2. C'est un processus complexe qui résulte de l'interaction de plusieurs facteurs<sup>66,67</sup>, notamment le stress du réticulum endoplasmique<sup>68</sup>, les altérations des voies de signalisation, l'inflammation et les changements dans l'expression des facteurs de transcription. Cette dédifférenciation conduit à une perte de la fonction insulinaire normale des cellules bêta, ce qui contribue à l'augmentation de la glycémie caractéristique du DT2 (Figure 12).

Concernant le stress du réticulum endoplasmique, les cellules bêta produisent une grande quantité d'insuline qui est synthétisée et repliée dans le réticulum endoplasmique. Lorsque les niveaux de production d'insuline augmentent, cela peut dépasser la capacité de traitement du RE, entraînant une accumulation de protéines mal repliées. Ce phénomène est appelé stress du réticulum endoplasmique<sup>69</sup>. Le stress prolongé du RE peut déclencher des signaux de réponse cellulaire, comme l'activation du facteur de transcription *X-box binding protein 1* (XBP1)<sup>70,71</sup>, qui peut conduire à des changements dans l'expression génique et favoriser la dédifférenciation des cellules bêta.

Le facteur de transcription v-Maf *avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A* (MAFA)<sup>72</sup> joue un rôle important dans la différenciation et la fonction des cellules bêta. Des altérations dans l'expression et l'activité de ces facteurs de transcription peuvent contribuer à la dédifférenciation des cellules bêta.

Outre la dédifférenciation, l'entrée en apoptose est un devenir possible des cellules bêta au cours du DT2. Il est le résultat de plusieurs mécanismes interconnectés, dont le stress du réticulum endoplasmique, la signalisation pro-apoptotique, la dysfonction mitochondriale, l'inflammation et le stress oxydatif. La combinaison de ces facteurs peut conduire à la perte progressive des cellules bêta et à la détérioration de la régulation de la glycémie (Figure 12).

Stress du réticulum endoplasmique : comme mentionné précédemment, la surproduction d'insuline due à la résistance à l'insuline peut entraîner un stress du réticulum endoplasmique<sup>73</sup>. Ce stress perturbe la synthèse et le repliement des protéines dans le RE, conduisant à l'accumulation de protéines mal repliées. En réponse à ce stress, les cellules bêta peuvent initier une voie de signalisation appelée *unfolded protein response* (UPR). Si le stress persiste, la réponse UPR peut déclencher des signaux pro-apoptotiques, incitant les cellules bêta à entrer en apoptose<sup>74,75</sup>.

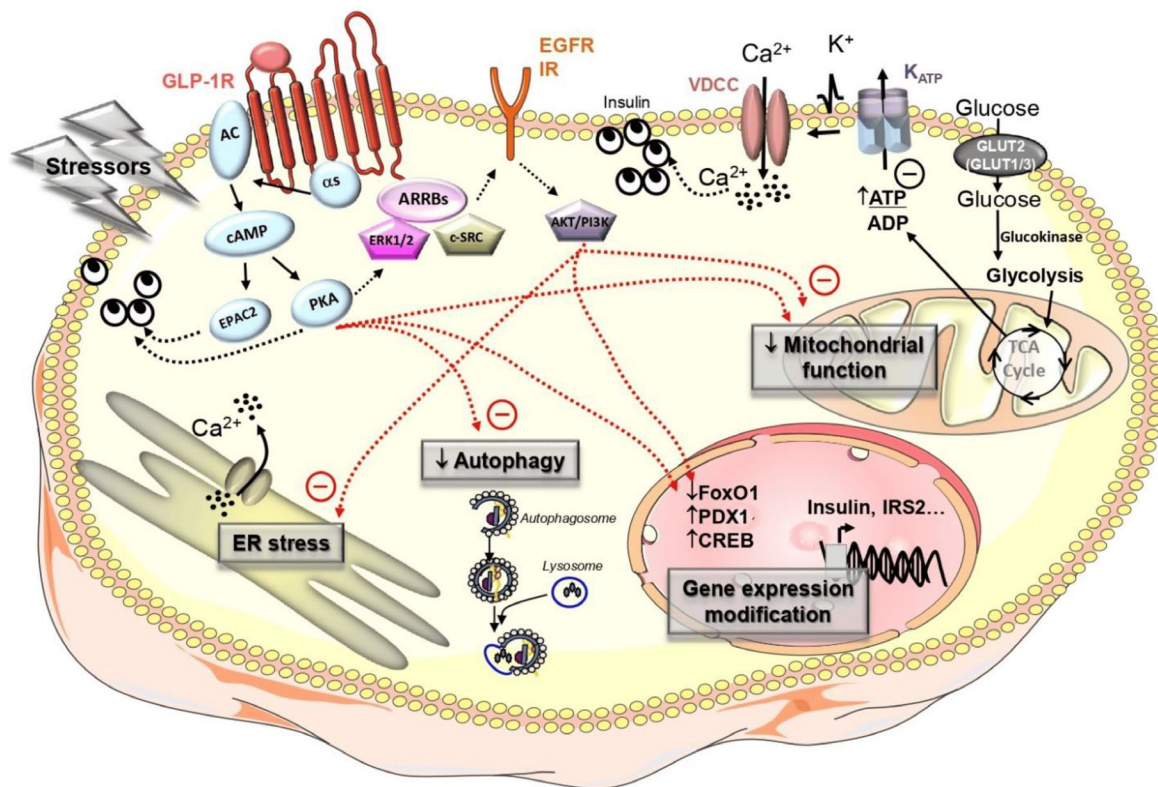
Signalisation pro-apoptotique : le stress du réticulum endoplasmique peut activer des protéines telles que *C/EBP homologous protein* (CHOP) qui favorisent la mort cellulaire<sup>76,77</sup>. CHOP agit en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose. Cette activation peut

conduire à la libération de molécules pro-apoptotiques du RE vers le cytosol, ce qui déclenche une cascade de réactions aboutissant à l'apoptose.

Dysfonction mitochondriale : les mitochondries jouent un rôle central dans la régulation de l'apoptose. Dans les cellules bêta en situation de stress et de dysfonctionnement, les mitochondries peuvent libérer des molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c dans le cytosol. Cette libération de cytochrome c active une cascade enzymatique appelée caspase, qui mène à la fragmentation de la cellule et à sa destruction<sup>78,79</sup>.

Inflammation : l'inflammation chronique caractéristique du DT2 peut également contribuer à l'apoptose des cellules bêta. Les cytokines pro-inflammatoires, telles que l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )<sup>80</sup> et le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- $\alpha$ )<sup>81</sup>, peuvent activer des voies de signalisation pro-apoptotiques dans les cellules bêta.

Stress oxydatif : l'augmentation du stress oxydatif, qui résulte de l'accumulation de radicaux libres dans les cellules, peut endommager les composants cellulaires, y compris l'ADN et les protéines. Ce stress oxydatif peut également favoriser l'apoptose des cellules bêta<sup>82</sup>.



**Figure 12. Défaillance de la cellule bêta au cours du DT2.**

Au cours du DT2, la défaillance de la cellule bêta joue un rôle crucial. Cette défaillance passe par plusieurs processus : la dédifférenciation des cellules bêta, due à des facteurs tels que le stress du réticulum endoplasmique, les altérations des voies de signalisation et l'inflammation, contribue à la perte de la fonction insulinaire normale. Le stress du réticulum endoplasmique, en particulier, peut déclencher des réponses cellulaires conduisant à des changements géniques et à la dédifférenciation des cellules bêta. De plus, l'apoptose des cellules bêta, influencée par le stress du réticulum endoplasmique, la signalisation pro-apoptotique, la dysfonction mitochondriale, l'inflammation et le stress oxydatif, peut conduire à la détérioration de la régulation de la glycémie dans le DT2.

Source : Costes, S., Bertrand, G. & Ravier, M. A. Mechanisms of Beta-Cell Apoptosis in Type 2 Diabetes-Prone Situations and Potential Protection by GLP-1-Based Therapies. *Int J Mol Sci* **22**, 5303 (2021).

#### b. Résistance à l'insuline :

La résistance à l'insuline constitue aussi un élément central du DT2<sup>36</sup>. Elle se manifeste lorsque les tissus de l'organisme, tels que les muscles, le foie et les tissus adipeux, perdent leur sensibilité à l'action de l'insuline, perturbant ainsi la régulation du métabolisme du glucose par ces tissus.

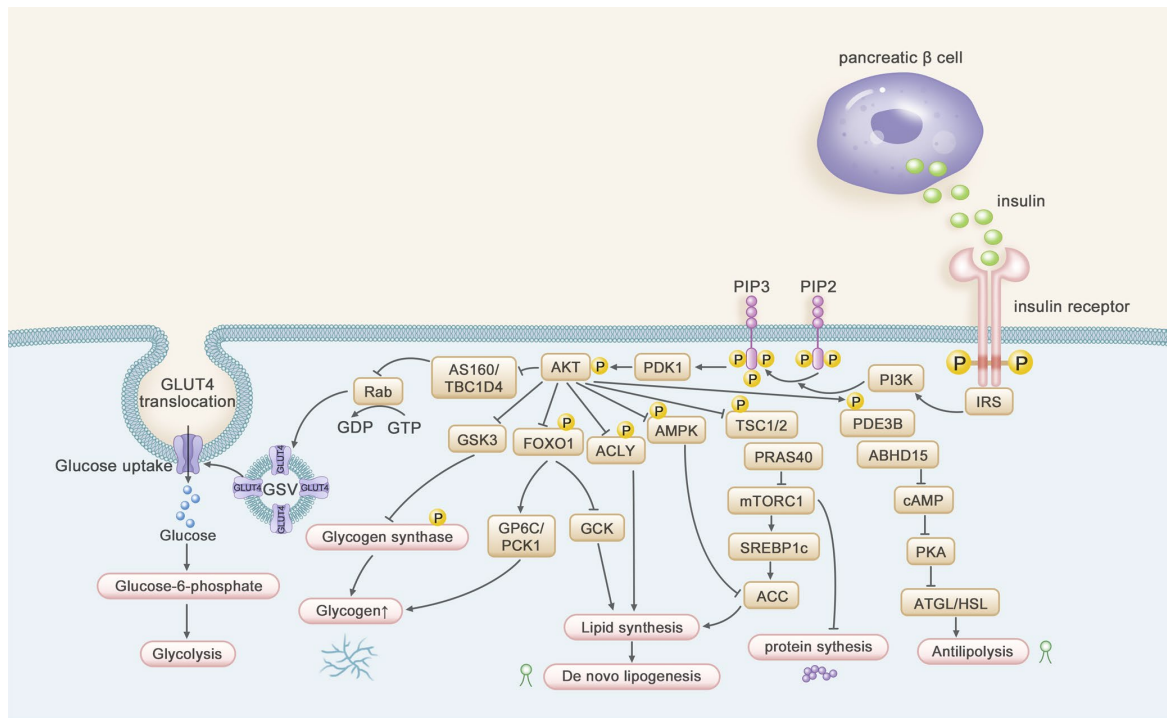
La voie de signalisation de l'insuline :

La régulation de la signalisation de l'insuline constitue un processus complexe essentiel au contrôle du métabolisme et à la croissance cellulaire. Lorsqu'une hausse de la glycémie induit la libération d'insuline, cette dernière se lie à son récepteur spécifique, enclenchant une série de réactions cellulaires qui orchestrent l'absorption du glucose, le métabolisme des lipides et des protéines, ainsi que la croissance cellulaire.

L'activation de la voie de signalisation de l'insuline implique une succession de phosphorylations réversibles modifiant l'activité des protéines impliquées. L'une des premières étapes consiste en l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline (IR) lui-même, créant des sites de fixation pour des protéines adaptatrices. Ces dernières, telles que *insulin receptor substrate-1* et 2 (IRS-1 et 2), se lient ensuite au récepteur phosphorylé, attirant d'autres protéines porteuses d'un domaine SH2 participant à la cascade de signalisation telle que la phosphoinositide 3-kinase (PI3K)<sup>83,84</sup>. Une fois recrutées, ces protéines adaptatrices enclenchent une série de cascades de phosphorylation en aval (Figure 13).

L'une des voies majeures activées est la voie PI3K-AKT, jouant un rôle central dans la régulation du métabolisme du glucose. La phosphorylation de la protéine kinase B (PKB/AKT) déclenche divers processus cellulaires, notamment la translocation du transporteur de glucose GLUT4 à la membrane cellulaire, facilitant ainsi l'entrée du glucose dans la cellule<sup>85,86</sup>.

La protéine PI3K joue un rôle essentiel en phosphorylant le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) à la membrane pour le convertir en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3). PIP3 active ensuite AKT via la kinase-1 dépendante des phosphoinositides (PDK-1)<sup>87,88</sup>. La phosphorylation d'AKT entraînant entre autres des phosphorylations inhibitrices sur la Forkhead box protein O1 (FoxO1)<sup>89</sup> et Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3)<sup>90</sup>.



**Figure 13. Voies de signalisation du récepteur de l'insuline.**

La voie de signalisation de l'insuline implique des phosphorylations réversibles, notamment l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline, recrutant des protéines adaptatrices telles que IRS-1 et 2. Ces protéines amorcent des cascades de phosphorylation, en particulier la voie PI3K-AKT, essentielle dans la régulation du métabolisme du glucose. La protéine PI3K joue un rôle clé en phosphorylant le PIP2 pour former le PIP3, qui active AKT et induit des phosphorylations régulatrices sur des protéines telles que FoxO1 et GSK-3.

Source : Li, M. et al. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. Signal Transduct Target Ther 7, 216 (2022).

Effets de l'insuline sur les tissus périphériques :

Effets de l'insuline sur le tissu adipeux :

L'insuline joue un rôle primordial dans la régulation du métabolisme lipidique et de l'équilibre énergétique. Elle exerce des effets significatifs sur le tissu adipeux en influant sur deux processus clés : la lipogenèse<sup>91</sup>, qui entraîne l'accumulation de graisses, et la lipolyse<sup>92</sup>, qui libère ces réserves pour générer de l'énergie (figure 14).

La régulation de la lipogenèse par l'insuline s'appuie en grande partie sur la modulation de l'expression génique. En effet, l'insuline, stimule l'activation de *sterol regulatory element-binding protein-1c* (SREBP-1c)<sup>93</sup> via la voie *mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) et de *carbohydrate-responsive element-binding protein* (ChREBP)<sup>94</sup>, qui agissent en tant que facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription amplifient la production d'acides gras et de triglycérides en favorisant la transcription des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse lipidique, telles que l'acétyl-CoA carboxylase (ACC)<sup>95</sup> et la fatty acid synthase (FAS)<sup>95</sup>, qui catalysent les étapes clés de la biosynthèse lipidique.

En outre, l'insuline, via la voie mTORC1 inhibe la lipolyse en réduisant l'activité des enzymes lipase hormonosensible (HSL) et lipase adipeuse (ATGL), responsables de la dégradation des triglycérides<sup>92</sup>. Ce mécanisme restreint la libération d'acides gras dans la circulation sanguine, limitant leur utilisation comme substrat énergétique.

L'impact de l'insuline sur la différenciation des adipocytes, les cellules spécialisées dans le stockage des graisses, est également significatif. L'insuline favorise la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures via la voie PI3K/AKT, l'activation d'AKT entraînant une phosphorylation inhibitrice FoxO1. Cette phosphorylation permet la dégradation de FoxO1 l'empêchant d'inhiber l'expression de facteurs de transcription tels que le *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ )<sup>96</sup> et le *CCAAT/enhancer-binding protein alpha* (C/EBP $\alpha$ )<sup>97</sup>. Cette différenciation accroît la capacité de stockage des graisses dans le tissu adipeux.

Effets de l'insuline sur le foie :

L'insuline joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme hépatique. Elle exerce des effets importants sur plusieurs processus clés du foie, notamment la néoglucogenèse, la glycogénogenèse, la lipogenèse hépatique et la régulation du métabolisme lipidique (Figure 14).

L'insuline exerce un effet inhibiteur puissant sur la néoglucogenèse<sup>98,99</sup>, processus produisant du glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que les acides aminés et le lactate. La liaison de l'insuline à son récepteur active la cascade de signalisation PI3K/AKT, ce qui réduit l'activité de FoxO1<sup>99</sup> et, par conséquent, diminue l'expression des gènes codant pour les enzymes essentielles à la néoglucogenèse, la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Cette régulation diminue la production hépatique de glucose, favorisant ainsi l'utilisation du glucose par les cellules périphériques et maintenant un équilibre glycémique approprié dans l'organisme.

D'autre part, en contraste avec son effet sur la transcription de la G6Pase et de la PEPCK, FoxO1 exerce une action inhibitrice sur la transcription de la glucokinase (GCK). Par conséquent, l'insuline agit comme un activateur de la transcription de la GCK, ce qui entraîne une activation de la glycolyse<sup>100</sup>.

Par ailleurs, l'insuline favorise la glycogénogenèse, processus de stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie<sup>98</sup>. Le glycogène représente une réserve de glucose stockée dans le foie et les muscles, disponible pour une utilisation ultérieure après la glycogénolyse. L'activation de la voie PI3K/AKT inhibe la protéine GSK3, permettant la déphosphorylation de la Glycogène Synthase (GS) et, par conséquent, l'activation de la glycogénogenèse<sup>101</sup>. En parallèle, l'inhibition de FoxO1 diminuant l'expression de la G6Pase et de la PEPCK cela permet de diminuer la glycogénolyse, augmentant la production de glycogène<sup>102</sup>.

En ce qui concerne la lipogenèse hépatique, l'insuline stimule la synthèse d'acides gras et de triglycérides en agissant sur les facteurs de transcription SREBP-1c et ChREBP en utilisant les mêmes mécanismes qu'elle emploie dans le tissu adipeux<sup>103</sup>. Parallèlement, l'insuline inhibe la lipolyse. Toutefois un excès de lipides accumulés dans le foie peut provoquer une stéatose hépatique, caractérisée par l'accumulation de graisse dans les cellules hépatiques. L'insuline inhibe également la production par le foie, de lipoprotéines de très basse densité (VLDL) riches en triglycérides<sup>104</sup>, particules assurant le transport des lipides dans le sang. En effet, l'inhibition de FoxO1 par la voie PI3K/AKT induit la diminution de l'expression des enzymes *Microsomal triglyceride Transfer Protein* (MTP) et apolipoprotéine B (apoB), responsables de la production de VLDL<sup>104</sup>.

#### Effets de l'insuline sur le muscle squelettique :

L'insuline exerce des effets majeurs sur le muscle squelettique en régulant l'absorption du glucose par les cellules musculaires et en stimulant le stockage du glucose sous forme de glycogène (Figure 14).



L'insuline entraîne l'activation de la voie PI3K/AKT. Lorsque la protéine AKT est phosphorylée, elle phosphoryle les protéines TBC1D1 et TBC1D4/AS160 levant ainsi l'inhibition qu'elle exerçait sur la GTPase Ras-related protein RAB. RAB, jouant un rôle crucial dans le transport des vésicules contenant GLUT4, l'insuline entraîne donc rapidement la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique permettant ainsi le transport du glucose de la circulation vers la cellule<sup>105</sup>.

De plus, l'insuline active la glycogénogenèse via la voie PI3K/AKT inhibant la GSK3 dans un système similaire à celui présent au niveau hépatique<sup>106</sup>. Ceci permet l'activation de la GS et favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène et permettant au muscle de conserver des réserves énergétiques pour une utilisation ultérieure.

Pour finir, l'insuline active la glycolyse au niveau musculaire<sup>107</sup>. En activant la voie PI3K/AKT l'insuline active le complexe mTor ce qui a pour effet d'activer le facteur de transcription SREBP-1c entraînant la transcription de l'hexokinase II (HK2). HK2 canalisant la métabolisation du glucose en G6P, première étape de la glycolyse<sup>107</sup>.

Outre son rôle métabolique, l'insuline exerce également un impact significatif sur la croissance musculaire. Elle représente un puissant facteur de croissance pour les cellules musculaires, stimulant la synthèse des protéines et freinant leur dégradation.

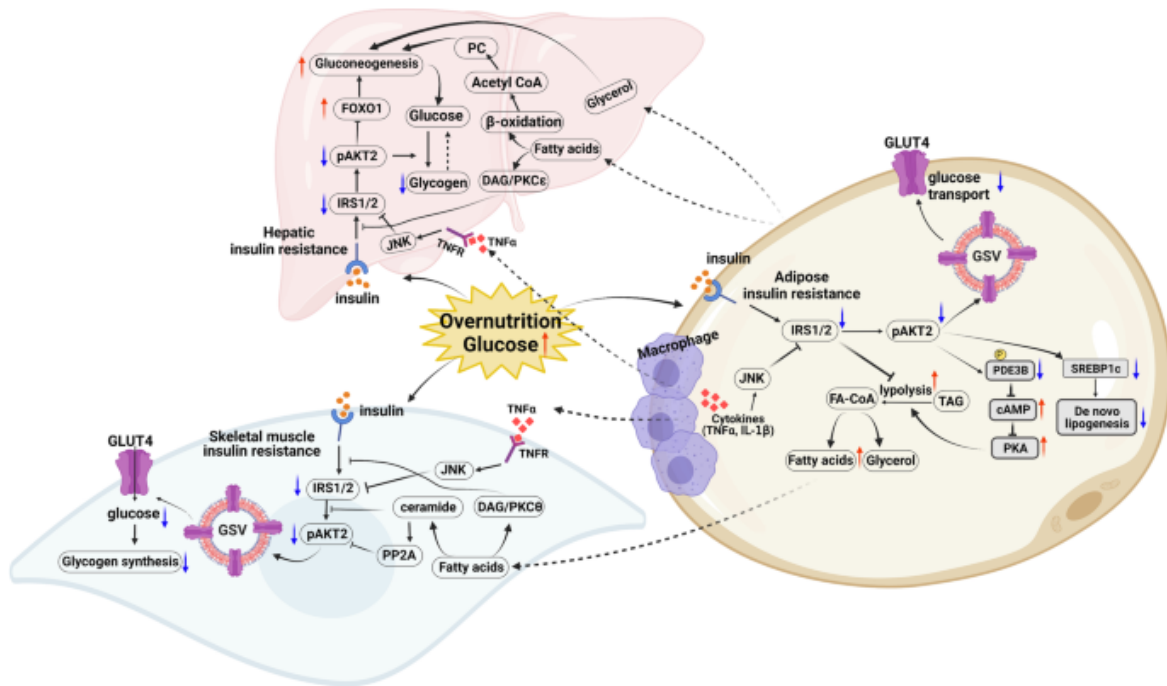
L'insulino-résistance au cours du diabète de type 2 :

Plusieurs mécanismes concourent à la résistance à l'insuline dans le DT2 notamment la lipotoxicité. L'accumulation de lipides ectopiques, particulièrement au niveau du foie, joue un rôle clé dans l'établissement de cette résistance<sup>108</sup>.

Plusieurs mécanismes moléculaires peuvent contribuer au dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline. Parmi ces mécanismes clés, la dérégulation de la phosphorylation des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline (en particulier AKT) joue un rôle central<sup>109</sup> (Figure 14).

Dans le contexte de l'insulino-résistance, des facteurs tels que les acides gras saturés (en particulier les céramides<sup>110</sup>) ou une inflammation chronique de bas grade ont été associés aux perturbations de la signalisation de l'insuline<sup>111</sup>.

Un autre processus moléculaire altéré dans le dysfonctionnement de la signalisation de l'insuline concerne la régulation de la captation du glucose par les transporteurs de glucose GLUT4. L'expression de GLUT4 peut présenter une altération chez les patients atteints de DT2<sup>112</sup> entraînant ainsi une réduction de la captation du glucose par les cellules musculaires et adipeuses chez les individus résistants à l'insuline.



**Figure 14. Effets de l'insuline sur les tissus périphériques et complication au cours du DT2.**

*L'insuline a des effets variables sur les divers tissus périphériques, notamment le tissu adipeux, le foie et le muscle squelettique. L'insuline régule la lipogenèse et la lipolyse dans le tissu adipeux, influençant ainsi l'accumulation et la libération de graisses. Dans le foie, elle contrôle la néoglucogenèse, la glycogénogenèse et la lipogenèse hépatique, favorisant la production de glycogène et inhibant la production de lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Dans le muscle squelettique, l'insuline stimule l'absorption du glucose et le stockage sous forme de glycogène, activant également la glycolyse. En outre, l'insuline joue un rôle crucial dans la croissance musculaire. Au cours du développement du DT2, l'accumulation de lipides mène à la résistance à l'insuline et inhibe par conséquent les processus induits normalement en réponse à une hausse de la glycémie.*

*Source : Li, M. et al. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. Signal Transduct Target Ther 7, 216 (2022).*

### c. Complications du diabète de type 2 :

Le DT2 entraîne de graves complications pour la santé. Les symptômes courants comprennent la polyurie (mictions fréquentes), la polydipsie (soif excessive), la polyphagie (faim excessive) et la fatigue. La polyurie et la polydipsie sont souvent associées et constituent généralement les symptômes les plus fréquents.

Le DT2 peut entraîner des complications aiguës et chroniques. Les complications aiguës comprennent l'hyperglycémie et une déshydratation sévère pouvant conduire à un coma

diabétique. La cétoacidose diabétique, caractérisée par une production excessive de cétones, est une complication potentiellement mortelle<sup>113</sup>.

Les complications chroniques du DT2 sont bien connues et incluent les maladies cardiovasculaires<sup>114</sup>, la néphropathie<sup>115</sup>, la rétinopathie<sup>116</sup> et la neuropathie<sup>117</sup>.

De plus, le DT2 peut avoir un impact négatif sur la qualité de vie des personnes touchées, en raison des contraintes liées aux traitements, aux complications et aux ajustements nécessaires dans la vie quotidienne.

#### **D. Facteurs de risque du diabète de type 2 : rôle crucial des facteurs génétiques**

Comme évoqué plus haut, les facteurs génétiques jouent un rôle crucial dans la prédisposition au DT2. Cette prédisposition génétique a été confirmée par des études sur des jumeaux et des analyses familiales, qui ont montré que la susceptibilité au DT2 peut être héritée<sup>29,30</sup>. Lorsqu'un parent proche, comme un parent, un frère ou une sœur, est atteint de cette maladie, le risque de développer le DT2 augmente considérablement. Cette observation suggère l'existence de variantes génétiques spécifiques qui prédisposent à la maladie.

Parmi les nombreux gènes associés au DT2, le premier à avoir été identifié mais aussi l'un des plus étudiés est le gène *TCF7L2*<sup>118,119</sup>. Ce gène joue un rôle crucial dans la régulation de la glycémie<sup>120</sup>.

Ce gène a été découvert peu avant l'utilisation des études d'association pangénomique (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) qui ont révolutionné la recherche en génétique humaine en permettant d'explorer de manière exhaustive et sans a priori l'association de variants fréquents et des maladies complexes telles que le DT2.

Contrairement aux études précédentes qui se concentraient sur un petit nombre de gènes candidats, les GWAS examinent des centaines de milliers à des millions de variants génétiques simultanément. Cette approche génomique globale a permis de faire d'énormes progrès dans la compréhension du DT2<sup>63</sup>.

Les GWAS ont permis de découvrir de nombreux gènes mais aussi variants génétiques communs (SNP) qui sont associés au DT2 et qui n'avaient pas été précédemment soupçonnés (la dernière méta-analyse a permis d'identifier 237 loci atteignant une valeur de significativité  $P < 5 \times 10^{-9}$ )<sup>121</sup>. Ces découvertes ont élargi la compréhension des mécanismes sous-jacents de la maladie.

Cependant, les GWAS ne sont pas sans limites. Ils ne fournissent qu'une corrélation statistique entre les variants génétiques et la maladie, des études fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents. De plus, les variants génétiques identifiés par les GWAS ont généralement de petits effets individuels, ce qui limite les analyses fonctionnelles<sup>63</sup>.

Contrairement aux études GWAS, la génomique fonctionnelle de variants rares est un outil puissant dans l'étude des mécanismes sous-jacents du DT2, car les variants rares ont des effets potentiellement bien plus forts sur le risque de DT2. Elle permet de comprendre le rôle biologique des gènes nouvellement découverts et de valider l'impact de variants qui ne sont pas tous délétères. Contrairement aux mutations synonymes, dont la mutation n'entraîne pas de changement au niveau de la séquence protéique (en raison de la redondance du code génétique), les mutations faux-sens entraînent la substitution d'un acide aminé. Toutefois, ce nouvel acide aminé n'est pas nécessairement délétère pour la protéine ainsi produite. Des prédictions peuvent être faites par des analyses *in silico*, mais seule la génétique fonctionnelle permet de savoir avec certitude si une mutation peut être considérée comme une perte de fonction. Cette approche a également révélé des cibles potentielles pour de nouveaux médicaments en identifiant des mutations dans des gènes qui affectent la sécrétion d'insuline dans les cellules bêta<sup>63</sup>.

La recherche en génétique du DT2 a considérablement enrichi notre compréhension de cette maladie complexe. Elle offre de nouvelles perspectives thérapeutiques en identifiant des cibles potentielles pour le développement de médicaments et en ouvrant des voies prometteuses pour la recherche et la médecine.

Cependant, il est important de noter que le DT2 est une maladie complexe résultant de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux qui jouent un rôle tout aussi essentiel dans le développement du DT2. Les personnes porteuses de variants génétiques associés à la maladie ne la développeront pas nécessairement. Des éléments tels que l'alimentation, l'activité physique, le stress et l'obésité peuvent influencer l'expression des gènes associés au DT2. Ainsi, une approche globale de la prévention et du traitement de cette maladie doit prendre en compte à la fois les facteurs génétiques et environnementaux.

## E. Traitements actuels contre le diabète de type 2

La prise en charge appropriée du DT2 est d'une importance capitale pour les personnes atteintes de cette maladie chronique. Au fil des années, les traitements et les approches dans la gestion du DT2 ont évolué, visant à atteindre un meilleur contrôle glycémique et à prévenir les complications à long terme.

### a. Modifications du mode de vie :

Les modifications du mode de vie jouent un rôle crucial dans la gestion du DT2, offrant des bénéfices considérables pour les patients. En combinant un changement de régime alimentaire, une activité physique régulière et la perte de poids, il est possible d'améliorer significativement le contrôle de cette maladie<sup>122,123</sup>.

Un régime alimentaire équilibré constitue une pierre angulaire pour maintenir une glycémie stable. Contrôler la quantité de glucides, de lipides et de calories est essentiel dans la gestion du DT2. Des études ont montré que les régimes à faible indice glycémique, riches en fibres et en protéines, sont particulièrement bénéfiques pour le contrôle de la glycémie chez les patients atteints de cette maladie<sup>124</sup>.

En parallèle, l'activité physique régulière joue un rôle crucial dans la prise en charge du DT2. Des exercices aérobiques tels que la marche rapide, la natation ou le vélo améliorent la sensibilité à l'insuline et contribuent au maintien d'un poids de santé<sup>125</sup>. De plus, une augmentation de l'activité physique a été directement associée à une réduction de l'hémoglobine glyquée et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

Enfin, il est important de souligner l'impact significatif de la perte de poids sur la sensibilité à l'insuline et le contrôle de la glycémie chez les personnes atteintes de DT2.

Cependant, il est primordial de personnaliser les modifications du mode de vie en fonction des besoins individuels de chaque patient. Une approche sur mesure, tenant compte des préférences alimentaires, des capacités physiques et des objectifs de perte de poids, est essentielle pour obtenir des résultats optimaux. Ainsi, le soutien d'un professionnel de la santé, tel qu'un diététicien, s'avère précieux pour guider les patients dans la mise en place de modifications durables du mode de vie. Grâce à ces changements adaptés, les patients atteints de DT2 peuvent améliorer leur qualité de vie et leur santé de manière significative.

## b. Médicaments oraux :

Les médicaments oraux sont couramment utilisés dans la prise en charge du DT2. Parmi les classes de médicaments oraux les plus courantes, on retrouve les biguanides<sup>126</sup>, les sulfonylurées<sup>127</sup>, les inhibiteurs des alpha-glucosidases<sup>128</sup> et les thiazolidinediones<sup>129</sup>.

Les biguanides sont une classe de médicaments largement utilisée dans le traitement du DT2. La metformine est l'un des médicaments les plus couramment prescrits appartenant à cette classe<sup>130</sup>. Elle est généralement considérée comme le premier choix de traitement pharmacologique pour les personnes atteintes de DT2, en particulier en cas de diagnostic récent et en l'absence de contre-indications.

Le mode d'action de la metformine dans le traitement du DT2 est multifactoriel, mais ses principaux mécanismes d'action sont les suivants :

- Réduction de la production de glucose hépatique : la metformine agit en inhibant la néoglucogenèse. Dans le DT2, le foie a tendance à produire une quantité excessive de glucose même lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont élevés. En inhibant la néoglucogenèse, la metformine aide à réduire la glycémie<sup>131</sup>.
- Augmentation de l'utilisation du glucose par les cellules : la metformine améliore également la sensibilité à l'insuline dans les cellules, permettant une augmentation de la métabolisation du glucose et une réduction de la glycémie<sup>132</sup>.

Il est important de noter que la metformine n'entraîne généralement pas d'hypoglycémie sévère, contrairement à certains autres médicaments antidiabétiques. Cela en fait un choix de traitement relativement sûr pour de nombreux patients atteints de DT2, en particulier ceux qui sont en surpoids<sup>133</sup>.

Cependant, comme avec tout médicament, la metformine peut provoquer des effets secondaires chez certaines personnes, tels que des troubles gastro-intestinaux (nausées, diarrhée, etc.). Les effets indésirables sont généralement temporaires et diminuent souvent avec le temps<sup>133</sup>.

Les sulfonylurées (ou sulfamides hypoglycémiantes) constituent une classe de médicaments antidiabétiques oraux largement utilisés pour traiter le DT2. Parmi les plus courantes, on retrouve la glimépiride, la gliclazide et la glipizide. Leur action principale vise à réduire la glycémie en augmentant la sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas<sup>127</sup>.

Leur mécanisme d'action principal réside dans l'inhibition des canaux potassiques ATP-sensibles. En bloquant ces canaux, le flux sortant d'ions K<sup>+</sup> est arrêté, ce qui provoque une dépolarisation de la membrane cellulaire. Cette dépolarisation entraîne ensuite l'activation des canaux calciques voltage-dépendants, permettant l'entrée d'ions Ca<sup>2+</sup> qui déclenchent

l'exocytose des vésicules contenant l'insuline. Ainsi, les sulfonylurées stimulent efficacement la sécrétion d'insuline par les cellules bêta<sup>134</sup> (Figure 15).

Cependant, l'utilisation des sulfonylurées est associée à un risque accru d'hypoglycémie. Ce risque provient de l'effet stimulant des médicaments sur la sécrétion d'insuline, indépendamment du niveau de glycémie. Pour prévenir toute hypoglycémie potentielle, il est crucial de surveiller régulièrement la glycémie, de respecter scrupuleusement la posologie prescrite et d'adopter une alimentation équilibrée avec des repas pris à intervalles réguliers.

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases, tels que l'acarbose<sup>135</sup>, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la glycémie postprandiale en ralentissant l'absorption des glucides dans l'intestin. Ces médicaments appartiennent à la classe des saccharides qui agissent dans un premier temps comme des inhibiteurs compétitifs des enzymes responsables de la digestion des glucides, en particulier l'enzyme alpha-glucosidase produite dans la bordure en brosse des cellules de l'intestin grêle. Les alpha-glucosidases intestinaux liés à la membrane sont normalement responsables de la décomposition des oligosaccharides, trisaccharides et disaccharides en glucose et autres monosaccharides dans l'intestin grêle<sup>136</sup>.

De plus, l'acarbose présente un mécanisme d'action supplémentaire en bloquant également l'alpha-amylase pancréatique, une enzyme qui hydrolyse les amidons complexes en oligosaccharides dans la lumière de l'intestin grêle<sup>137</sup>.

En inhibant ces systèmes enzymatiques, les inhibiteurs des alpha-glucosidases réduisent le taux de digestion des glucides entraînant une moindre absorption du glucose et donc une baisse de la glycémie postprandiale.

Toutefois, il est à noter que les inhibiteurs des alpha-glucosidases peuvent entraîner certains effets secondaires indésirables, tels que des flatulences, des ballonnements, des épisodes de diarrhée, des crampes abdominales et, plus rarement, des réactions cutanées.

Les thiazolidinediones (TZDs), également connues sous le nom de glitazones, sont une classe de médicaments antidiabétiques utilisés pour traiter le DT2. La pioglitazone est l'un des médicaments les plus couramment prescrits de cette classe, elle a pour effet d'améliorer la sensibilité à l'insuline<sup>138</sup>.

Le mécanisme d'action des TZDs est complexe et implique principalement l'interaction avec des récepteurs nucléaires spécifiques. Une fois ingérées, les TZDs se lient aux récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes gamma (PPAR $\gamma$ )<sup>139</sup>. Ces récepteurs sont principalement présents dans les tissus adipeux et dans les muscles. L'activation de PPAR $\gamma$  dérégule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et des glucides.

Au niveau musculaire, les TZDs entraînent l'augmentation de l'expression de *SLC2A4*, un gène qui code le transporteur de glucose 4 (GLUT4) ce qui favorise la captation du glucose par les muscles et améliore la glycémie postprandiale.

Au niveau hépatique les TZD entraînent une diminution de l'expression de la Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), une protéine impliquée dans la néoglucogenèse<sup>140</sup>.

Enfin au niveau des adipocytes l'expression du gène de l'Adiponectine (ADIPOQ) est augmentée par les TZDs<sup>141</sup>. L'adiponectine est une hormone impliquée dans la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus périphériques tels que les muscles et le foie en activant la translocation des récepteurs du glucose 4 (GLUT4) ou en activant l'AMP-activated protein kinase (AMPK).

De plus, les TZDs stimulent la différenciation des cellules pré-adipocytaires et favorisent la prolifération des adipocytes matures ce qui aura pour effet de limiter les dépôts de graisse ectopiques<sup>141</sup>.

Il est important de noter que, comme tout médicament, les TZDs peuvent avoir des effets secondaires potentiels, notamment une prise de poids, une rétention d'eau, une augmentation de la rétention de sodium et un risque accru de fractures osseuses. En raison de ces effets secondaires, les TZDs ne sont généralement pas le premier choix de traitement dans le DT2, mais ils peuvent être utilisés lorsque d'autres traitements ne sont pas efficaces ou sont mal tolérés.

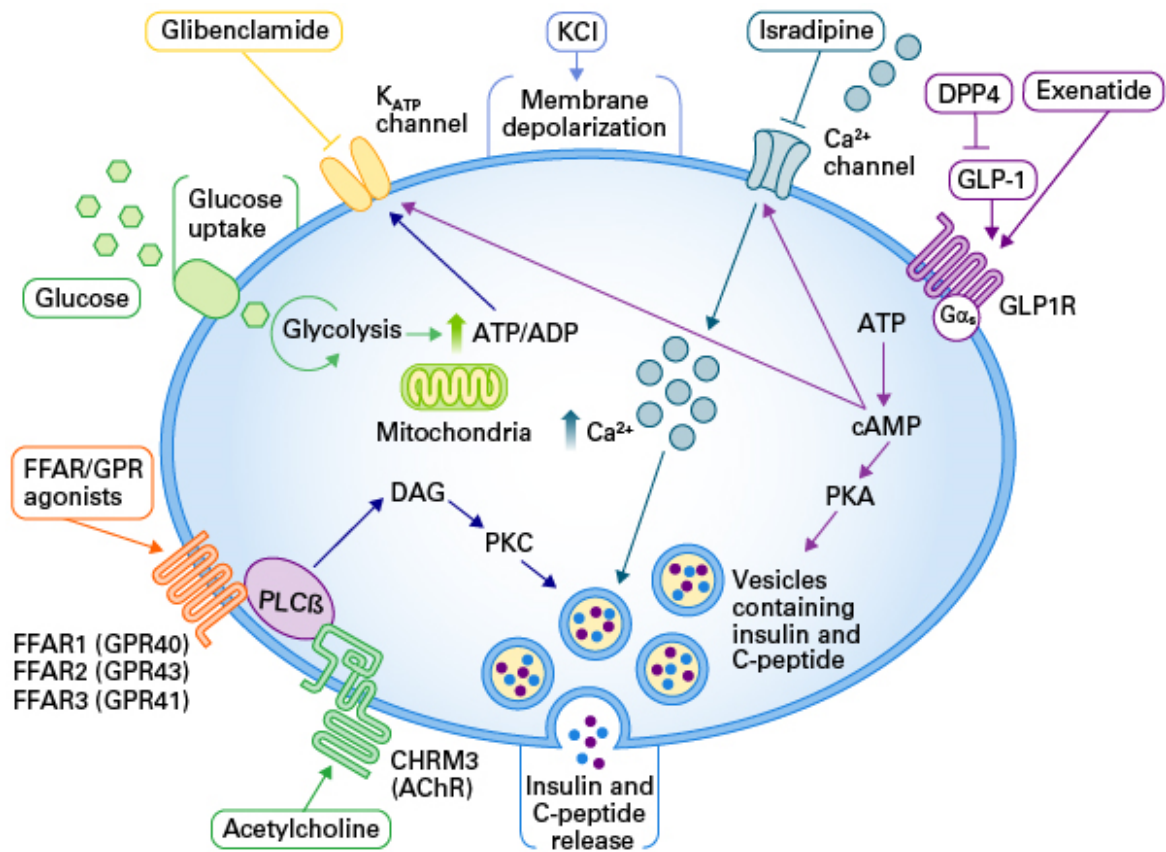
Les inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2), également connus sous le nom de gliflozines, sont une classe de médicaments antidiabétiques oraux utilisés pour traiter le DT2. Parmi eux la dapagliflozine et la canagliflozine sont les médicaments de cette classe les plus courants. Leur mécanisme d'action innovant repose sur la régulation du glucose au niveau rénal en augmentant la glycosurie.

Les inhibiteurs du SGLT2 bloquent spécifiquement l'action du SGLT2, ce qui réduit la réabsorption du glucose dans les tubules rénaux. En conséquence, une plus grande quantité de glucose reste dans les tubules rénaux et est éliminée dans les urines, entraînant une augmentation de l'excrétion du glucose<sup>142</sup>.

L'augmentation de la glycosurie induite par les inhibiteurs du SGLT2 présente plusieurs avantages. Une réduction de la glycémie, en augmentant l'élimination du glucose dans les urines, mais aussi une perte de poids car le glucose ainsi éliminé ne peut plus être utilisé en tant que substrat énergétique<sup>143</sup>.

Toutefois les inhibiteurs du SGLT2 peuvent être associés à des effets secondaires, tels que des infections urinaires, des infections génitales, une déshydratation et une augmentation du risque de cétose diabétique (une complication potentiellement grave du diabète).





**Figure 15. Mécanisme d'action des différents traitements anti-diabetiques ciblant la cellule bêta.**

*Les médicaments antidiabétiques jouent un rôle essentiel dans la gestion du diabète en ciblant la cellule bêta, responsable de la production d'insuline. Ces agents thérapeutiques visent à optimiser la sécrétion d'insuline, favorisant ainsi un meilleur contrôle du taux de sucre dans le sang. Les agonistes des récepteurs du GLP-1 et les inhibiteurs de la DPP-4, illustrent bien cette approche ciblée, ainsi ces traitements stimulent la sécrétion d'insuline de manière contrôlée.*

Source : Takara Bio (<https://www.takarabio.com/learning-centers/stem-cell-research/technical-notes/beta-cells/beta-cells-for-disease-modeling>)

### c. Injectables non-insulinique :

Les injectables non insuliniques comme les analogues du Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)<sup>144</sup> sont eux aussi des traitements impliqués dans la prise en charge du DT2.

Les analogues du GLP-1 sont une classe de médicaments antidiabétiques qui agissent en ciblant le système des incrétines, un groupe d'hormones intestinales qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la glycémie postprandiale. Trois des médicaments les plus couramment utilisés de cette classe sont l'exénatide, le liraglutide et le semaglutide<sup>145</sup>.

Leur principal mode d'action est d'imiter l'action du GLP-1, qui est une incrétine produite dans l'intestin en réponse à la présence de nutriments dans l'estomac. Au niveau pancréatique, le GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline par les cellules bêta<sup>53</sup> (Figure 15). En parallèle, il réduit également la sécrétion de glucagon par les cellules alpha<sup>146</sup>. Le glucagon étant une hormone qui favorise la néoglucogénèse. En stimulant la sécrétion d'insuline et en réduisant la production de glucagon, les inhibiteurs des incrétines favorisent une diminution de la glycémie chez les patients atteints de DT2. Cela contribue à prévenir les pics de glycémie postprandiale. De plus, les inhibiteurs des incrétines ont un effet bénéfique sur le poids corporel. En stimulant la sécrétion d'insuline, ils favorisent l'absorption du glucose par les cellules et réduisent la quantité de glucose circulant dans le sang. Cela peut entraîner une réduction de l'appétit et une augmentation de la sensation de satiété chez certains patients, ce qui contribue à une réduction de l'apport alimentaire et favorise la perte de poids<sup>147</sup>.

Outre leur action sur la glycémie et le poids, les inhibiteurs des incrétines peuvent également avoir d'autres effets bénéfiques, tels que la protection des cellules bêta, une diminution de l'inflammation et une amélioration de la fonction cardiaque.

Ces médicaments sont généralement administrés par injection sous-cutanée, une à deux fois par jour, selon le médicament. Ils peuvent être associés à des effets secondaires potentiels, tels que des nausées, des vomissements, ou des réactions cutanées locales.

### d. Insuline :

L'insuline, qui est normalement sécrétée par les cellules bêta, est un élément essentiel dans la prise en charge du DT2 lorsque les traitements oraux et les injectables non-insuliniques ne suffisent pas à maintenir une glycémie stable. Différentes formulations d'insuline sont disponibles, chacune ayant des caractéristiques spécifiques et un rôle dans la régulation de la glycémie à différents moments de la journée<sup>148</sup>.

L'insuline à action prolongée, comme l'insuline Glargine et l'insuline Détémir, est administrée par voie sous-cutanée avec une formulation spéciale conçue pour une distribution continue tout au long de la journée<sup>149</sup>.

L'insuline Glargine est stockée sous forme soluble dans un environnement acide. Lorsqu'elle est injectée, l'acidité est rapidement neutralisée dans l'hypoderme, ce qui entraîne la formation de cristaux d'insuline. Ces cristaux se solubilisent progressivement au cours de la journée, libérant ainsi de l'insuline de manière continue pendant environ 24 heures. Cette libération continue permet de maintenir une régulation stable de la glycémie.

Ces insulines à action prolongée constituent un pilier essentiel du traitement du diabète, en complément des insulines à action rapide utilisées pour gérer la glycémie après les repas.

L'insuline prandiale, comme l'insuline Lispro et l'insuline Asparte, est administrée avant les repas pour réguler la glycémie postprandiale. Ces insulines sont des protéines recombinantes où la substitution de deux acides aminés empêche la formation de dimères ce qui leur permet une d'action plus rapide comparée à l'insuline à action prolongée.

Cette action efficace de l'insuline prandiale permet de faire face à la montée de la glycémie qui se produit après les repas, et elle atteint ainsi son effet maximal plus rapidement. L'insuline prandiale contribue ainsi à éviter les pics de glucose et permet une gestion de la glycémie plus fine et flexible, qui peut être adaptée en fonction de la taille et du contenu des repas<sup>148</sup>.

#### e. Chirurgie bariatrique :

La chirurgie bariatrique joue un rôle crucial dans la gestion du DT2 chez les patients souffrant d'obésité sévère<sup>150-152</sup>. Des procédures telles que la gastrectomie longitudinale en manchon (sleeve) ou le bypass gastrique permettent une perte de poids significative chez les patients. La majorité des patients avec initialement un DT2 ayant subi une chirurgie bariatrique connaissent une rémission de leur DT2, avec une amélioration significative du contrôle glycémique et une réduction de la nécessité d'un traitement antidiabétique.

Les mécanismes sous-jacents à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline après la chirurgie bariatrique sont complexes et multifactoriels :

- Réduction du tissu adipeux : la perte de poids significative induite par la chirurgie réduit la masse grasse du corps, ce qui contribue à une meilleure sensibilité à l'insuline dans les tissus périphériques<sup>153</sup>.
- Changements hormonaux : l'augmentation de la sécrétion de leptine, mais aussi d'autres hormones liées au métabolisme, telles que l'adiponectine et les incrétines, peuvent être modifiées après la chirurgie bariatrique, améliorant ainsi la sensibilité à l'insuline<sup>154</sup>.
- Effets sur le microbiome intestinal : la chirurgie bariatrique peut également influencer la composition du microbiome intestinal, ce qui peut jouer un rôle dans la régulation de l'insuline et du métabolisme<sup>155</sup>.

Cependant, il est important de noter que la chirurgie bariatrique est une procédure invasive et ne convient pas à tous les patients atteints de DT2. Elle est généralement réservée aux patients souffrant d'obésité sévère et qui n'ont pas réussi à contrôler leur glycémie avec d'autres traitements. Les risques et les avantages de la chirurgie bariatrique doivent être soigneusement évalués, et une approche multidisciplinaire impliquant des professionnels de la santé tels que des chirurgiens, des endocrinologues et des nutritionnistes est essentielle pour garantir des résultats optimaux.

Le taux de diabétiques de type 2 qui parviennent à atteindre un contrôle glycémique optimal grâce à un traitement varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment la gravité de la maladie, la réponse individuelle au traitement, le respect des recommandations médicales et les changements de mode de vie. Cependant, il est important de noter que l'objectif du traitement n'est pas nécessairement de "guérir" le diabète, mais plutôt de le gérer de manière efficace et de maintenir des niveaux de glucose sanguin aussi proches de la normale que possible. Selon les estimations, environ 35%<sup>156</sup> à 41.6%<sup>157</sup> des patients atteints de DT2 parviennent à atteindre un niveau d'HbA1c inférieur à 7 %. Cependant, il convient de noter que ces chiffres peuvent varier en fonction des populations étudiées, des traitements utilisés et des critères spécifiques de contrôle glycémique fixés.

La poursuite de la recherche afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques contre le DT2 revêt une importance cruciale, étant donné le nombre limité de patients diabétiques parvenant à atteindre un contrôle glycémique satisfaisant à la suite d'un traitement. Malgré les avancées significatives dans la prise en charge de cette maladie, il reste évident qu'il existe un besoin pressant d'élargir les options de traitement à notre disposition.

## **II. IMPLICATION DU RECEPTEUR PURINERGIQUE P2RY1 DANS LA REGULATION DE LA SECRETION D'INSULINE**

### **A. Les récepteurs couplés aux protéines G : cibles thérapeutiques privilégiées**

Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) forment une grande famille de protéines membranaires impliquées dans la transmission de signaux cellulaires, ils agissent comme des récepteurs pour une grande variété de signaux chimiques, tels que les neurotransmetteurs, les hormones, et les médiateurs extracellulaires<sup>158,159</sup>. Lorsqu'un ligand se fixe à un RCPG spécifique, il déclenche une cascade de réactions intracellulaires qui aboutissent à des réponses cellulaires appropriées. Ces réponses peuvent inclure la régulation de la sécrétion d'hormones, la modulation de la réponse immunitaire, la régulation de la pression artérielle, et bien d'autres fonctions vitales<sup>158</sup>.

Les RCPG jouent un rôle crucial dans la recherche pharmaceutique<sup>160</sup>, et leur importance ne cesse de croître. La grande diversité des RCPG, avec plus de 800 membres identifiés dans le génome humain, en fait des cibles potentielles pour le développement de médicaments. En effet, de nombreuses maladies sont associées à des dysfonctionnements des RCPG. Par exemple, l'asthme, la dépression, la maladie de Parkinson, et le DT2 sont autant d'affections liées à des altérations des réponses des RCPG. Par conséquent, la recherche pharmaceutique s'est largement penchée sur la découverte de médicaments qui modulent sélectivement l'activité des RCPG<sup>160</sup>.

Les avancées dans la compréhension de la structure moléculaire des RCPG ont permis la conception de médicaments qui ciblent précisément un RCPG donné sans affecter les autres membres de la famille. Les avancées en pharmacologie et en biologie structurale ont permis de concevoir des médicaments plus précis, minimisant ainsi les effets secondaires indésirables. De plus, de nombreux laboratoires de recherche explorent activement les RCPG orphelins, c'est-à-dire ceux pour lesquels les ligands naturels ne sont pas encore identifiés. La découverte de ligands et de médicaments ciblant ces RCPG pourrait ouvrir de nouvelles voies pour le traitement de maladies jusqu'alors incurables ou difficiles à traiter.

Les RCPG sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta, ainsi que dans la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques, tels que les muscles et le foie. En modulant ces processus, les RCPG peuvent influencer directement le métabolisme du glucose. Par conséquent, en ciblant spécifiquement les RCPG avec des molécules pharmacologiques, il est possible de développer de nouvelles approches pour traiter le DT2.

Plusieurs types de RCPG sont particulièrement pertinents dans la recherche de traitements contre le DT2. Parmi eux, le récepteur Glucagon-Like Peptide-1 (GLP1R) et le récepteur peptide insulinothrotrope dépendant du glucose (GIPR) sont des cibles prometteuses. Le récepteur GLP-1 est impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline et peut également favoriser la perte de poids, ce qui en fait une cible attrayante pour le traitement du DT2. Les médicaments agonistes du récepteur GLP-1R, tels que l'exénatide, le liraglutide et le semaglutide, sont déjà utilisés cliniquement avec succès<sup>161</sup>.

Les RCPG sont des cibles privilégiées dans la recherche de nouvelles molécules pour traiter le DT2. Leur rôle central dans la régulation de la glycémie et du métabolisme en fait des candidats prometteurs pour le développement de thérapies plus efficaces et mieux ciblées. Le futur de la lutte contre le DT2 repose en partie sur la compréhension et l'exploitation de ces récepteurs.

Ma thèse s'est focalisée sur l'investigation génétique du RCPG, P2RY1, un récepteur purinergique.

## **B. La famille des récepteurs purinergiques :**

### **a. Les différentes catégories de récepteur purinergique :**

Les récepteurs purinergiques, répandus à travers divers tissus et organes, sont des récepteurs membranaires cruciaux pour la signalisation des nucléotides puriniques extracellulaires tels que l'ATP et l'ADP. Ces récepteurs sont classés en deux grandes catégories : les récepteurs P1 (ou adénosiniques)<sup>162,163</sup> et les récepteurs P2<sup>163</sup>. Cette classification est basée sur leur spécificité aux ligands et les mécanismes de signalisation qu'ils activent.

#### **Récepteurs P1 :**

Les récepteurs P1 sont activés par l'adénosine, un dérivé de l'ATP. Ils sont subdivisés en quatre sous-types : A1, A2A, A2B et A3, chacun étant impliqué dans des voies de signalisation spécifiques et jouant des rôles distincts dans l'organisme. Par exemple, les récepteurs A1 sont largement exprimés dans le cerveau et sont impliqués dans la modulation du sommeil et de la vigilance. Les récepteurs A2A, quant à eux, sont impliqués dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et du système nerveux central<sup>164</sup>.

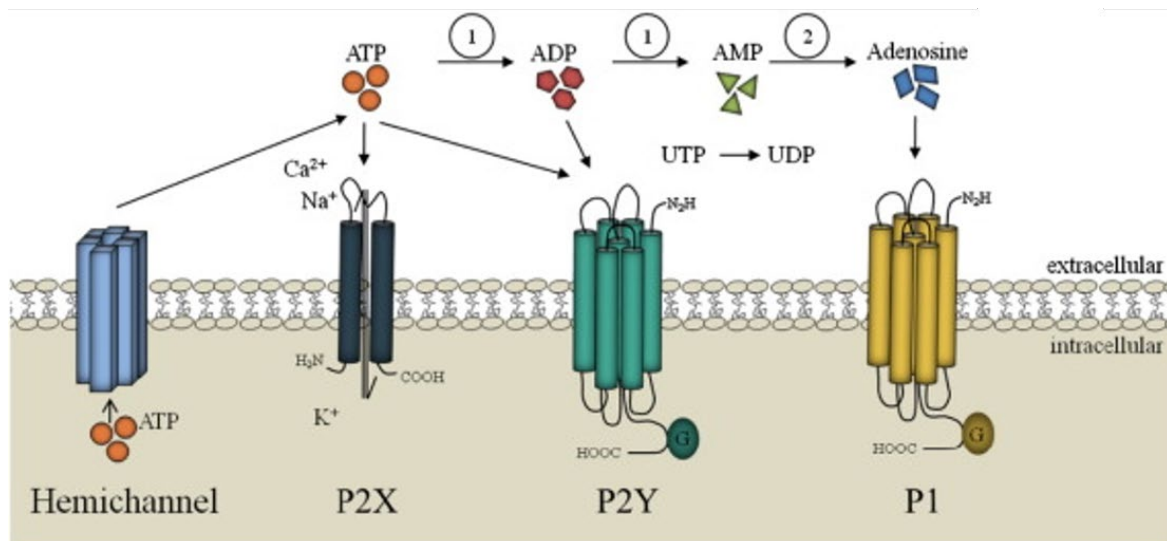
## Récepteurs P2 :

Les récepteurs P2 sont activés par l'ATP ou l'ADP (en fonction du récepteur) et sont divisés en deux sous-types principaux : P2X (canaux ionique) et P2Y (récepteurs couplés aux protéines G) (Figure 16).

Les récepteurs P2X sont des canaux ioniques, formant des pores transmembranaires, et sont impliqués dans la transmission synaptique, la contraction musculaire et la régulation du flux ionique intracellulaire<sup>163</sup>.

Les récepteurs P2Y sont des RCPG, régulant divers processus tels que la libération de calcium<sup>163,165</sup>.

La stimulation des récepteurs purinergiques peut déclencher une variété de réponses cellulaires, comme par exemple la transmission neuronale ou par la réponse immunitaire. Ces récepteurs jouent donc un rôle essentiel dans la physiologie de nombreux tissus et organes. En outre, des recherches suggèrent que les récepteurs purinergiques pourraient être des cibles thérapeutiques potentielles pour diverses maladies, notamment les troubles neurologiques, cardiovasculaires et inflammatoires<sup>163</sup>.



**Figure 16. Les différentes catégories de récepteurs purinergiques.**

Les récepteurs purinergiques sont cruciaux pour la signalisation des nucléotides puriniques. On les divise en deux catégories : les récepteurs P1, activés par l'adénosine, et les récepteurs P2, activés par l'ATP ou l'ADP. Les récepteurs P2 se subdivisent en P2X (canaux ioniques) et P2Y (récepteurs couplés aux protéines G).

Source : adaptée de : Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P. & Tobiasch, E. *The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. Comput Struct Biotechnol J* 13, 75–84 (2015).

#### b. Caractéristiques du récepteur P2RY1 :

Le récepteur P2RY1, fait partie de la famille des récepteurs purinergiques de type P2Y, chez l'homme il est codé par le gène *P2RY1* situé sur le chromosome 3.

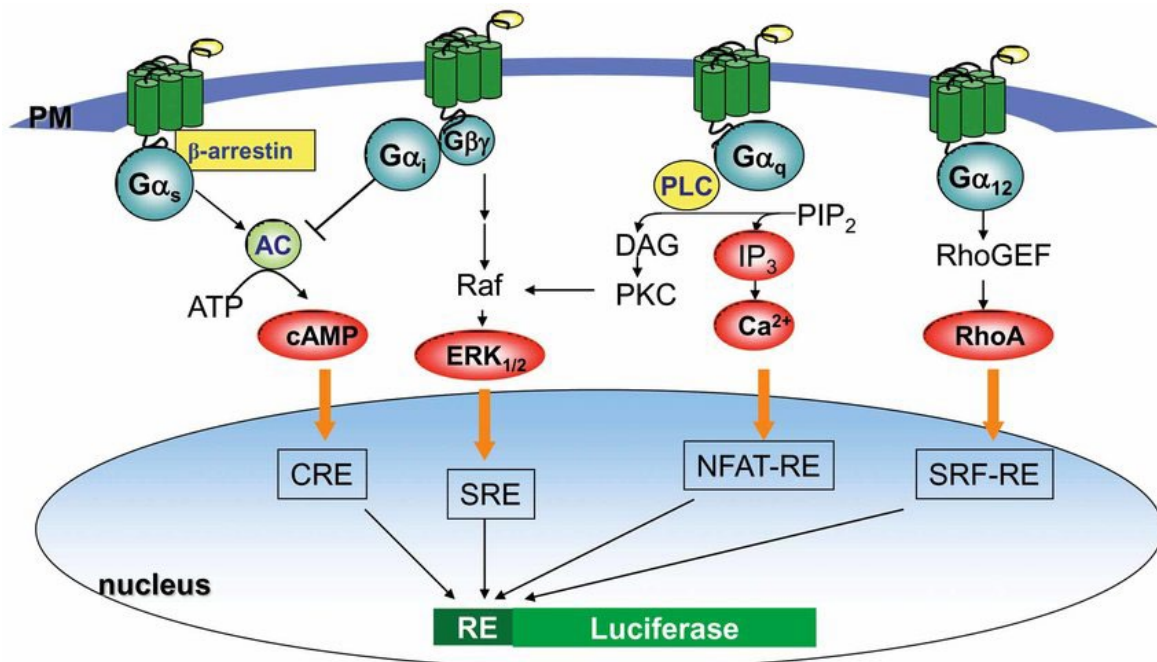
Il joue un rôle crucial en tant que médiateur des effets de l'ADP et en moindre mesure de l'ATP qui agissent comme ligands endogènes<sup>163</sup>. Lorsqu'ils sont libérés dans l'environnement extracellulaire, ces nucléotides puriniques se lient spécifiquement aux sites de liaison du récepteur P2RY1, déclenchant ainsi sa stimulation. Cette activation provoque un changement conformationnel dans la structure du récepteur, qui active ensuite les voies de signalisation intracellulaires. Etant un RCPG, le récepteur P2RY1 est composé de sept domaines transmembranaires reliés par des boucles intracellulaires et extracellulaires. Ces domaines transmembranaires sont responsables de la reconnaissance et de la liaison spécifique des ligands purinergiques tels que l'ADP<sup>163</sup>.

#### Voies de signalisation du récepteur P2RY1 :

L'activation du récepteur P2RY1 déclenche principalement la signalisation via la protéine Gq/11, ce qui entraîne une cascade d'événements intracellulaires<sup>166</sup>. Lorsque le récepteur est activé, il interagit avec la protéine Gq/11, entraînant la dissociation de la sous-unité alpha de la protéine G. La sous-unité alpha activée de la protéine Gq/11 active ensuite l'enzyme phospholipase C (PLC). PLC par la sous-unité alpha de la protéine Gq/11 entraîne le clivage des phospholipides membranaires, en particulier du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3). Le DAG reste ancré dans la membrane plasmique, tandis que l'IP3 est libéré dans le cytosol.

L'IP3 libéré active les canaux calciques de la membrane du réticulum endoplasmique, entraînant une libération rapide du calcium (Ca<sup>2+</sup>) intracellulaire. L'augmentation du calcium intracellulaire agit comme un second messenger, permettant l'activation de la voie Nuclear factor of activated T-cells (NFAT)<sup>167</sup> (Figure 17).





**Figure 17. Les différentes classes de récepteur couplé au protéine G.**

Les protéines G activées par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) se divisent en classes fonctionnelles. Les  $G_{\alpha_s}$  stimulent la production d'AMPc, les  $G_{\alpha_i}$  inhibent l'AMPc, les  $G_{\alpha_q}$  activent la phospholipase C, les  $G_{\alpha_{12}}$  active RhoA. Ces classes forment un réseau complexe de régulation cellulaire. Les sous-unités  $G_{\beta\gamma}$  tout comme la  $\beta$ -arrestine régulent diverses voies.

Source : Cheng, Z. et al. Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics* 4, 84–91 (2010).

Le récepteur P2RY1 est largement distribué dans différents tissus et organes. Au niveau du système nerveux central (SNC), le récepteur P2RY1 est exprimé dans les neurones et est impliqué dans la modulation de la neurotransmission où il est associé à des fonctions cognitives et comportementales spécifiques<sup>168</sup>.

Mais il est aussi impliqué dans le système cardiovasculaire. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, le récepteur P2RY1 est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression sanguine. Son activation par l'ADP induit la vasoconstriction, jouant ainsi un rôle dans le maintien de la pression artérielle<sup>169,170</sup>.

Enfin le récepteur P2RY1 est surtout étudié pour son rôle très important dans l'activation des plaquettes sanguines<sup>171–173</sup>.

Le récepteur P2RY1 est exprimé à la surface des plaquettes et réagit à l'ADP libéré par les cellules endommagées. Lorsque l'ADP se lie au récepteur P2RY1, cela déclenche une

cascade de signaux intracellulaires, provoquant une augmentation rapide du calcium intracellulaire qui est essentielle pour l'activation des plaquettes. Elle conduit à la libération de granules de stockage contenant des médiateurs tels que l'ADP, la sérotonine et le facteur de von Willebrand induisant une boucle de régulation positive qui renforce davantage l'agrégation plaquettaire et la formation du caillot sanguin. De plus, l'activation du récepteur P2RY1 favorise un changement de forme des plaquettes, les rendant plus adhésives et facilitant ainsi leur fixation aux parois vasculaires endommagées.

### C. Rôle du récepteur P2RY1 dans la sécrétion d'insuline :

#### a. Effet de l'activation de P2RY1 au sein de la cellule bêta

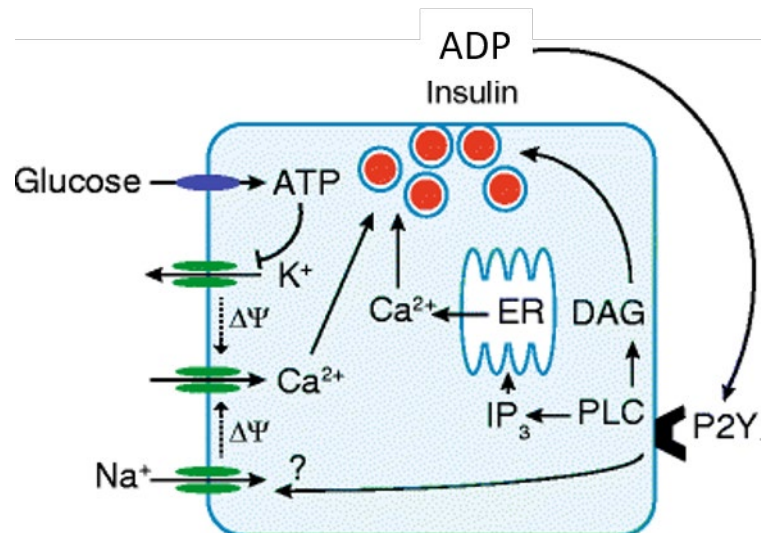
Le récepteur P2RY1, joue un rôle crucial dans la régulation de la glycémie chez les rongeurs en régulant la sécrétion d'insuline par le pancréas<sup>174,175</sup>. Toutefois son rôle chez l'humain doit être éclairci. Le récepteur P2RY1 est exprimé dans les cellules bêta, aussi bien chez l'humain que chez les rongeurs. Il a été démontré chez la souris que le gène *P2ry1* joue un rôle sur l'homéostasie glucidique en influençant l'insulinémie. En effet les souris knockout pour le gène *P2ry1* présentent une intolérance au glucose (étudiée via un GTT) dû à une perte de la réponse insulinémique en réponse à la hausse de glycémie par rapport au groupe control<sup>176</sup>. Ce phénomène est cohérent avec ce qui avait été observé *in vitro* via une approche pharmacologique de sécrétion d'insuline en réponse à divers agonistes spécifiques ou non de P2RY1 dans des modèles de cellules bêta murines (MIN6, INS1)<sup>177-179</sup>.

En réponse à une augmentation de la glycémie, l'ADP est libérée des cellules bêta conjointement à l'insuline dans les vésicules stockées au niveau de la membrane plasmique<sup>180,181</sup>.

L'ADP extracellulaire agit ensuite comme un ligand du récepteur P2RY1, provoquant ainsi son activation. L'activation du récepteur P2RY1 dans les cellules bêta déclenche une cascade de signalisations qui conduit à l'augmentation du calcium ( $Ca^{2+}$ ) intracellulaire<sup>182</sup>. Cette augmentation du calcium intracellulaire est essentielle pour la libération d'insuline des cellules bêta. Le calcium agit comme un second messager, stimulant la fusion des vésicules contenant de l'insuline avec la membrane cellulaire et permettant ainsi la libération de l'insuline et d'ADP formant ainsi une boucle de régulation positive<sup>182,183</sup> (Figure 18).

Les nucléosides jouent donc un double rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta. Dans un premier temps en inhibant les canaux potassiques ATP-sensitives

dans les cellules bêta, l'inhibition de ces canaux  $K_{ATP}$  entraînant une dépolarisation de la membrane cellulaire et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants, ce qui conduit à l'entrée de calcium dans les cellules bêta et favorise la libération d'insuline. Mais également en agissant comme des ligands des récepteurs purinergique tel que P2RY1.



**Figure 18. Voie de signalisation de P2RY1 dans la cellule bêta.**

*L'activation de P2RY1 par de l'ADP entrainerait l'activation de la PLC et donc une augmentation des concentrations d'IP3 intracellulaire ce qui aurait pour effet d'activer l'entrée de calcium dans la cellule, entraînant la sécrétion des vésicules d'insuline. L'activation de P2RY1 par l'ADP active la PLC, entraînant une augmentation des concentrations d'IP3, ceci induisant une augmentation du calcium intracellulaire conduisant à la sécrétion de vésicules d'insuline.*

*Source : adaptée de : Tengholm, A. Purinergic P2Y1 receptors take centre stage in autocrine stimulation of human beta cells. Diabetologia 57, 2436–2439 (2014).*

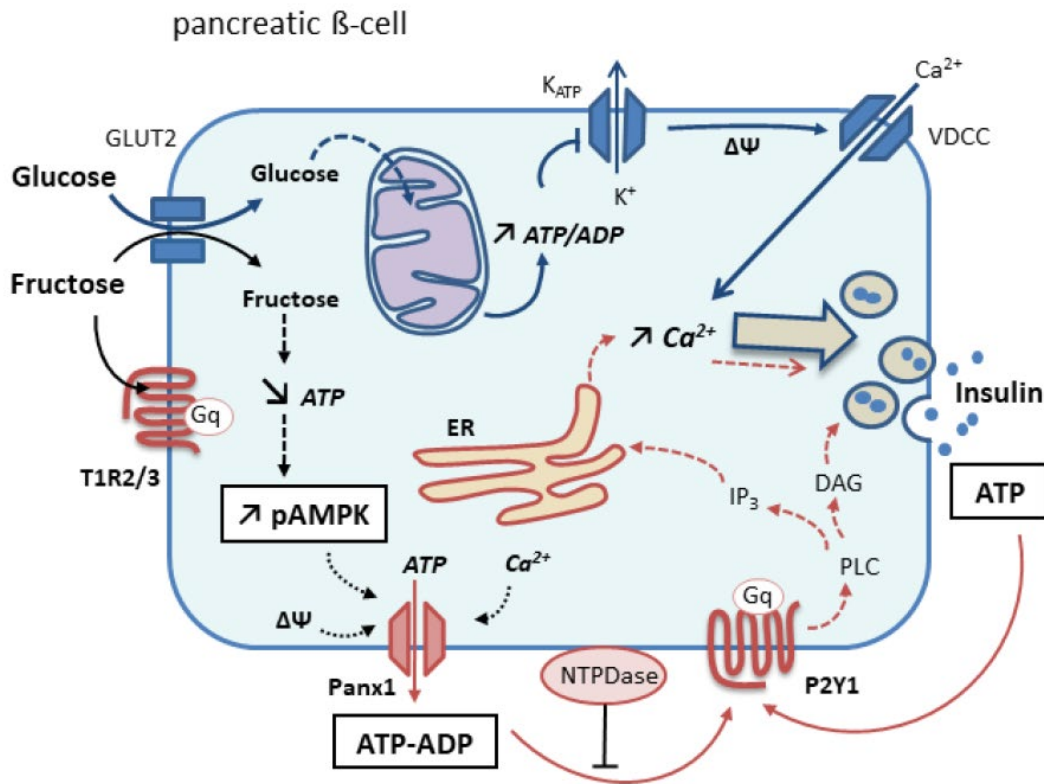
#### b. Effet autocrine de l'activation de P2RY1 dans l'îlot

L'ADP étant produit directement par la cellule bêta, plusieurs acteurs interviennent dans l'activité de P2RY1 en tant qu'activateurs de la sécrétion d'insuline via les concentrations extracellulaires en ADP.

Afin d'activer le récepteur P2RY1, l'ADP doit dans un premier temps franchir la membrane plasmique<sup>184</sup>. Pour ce faire, ils peuvent traverser via la pannexine-1 (codé par le gène *PANX1*), un canal à adénosine, comme cela se produit dans différents types cellulaires. Il a été démontré que les nucléosides pouvaient franchir la membrane plasmide de la cellule bêta via la pannexine-1 et avoir un effet sur la sécrétion d'insuline via différents récepteurs purinergiques<sup>185,186</sup> (Figure 19).

Mais il semblerait que la sécrétion d'ATP et d'ADP par les cellules bêta passe majoritairement par les vésicules d'insuline grâce au transporteur nucléotidique vésiculaire (VNUT), qui charge les vésicules d'insuline en nucléosides. Ces nucléosides peuvent ensuite activer les récepteurs purinergiques, notamment P2RY1, jouant ainsi un rôle crucial dans la régulation de la sécrétion d'insuline<sup>187</sup> (Figure 19).

Une fois dans le milieu extracellulaire, les concentrations en ATP et ADP peuvent être modulées par l'action d'ectonucléotidases. Au niveau pancréatique, ce rôle est joué par l'ENPDase3 (codé par le gène *ENTPD3*) et exprimé de manière très spécifique dans les cellules bêta. L'ENPDase3 est principalement impliqué dans la dégradation de l'ATP en ADP, puis en adénosine, par un processus de phosphohydrolyse. Ce mécanisme entraîne une diminution des concentrations d'ADP extracellulaire et, par conséquent, réduit la quantité de ligands disponibles pour l'activation de P2RY1, ce qui a pour effet de diminuer la sécrétion d'insuline<sup>188,189</sup> (Figure 19).



**Figure 19. Effet autocrine de l'activation de P2RY1 dans la cellule bêta.**

L'ADP, produit directement par la cellule bêta, joue un rôle clé dans l'activation du récepteur P2RY1 pour la sécrétion d'insuline. Pour activer P2RY1, l'ADP doit franchir la membrane plasmique, ce qui peut se faire via la pannexine-1 ou les vésicules d'insuline chargées de nucléosides par le transporteur VNUT. Les nucléosides activent les récepteurs purinergiques, en particulier P2RY1, régulant ainsi la sécrétion d'insuline. Les concentrations extracellulaires en ATP et ADP sont modulées par l'action d'ectonucléotidases, comme l'ENPDase3 dans le pancréas. L'ENPDase3 dégrade l'ATP en ADP, puis en adénosine, réduisant les concentrations d'ADP extracellulaire et diminuant ainsi l'activation de P2RY1, ce qui diminue la sécrétion d'insuline.

Source : Bartley, C. et al. Chronic fructose renders pancreatic β-cells hyper-responsive to glucose-stimulated insulin secretion through extracellular ATP signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317, E25–E41 (2019).

### III. OBJECTIFS DE LA THESE

L'implication de P2RY1 dans la voie de sécrétion de l'insuline chez les rongeurs est de plus en plus solidement établie. Les premières preuves du rôle des récepteurs purinergiques, obtenues grâce à l'utilisation d'agonistes non spécifiques, ont considérablement évolué à présent. Dans un premier temps, le développement de nouvelles molécules spécifiques du récepteur P2RY1 a permis de confirmer le potentiel de P2RY1 en tant que cible prometteuse pour le développement de traitements contre le diabète de type 2, en tant que sécrétagogue. De plus, le phénotypage des souris knockout pour le gène *P2ry1* a clairement démontré le rôle de ce récepteur en tant qu'acteur essentiel du maintien de l'homéostasie glucidique, influençant la réponse insulinique lors d'un challenge glycémique.

Cependant, chez l'homme, le rôle de P2RY1 n'est pas encore complètement élucidé. Bien que le gène *P2RY1* ait été associé au risque de DT2 par des études GWAS, peu de recherches ont été menées pour approfondir dans quelle mesure ce récepteur influence la sécrétion d'insuline, voire si son expression est modulée lors de l'installation du DT2.

Les données de RNAseq et de single cell RNAseq semblent indiquer que *P2RY1* est bel et bien exprimé au niveau pancréatique, et qu'il est même enrichi dans les cellules bêta. Cependant, son expression reste nettement moins élevée que dans les modèles murins. Du point de vue mécanistique, son influence sur les concentrations intracellulaires de calcium en fait une cible prometteuse pour la modulation de la sécrétion d'insuline. Toutefois, l'expression de *P2RY1* chez l'homme est-elle suffisante pour qu'il puisse être utilisé comme cible thérapeutique ? Si c'est le cas, quelle est son activité intracellulaire et quel rôle joue-t-il dans la régulation de l'insulinémie ?

Ma thèse vise à déterminer, à l'aide de différentes approches génomiques et fonctionnelles, le rôle de P2RY1 dans le développement du DT2, le maintien de l'homéostasie glucidique, ainsi que son potentiel en tant que cible thérapeutique dans le développement d'une nouvelle classe de sécrétagogues de l'insuline.

## MATERIEL ET METHODES

### I. COHORTES – DEFINITION DES CAS ET TEMOINS

*P2YR1* (NM\_002563.5) a été séquencé chez 9 266 adultes français ou belges, dont 4 177 participants atteints de DT2 (Tableau 1). Des données cliniques, en particulier des données anthropométriques et métaboliques, sont disponibles pour chaque patient lors du recrutement. Les critères d'exclusion comprenaient le diabète auto-immun latent de l'adulte (LADA), le DT1 (basé sur la présence d'autoanticorps) et le diabète gestationnel. Tous les patients inclus avaient plus de 18 ans. Un total de 7 268 échantillons provient de l'étude RaDiO.

Cette étude rassemble des participants provenant de diverses études épidémiologiques :

1. L'étude D.E.S.I.R. (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'InsulinoRésistance), une étude prospective française couvrant 9 années, qui comprend à la fois des hommes et des femmes résidant dans l'ouest de la France<sup>190</sup>.
2. Des individus recrutés par l'UMR 1283/8199, le service de nutrition de l'hôpital Hôtel-Dieu (Paris, France) ou le CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, hôpital Saint-Louis, France)<sup>191,192</sup>.
3. Des participants recrutés par le service d'endocrinologie de l'hôpital de Corbeil-Essonnes (Corbeil-Essonnes, France)<sup>191</sup>.
4. Des individus sélectionnés par l'association Fleurbaix Laventie Ville Santé<sup>192</sup>.

1 998 échantillons proviennent de l'étude PreciDIAG, comprenant des patients diagnostiqués avec un DT2. Ces patients ont été suivis de manière prospective au département de Diabétologie de l'Hôpital Universitaire de Liège (Belgique).

Nous disposons d'informations détaillées concernant le profil métabolique de chaque participant, notamment son IMC, son statut glycémique, son profil lipidique ainsi que sa pression sanguine.

L'hyperglycémie est identifiée par une glycémie à jeun supérieure à 5,6 mmol/L et/ou par la prise de traitements hypoglycémiant. La présence de DT2 est caractérisée par une glycémie à jeun dépassant 7 mmol/L, une hémoglobine glyquée A1c supérieure à 6,5 % et/ou par la prise de traitements hypoglycémiant, à condition qu'aucun anticorps ne soit détecté. Les participants contrôles, utilisés dans les études cas-témoins sur l'hyperglycémie ou le DT2, présentent une glycémie à jeun inférieure à 5,6 mmol/L, ne suivent aucun traitement hypoglycémiant et ont plus de 40 ans.

Toutes les études de cohorte ont suivi les principes éthiques définis dans la déclaration d'Helsinki (révisée en 1996) et ont été approuvées par les comités éthiques locaux de l'hôpital

de Corbeil-Essonnes (France), du Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à des Recherches Biomédicales (CCPPRB) de Lille - Hôpital de Lille (Lille, France), de l'hôpital Hôtel-Dieu (France), de l'hôpital Bicêtre (France) et de Liège (Belgique). Tous les participants ont signé un formulaire de consentement éclairé.

## II. SEQUENÇAGE DE L'ADN HAUT DEBIT

Dans le cadre de l'étude RaDiO, le gène *P2RY1* a été soumis à une analyse de séquençage ciblé en utilisant la technologie NGS (Next-Generation Sequencing). Cette approche a été employée pour réaliser un enrichissement précis de séquences génétiques spécifiques de gènes présélectionnés, en recourant au kit NimbleGen SeqCap EZ Choice XL (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, USA).

L'étape initiale consiste à constituer une librairie, c'est à dire à fragmenter 1 µg d'ADN extrait du plasma sanguin des individus de l'étude à l'aide de l'ultrasonicateur E220 (Covaris, Woburn, USA). Les fragments d'ADN résultants sont ensuite réparés pour obtenir des extrémités franches, et ils sont liés à des adaptateurs. Pour finir, les fragments sont ensuite amplifiés par réaction en chaîne par polymérase (PCR).

Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont finalement soumis à un séquençage sur la plateforme HiSeq 4000 (Illumina, San Diego, USA), en suivant un protocole de séquençage *paired-end* (2x150 pb) qui permet de lire les séquences des deux extrémités des fragments.

Les données résultantes du séquençage sont ensuite analysées à l'aide du logiciel de conversion bcl2fastq d'Illumina (version 2.17), ce qui permet, grâce aux indices attribués précédemment, de trier et d'organiser les différents "reads" en fonction des individus. Par la suite, ces "reads" sont alignés sur la séquence du génome humain (GRCh38 / hg38).

Les variants sont ensuite soumis à une annotation, où des informations pertinentes sont attribuées à chaque variant en se basant sur des bases de données. Ces informations incluent la fréquence du variant dans la population, les conséquences moléculaires associées, ainsi que des prédictions quant à leurs effets nuisibles. L'annotation est effectuée en utilisant les Interfaces d'Application Perl d'Ensembl (version 75) ainsi que des scripts personnalisés en Perl, en s'appuyant sur les bases de données dbSNP (version 135) et dbNSFP (version 3.0).

Les échantillons d'ADN de l'étude PreciDIAG ont quant à eux été séquencés par séquençage de l'exome entier. Le processus de séquençage NGS était similaire à celui utilisé pour l'étude RADIO, à la différence près qu'un séquençage Illumina système NovaSeq6000 a été utilisé.



### III. ÉTUDE EQTL

#### A. Cohortes :

Des échantillons de sang et d'îlots pancréatiques ont été prélevés sur un total de 116 patients ayant subi une pancréatectomie au cours d'une intervention chirurgicale pour différentes maladies du pancréas. Les îlots ont ensuite été isolés par microdissection à capture laser (LCM) à partir des marges saines de fragments chirurgicaux des patients<sup>193</sup>.

#### B. eQTL

Les SNPs au locus *P2RY1* ont été identifiés par le biais d'une analyse de microarray d'ADN (puce à billes Illumina Omni2.5M), tandis que l'expression de *P2RY1* (NM\_002563.5) a été évaluée à l'aide du séquençage de l'ARN<sup>193,194</sup>.

L'analyse des eQTL a été réalisée à l'aide du PackR QTLTools, en prenant en compte le sexe, l'IMC, l'âge et l'effet de lot d'ARN en tant que covariables. L'analyse des eQTL s'est concentrée sur les variants courants au locus *P2RY1* connus pour être associés de manière significative ou nominale au risque de DT2<sup>195</sup>.

#### C. Carte de la chromatine :

La carte chromatinienne a été générée à l'aide de l'outil shinyapp (<https://shinyapps.jax.org/endoc-islet-multi-omics/>) basé sur l'analyse des états de chromatine (ChromHMM) réalisée dans la lignée cellulaire bêta pancréatique humaine EndoC $\beta$ H1<sup>196</sup>.

## IV. ACTIVITE DES MUTANTS

### A. Génération des plasmides :

#### a. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) de mutagenèse :

Divers variants du gène *P2RY1* ont été générés à partir de plasmides via une PCR de mutagenèse en utilisant le kit Quick Change II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent, Santa Clara, USA). L'objectif de cette approche était la génération de nouveaux plasmides portant les mutations souhaitées à partir des plasmides contenant la version sauvage (WT) du gène d'intérêt. Pour chaque plasmide à créer, un mélange a été préparé, comprenant 1 µl de plasmide *P2RY1* WT et 1,25 µl de chaque amorce portant la mutation souhaitée (sens et anti-sens), 5 µl de tampon de réaction 10X, 1,2 µl de mélange de dNTP, 3 µl de réactif QuickSolution, et 36,3 µl d'eau. Enfin, le mélange a été complété par l'incorporation de 1 µl de l'enzyme PfuUltra High Fidelity DNA polymerase.

La PCR de mutagenèse a ensuite été lancée dans un thermocycleur en suivant ce protocole : 95°C pendant 1 minute ; 18 cycles de (95°C pendant 1 minute ; 55°C pendant 1 minute ; 70°C pendant 22 minutes) ; 68°C pendant 7 minutes.

#### b. Méthode de purification par dialyse :

Les produits issus de la réaction de PCR de mutagenèse ont ensuite subi une purification par dialyse pour éliminer toute trace résiduelle des réactifs utilisés lors de la PCR, tels que l'enzyme, les dNTPs et les amorces. Cette étape a été réalisée en déposant l'intégralité du mélange de PCR sur un filtre positionné au-dessus de l'eau, ce qui permet de se débarrasser des résidus tout en préservant les plasmides d'intérêt. Après un laps de temps de 20 minutes, le produit de PCR purifié, composé des plasmides WT et mutés, est resté en surface du filtre et a été recueilli.

#### c. Étape de digestion enzymatique :

Après la dialyse, pour sélectionner spécifiquement les plasmides mutés, il est impératif d'éliminer les plasmides sauvages (WT). Pour ce faire, le produit de PCR dialysé est soumis à une digestion enzymatique visant à cliver le plasmide WT méthylé, en contraste avec le plasmide muté non méthylé. Pour cette étape, 5 µl du produit de PCR dialysé ont été mélangés à 1 µl de l'enzyme DpnI (capable de cliver les plasmides au niveau des adénines méthylées),

1  $\mu\text{l}$  du tampon Cutsmart (New England Biolabs, Ipswich, États-Unis) et 4,6  $\mu\text{l}$  d'eau. La réaction enzymatique est ensuite conduite durant 6 heures à une température de 37°C.

d. Processus de transformation bactérienne :

Après que les plasmides mutés et purifiés aient été obtenus, ces derniers ont été amplifiés par le biais d'une transformation bactérienne. Cette phase requiert l'utilisation de bactéries compétentes E. Coli One Shot TOP10 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). En amont, 5  $\mu\text{l}$  du plasmide muté purifié ont été introduits dans le tube contenant les bactéries TOP10. Après une période de 30 minutes sur glace, la solution a ensuite été chauffée à 42°C pendant 30 secondes, puis refroidie sur glace pendant 2 minutes. Ce procédé crée un choc thermique qui a facilité la transformation bactérienne. Par la suite, les bactéries ont été mises en culture en suspension dans 250  $\mu\text{l}$  du milieu Super Optimal Broth (SOC) (Thermo Fisher Scientific) et agitées à 225 rpm pendant une heure à 37°C. Enfin, les bactéries transformées ont étéensemencées sur une gélose Lysogeny Broth (LB), comprenant de la kanamycine afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide porteur d'un gène de résistance, puis incubées à 37°C pendant la nuit.

e. Miniprép et extraction des plasmides :

Après la transformation bactérienne, les bactéries ayant intégré avec succès les plasmides mutés, sélectionnées grâce au gène de résistance à l'antibiotique porté par les plasmides, ont été amplifiées. Ce processus a impliqué la sélection de 4 colonies bactériennes, qui ont été numérotées, prélevées, et cultivées en suspension dans 3 mL de milieu LB enrichi en kanamycine ou ampicilline sous agitation à 165 rpm à 37°C, durant la nuit.

L'extraction de l'ADN plasmidique à partir des bactéries transformées et amplifiées a été réalisée au moyen du kit NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Concrètement, pour chaque colonie amplifiée, 1,9 mL du milieu de culture bactérienne ont été prélevés, centrifugés à 11 000 g pendant 10 minutes, et le culot de bactéries a été préservé. À cela s'est ajouté l'ajout de 250  $\mu\text{l}$  de tampon A1 contenant de la RNase, suivi de l'ajout de 250  $\mu\text{l}$  du tampon de lyse A2. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, la solution a été neutralisée avec 300  $\mu\text{l}$  du tampon A3. Par la suite, après une centrifugation à 11 000 g pendant 10 minutes, le surnageant contenant l'ADN plasmidique a été chargé sur une colonne de silice, puis centrifugé pour la purification. Des étapes successives de lavage et de séchage ont été entreprises avant l'élution finale de l'ADN

plasmidique avec de l'eau ultrapure. La concentration de l'ADN plasmidique obtenue a été évaluée au Nanodrop.

f. Séquençage Sanger :

Ensuite, un séquençage de Sanger a été effectué afin de vérifier l'intégrité des nouvelles constructions plasmidiques et de détecter toute éventuelle mutation indésirable.

Le séquençage a été conduit avec le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific). Pour chaque amorçage de séquençage spécifique, 3 µl du plasmide muté (à une concentration de 125 ng/µl) ont été associés à 0,3 µl de BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 0,2 µl d'amorce forward ou reverse, 3,6 µl de tampon de séquençage 5X, et 12,4 µl d'eau pure. La réaction de séquençage a ensuite été initiée suivant ce protocole : 96°C pendant 1 minute ; 30 cycles de (94°C pendant 10 secondes ; 50°C pendant 5 secondes ; 60°C pendant 4 minutes).

À la suite de la réaction de séquençage, les produits ont été purifiés à l'aide de colonnes de résine SEPHADEX G50 via une centrifugation à 960 g. Le séquençage Sanger a été exécuté avec l'automate 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

g. Maxiprep et extraction des plasmides :

Une fois qu'une colonie bactérienne portant la mutation correcte a été identifiée lors du séquençage des plasmides obtenus après la miniprèp, cette colonie a été à nouveau amplifiée à travers une maxipréparation, suivie de l'extraction de l'ADN plasmidique. Pour ce faire, une petite quantité de bactéries provenant de la miniprèp a été mise en culture dans 250 mL de milieu LB enrichi en antibiotique. Cette culture a ensuite été incubée sous agitation à 165 rpm à 37°C pendant la nuit.

L'ADN plasmidique a ensuite été extrait en utilisant le kit NucleoBond Xtra Maxi Plus (Macherey-Nagel). Pour chaque maxipréparation, le milieu de culture bactérienne a été réparti dans plusieurs tubes, puis centrifugé à 5000 g pendant 15 minutes afin de récupérer le culot de bactéries. Ce culot a ensuite été resuspendu dans 12 mL de tampon RES contenant de la RNase, en transférant les bactéries d'un tube à l'autre jusqu'à ce qu'elles soient complètement re suspendues. Ensuite, 12 mL de tampon de lyse LYS ont été ajoutés, suivis d'une incubation de 5 minutes à température ambiante. Après cela, la solution a été neutralisée en ajoutant 12 mL de tampon NEU jusqu'à ce que la coloration bleue disparaisse. Après une centrifugation de 10 minutes à 5000 g, le surnageant contenant les plasmides a été appliqué sur un filtre humidifié avec 25 mL de tampon d'équilibration EQU, placé au-dessus d'une colonne

contenant une membrane de silice. Le filtre a ensuite été rincé avec 15 mL de tampon d'équilibration, suivi par l'ajout de 25 mL de tampon de lavage après l'écoulement. La colonne a été placée au-dessus d'un nouveau tube, et les plasmides ont été élués avec 15 mL de tampon ELU.

Afin de concentrer les plasmides, une précipitation a été réalisée en ajoutant 10,5 mL d'isopropanol dans le tube, suivie d'une agitation et d'une incubation d'au moins 2 minutes à température ambiante. La solution a été filtrée lentement de manière à permettre aux plasmides de se lier au filtre. Ensuite, le filtre a été lavé avec 4 mL d'éthanol à 70% et séché. Les plasmides ont été finalement élués du filtre avec 400 µl d'eau. La concentration en ADN plasmidique a été mesurée à l'aide d'un Nanodrop. La séquence du plasmide obtenu a été vérifiée conformément à ce qui a été décrit précédemment.

### **B. Culture des cellules HEK293 :**

Les cellules HEK293 (Promega, Madison, USA) ont été cultivées dans le milieu Eagle modifié de Dulbecco (Gibco, Waltham, USA) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et de 50 µg/ml d'hygromycine B (Thermo Fisher Scientific) à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Ces cellules, désignées sous le nom de HEK293luc pour la suite de la discussion, sont une lignée cellulaire stable de transfection contenant un plasmide comprenant le gène de la luciférase (luc2P) régulé par un promoteur minimal TATA qui intègre plusieurs éléments de réponse du facteur nucléaire des cellules T activées (NFAT-RE).

### **C. Transfection des plasmides :**

Un million de cellules HEK293luc ont été centrifugées à 500g pendant 5 minutes à TA puis re suspendues avec 100 µl de tampon de transfection prévu dans le kit Cell Line Nucleofector V (Lonza, Bâle, Suisse), puis 5 µg (à une concentration de 0,5 µg/µl) de plasmide de codant pour le gène *P2RY1* ou de l'un de ses variant a été ajouté. L'électroporation a été réalisée à l'aide du dispositif Nucleofector 2b (Lonza, Bâle, Suisse) avec le programme Q-001. Les cellules ont ensuite été re suspendues dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (Gibco, Waltham, États-Unis) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et de 1 % de pénicilline/streptomycine (Gibco), et ensemencées dans des plaques opaques blanches 96 puits préalablement coater de poly-D-lysine à une concentration de 20 000 cellules/puits (100 µl/puits), puis cultivées pendant 48 heures.

#### **D. Dosages de la luciférase :**

Les cellules HEK293luc électroporées (Promega) ont été traitées pendant 6 heures avec des doses croissantes de MRS2365 (Tocris Bioscience, Bristol, Royaume-Uni) allant de  $10^{-8}$  à  $10^{-2}$  M diluées dans un milieu modifié Eagle modifié de Dulbecco (Gibco), complété avec 1 % de sérum de veau fœtal, pendant 6 heures pour l'expérience de dose-réponse, ou avec  $10^{-2}$  M de MRS2365 dilué dans un milieu modifié Eagle modifié de Dulbecco (Gibco) complété avec 1 % de sérum de veau fœtal jusqu'à 14 heures par intervalles de 2 heures pour l'expérience de cinétique. Les cellules ont ensuite été lysées dans 40  $\mu$ l de tampon de lyse passive (Promega) pendant 30 minutes. L'activité de la luciférase a été mesurée en ajoutant directement au puit 25  $\mu$ l de tampon de substrat de luciférase (luciferine) (Promega). La luminescence a été mesurée à l'aide d'un luminomètre GloMax (Promega). Chaque expérience a été réalisée quatre fois de manière indépendante et en quadruplicats techniques.

#### **E. Graphiques en radar :**

Des graphiques en radar ont été générés à partir de données issues des expériences de dose-réponse, de cinétique, d'activité basale et de quantification de l'expression. Sur ces graphiques, chaque valeur a été tracée en utilisant la transformation logarithmique en base 10 ( $\log_{10}$ ), ce qui a permis une représentation complète des données, mettant en évidence les différences relatives sur une échelle logarithmique. L'activité de P2RY1 sauvage a été fixée à zéro, et l'échelle pour tous les graphiques radar varie de -1 à +1. Les variants aux propriétés améliorées sont représentés dans la plage de 0 à +1, tandis que les variants aux propriétés altérées sont représentés dans la plage de 0 à -1.

Le terme "Expression" représente le niveau d'expression de chaque mutant de P2RY1 quantifié à partir de tests d'immunofluorescence. La valeur "Basal" représente l'activité du récepteur dans des conditions basales (c'est-à-dire sans stimulation par agoniste). La valeur "Max" représente l'effet maximal, "Span" indique l'écart entre les effets minimum et maximum, et "EC50" représente la dose nécessaire pour atteindre 50 % de l'effet maximal dans l'expérience de dose-réponse. Tous ces paramètres ont été calculés à l'aide de GraphPad Prism (version 9), en utilisant une régression non linéaire (ajustement de courbe, pente variable, 4 paramètres) pour leur détermination. Le coefficient de pente "Hillslope" a également été calculé à l'aide de GraphPad Prism 9, en utilisant une régression linéaire simple à partir des données de l'expérience de cinétique.

## **V. LOCALISATION ET EXPRESSION DES MUTANTS**

### **A. Immunofluorescence :**

Les cellules HEK293luc électroporées (Promega) ont étéensemencées sur des lamelles préalablement coater de poly-D-lysine dans une plaque à 12 puits à une concentration de 100 000 cellules/puits (1000 µl/puits) et cultivées pendant 48 heures. Deux jours après l'électroporation, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde à 4 % (Thermo Fisher Scientific) pendant 1 heure, suivies de trois lavages au tampon phosphate-saline (PBS). Par la suite, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1 % (dilué dans du PBS) pendant 15 minutes. Les sites de liaison non occupés ont été bloqués en utilisant un tampon de blocage Background Reducing (Agilent) pendant 1 heure. Une incubation à 4 °C pendant 16 heures a été réalisée avec l'anticorps primaire anti-DDK (TA-50011) (Origene, Rockville, USA) et anti- $\alpha$ Tubulin (PA1-38814) (Thermo Fisher Scientific), les deux dilués à 1/1000 dans le tampon de blocage. Après trois lavages au PBS contenant 0,1 % de Tween, les cellules ont été incubées avec les anticorps secondaires fluorescents (A-11029 et A11012) (Sigma, Saint Louis, USA), les deux dilués à 1/1000 dans le tampon de blocage, et les noyaux ont été marqués avec du DAPI (D9542) dilué à 1/1000 (Thermo Fisher Scientific) pendant 1 heure dans l'obscurité. Après trois lavages au PBS contenant 0,1 % de Tween, les lamelles ont été montées à l'aide du milieu de montage Prolong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont été observées à l'aide du système de numérisation de lame Cell Observer NanoZoomer S20MD (Hamamatsu, Shizuoka, Japan). Cette expérience a été menée indépendamment trois fois.

### **B. Quantification :**

Afin de quantifier l'expression de P2RY1, l'intensité lumineuse produite par l'anticorps secondaire anti DDK a été mesurée (en utilisant ImageJ Fiji) et normalisée par rapport à l'intensité du DAPI. Cette expérience a été réalisée sur six régions de trois lames distinctes pour chaque variant. L'expression de chaque mutant a ensuite été exprimée en pourcentage de l'expression de P2RY1 non muté.

## **VI. EFFET DE L'AGONISTE DE P2RY1 SUR LA SECRETION D'INSULINE**

### **A. Culture des cellules EndoCBH5 :**

Les cellules EndoC-βH5 ont été générées par transfert génique intégratif de gènes d'immortalisation Transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT), Simian vacuolating virus 40 large T antigen (SV40LT) ainsi que la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1), dans du pancréas fœtal humain. Les gènes d'immortalisation ont été retirés après amplification en utilisant le système CRE-Lox. Les cellules résultantes sont disponibles à l'achat sous forme de cellules EndoC-βH5 prêtes à l'emploi (Human cell desing, Toulouse, France).

Les cellules EndoCBH5 ont été cultivées dans le milieu Ultiβ1 (Univercell Biosolutions, Toulouse, France) à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 100 000 cellules par puits dans une plaque à 96 puits préalablement coater de βcoat (Univercell Biosolutions), conformément au protocole du fabricant<sup>197</sup>.

### **B. GSIS :**

Après six jours d'ensemencement, les cellules ont été soumises à une période de privation dans un milieu Ulti-ST pauvre en nutriment (starving) pendant 24 heures, puis traitées avec un tampon βKrebs (Univercell Biosolutions) supplémenté de 0,1% de BSA pendant 60 minutes à 37 °C.

Par la suite, les cellules ont été traitées avec un tampon βKrebs-BSA contenant ± 20 mM de glucose ± 1 μM de MRS2365 ou 1 μM de MRS2500 pendant 40 minutes.

Le milieu de sécrétion est récupéré puis les cellules sont lysées sur glace avec 100 μl de tampon TETG contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) pendant 5 minutes. Le lysat cellulaire ainsi obtenu est lui aussi récupéré.

Le milieu de sécrétion ainsi que les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 5 minutes à 700 rcf et à une température de 4°C. 80 μl de surnageant de chaque solution sont récupérés et conservés à une température de -20°C en vue du dosage de l'insuline ultérieur.

### **C. Dosages de la sécrétion d'insuline :**

Les échantillons du test de stimulation-sécrétion, sont préalablement dilués à un rapport de 1:50 avec de l'eau ultrapure pour la sécrétion, tandis que le lysat cellulaire a été dilué au 1:4000



toujours dans de l'eau. Chaque échantillon dilué a été quantifié avec le kit ELISA Human Insulin (MercoDIA, Uppsala, Suède), (ELISA en sandwich).

Dans chaque puits du kit, 25 µl d'échantillons ont été ajoutés à 100 µl d'une enzyme peroxydase conjuguée à un anticorps ciblant l'insuline humaine. La plaque a été incubée sous agitation pendant une heure à température ambiante. À la fin de l'incubation, 6 rinçages de chaque puits avec 350 µl de tampon de lavage ont été effectués. Ensuite 200 µl de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), le substrat de la peroxydase, ont été ajoutés à chaque puit, et la plaque a été incubée sous agitation pendant 15 minutes. Pour arrêter la réaction enzymatique, 50 µl de solution STOP a été ajouté. Enfin, nous avons mesuré la densité optique de chaque puits à une longueur d'onde de 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre GloMax.

La sécrétion d'insuline a été exprimée en pourcentage du contenu intracellulaire en insuline. Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante et en quadruplicats techniques.

## **VII. SEQUENÇAGE D'ARN DES CELLULES BETA PANCREATIQUES HUMAINES**

### **A. Extraction de l'ARN :**

Après six jours d'ensemencement (500 000 cellules par puits dans une plaque à 24 puits), les cellules EndoC-βH5 ont été soumises à une période de privation dans un milieu Ulti-ST pauvre en nutriment (starving) pendant 24 heures, puis traitées avec un tampon βKrebs (Univercell Biosolutions) supplémenté de 0,1% de BSA pendant 60 minutes à 37 °C. Par la suite, les cellules ont été traitées avec un tampon βKrebs-BSA contenant ± 20 mM de glucose ± 1 µM de MRS2365 pendant 5 heures, puis l'ARN a été extrait grâce à un kitNucleoSpin RNA, Mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel).

Après traitement les cellules ont ensuite été lysées dans 350 µL de Buffer RA1 supplémenté de 3,5 µL de β-mercaptoéthanol (β-ME). Dans le but de réduire la viscosité et d'obtenir un lysat plus clair, une étape de filtration a été entreprise en utilisant un filtre NucleoSpin, suivi d'une centrifugation d'une minute à 11 000 x g.

Après avoir homogénéisé le lysat, 350 µL d'éthanol à 70 % ont été incorporés, puis centrifugés pendant 30 secondes à 11 000 x g pour favoriser la séparation des constituants. Afin d'assurer l'élimination de la phase aqueuse, le lysat a été combiné avec 350 µL de BDM (Tampon de déssalage) et centrifugé à 11 000 x g pendant une minute.

Pour la suite de la procédure, 95 µL du mélange de réaction de la DNase ont été appliqués au centre de la membrane de silice de la colonne, suivis d'une incubation à température ambiante pendant 15 minutes.

Le lavage a été réalisé en plusieurs étapes :

Pour le premier lavage, 200 µL de tampon RAW2 ont été introduits dans la colonne NucleoSpin ARN, puis centrifugés pendant 30 secondes à 11 000 x g.

Pour le deuxième lavage, 600 µL de tampon RA3 ont été ajoutés à la colonne NucleoSpin ARN, puis centrifugés pendant 30 secondes à 11 000 x g. Le filtrat résultant a ensuite été éliminé.

Pour le troisième et dernier lavage, 250 µL de tampon RA3 ont été introduits dans la colonne NucleoSpin ARN, suivis d'une centrifugation de deux minutes à 11 000 x g, permettant d'assurer un séchage complet de la membrane. Le filtrat résultant a ensuite été éliminé.

Après les lavages, 60 µL d'eau RNase-free ont été ajoutés, suivis d'une centrifugation d'une minute à 11 000 x g afin de récupérer le produit final. La concentration en ARN obtenu a été évaluée au Nanodrop. La qualité des échantillons a été vérifiée à l'aide de nanopuces RNA 6000 sur le Bioanalyzer Agilent 2100

## **B. Séquençage d'ARNm :**

L'ARN purifié (500 ng) a été utilisé pour la préparation des bibliothèques. Les bibliothèques d'ARN ont été générées à l'aide des billes poly(A) NextFlex 2.0 et du kit de séquençage d'ARN directionnel rapide NextFlex 2.0 (PerkinElmer, Waltham, MA, États-Unis) conformément aux instructions du fabricant. Les bibliothèques ont été séquencées sur le système Illumina NovaSeq6000. Quatre réplicats biologiques par condition ont été séquencés. Les données brutes ont été démultiplexées à l'aide du logiciel bcl2fastq (Illumina ; version v2.19.1.403). Une étape de suppression des adaptateurs a été réalisée à l'aide de trimmomatic (version 0.39). Le mappage des lectures sur le génome humain (Hg38) a été réalisé à l'aide de STAR (version 2.7.3a). En moyenne, 85 millions de lectures ont été correctement alignées sur le génome humain. Les étapes de comptage brut et normalisé ont été effectuées à l'aide de RSEM (version v1.3.1). Les annotations des noms de gènes ont été effectuées à l'aide d'un fichier GTF provenant d'Encode (version 42) et d'Ensembl (version 108). L'analyse différentielle a été réalisée à l'aide de DESeq2 (version 1.38.3) en se concentrant sur les gènes ayant une moyenne de Transcripts Par Million (TPM) supérieure à 1. Le volcano plot a été généré à l'aide de l'outil shinyapp (<http://www.graphbio1.com/en/>). L'analyse d'enrichissement des ensembles

de gènes a été réalisée à l'aide de Metascape (juillet 2023)<sup>198</sup>. Dans cette analyse, nous n'avons inclus que les gènes qui étaient significativement surexprimés ( $P_{\text{adj}} < 0,05$ ).

# RESULTATS

## I. DETECTION DES MUTATIONS PAR SEQUENÇAGE D'ADN

*P2RY1* (NM\_002563.5) a été séquencé par séquençage de nouvelle génération chez 9 266 adultes, dont 4 177 participants atteints de DT2 (Tableau 1). Nous avons identifié 22 variants rares non synonymes, dont 11 nouveaux variants (Tableau 2). Chaque variant était porté par un, deux ou trois participants (Tableau 2). Ces variants sont répartis dans l'ensemble du récepteur (Figure 1).

**Tableau 1. Informations cliniques des participants inclus dans cette étude.**

Données Clinique	Etude RaDiO	Etude PreciDIAG
<b>N</b>	7,268	1,998
<b>Sexe</b>	M: 3,592 / F: 3,676	M: 1,272 / F: 726
<b>Age à l'investigation</b>	50.9 ± 12.6	66.1 ± 10.8
<b>Indice de masse corporelle (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.3 ± 6.5	30.7 ± 5.3
<b>N<sub>T2D</sub> (%)</b>	2,179 (30%)	1,998 (100%)

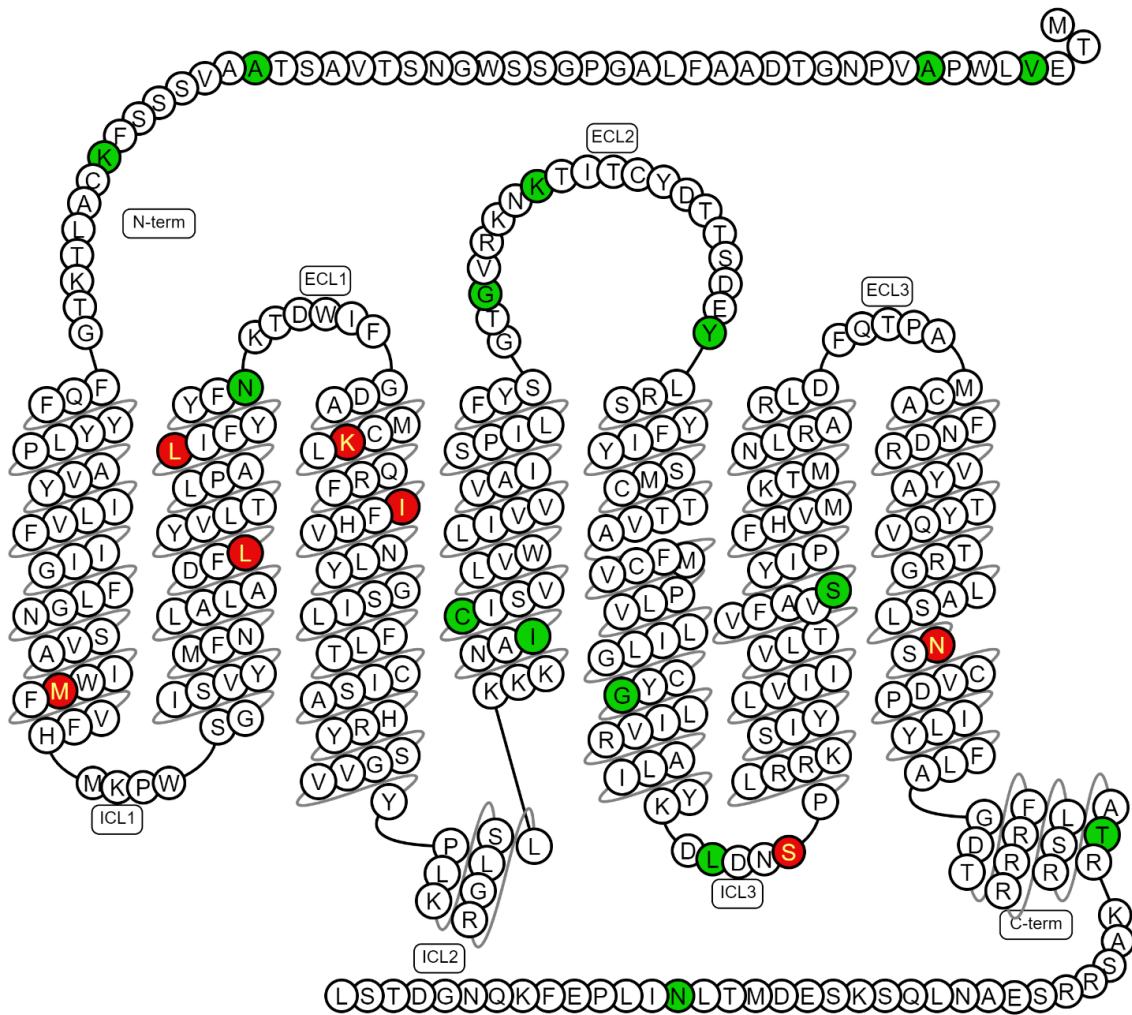
Les données sont exprimées en nombres ou en moyennes ± écart type.

**Tableau 2. Variants rares de *P2RY1* identifiés dans la présente étude.**

Variants rare dans <i>P2RY1</i> (NM_002563.5)	MAC dans cette étude	MAC dans gnomAD	REVEL (score)	Catégorie selon les tests in vitro
c.11T>G, p.V4G	1	5	Neutre (0.06)	Neutre
c.23C>G, p.A8G	1	9	Neutre (0.039)	Neutre
c.101C>T, p.A34V	1	387	Neutre (0.106)	Neutre
c.122A>G, p.K41R	1	1	Neutre (0.057)	Neutre
c.225G>A, p.M75I	1	0	Neutre (0.264)	Délétère
c.296T>G, p.L99W	2	0	Neutre (0.38)	Délétère
c.319C>G, p.L107V	1	0	Neutre (0.44)	Délétère
c.338A>G, p.N113S	3	45	Neutre (0.306)	Neutre
c.373A>G, p.K125E	1	0	Délétère (0.633)	Délétère
c.388A>G, p.I130V	1	0	Neutre (0.059)	Délétère
c.507C>G, p.I169M	1	0	Neutre (0.048)	Neutre
c.509G>C, p.C170S	1	2	Neutre (0.101)	Neutre
c.577G>A, p.G193R	1	3	Neutre (0.149)	Neutre
c.592A>G, p.K198E	2	0	Neutre (0.043)	Neutre
c.628T>C, p.Y210H	1	0	Neutre (0.044)	Neutre
c.713G>T, p.G238V	2	0	Neutre (0.305)	Neutre
c.745C>G, p.L249V	1	1	Neutre (0.06)	Neutre
c.755C>T, p.S252F	1	3	Neutre (0.217)	Délétère
c.815C>G, p.S272C	1	0	Neutre (0.208)	Neutre
c.947A>G, p.N316S	1	0	Neutre (0.483)	Délétère
c.1015A>G, p.T339A	2	15	Neutre (0.227)	Neutre
c.1079A>G, p.N360S	3	4	Neutre (0.196)	Neutre

**GnomAD**, genome aggregation database (version 2.1.1); **MAC**, minor allele count (nombre d'allèles mineurs); **REVEL**, rare exome variant ensemble learner

**Figure 1. Emplacement des variants trouvés dans P2RY1**

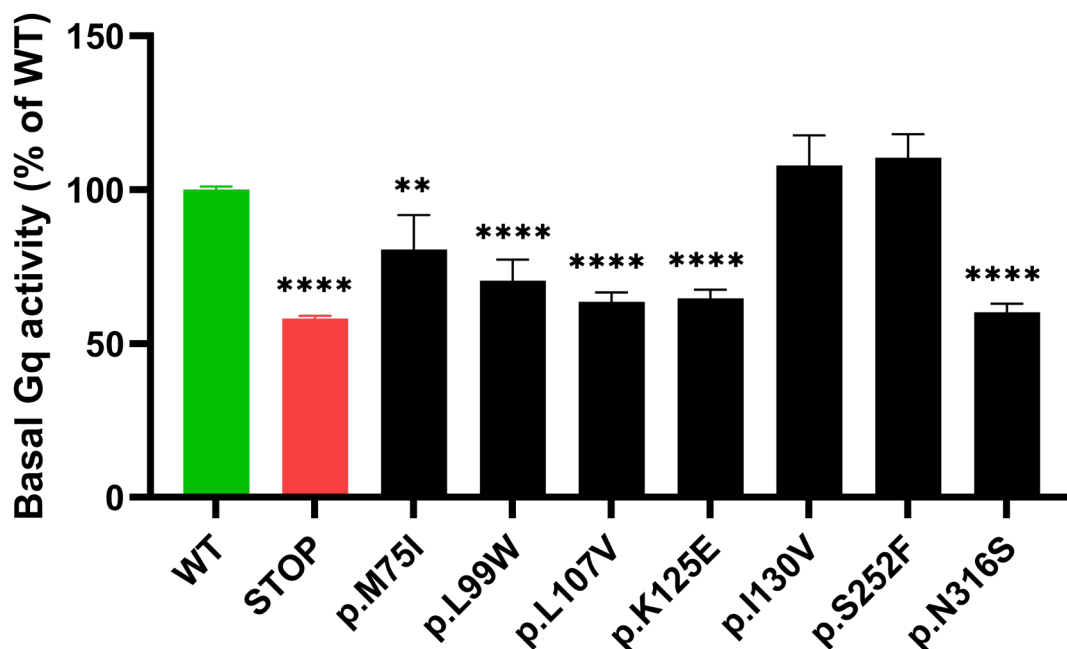


Schématisme de la structure humaine du récepteur P2RY1 (NM\_002563.5) selon les données de Swiss-Prot (accessibles via la base de données GPCR [lien : <https://gpcrdb.org/>]). Les mutations annotées en rouge illustrent les modifications d'acides aminés associées aux variants induisant une perte de fonction, tandis que les mutations en vert symbolisent les changements d'acides aminés liés aux variants neutres d'après nos évaluations in vitro. C-term, Carboxyl-Terminus (extrémité carboxy-terminale) ; ECL, Boucle Extra Cellulaire ; ICL, Boucle Intra Cellulaire ; N-term, Amino-Terminus (extrémité amino-terminale).

## II. GENETIQUE FONCTIONNELLE DES VARIANTS RARES DE *P2RY1*.

Chaque mutant de *P2RY1* a été exprimé dans des cellules rénales embryonnaires humaines 293 (HEK293luc), qui exprimaient de manière stable le gène de la luciférase sous la régulation d'un promoteur incorporant de multiples éléments de réponse du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT-RE) activés par les récepteurs couplés à la protéine Gq<sup>199,200</sup>. Parmi les 22 variants de *P2RY1* testés, nous avons observé une réduction de l'activité basale par rapport au récepteur de type sauvage pour cinq variants encodant p.M75I, p.L99W, p.L107V, p.K125E et p.N316S (Figure 2). Cette réduction suggérait que ces variants spécifiques impactent négativement la capacité du récepteur à initier les voies de signalisation en aval.

**Figure 2. Analyses in vitro pour caractériser l'activité de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour les variants de perte de fonction de *P2RY1* : activité basale.**

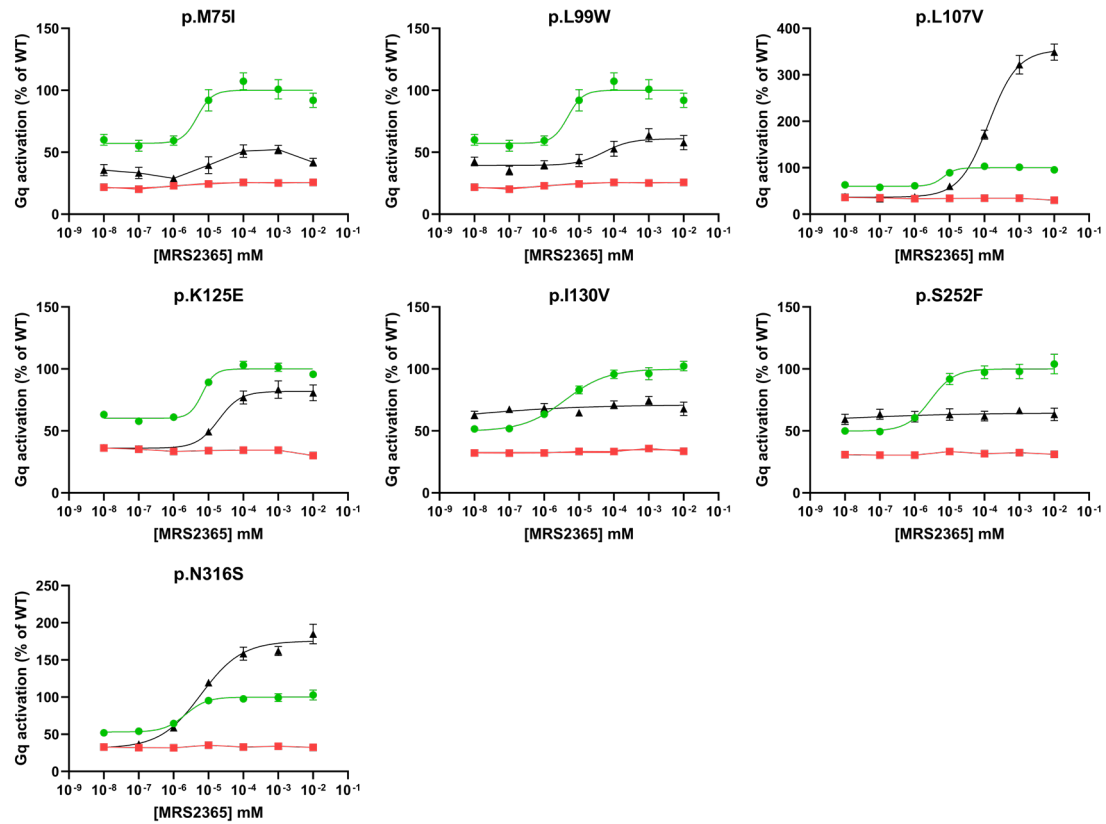


Activité basale de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour chaque variant de perte de fonction de *P2RY1*. Chaque mutant (représenté par des marqueurs noirs) a été comparé à l'activité du *P2RY1* de type sauvage (représenté en vert en tant que contrôle positif) et à un mutant *P2RY1* porteur d'une variation de codon stop précoce (indiqué en rouge en tant que contrôle négatif). Les données sont présentées en pourcentage de l'activité de type sauvage. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne de quatre expériences indépendantes, chacune réalisée en quadruplicats techniques.

Nous avons ensuite réalisé une analyse de dose réponse afin d'évaluer l'activité de la luciférase des 22 variants rares de P2RY1 en réponse à une dose croissante de l'agoniste spécifique de P2RY1, le (N)-methanocarpa-2MeSADP (MRS2365). Parmi les 22 variants de *P2RY1* testés, trois variants encodant p.L107V, p.K125E et p.N316S ont présenté un décalage de la valeur EC50 par rapport au récepteur de type sauvage (Figure 3). Ce résultat indique que ces trois variants présentaient une capacité réduite du MRS2365 à se lier au récepteur. Le variant codant p.K125E a également présenté une activité réduite, tandis que les variants codant p.L107V et p.N316S ont présenté une activité basale réduite et un effet maximal augmenté (Figure 3). De plus, les variants codant p.M75I, p.L99W, p.I130V et p.S252F ont montré une réponse minimale voire nulle à la stimulation par l'agoniste spécifique de *P2RY1* (Figure 3), suggérant une perte potentielle de fonctionnalité du récepteur et une activation altérée des voies de signalisation en aval dans ces variants. Les 15 autres variants ont présenté une activité similaire au P2RY1 de type sauvage (Annexe Figure supplémentaire 1).



**Figure 3. Analyses in vitro pour caractériser l'activité de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour les variants de perte de fonction de P2RY1 : dose réponse.**

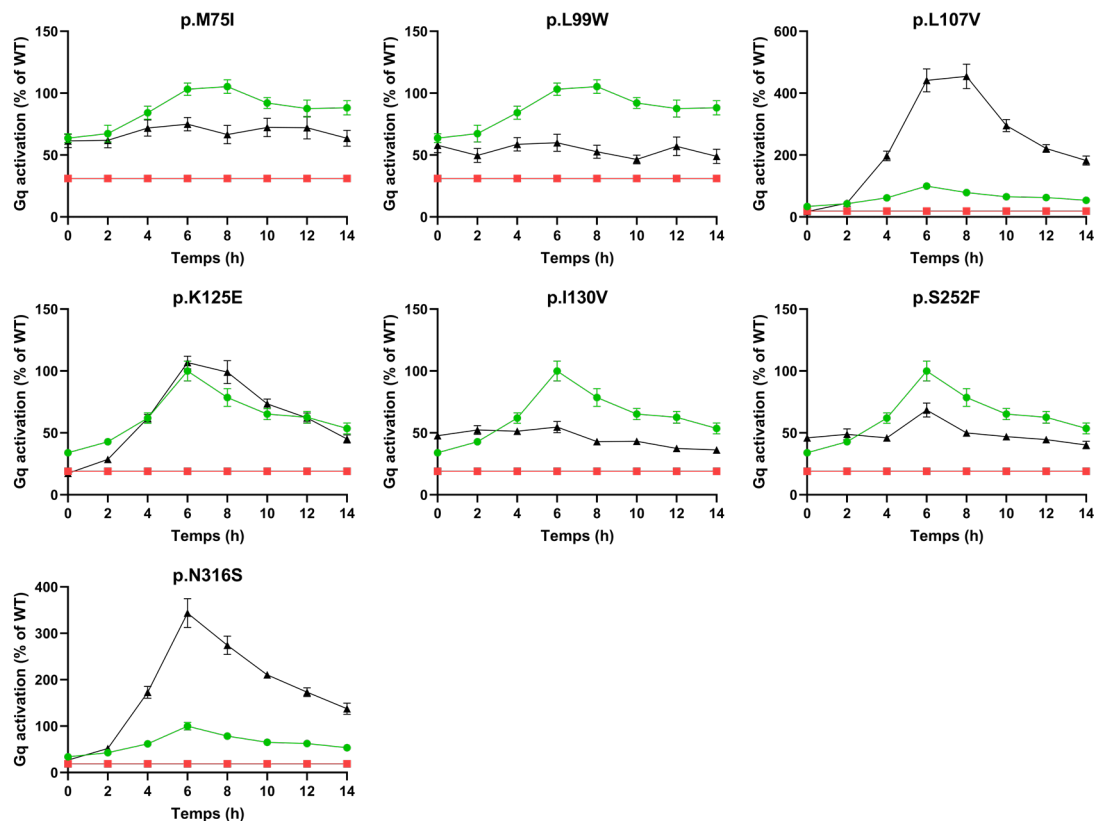


Expériences de dose réponse (pendant une période de 6h) représentant l'activation de la luciférase NFAT-RE pour chaque variant de perte de fonction de *P2RY1*. Chaque mutant (représenté par des triangles noirs) a été comparé à l'activité du *P2RY1* de type sauvage (témoin positif représenté par des points verts) ainsi qu'à un mutant de *P2RY1* portant un variant de codon stop précoce (témoin négatif représenté par un carré rouge). Les données sont présentées en pourcentage de l'activité maximale de type sauvage. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne de 4 expériences indépendantes, chacune réalisée en quadruplicats techniques.

Nous avons ensuite examiné l'activité des sept variants perte de fonction de *P2RY1* identifiés dans les expériences précédentes (Figure 3) par le biais d'une expérience de cinétique en réponse à 10  $\mu$ M de l'agoniste spécifique de P2RY1.

Suite à la stimulation par le MRS2365, ces variants ont présenté une réponse d'activité égale (p.K125E) ou significativement supérieure (p.L107V et p.N316S) au fil du temps par rapport au récepteur de type sauvage (Figure 4). Cela indique que malgré l'activité basale réduite, ces variants spécifiques augmentent la sensibilité du récepteur à une très forte dose de l'agoniste spécifique de P2RY1. En revanche, les variants codant p.M75I, p.L99W, p.L130V et p.S252F ont montré une réponse minimale voire nulle à la stimulation par le MRS2365.

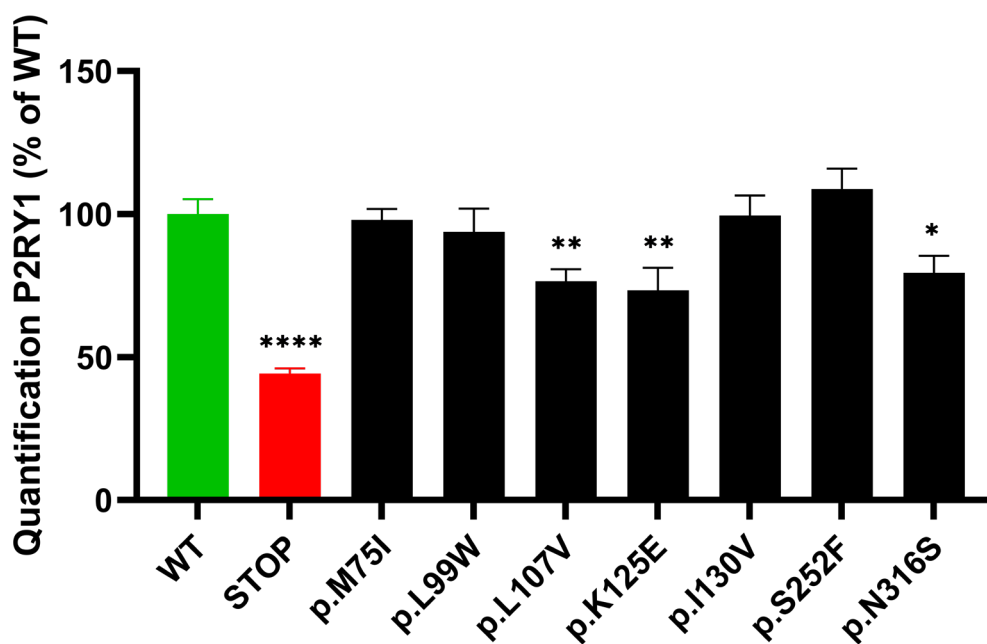
**Figure 4. Analyses in vitro pour caractériser l'activité de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour les variants de perte de fonction de P2RY1 : cinétique.**



Expériences de cinétique (à une concentration de 10 $\mu$ M d'agoniste) représentant l'activation de la luciférase NFAT-RE pour chaque variant de perte de fonction de *P2RY1*. Chaque mutant (représenté par des triangles noirs) a été comparé à l'activité du P2RY1 de type sauvage (témoin positif représenté par des points verts) ainsi qu'à un mutant de P2RY1 portant un variant de codon stop précoce (témoin négatif représenté par un carré rouge). Les données sont présentées en pourcentage de l'activité maximale de type sauvage. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne de 4 expériences indépendantes, chacune réalisée en quadruplicats techniques.

Pour finir nous avons étudié la localisation des sept mutants perte de fonction de *P2RY1* à la membrane cellulaire grâce à des expériences d'immunofluorescence. Une quantification, nous a permis d'observer des niveaux d'expression significativement réduits pour trois variants codant p.L107V, p.K125E et p.N316S, par rapport au récepteur de type sauvage (Figure 5). Ce résultat suggère que ces variants spécifiques pourraient avoir un impact sur la traduction ou la stabilité du récepteur, entraînant des niveaux d'expression globalement plus faibles. En revanche, les variants codant p.M75I, p.L99W, p.I130V et p.S252F n'ont montré aucun changement significatif d'expression par rapport au témoin de type sauvage, indiquant que ces variants n'affectent pas significativement l'expression. Toutefois, l'intégralité des mutants perte de fonction de *P2RY1* ont été observés à la périphérie cellulaire, suggérant que ces variants n'empêchent pas l'adressage du récepteur à la surface cellulaire (Figure 6).

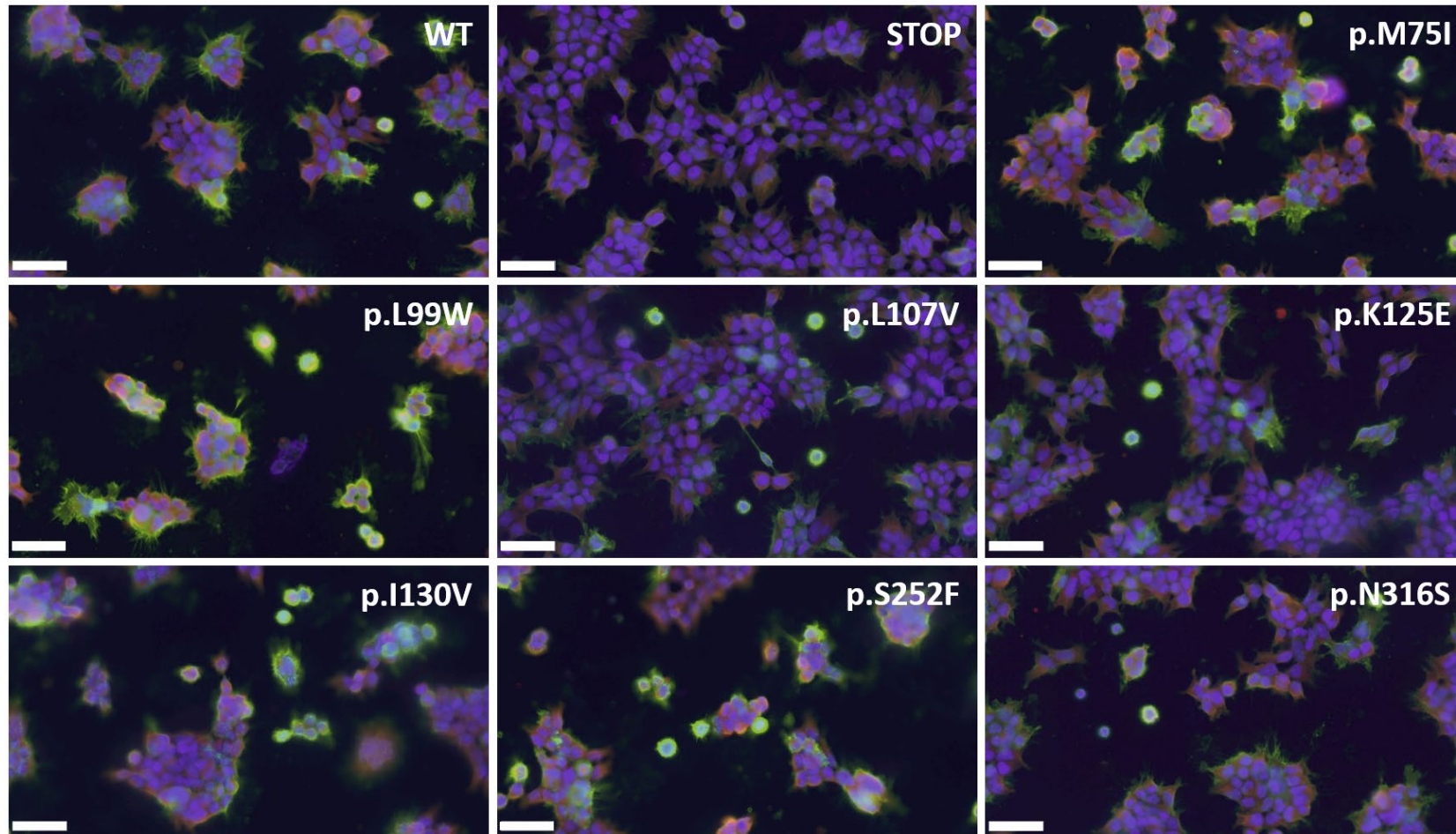
**Figure 5. Analyses in vitro pour caractériser l'expression des variants de perte de fonction de *P2RY1*.**



Expression des mutations perte de fonction de *P2RY1*. Chaque mutant (affiché en noir) a été comparé à l'expression de *P2RY1* de type sauvage (représentée en vert en tant que témoin positif) ainsi qu'à un mutant *P2RY1* porteur d'une variante de codon stop précoce (dépeint en rouge en tant que témoin négatif). Les données sont présentées en pourcentage de l'expression de type sauvage. Les valeurs reflètent les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes, chacune réalisée avec des sextuplicats techniques.

L'analyse statistique de l'activité basale ou de l'expression de chaque mutant a été réalisée à l'aide du test de Mann-Whitney, \*\*P < 0,01 ; \*\*P < 0,01 ; \*\*\*P < 0,001 et \*\*\*\*P < 0,0001.

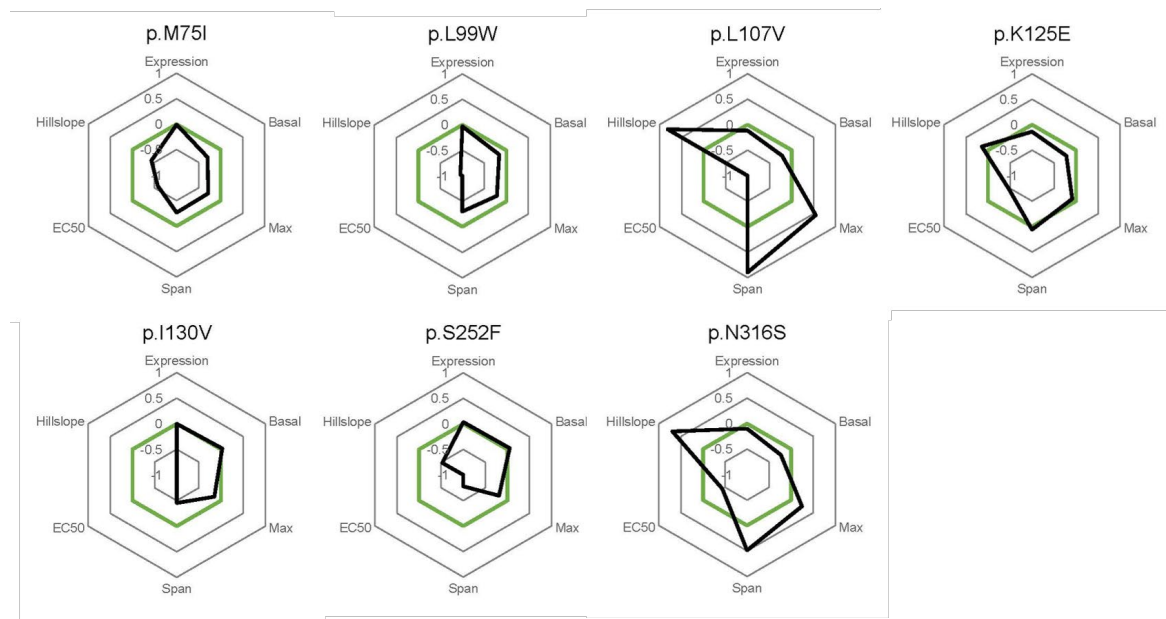
Figure 6. Localisation des mutants P2RY1 à fonction altérée par immunofluorescence.



Microscopie par immunofluorescence des mutants P2RY1 dans les cellules HEK293Luc. Images d'immunofluorescence représentant les cellules HEK293Luc électroporées avec le plasmide P2RY1 de type sauvage, une variante de P2RY1 portant une variation de codon stop précoce (STOP), et des variants P2RY1 à fonction altérée. Le P2RY1 est visualisé en fluorescence verte, les noyaux sont mis en évidence en bleu (coloration DAPI) et la tubuline est montrée en rouge. La barre d'échelle indique 50  $\mu$ m, fournissant une référence pour la taille.

En résumé, les variants codant p.L107V, p.K125E et p.N316S ont entraîné une activité basale réduite, une expression réduite et des valeurs EC50 modifiées du récepteur P2RY1 (Figure 7). De plus, les variants codant p.M75I, p.L99W, p.I130V et p.S252F étaient associés à une absence ou à une réponse réduite au MRS2365. De plus tous ces variants de *P2RY1* identifiés comme perte de fonction étaient situés dans des régions transmembranaires du récepteur, à l'exception du variant codant p.S252F, qui était lui positionné dans la troisième boucle intracellulaire et a été identifié comme un site de phosphorylation (Figure 1)<sup>201</sup>.

**Figure 7. Analyses in vitro pour caractériser l'activité de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour les variants perte de fonction de P2RY1 : Radar Charts.**



Graphiques en radar représentent la signature de signalisation des sept variants de perte de fonction (représentés en noir) ainsi que du P2RY1 de type sauvage (représenté en vert). Les paramètres mesurés comprennent l'expression protéique, l'activité basale, l'effet maximal lors de la stimulation par un agoniste (Max), l'écart entre les effets minimums et maximums (Span), la concentration effective à mi-maximal (EC50) et l'activité au fil du temps (Hillslope).

Il est à noter que nous avons trouvé une association significative ( $P = 1,3 \times 10^{-3}$ ) entre le score in silico prévu des variants via REVEL<sup>202</sup> et l'effet délétère des variants de *P2RY1* basé sur nos analyses in vitro (Tableau 2). A l'exception d'un variant (codant p.S252F), toutes les mutations de perte de fonction de *P2RY1* étaient nouvelles, et ne figuraient donc pas dans la base de données GnomAD (Tableau 2).

Parmi les huit porteurs d'un variant de perte de fonction de *P2RY1*, tous ont présenté une intolérance au glucose (1 individu avec une prédiabète et six avec un DT2 manifeste), à l'exception d'un adulte de 51 ans avec un poids normal. Les porteurs d'un variant perte de fonction de *P2RY1* ayant un prédiabète ou un DT2 étaient en surpoids (c'est-à-dire avec un indice de masse corporelle entre 25 et 35 kg/m<sup>2</sup>) et étaient traités pour le DT2 avec de la

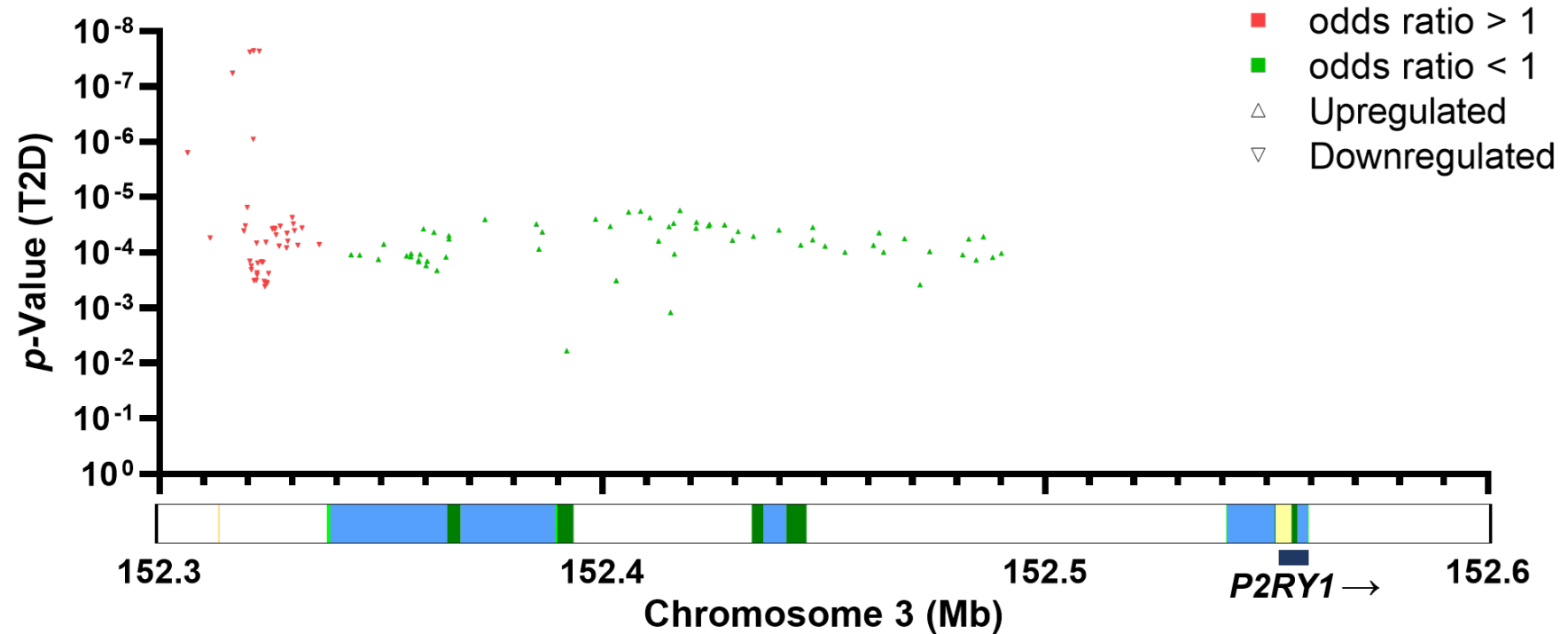
metformine (dont un était également sous insuline). Par conséquent, les porteurs d'un variant perte de fonction de *P2RY1* présentaient une forme commune de DT2.

Dans l'étude TOPMed du T2D knowledge portal<sup>195</sup>, nous avons constaté que les variants nuls de *P2RY1* (c'est-à-dire entraînant soit des décalages de lecture, soit une protéine tronquée) étaient significativement associés à un risque plus élevé de DT2 chez 44 083 participants ( $P = 0,043$  avec un rapport de cotes de 10,9).

### **III. EFFET DES POLYMORPHISMES FREQUENTS AU LOCUS *P2RY1* SUR L'EXPRESSION DE *P2RY1* DANS LES ILOTS PANCREATIQUES HUMAINS.**

Nous avons ensuite réalisé une analyse d'expression quantitative des caractères génétiques (eQTL) chez 103 individus pancréatectomisés<sup>193,194</sup>. Nous avons spécifiquement analysé l'effet des polymorphismes nucléotidiques (SNP) au locus de *P2RY1*, connus pour être associés au DT2<sup>195</sup>, sur l'expression de *P2RY1* dans les échantillons d'îlots pancréatiques de ces donneurs vivants. Notre analyse d'eQTL a révélé une association négative entre les niveaux d'expression de *P2RY1* et les allèles « à risque » de DT2 (Figure 8). Notamment, tous les SNP qui entraînent une élévation de l'expression de *P2RY1* dans les îlots pancréatiques sont systématiquement associés à un effet protecteur sur le risque de DT2 (Figure 8). En revanche, chaque SNP lié à une diminution de l'expression de *P2RY1* est associé à une augmentation du risque de DT2 (Figure 8). Cette observation indique que les niveaux d'expression de *P2RY1* dans les îlots pancréatiques humains jouent un rôle crucial dans la modulation de la susceptibilité au DT2. Il est à noter que les SNP associés à des niveaux augmentés d'expression de *P2RY1* et à un risque réduit de DT2 étaient situés dans une région enhancer active dans la lignée de cellules bêta pancréatiques humaines Endoc $\beta$ H1, tandis que les SNP associés à une diminution des niveaux d'expression de *P2RY1* étaient situés dans une région de chromatine silencieuse (Figure 8).

Figure 8. Association négative entre les niveaux d'expression de *P2RY1* dans les îlots pancréatiques humains et les SNPs à risque de diabète de type 2 (DT2).



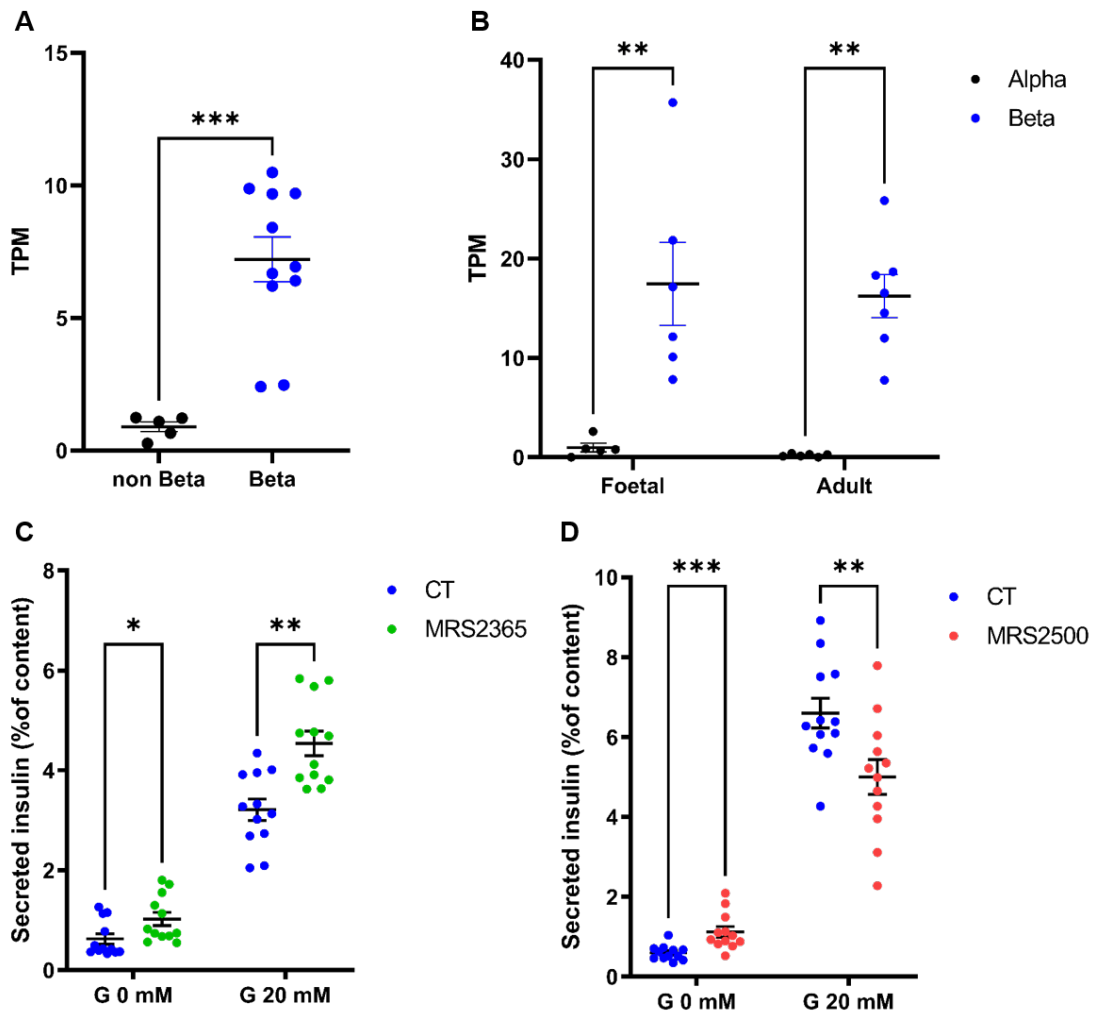
Sur l'axe des abscisses, la localisation des loci d'expression quantitative (eQTL) au niveau du locus *P2RY1* est représentée, tandis que l'axe des ordonnées représente la *p*-Value de leur association avec le risque de diabète de type 2 (DT2). Les triangles verts pointant vers le haut représentent les SNP associés de manière significative à une augmentation de l'expression de *P2RY1* dans les îlots pancréatiques humains et à une réduction du risque de DT2, tandis que les triangles rouges pointant vers le bas représentent les SNP associés de manière significative à une diminution de l'expression de *P2RY1* dans les îlots et à une augmentation du risque de DT2.

#### **IV. EFFET DE L'ACTIVATION DU RECEPTEUR P2RY1 SUR LA SECRETION D'INSULINE DANS LES CELLULES PANCREATIQUES HUMAINES.**

Nous avons ensuite cherché à étudier l'impact de P2RY1 sur la sécrétion d'insuline. À cette fin, nous avons d'abord évalué l'expression de *P2RY1* dans les cellules bêta pancréatiques humaines. En utilisant des données de séquençage ARN<sup>203</sup>, nous avons constaté que l'expression de *P2RY1* était significativement enrichie dans les cellules bêta pancréatiques humaines par rapport à d'autres types cellulaires dans les îlots pancréatiques (Figure 9A). En examinant les données de RNA-seq provenant des cellules bêta pancréatiques humaines fœtales et adultes<sup>204</sup>, nous avons observé que l'expression de *P2RY1* est restée stable et inchangée au cours de ces stades de développement (Figure 9B). En utilisant les cellules bêta pancréatiques humaines EndoCBH5<sup>197</sup>, nous avons constaté que la stimulation de P2RY1 avec son agoniste spécifique MRS2365 a entraîné une augmentation de 41 % de la sécrétion d'insuline dans des conditions de forte concentration en glucose (Figure 9C), tandis que le contenu en insuline est resté stable (Annexe Figure supplémentaire 2A). En revanche, l'inhibition de P2RY1 avec son antagoniste spécifique MRS2500 a entraîné une diminution de 24 % de la sécrétion d'insuline dans des conditions de forte concentration en glucose (Figure 9D), tandis que le contenu en insuline est resté stable (Annexe Figure supplémentaire 2B).



**Figure 9. Expression de *P2RY1* dans les cellules bêta pancréatiques humaines et effet de *P2RY1* sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose suite à sa stimulation ou à son inhibition.**



(A) Expression de *P2RY1* dans les cellules bêta pancréatiques humaines purifiées (n = 11) et les cellules non-bêta (préparation restante d'îlots) (n = 5) évaluée via <sup>200</sup>. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM de RPKM (Lectures Par Million de Kilobases).

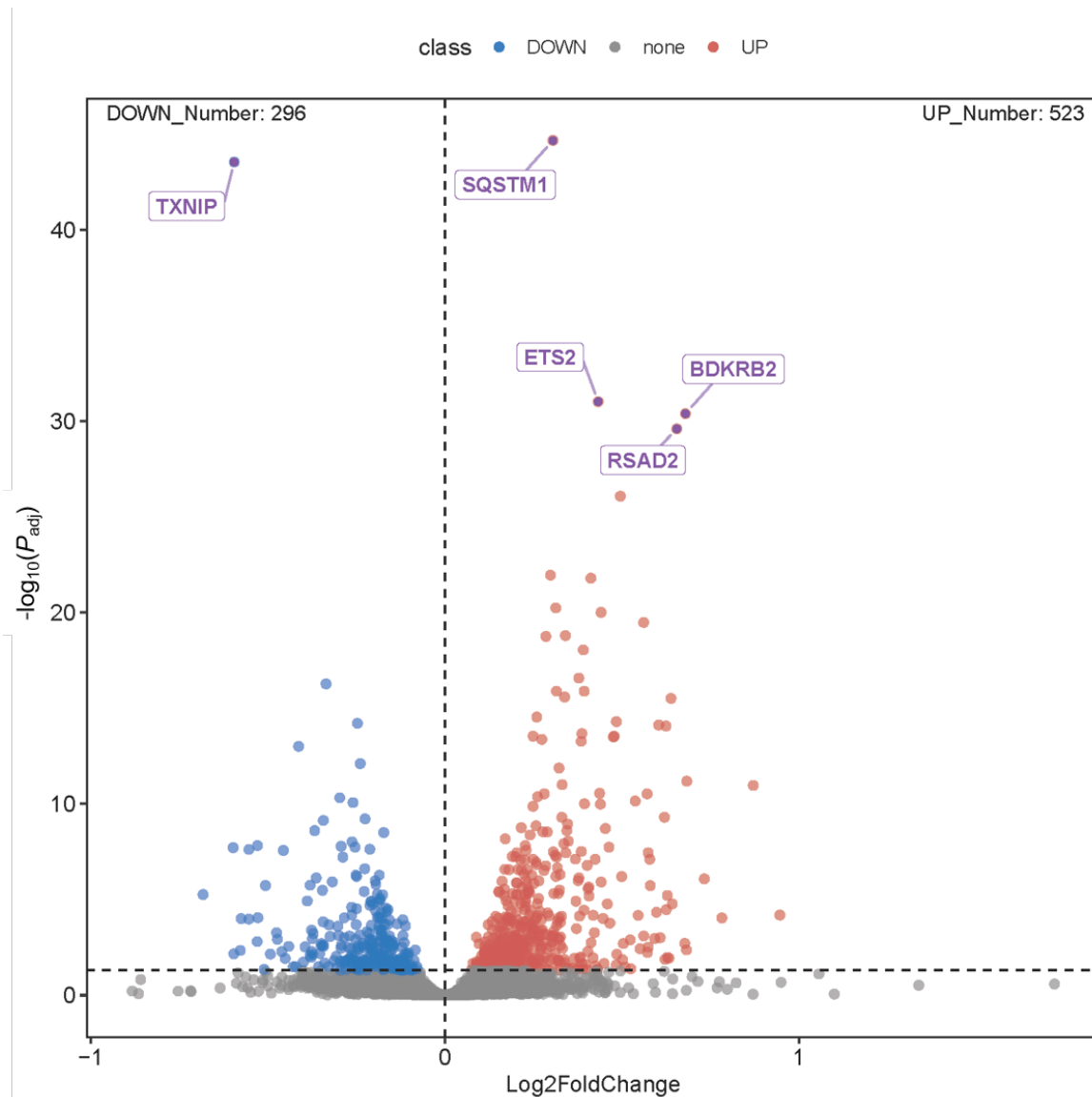
(B) Expression de *P2RY1* dans les cellules bêta et alpha humaines fœtales et adultes (entre 6 et 7 échantillons par condition) évaluée via <sup>201</sup>. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM de TPM (Transcrits Par Million).

Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (glucose [G] 0 mM par rapport à G 20 mM) à partir d'EndoC $\beta$ H5 traitées (pendant 40 min) avec (C)  $\pm$  1  $\mu$ M d'agoniste spécifique de *P2RY1*, MRS2365 ; ou (D)  $\pm$  1  $\mu$ M d'antagoniste spécifique de *P2RY1*, MRS2500. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes, chacune réalisée en quadruplicats techniques. Toutes les expériences ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney : \*P < 0.01 ; \*\*P < 0.01 ; \*\*\*P < 0.001. CT, condition témoin.

En traitant les cellules EndoCBH5 avec l'agoniste spécifique de P2RY1 dans des conditions de forte concentration en glucose, l'analyse du RNA-Seq a révélé une régulation à la hausse de 532 gènes (avec un nombre de transcrits par million (TPM) supérieur à 1) et de 296 gènes régulés à la baisse (avec un TPM supérieur à 1) en réponse à l'agoniste de P2RY1 (Figure 10). Nous avons notamment trouvé un enrichissement de gènes significativement régulés à la hausse dans plusieurs voies en réponse à l'agoniste de P2RY1 : niveaux de nutriments ( $P = 3,3 \times 10^{-12}$ ), stimulus extracellulaire ( $P = 3,7 \times 10^{-12}$ ), privation en nutriment ( $P = 6,9 \times 10^{-8}$ ), privation de glucose ( $P = 1,3 \times 10^{-4}$ ), mais aussi signalisation en aval des récepteurs couplés à la protéine G ( $P = 1,5 \times 10^{-4}$ ) et plus spécifiquement la voie NFAT ( $P = 2,2 \times 10^{-4}$ ) (Annexe Tableau supplémentaire 1). Il est intéressant de noter qu'en réponse à l'agoniste de P2RY1 uniquement (c'est-à-dire sans stimulation au glucose), seuls les gènes liés à la voie de signalisation des récepteurs couplés à la protéine G ont été significativement induits (données non montrées).

Parmi les gènes significativement dérégulés en réponse à l'agoniste spécifique de P2RY1, *TXNIP* (codant pour la protéine d'interaction Thioredoxine) a émergé comme le gène dont l'expression était le plus significativement régulé à la baisse (Log2 Fold Change = -0,60 ; Padj =  $3,0 \times 10^{-44}$  ; Figure 10). Ceci est d'un intérêt particulier, compte tenu du rôle connu de TXNIP dans le développement du DT2. En effet, une expression élevée de TXNIP a été liée à un stress oxydatif accru et à une diminution de la capture de glucose dans les cellules bêta pancréatiques<sup>205,206</sup>. Cela, à son tour, a été suggéré comme contribuant à une sécrétion d'insuline altérée et au développement du diabète<sup>207,208</sup>. TXNIP a également été associé à l'activation des inflammasomes, conduisant à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires, favorisant davantage la dysfonction et l'apoptose des cellules bêta<sup>209</sup>. La dysrégulation de TXNIP en réponse à la stimulation de l'agoniste de P2RY1 pourrait donc représenter un lien critique entre la signalisation de P2RY1 et le développement du DT2.




**Figure 10. Gènes différentiellement exprimés dans les cellules traitées avec l'agoniste spécifique de P2RY1 dans de cellules EndoC $\beta$ H5, en condition de forte concentration en glucose.**



Volcano plot illustrant les changements d'expression génique résultant du traitement des cellules EndoC $\beta$ H5 avec 1  $\mu\text{M}$  de MRS2365 pendant 5h, dans des conditions de forte concentration en glucose. Seuls les gènes ayant un TPM supérieur à 1 sont affichés. Les gènes dont l'expression est réduite sont représentés en bleu, les gènes dont l'expression est augmentée sont montrés en rouge, et les gènes présentant une dérégulation non significative sont représentés en noir.

## DISCUSSION

Le gène *P2RY1* se distingue par sa remarquable conservation au sein des espèces, présentant des similitudes élevées dans la séquence d'ADN (87,17%) et dans la séquence protéique (94,91%) entre les humains et les souris. Cette préservation s'exprime de plus par une réduction significative du nombre de mutations par rapport à ce qui serait attendu en fonction de la taille du gène. Nous observons notamment environ deux fois moins de mutations non-synonymes (mutations ponctuelles entraînant un changement d'acide aminé dans la protéine) que prévu compte tenu de la taille du gène (Genome Aggregation Database (gnomAD)). De plus, les mutations entraînant une perte de fonction (délétions, insertions ou l'apparition d'un codon stop prématuré) sont réduites d'environ cinq fois.

<b>Constraint</b>				
Category	<u>Expected SNVs</u>	<u>Observed SNVs</u>	Constraint metrics	
Synonymous	<u>93.6</u>	93	Z = <u>0.05</u> o/e = <u>0.99</u> ( <u>0.84</u> - <u>1.18</u> )	0  1
Missense	<u>214.4</u>	148	Z = <u>1.61</u> o/e = <u>0.69</u> ( <u>0.6</u> - <u>0.79</u> )	0  1
pLoF	<u>10.6</u>	2	pLI = <u>0.52</u> o/e = <u>0.19</u> ( <u>0.08</u> - <b>0.6</b> )	0  1

Constraint metrics based on Ensembl canonical transcript ([ENST00000305097.3](#)).

Tableau des données prévisionnelles et rapportées des mutations présentes dans le gène *P2RY1* source : Genome Aggregation Database (gnomAD)

Synonymous : mutation synonyme ; Missense : mutation non synonyme ; pLoF : mutation perte de fonction.

Ces données mettent en évidence la rareté des mutations dans le gène *P2RY1*, soulignant ainsi l'importance cruciale de ce récepteur dans le bon fonctionnement des organismes. Cependant, cette rareté limite également la puissance statistique de notre étude de génétique fonctionnelle. Lors de notre analyse des mutations de *P2RY1*, nous avons constaté que les

variants rares de perte de fonction étaient quasi exclusivement portés par des individus atteints de diabète de type 2 (DT2) typique ou de prédiabète associé à un surpoids.

Une limitation de notre étude se focalise sur le fait nous avons choisi d'analyser les mutations du gène *P2RY1* en utilisant la quantification de l'activité luciférase, ce qui reflète l'activation de la voie NFAT par le récepteur. En élargissant notre analyse, nous aurions pu envisager d'examiner par exemple le recrutement de la bêta-arrestine dans notre étude fonctionnelle, offrant ainsi une perspective plus complète. La bêta-arrestine joue un rôle crucial dans la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), ce qui pourrait avoir un impact significatif sur la modulation des voies de signalisation, y compris la voie NFAT. L'étude de ces interactions aurait permis une meilleure compréhension de l'impact des mutations de perte de fonction sur la voie de signalisation.

L'effet de la désensibilisation des RCPG par le recrutement de la bêta-arrestine est actuellement une piste de développement de nouvelles molécules, notamment les agonistes des RCPG dits "biaisés", qui activent la voie canonique du récepteur sans induire le recrutement de la bêta-arrestine<sup>161</sup>. Cela a pour effet d'augmenter l'activité maximale du récepteur et sa durée d'activation.

Parmi les mutations perte de fonction, certaines ont entraîné une diminution de l'expression de *P2RY1*, principalement observée chez les patients diabétiques. Il semble donc qu'une diminution de l'expression de *P2RY1* puisse être responsable de l'apparition du DT2. Cette observation corrobore nos analyses d'eQTL sur des échantillons d'îlots pancréatiques humains de donneurs qui confirment que la réduction de l'expression de *P2RY1* est associée à une augmentation du risque de développer un DT2, tandis qu'une augmentation de son expression a un effet protecteur.

Le potentiel rôle de *P2RY1* dans la modulation de la voie de sécrétion de l'insuline chez l'homme a été confirmée par nos expériences de sécrétion d'insuline dans un modèle de cellules bêta humaines (EndoCBH5). L'utilisation de l'agoniste de *P2RY1* entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, tandis que l'utilisation de l'antagoniste provoque une diminution de la sécrétion.

Cette expérience apporte deux informations capitales. Tout d'abord, l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose grâce à l'agoniste spécifique de *P2RY1* démontre l'intérêt de ce récepteur en tant que cible thérapeutique potentielle. Ensuite, la diminution provoquée par l'antagoniste de *P2RY1* met en évidence le rôle endogène très important de ce récepteur dans la voie de sécrétion de l'insuline.

Il convient de noter que la lignée cellulaire particulière, les EndoCBH5, présente une expression de *P2RY1* relativement réduite par rapport aux cellules bêta humaines (1 tpm contre 7 tpm<sup>203</sup>). De plus, il semble que l'activation endogène de *P2RY1* se produise de

manière autocrine et paracrine, avec potentiellement des effets d'autres types cellulaires que les cellules bêta. Pour ces raisons, des expériences de sécrétion d'insuline sur des îlots humains pourraient s'avérer intéressantes.

Cependant, il convient de noter que P2RY1 est exprimé dans plusieurs tissus, ce qui pourrait justifier l'utilisation de modèles murins, notamment les souris floxées. Ce modèle d'invalidation génétique utilisant le système cre-lox permet d'éteindre un gène (dont un exon est flanqué de deux sites LoxP) spécifiquement dans un tissu (grâce à la cre recombinase qui est sous un promoteur spécifique du tissu choisi), permettrait de valider spécifiquement le rôle de P2RY1 dans les cellules bêta pancréatiques. De plus, des tests de pharmacologie in vivo chez des modèles de souris diabétiques ob/ob (dont la mutation dans le gène de la leptine entraîne une hyperphagie) ou sous régime riche en graisse pourraient être pertinents afin de valider le potentiel thérapeutique de l'agoniste de P2RY1.

Pour conclure, les résultats de l'analyse RNA-seq ont clairement démontré que l'activation de P2RY1 dans les cellules bêta entraînait une réduction de l'expression de TXNIP. Étant donné son rôle essentiel dans le stress oxydatif des cellules bêta, l'investigation du rôle de P2RY1 dans ce contexte pourrait représenter une piste très prometteuse. En outre, en plus d'influer sur la sécrétion d'insuline, il est possible que P2RY1 joue un rôle positif dans le maintien de la masse des cellules bêta au cours du développement du diabète de type 2.

En conclusion, nos recherches en génétique fonctionnelle et nos analyses in vitro sur les cellules bêta pancréatiques humaines suggèrent un lien significatif entre P2RY1 et le diabète de type 2 (DT2), appuyé par la fonction de P2RY1 dans la modulation de la sécrétion d'insuline.

D'autres récepteurs purinergiques pourraient également jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta. Parmi les membres de la famille P2Y, P2Y11 est présent dans les cellules bêta, cependant, les analyses d'association pangénomique (GWAS) n'avaient pointé aucun signal d'association à ce locus.

D'autre part, les récepteurs P2X sont des canaux ioniques activés par l'ATP. L'activation de ces récepteurs conduit à une augmentation du calcium intracellulaire, déclenchant ainsi la sécrétion d'insuline. Parmi les sous-types de récepteurs P2X, P2X4 a été identifié dans les cellules bêta et pourrait jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline, étant associé au DT2 par des analyses GWAS.

Parmi les récepteurs purinergiques, seul P2RX4 serait aussi une cible intéressante à investiguer dans la régulation de la sécrétion d'insuline chez l'homme.

Il a est à noter que des analyses GWAS ont montré que *P2RY2* et *P2RX7* sont associés au DT2, probablement via des mécanismes autres que la régulation de la sécrétion d'insuline (ces deux gènes n'étant pas exprimés dans la cellule bêta.).

En résumé, ces résultats font des récepteurs purinergiques des cibles potentielles pour le développement de thérapies visant à traiter les troubles métaboliques, tels que le diabète.

Au niveau des cellules bêta, plusieurs RCPG ont été montrés impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Ces dernières années, les études sur le potentiel thérapeutique des RCPG se sont multipliées. Au niveau pancréatique, deux cibles se sont dégagées : le récepteur au GIP et surtout le récepteur au GLP1. D'autres RCPG sont exprimés au niveau des cellules bêta et pourraient influencer la régulation de l'insulinémie. Cependant, il existe encore une centaine de RCPG orphelins, ce qui les rend aujourd'hui incompatibles avec une approche pharmacologique.

P2RY1 étant un RCPG, il pourrait représenter aussi une cible médicamenteuse prometteuse. Cela ouvre la voie à de nouvelles approches thérapeutiques pour le DT2, par exemple dans un futur potentiel. Une trithérapie combinant les agonistes de GLP1R, GIPR et P2RY1 où les potentielles actions synergiques de ces récepteurs pourraient être intéressants dans le domaine du traitement du DT2. En effet, les agonistes de GLP1R et GIPR, déjà reconnus pour leur capacité à stimuler la sécrétion d'insuline et à réduire l'appétit, pourraient être complétés par l'influence de P2RY1 sur la sécrétion d'insuline. Cette combinaison offrirait ainsi un moyen novateur de maintenir la glycémie à des niveaux stables et de renforcer la sensibilité à l'insuline.

Si cette trithérapie venait à se concrétiser, elle ouvrirait des portes jusqu'ici fermées dans le domaine des traitements personnalisés. Les patients pourraient bénéficier d'une approche plus précise et adaptée à leurs besoins individuels, optimisant ainsi leur gestion du DT2.

En conclusion, les recherches approfondies sur le récepteur purinergique P2RY1 ont révélé son rôle crucial dans la régulation de la sécrétion d'insuline, établissant ainsi un lien significatif avec le DT2. Cette découverte ouvre la voie à de nouvelles opportunités pour le développement de thérapies ciblées, grâce à des stratégies pharmacologiques spécifiquement conçues pour

agir sur P2RY1. Cette approche offrirait une perspective prometteuse pour un traitement plus efficace et personnalisé du diabète de type 2, ouvrant ainsi la voie à un avenir où cette maladie métabolique pourrait être mieux contrôlée et améliorant ainsi la qualité de vie des individus touchés.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* **42**, S13–S28 (2019).
2. Breton, M. D. *et al.* Continuous Glucose Monitoring and Insulin Informed Advisory System with Automated Titration and Dosing of Insulin Reduces Glucose Variability in Type 1 Diabetes Mellitus. *Diabetes Technol Ther* **20**, 531–540 (2018).
3. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michels, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, 69–82 (2014).
4. Kaur, R. *et al.* Good Glycemic Outcomes Following Bariatric Surgery Among Patients With Type 2 Diabetes, Obesity, and Low-Titer GAD Antibodies. *Diabetes Care* **44**, 607–609 (2021).
5. Peters, A. L. *et al.* Diabetes Technology-Continuous Subcutaneous Insulin Infusion Therapy and Continuous Glucose Monitoring in Adults: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **101**, 3922–3937 (2016).
6. Bommer, C. *et al.* The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **5**, 423–430 (2017).
7. Fajans, S. S., Bell, G. I. & Polonsky, K. S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* **345**, 971–980 (2001).
8. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458–460 (1996).
9. Yamagata, K. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455–458 (1996).
10. De León, D. D. & Stanley, C. A. Permanent Neonatal Diabetes Mellitus. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993).

11. Iwasaki, N. *et al.* Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta (MODY5) gene are not a major factor contributing to end-stage renal disease in Japanese people with diabetes mellitus. *Diabetologia* **44**, 127–128 (2001).
12. Dunkley, A. J. *et al.* Effectiveness of interventions for reducing diabetes and cardiovascular disease risk in people with metabolic syndrome: systematic review and mixed treatment comparison meta-analysis. *Diabetes Obes Metab* **14**, 616–625 (2012).
13. Bowman, P. *et al.* Psychiatric morbidity in children with KCNJ11 neonatal diabetes. *Diabet Med* **33**, 1387–1391 (2016).
14. Proks, P. *et al.* A heterozygous activating mutation in the sulphonylurea receptor SUR1 (ABCC8) causes neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* **15**, 1793–1800 (2006).
15. Philippi, A. *et al.* Mutations and variants of ONECUT1 in diabetes. *Nat Med* **27**, 1928–1940 (2021).
16. Simmons, D. Diabetes and obesity in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **25**, 25–36 (2011).
17. American Diabetes Association. 15. Diabetes Care in the Hospital: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* **44**, S211–S220 (2021).
18. Landon, M. B. *et al.* A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med* **361**, 1339–1348 (2009).
19. GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet* **402**, 203–234 (2023).
20. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* **387**, 1513–1530 (2016).
21. Ogurtsova, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* **128**, 40–50 (2017).
22. Geiss, L. S. *et al.* Prevalence and incidence trends for diagnosed diabetes among adults aged 20 to 79 years, United States, 1980–2012. *JAMA* **312**, 1218–1226 (2014).

23. Dabelea, D. *et al.* Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. *JAMA* **311**, 1778–1786 (2014).
24. Cheng, Y. J. *et al.* Prevalence of Diabetes by Race and Ethnicity in the United States, 2011-2016. *JAMA* **322**, 2389–2398 (2019).
25. Satija, A. *et al.* Plant-Based Dietary Patterns and Incidence of Type 2 Diabetes in US Men and Women: Results from Three Prospective Cohort Studies. *PLoS Med* **13**, e1002039 (2016).
26. Xie, X. *et al.* Effects of intensive blood pressure lowering on cardiovascular and renal outcomes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* **387**, 435–443 (2016).
27. Malik, V. S. *et al.* Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* **33**, 2477–2483 (2010).
28. Hu, F. B. *et al.* Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study. *JAMA* **282**, 1433–1439 (1999).
29. Poulsen, P., Kyvik, K. O., Vaag, A. & Beck-Nielsen, H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* **42**, 139–145 (1999).
30. Almgren, P. *et al.* Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia Study. *Diabetologia* **54**, 2811–2819 (2011).
31. Steinberg, A. G. The genetics of diabetes: a review. *Ann N Y Acad Sci* **82**, 197–207 (1959).
32. Beck-Nielsen, H., Vaag, A., Poulsen, P. & Gaster, M. Metabolic and genetic influence on glucose metabolism in type 2 diabetic subjects--experiences from relatives and twin studies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**, 445–467 (2003).
33. Davies, M. J. *et al.* Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia* **61**, 2461–2498 (2018).
34. Dunkley, A. J. *et al.* Diabetes prevention in the real world: effectiveness of pragmatic lifestyle interventions for the prevention of type 2 diabetes and of the impact of

- adherence to guideline recommendations: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* **37**, 922–933 (2014).
35. Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R. & Neil, H. A. W. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* **359**, 1577–1589 (2008).
  36. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
  37. Buchwald, P. *et al.* Fully Automated Islet Cell Counter (ICC) for the Assessment of Islet Mass, Purity, and Size Distribution by Digital Image Analysis. *Cell Transplant* **25**, 1747–1761 (2016).
  38. Rutter, G. A. & Hodson, D. J. Minireview: intraislet regulation of insulin secretion in humans. *Mol Endocrinol* **27**, 1984–1995 (2013).
  39. Cleaver, O. & Dor, Y. Vascular instruction of pancreas development. *Development* **139**, 2833–2843 (2012).
  40. Noorafshan, A., Hoseini, L., Karbalay-Doust, S. & Nadimi, E. A simple stereological method for estimating the number and the volume of the pancreatic beta cells. *JOP* **13**, 427–432 (2012).
  41. Mutskov, V. & Felsenfeld, G. The human insulin gene is part of a large open chromatin domain specific for human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17419–17424 (2009).
  42. Prabhu, Y. *et al.* Defective transport of the obesity mutant PC1/3 N222D contributes to loss of function. *Endocrinology* **155**, 2391–2401 (2014).
  43. Sansbury, F. H. *et al.* SLC2A2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting GLUT2 may have a role in human insulin secretion. *Diabetologia* **55**, 2381–2385 (2012).
  44. Chen, L. *et al.* Regulation of beta-cell glucose transporter gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4088–4092 (1990).
  45. Hu, C. *et al.* Effects of GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B variants on glucose metabolism and insulin secretion. *PLoS One* **5**, e11761 (2010).

46. Ristow, M. *et al.* Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans is associated with impairment of insulin secretory oscillations. *Diabetes* **48**, 1557–1561 (1999).
47. Miki, T. *et al.* Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10402–10406 (1998).
48. Reis, A. F. & Velho, G. Sulfonylurea receptor -1 (SUR1): genetic and metabolic evidences for a role in the susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab* **28**, 14–19 (2002).
49. Rorsman, P. & Braun, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol* **75**, 155–179 (2013).
50. Lester, L. B., Faux, M. C., Nauert, J. B. & Scott, J. D. Targeted protein kinase A and PP-2B regulate insulin secretion through reversible phosphorylation. *Endocrinology* **142**, 1218–1227 (2001).
51. Kaneko, Y. K. & Ishikawa, T. Diacylglycerol Signaling Pathway in Pancreatic  $\beta$ -Cells: An Essential Role of Diacylglycerol Kinase in the Regulation of Insulin Secretion. *Biol Pharm Bull* **38**, 669–673 (2015).
52. Jewell, J. L., Oh, E. & Thurmond, D. C. Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R517-531 (2010).
53. Shima, K., Hirota, M. & Ohboshi, C. Effect of glucagon-like peptide-1 on insulin secretion. *Regulatory Peptides* **22**, 245–252 (1988).
54. Shigeto, M. *et al.* GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest* **125**, 4714–4728 (2015).
55. Fehmann, H. C. & Göke, B. Characterization of GIP(1-30) and GIP(1-42) as stimulators of proinsulin gene transcription. *Peptides* **16**, 1149–1152 (1995).
56. Dupre, J., Ross, S. A., Watson, D. & Brown, J. C. Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *J Clin Endocrinol Metab* **37**, 826–828 (1973).

57. Benthem, L., Mundinger, T. O. & Taborsky, G. J. Meal-induced insulin secretion in dogs is mediated by both branches of the autonomic nervous system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E603-610 (2000).
58. D'Alessio, D. A., Kieffer, T. J., Taborsky, G. J. & Havel, P. J. Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-induced insulin secretion in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1253–1259 (2001).
59. McCarty, M. F. Elevated sympathetic activity may promote insulin resistance syndrome by activating alpha-1 adrenergic receptors on adipocytes. *Med Hypotheses* **62**, 830–838 (2004).
60. Porte, D. Sympathetic regulation of insulin secretion. Its relation to diabetes mellitus. *Arch Intern Med* **123**, 252–260 (1969).
61. Deng, S. *et al.* Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **53**, 624–632 (2004).
62. Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C. & Henquin, J. C. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* **10 Suppl 4**, 32–42 (2008).
63. Bonnefond, A. & Froguel, P. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab* **21**, 357–368 (2015).
64. Poitout, V. & Robertson, R. P. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes-- a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* **143**, 339–342 (2002).
65. Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O. T. & Poitout, V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S119-124 (2004).
66. Bensellam, M., Jonas, J.-C. & Laybutt, D. R. Mechanisms of  $\beta$ -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions. *J Endocrinol* **236**, R109–R143 (2018).
67. Yoon, K. H. *et al.* Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 2300–2308 (2003).

68. Sakuraba, H. *et al.* Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* **45**, 85–96 (2002).
69. H, E. *et al.* Acute nutrient regulation of the unfolded protein response and integrated stress response in cultured rat pancreatic islets. *Diabetologia* **50**, (2007).
70. Schröder, M. & Kaufman, R. J. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* **569**, 29–63 (2005).
71. Chan, J. Y. *et al.* 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 (2015).
72. Nishimura, W., Takahashi, S. & Yasuda, K. MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia* **58**, 566–574 (2015).
73. Chan, J. Y., Luzuriaga, J., Bensellam, M., Biden, T. J. & Laybutt, D. R. Failure of the adaptive unfolded protein response in islets of obese mice is linked with abnormalities in  $\beta$ -cell gene expression and progression to diabetes. *Diabetes* **62**, 1557–1568 (2013).
74. Chambers, K. T., Weber, S. M. & Corbett, J. A. PGJ2-stimulated beta-cell apoptosis is associated with prolonged UPR activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E1052-1061 (2007).
75. Sargsyan, E., Sol, E.-R. M. & Bergsten, P. UPR in palmitate-treated pancreatic beta-cells is not affected by altering oxidation of the fatty acid. *Nutr Metab (Lond)* **8**, 70 (2011).
76. Song, B., Scheuner, D., Ron, D., Pennathur, S. & Kaufman, R. J. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* **118**, 3378–3389 (2008).
77. Oyadomari, S. *et al.* Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* **109**, 525–532 (2002).
78. Cai, Y. *et al.* Increased oxygen radical formation and mitochondrial dysfunction mediate beta cell apoptosis under conditions of AMP-activated protein kinase stimulation. *Free Radic Biol Med* **42**, 64–78 (2007).

79. Sidarala, V. *et al.* Mitophagy protects  $\beta$  cells from inflammatory damage in diabetes. *JCI Insight* **5**, e141138, 141138 (2020).
80. Islet beta-cell apoptosis triggered in vivo by interleukin-1beta is not related to the inducible nitric oxide synthase pathway: evidence for mitochondrial function impairment and lipoperoxidation - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12960105/>.
81. Ishizuka, N. *et al.* Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic beta cells. *Metabolism* **48**, 1485–1492 (1999).
82. Drews, G., Krippeit-Drews, P. & Düfer, M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch* **460**, 703–718 (2010).
83. Sun, X. J. *et al.* Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73–77 (1991).
84. Backer, J. M. *et al.* Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells. *J Biol Chem* **268**, 8204–8212 (1993).
85. Ng, Y., Ramm, G., Lopez, J. A. & James, D. E. Rapid activation of Akt2 is sufficient to stimulate GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Cell Metab* **7**, 348–356 (2008).
86. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9415393/>.
87. Alessi, D. R. & Downes, C. P. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* **1436**, 151–164 (1998).
88. Shepherd, P. R., Withers, D. J. & Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* **333** ( Pt 3), 471–490 (1998).
89. Asada, S. *et al.* Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. *Cell Signal* **19**, 519–527 (2007).
90. Thornton, T. M. *et al.* Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* **320**, 667–670 (2008).



91. Lm, M., G, C., E, R. & A, C. Insulin and lipogenesis in rat adipocytes. I. Effect of insulin incubation on lipid synthesis by isolated rat adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **188**, (1992).
92. Zhao, J., Wu, Y., Rong, X., Zheng, C. & Guo, J. Anti-Lipolysis Induced by Insulin in Diverse Pathophysiologic Conditions of Adipose Tissue. *Diabetes Metab Syndr Obes* **13**, 1575–1585 (2020).
93. Boden, G. *et al.* Comparison of in vivo effects of insulin on SREBP-1c activation and INSIG-1/2 in rat liver and human and rat adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* **21**, 1208–1214 (2013).
94. Witte, N. *et al.* The Glucose Sensor ChREBP Links De Novo Lipogenesis to PPAR $\gamma$  Activity and Adipocyte Differentiation. *Endocrinology* **156**, 4008–4019 (2015).
95. Cignarelli, A. *et al.* Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int J Mol Sci* **20**, 759 (2019).
96. Rieusset, J. *et al.* Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* **48**, 699–705 (1999).
97. MacDougald, O. A., Cornelius, P., Liu, R. & Lane, M. D. Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **270**, 647–654 (1995).
98. Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K. & Puigserver, P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1411**, 21–35 (2018).
99. Mechanism of control of hepatic glycogenesis by insulin - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4349866/>.
100. Terrettaz, J., Assimacopoulos-Jeannet, F. & Jeanrenaud, B. Inhibition of hepatic glucose production by insulin in vivo in rats: contribution of glycolysis. *Am J Physiol* **250**, E346-351 (1986).
101. Blatt, L. M. & Kim, K. H. Regulation of hepatic glycogen synthetase. Stimulation of glycogen synthetase in an in vitro liver system by insulin bound to sepharose. *J Biol Chem* **246**, 4895–4898 (1971).

102. Liu, Z., Gardner, L. B. & Barrett, E. J. Insulin and glucose suppress hepatic glycogenolysis by distinct enzymatic mechanisms. *Metabolism* **42**, 1546–1551 (1993).
103. Eissing, L. *et al.* De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- $\beta$  and metabolic health. *Nat Commun* **4**, 1528 (2013).
104. FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production - PubMed.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18927507/>.
105. Sano, H., Peck, G. R., Blachon, S. & Lienhard, G. E. A potential link between insulin signaling and GLUT4 translocation: Association of Rab10-GTP with the exocyst subunit Exoc6/6b. *Biochem Biophys Res Commun* **465**, 601–605 (2015).
106. Ivy, J. L. Role of insulin during exercise-induced glycogenesis in muscle: effect on cyclic AMP. *Am J Physiol* **233**, E509-513 (1977).
107. Challiss, R. A., Espinal, J. & Newsholme, E. A. Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats. *Biosci Rep* **3**, 675–679 (1983).
108. Shulman, G. I. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *N Engl J Med* **371**, 1131–1141 (2014).
109. Tonks, K. T. *et al.* Impaired Akt phosphorylation in insulin-resistant human muscle is accompanied by selective and heterogeneous downstream defects. *Diabetologia* **56**, 875–885 (2013).
110. Hla, T. & Kolesnick, R. C16:0-ceramide signals insulin resistance. *Cell Metab* **20**, 703–705 (2014).
111. Raichur, S. *et al.* The role of C16:0 ceramide in the development of obesity and type 2 diabetes: CerS6 inhibition as a novel therapeutic approach. *Mol Metab* **21**, 36–50 (2019).
112. Koudhi, S. *et al.* Human subcutaneous adipose tissue Glut 4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes. *Acta Diabetol* **50**, 227–232 (2013).
113. Palermo, N. E., Sadhu, A. R. & McDonnell, M. E. Diabetic Ketoacidosis in COVID-19: Unique Concerns and Considerations. *J Clin Endocrinol Metab* **105**, dgaa360 (2020).

114. Henning, R. J. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol* **14**, 491–509 (2018).
115. Thipsawat, S. Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature. *Diab Vasc Dis Res* **18**, 14791641211058856 (2021).
116. Sun, Q. *et al.* The Risk Factors for Diabetic Retinopathy in a Chinese Population: A Cross-Sectional Study. *J Diabetes Res* **2021**, 5340453 (2021).
117. Javed, S., Hayat, T., Menon, L., Alam, U. & Malik, R. A. Diabetic peripheral neuropathy in people with type 2 diabetes: too little too late. *Diabet Med* **37**, 573–579 (2020).
118. Grant, S. F. A. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* **38**, 320–323 (2006).
119. Scott, L. J. *et al.* Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. *Diabetes* **55**, 2649–2653 (2006).
120. Jin, T. & Liu, L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* **22**, 2383–2392 (2008).
121. Mahajan, A. *et al.* Multi-ancestry genetic study of type 2 diabetes highlights the power of diverse populations for discovery and translation. *Nat Genet* **54**, 560–572 (2022).
122. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* **44**, S15–S33 (2021).
123. Knowler, W. C. *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* **346**, 393–403 (2002).
124. Franz, M. J. *et al.* Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care* **26 Suppl 1**, S51-61 (2003).
125. Motahari-Tabari, N., Ahmad Shirvani, M., Shirzad-E-Ahoodashty, M., Yousefi-Abdolmaleki, E. & Teimourzadeh, M. The effect of 8 weeks aerobic exercise on insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized clinical trial. *Glob J Health Sci* **7**, 115–121 (2014).

126. Schäfer, G. Biguanides. A review of history, pharmacodynamics and therapy. *Diabete Metab* **9**, 148–163 (1983).
127. McGowan, L. D. & Roumie, C. L. Sulfonylureas as second line treatment for type 2 diabetes. *BMJ* **362**, k3041 (2018).
128. van de Laar, F. A. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* **4**, 1189–1195 (2008).
129. Camp, H. S. Thiazolidinediones in diabetes: current status and future outlook. *Curr Opin Investig Drugs* **4**, 406–411 (2003).
130. Lv, Z. & Guo, Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 191 (2020).
131. Argaud, D., Roth, H., Wiernsperger, N. & Leverve, X. M. Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **213**, 1341–1348 (1993).
132. Westhaus, A., Blumrich, E. M. & Dringen, R. The Antidiabetic Drug Metformin Stimulates Glycolytic Lactate Production in Cultured Primary Rat Astrocytes. *Neurochem Res* **42**, 294–305 (2017).
133. Hermann, L. S. Metformin: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabete Metab* **5**, 233–245 (1979).
134. Renström, E., Barg, S., Thévenod, F. & Rorsman, P. Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-independent action. *Diabetes* **51 Suppl 1**, S33-36 (2002).
135. Rosak, C. & Mertes, G. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes Metab Syndr Obes* **5**, 357–367 (2012).
136. Rachmani, R. *et al.* The effect of acarbose on insulin resistance in obese hypertensive subjects with normal glucose tolerance: a randomized controlled study. *Diabetes Obes Metab* **6**, 63–68 (2004).

137. Kim, M. J. *et al.* Comparative study of the inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and cyclomaltoextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch Biochem Biophys* **371**, 277–283 (1999).
138. DeFronzo, R. A. *et al.* Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* **364**, 1104–1115 (2011).
139. Wolford, J. K. *et al.* Sequence variation in PPARG may underlie differential response to troglitazone. *Diabetes* **54**, 3319–3325 (2005).
140. Nanjan, M. J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B. R. & Chandrasekar, M. J. N. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg Chem* **77**, 548–567 (2018).
141. Hauner, H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev* **18 Suppl 2**, S10-15 (2002).
142. Imamura, M. *et al.* Discovery of Ipragliflozin (ASP1941): a novel C-glucoside with benzothiophene structure as a potent and selective sodium glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Bioorg Med Chem* **20**, 3263–3279 (2012).
143. Chao, E. C. & Henry, R. R. SGLT2 inhibition--a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 551–559 (2010).
144. Manandhar, B. & Ahn, J.-M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogs: recent advances, new possibilities, and therapeutic implications. *J Med Chem* **58**, 1020–1037 (2015).
145. Goldenberg, R. M. & Steen, O. Semaglutide: Review and Place in Therapy for Adults With Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* **43**, 136–145 (2019).
146. Gromada, J. & Rorsman, P. New insights into the regulation of glucagon secretion by glucagon-like peptide-1. *Horm Metab Res* **36**, 822–829 (2004).
147. Grill, H. J. A Role for GLP-1 in Treating Hyperphagia and Obesity. *Endocrinology* **161**, bqaa093 (2020).

148. American Diabetes Association. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care* **44**, S73–S84 (2021).
149. Freemantle, N. *et al.* Safety and efficacy of insulin glargine 300 u/mL compared with other basal insulin therapies in patients with type 2 diabetes mellitus: a network meta-analysis. *BMJ Open* **6**, e009421 (2016).
150. Schauer, P. R. *et al.* Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy for Diabetes - 5-Year Outcomes. *N Engl J Med* **376**, 641–651 (2017).
151. Mingrone, G. *et al.* Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial. *Lancet* **386**, 964–973 (2015).
152. Inzucchi, S. E. *et al.* Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **38**, 140–149 (2015).
153. Wise, J. Weight loss is sustained over four years after bariatric surgery, study finds. *BMJ* **351**, h6917 (2015).
154. Geloneze, B. *et al.* Serum leptin levels after bariatric surgery across a range of glucose tolerance from normal to diabetes. *Obes Surg* **11**, 693–698 (2001).
155. Gasmi, A. *et al.* Gut microbiota in bariatric surgery. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1–16 (2022) doi:10.1080/10408398.2022.2067116.
156. Turner, R. C., Cull, C. A., Frighi, V. & Holman, R. R. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* **281**, 2005–2012 (1999).
157. Shani, M. *et al.* Characteristics of diabetics with poor glycemic control who achieve good control. *J Am Board Fam Med* **21**, 490–496 (2008).
158. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).

159. Venkatakrisnan, A. J. *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185–194 (2013).
160. Yang, D. *et al.* G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 7 (2021).
161. Jones, B. *et al.* Genetic and biased agonist-mediated reductions in  $\beta$ -arrestin recruitment prolong cAMP signaling at glucagon family receptors. *J Biol Chem* **296**, 100133 (2021).
162. Haddad, M., Cherchi, F., Alsalem, M., Al-Saraireh, Y. M. & Madae'en, S. Adenosine Receptors as Potential Therapeutic Analgesic Targets. *Int J Mol Sci* **24**, 13160 (2023).
163. Burnstock, G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci Adv* **2**, 2398212818817494 (2018).
164. Kutryb-Zajac, B. *et al.* Drugs targeting adenosine signaling pathways: A current view. *Biomed Pharmacother* **165**, 115184 (2023).
165. von Kugelgen, I. Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes - an update. *Purinergic Signal* (2023) doi:10.1007/s11302-023-09963-w.
166. Waldo, G. L. & Harden, T. K. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* **65**, 426–436 (2004).
167. Crabtree, G. R. & Olson, E. N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-79 (2002).
168. Guzman, S. J. & Gerevich, Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. *Neural Plast* **2016**, 1207393 (2016).
169. Bender, S. B., Berwick, Z. C., Laughlin, M. H. & Tune, J. D. Functional contribution of P2Y1 receptors to the control of coronary blood flow. *J Appl Physiol (1985)* **111**, 1744–1750 (2011).
170. Buvinic, S., Briones, R. & Huidobro-Toro, J. P. P2Y(1) and P2Y(2) receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol* **136**, 847–856 (2002).

171. Hetherington, S. L. *et al.* Dimorphism in the P2Y1 ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 252–257 (2005).
172. Savi, P. *et al.* Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett* **422**, 291–295 (1998).
173. Fabre, J. E. *et al.* Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* **5**, 1199–1202 (1999).
174. Petit, P., Lajoix, A.-D. & Gross, R. P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology. *Eur J Pharm Sci* **37**, 67–75 (2009).
175. Burnstock, G. & Novak, I. Purinergic signalling and diabetes. *Purinergic Signal* **9**, 307–324 (2013).
176. Léon, C. *et al.* The P2Y1 receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. *Purinergic Signalling* **1**, 145–151 (2005).
177. Mesto, N. *et al.* Involvement of P2Y signaling in the restoration of glucose-induced insulin exocytosis in pancreatic  $\beta$  cells exposed to glucotoxicity. *J Cell Physiol* **237**, 881–896 (2022).
178. Farret, A. *et al.* P2Y receptor mediated modulation of insulin release by a novel generation of 2-substituted-5'-O-(1-boranotriphosphate)-adenosine analogues. *Pharm Res* **23**, 2665–2671 (2006).
179. Balasubramanian, R., de Azua, I. R., Wess, J. & Jacobson, K. A. Activation of distinct P2Y receptor subtypes stimulates insulin secretion in MIN6 mouse pancreatic  $\beta$  cells. *Biochemical Pharmacology* **79**, 1317–1326 (2010).
180. Wayne Leitner, J., Sussman, K. E., Vatter, A. E. & Howard Schneider, F. Adenine Nucleotides in the Secretory Granule Fraction of Rat Islets <sup>1</sup>. *Endocrinology* **96**, 662–677 (1975).
181. Hutton, J. C., Penn, E. J. & Peshavaria, M. Low-molecular-weight constituents of isolated insulin-secretory granules. Bivalent cations, adenine nucleotides and inorganic phosphate. *Biochem J* **210**, 297–305 (1983).



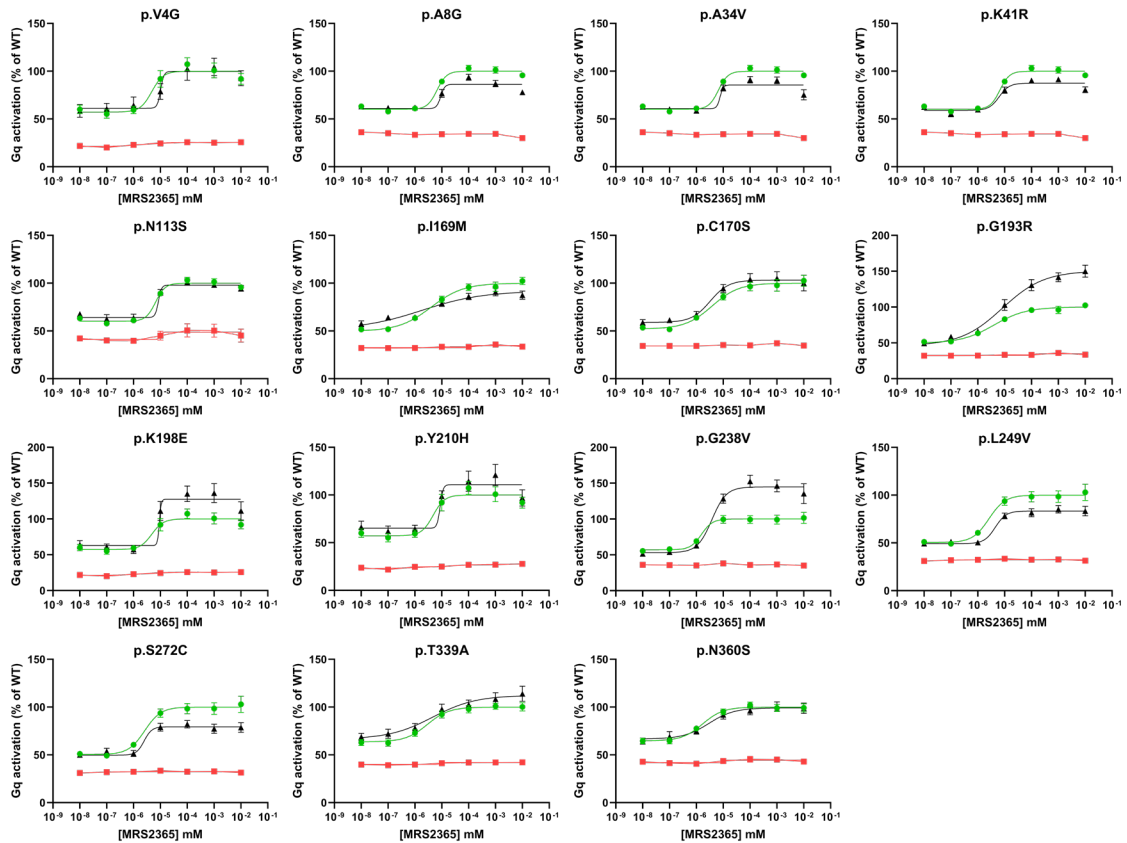
182. Khan, S. *et al.* Autocrine activation of P2Y1 receptors couples Ca<sup>2+</sup> influx to Ca<sup>2+</sup> release in human pancreatic beta cells. *Diabetologia* **57**, 2535–2545 (2014).
183. Tengholm, A. Purinergic P2Y1 receptors take centre stage in autocrine stimulation of human beta cells. *Diabetologia* **57**, 2436–2439 (2014).
184. Hazama, A., Hayashi, S. & Okada, Y. Cell surface measurements of ATP release from single pancreatic beta cells using a novel biosensor technique. *Pflugers Arch* **437**, 31–35 (1998).
185. Tozzi, M. *et al.* The P2X7 receptor and pannexin-1 are involved in glucose-induced autocrine regulation in  $\beta$ -cells. *Sci Rep* **8**, 8926 (2018).
186. Bartley, C. *et al.* Chronic fructose renders pancreatic  $\beta$ -cells hyper-responsive to glucose-stimulated insulin secretion through extracellular ATP signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **317**, E25–E41 (2019).
187. Geisler, J. C. *et al.* Vesicular nucleotide transporter-mediated ATP release regulates insulin secretion. *Endocrinology* **154**, 675–684 (2013).
188. Syed, S. K. *et al.* Ectonucleotidase NTPDase3 is abundant in pancreatic  $\beta$ -cells and regulates glucose-induced insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **305**, E1319–E1326 (2013).
189. Lavoie, E. G. *et al.* Identification of the ectonucleotidases expressed in mouse, rat, and human Langerhans islets: potential role of NTPDase3 in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E647–656 (2010).
190. Balkau, B. [An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome]. *Rev Epidemiol Sante Publique* **44**, 373–375 (1996).
191. Sladek, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* **445**, 881–885 (2007).
192. Romon, M. *et al.* Relationships between physical activity and plasma leptin levels in healthy children: the Fleurbaix-Laventie Ville Santé II Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**, 1227–1232 (2004).

193. Wigger, L. *et al.* Multi-omics profiling of living human pancreatic islet donors reveals heterogeneous beta cell trajectories towards type 2 diabetes. *Nat Metab* **3**, 1017–1031 (2021).
194. Khamis, A. *et al.* Laser capture microdissection of human pancreatic islets reveals novel eQTLs associated with type 2 diabetes. *Mol Metab* **24**, 98–107 (2019).
195. Costanzo, M. C. *et al.* The Type 2 Diabetes Knowledge Portal: An open access genetic resource dedicated to type 2 diabetes and related traits. *Cell Metab* **35**, 695-710.e6 (2023).
196. Lawlor, N. *et al.* Multiomic Profiling Identifies cis-Regulatory Networks Underlying Human Pancreatic  $\beta$  Cell Identity and Function. *Cell Rep* **26**, 788-801.e6 (2019).
197. Bianchi, B. *et al.* EndoC- $\beta$ H5 cells are storable and ready-to-use human pancreatic beta cells with physiological insulin secretion. *Mol Metab* **76**, 101772 (2023).
198. Zhou, Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* **10**, 1523 (2019).
199. Abbott, K. L., Loss, J. R., Robida, A. M. & Murphy, T. J. Evidence that Galpha(q)-coupled receptor-induced interleukin-6 mRNA in vascular smooth muscle cells involves the nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol* **58**, 946–953 (2000).
200. Kawano, S. *et al.* ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* **39**, 313–324 (2006).
201. Kim, S.-A., Choi, H. S. & Ahn, S.-G. Pin1 induces the ADP-induced migration of human dental pulp cells through P2Y1 stabilization. *Oncotarget* **7**, 85381–85392 (2016).
202. Ioannidis, N. M. *et al.* REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* **99**, 877–885 (2016).
203. Nica, A. C. *et al.* Cell-type, allelic, and genetic signatures in the human pancreatic beta cell transcriptome. *Genome Res* **23**, 1554–1562 (2013).
204. Blodgett, D. M. *et al.* Novel Observations From Next-Generation RNA Sequencing of Highly Purified Human Adult and Fetal Islet Cell Subsets. *Diabetes* **64**, 3172–3181 (2015).

205. Junn, E. *et al.* Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* **164**, 6287–6295 (2000).
206. J, Y., Y, M., H, T., H, M. & T, I. Anti-Inflammatory Thioredoxin Family Proteins for Medicare, Healthcare and Aging Care. *Nutrients* **9**, (2017).
207. Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I. & Tschopp, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* **11**, 136–140 (2010).
208. Ma, M., O, B. & Cr, K. Metabolic syndrome: is Nlrp3 inflammasome a trigger or a target of insulin resistance? *Circulation research* **108**, (2011).
209. Chen, J. *et al.* Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. *FASEB J* **22**, 3581–3594 (2008).

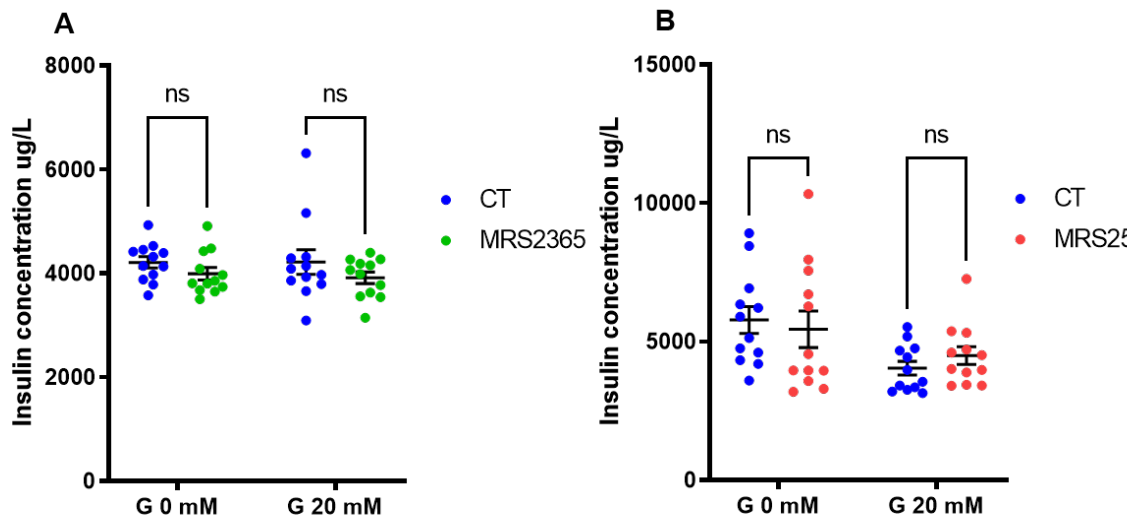
## ANNEXES

**Figure supplémentaire 1. Analyses in vitro pour caractériser l'activité de l'activation de la luciférase NFAT-RE pour les variants neutres de P2RY1 : dose réponse.**



Expériences de dose réponse représentant l'activation de la luciférase NFAT-RE pour chaque variant de perte de fonction de P2RY1. Chaque mutant (représenté par des triangles noirs) a été comparé à l'activité du P2RY1 de type sauvage (témoin positif représenté par des points verts) ainsi qu'à un mutant de P2RY1 portant un variant de codon stop précoce (témoin négatif représenté par un carré rouge). Les données sont présentées en pourcentage de l'activité maximale de type sauvage. Les résultats représentent les moyennes  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne de 4 expériences indépendantes, chacune réalisée en quadruplicats techniques.

**Figure supplémentaire 2. Contenu en insuline suite au traitement avec un agoniste de P2RY1 dans les cellules EndoC $\beta$ H5.**



Contenu en insuline dans les cellules EndoC $\beta$ H5 après sécrétion stimulée par le glucose, traitées avec (A)  $\pm$  1  $\mu$ M de l'agoniste P2RY1 MRS2365 ou (B)  $\pm$  1  $\mu$ M de l'antagoniste P2RY1 MRS2500. Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes en quadrupléat techniques. Toutes les expériences ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney. CT, condition témoin ; ns, non significatif.

**Tableau supplémentaire 1. Analyse de l'enrichissement fonctionnel des voies régulées à la hausse suite au traitement avec un agoniste de P2RY1 dans les cellules EndoCBH5, en condition de haute concentration en glucose.**

Description	Log P
inflammatory response	-14.80786
cellular response to lipid	-11.92394
response to bacterium	-10.95225
cellular response to biotic stimulus	-9.63162
cellular response to lipopolysaccharide	-9.40477
response to lipopolysaccharide	-9.38108
cellular response to molecule of bacterial origin	-8.94892
response to molecule of bacterial origin	-8.83653
regulation of response to biotic stimulus	-6.94192
positive regulation of response to external stimulus	-6.47193
regulation of innate immune response	-6.27036
positive regulation of immune response	-6.24807
positive regulation of defense response	-5.51833
positive regulation of innate immune response	-5.30354
pattern recognition receptor signaling pathway	-4.96947
immune response-activating signaling pathway	-4.94637
positive regulation of response to biotic stimulus	-4.73396
immune response-regulating signaling pathway	-4.40447
innate immune response-activating signaling pathway	-4.29191
activation of immune response	-3.88746
activation of innate immune response	-3.67118
IL-18 signaling pathway	-14.71424
Pathogenic Escherichia coli infection	-12.66055
Pathogenic Escherichia coli infection	-12.66055
Salmonella infection	-6.05188
Cytokine Signaling in Immune system	-12.24039
Cytokine Signaling in Immune system	-12.24039
Signaling by Interleukins	-9.44584
cellular response to cytokine stimulus	-9.32494
cytokine-mediated signaling pathway	-9.12340
Cytokine-cytokine receptor interaction	-8.34657
NF-kappa B signaling pathway	-11.91151
NF-kappa B signaling pathway	-11.91151
TNF signaling pathway	-10.20955
SARS-CoV-2 innate immunity evasion and cell-specific immune response	-9.14546
NOD-like receptor signaling pathway	-7.88059
Burn wound healing	-7.34821
IL-17 signaling pathway	-7.33854
Lipid and atherosclerosis	-6.95421
leukocyte migration	-6.89722
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	-6.68265
Legionellosis	-6.45437
Viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor	-6.11242
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	-5.36850
Network map of SARS-CoV-2 signaling pathway	-4.79032
Alcoholic liver disease	-4.62915
Cytokines and inflammatory response	-4.24426
Chemokine signaling pathway	-4.07700
Interleukin-10 signaling	-3.94546
cell chemotaxis	-3.88855
Peptide ligand-binding receptors	-3.88855
GPCR downstream signalling	-3.82409

leukocyte chemotaxis	-3.76552
Spinal cord injury	-3.75619
Prostaglandin signaling	-3.72795
Pertussis	-3.60386
Amoebiasis	-3.55564
Overview of proinflammatory and profibrotic mediators	-3.54736
Signaling by GPCR	-3.49366
Chemokine receptors bind chemokines	-3.39438
Chemokine signaling pathway	-3.36502
myeloid leukocyte migration	-3.30858
Lung fibrosis	-3.20306
response to chemokine	-3.09815
cellular response to chemokine	-3.09815
Rheumatoid arthritis	-3.07022
humoral immune response	-2.92078
Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	-2.84939
neutrophil chemotaxis	-2.66777
chemokine-mediated signaling pathway	-2.58777
granulocyte chemotaxis	-2.53641
antimicrobial humoral response	-2.51698
neutrophil migration	-2.39099
NABA SECRETED FACTORS	-2.33619
GPCR ligand binding	-2.30600
granulocyte migration	-2.21500
antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	-2.10953
regulation of cell activation	-11.86318
regulation of leukocyte activation	-11.80690
regulation of lymphocyte activation	-8.19265
regulation of cell-cell adhesion	-7.24594
positive regulation of cell adhesion	-6.29740
regulation of T cell activation	-5.85355
positive regulation of cell-cell adhesion	-5.75475
regulation of leukocyte proliferation	-5.61479
regulation of leukocyte cell-cell adhesion	-5.26890
positive regulation of leukocyte activation	-4.74076
positive regulation of cell activation	-4.47951
regulation of lymphocyte proliferation	-4.34949
regulation of mononuclear cell proliferation	-4.27143
positive regulation of lymphocyte activation	-3.44119
positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	-3.20739
positive regulation of T cell activation	-3.04839
positive regulation of lymphocyte proliferation	-2.56026
positive regulation of mononuclear cell proliferation	-2.50566
regulation of T cell proliferation	-2.47777
positive regulation of leukocyte proliferation	-2.20721
response to nutrient levels	-11.48804
response to extracellular stimulus	-11.43583
cellular response to external stimulus	-7.63251
response to starvation	-7.16281
cellular response to nutrient levels	-5.26228
cellular response to extracellular stimulus	-5.21709
cellular response to starvation	-4.59128
cellular response to glucose starvation	-3.89346
response to acid chemical	-3.33144
response to amino acid	-3.03604
cellular response to acid chemical	-2.41437
regulation of defense response	-11.07759
regulation of inflammatory response	-9.13213
negative regulation of response to external stimulus	-4.98058

negative regulation of defense response	-3.71805
negative regulation of inflammatory response	-3.27268
Hepatitis C	-10.84276
Epstein-Barr virus infection	-8.94387
Hepatitis B	-7.10125
Neuroinflammation and glutamatergic signaling	-7.08678
Oncostatin M signaling pathway	-6.99651
Hepatitis B infection	-6.67601
TGF-beta receptor signaling	-6.59251
Toxoplasmosis	-6.48787
Measles virus infection	-6.39590
TGF-beta receptor signaling in skeletal dysplasias	-6.32184
Measles	-5.48214
Hepatitis C and hepatocellular carcinoma	-5.45960
Human cytomegalovirus infection	-5.28565
Influenza A	-5.27386
PID TNF PATHWAY	-5.03183
Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	-4.93358
Necroptosis	-4.88196
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer	-4.80608
Th17 cell differentiation pathway	-4.72394
Gastrin signaling pathway	-4.69333
PID IL23 PATHWAY	-4.54997
Prolactin signaling pathway	-4.46065
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	-4.39883
PDGF pathway	-4.35023
Th17 cell differentiation	-4.13574
Human T-cell leukemia virus 1 infection	-4.07927
Acute viral myocarditis	-4.07318
Coronavirus disease - COVID-19	-3.88756
Viral carcinogenesis	-3.82823
IL-4 signaling pathway	-3.60620
Inflammatory bowel disease	-3.16696
AGE/RAGE pathway	-3.13153
Leishmaniasis	-2.78039
Tuberculosis	-2.52536
positive regulation of miRNA metabolic process	-2.49151
Th1 and Th2 cell differentiation	-2.39099
Herpes simplex virus 1 infection	-2.30088
Inflammatory bowel disease signaling	-2.27713
Human immunodeficiency virus 1 infection	-2.06886
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway	-2.01169
cell activation	-10.11162
leukocyte activation	-9.45051
lymphocyte activation	-8.23606
hemopoiesis	-8.09006
alpha-beta T cell activation	-7.83847
alpha-beta T cell differentiation	-7.47653
T cell activation	-7.22561
leukocyte differentiation	-6.86478
CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	-6.66383
mononuclear cell differentiation	-6.18545
CD4-positive, alpha-beta T cell activation	-5.84029
lymphocyte differentiation	-5.23721
T cell differentiation	-5.05775
CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation involved in immune response	-4.22657
T-helper cell differentiation	-4.22657
alpha-beta T cell activation involved in immune response	-4.16731
alpha-beta T cell differentiation involved in immune response	-4.16731



T cell differentiation involved in immune response	-3.94546
T cell activation involved in immune response	-3.43271
leukocyte activation involved in immune response	-3.30884
cell activation involved in immune response	-3.23701
lymphocyte activation involved in immune response	-2.73367
immune effector process	-2.61042
T-helper 1 type immune response	-2.21829
I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	-10.06145
CHUK-NFKB2-REL-IKBKG-SPAG9-NFKB1-NFKBIE-COPB2-TNIP1-NFKBIA-RELA-TNIP2 complex	-7.79987
Non-genomic actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3	-7.41403
Photodynamic therapy-induced NF-kB survival signaling	-7.10958
TNF-alpha/Nf-kappa B signaling complex	-6.70321
NFKB1-NFKB2-REL-RELA-RELB complex	-6.45603
TNF-alpha/NF-kappa B signaling complex	-6.30958
Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) signaling pathway	-6.05851
NIK/NF-kappaB signaling	-5.91436
Osteoclast differentiation	-5.86023
Ebola virus infection in host	-5.82423
TNF-alpha signaling pathway	-5.56247
Toll Like Receptor 3 (TLR3) Cascade	-5.04249
miRNA role in immune response in sepsis	-4.96486
MyD88-independent TLR4 cascade	-4.86302
TRIF(TICAM1)-mediated TLR4 signaling	-4.86302
NFKB1-NFKB2-RELA-RELB complex	-4.76397
PID HIV NEF PATHWAY	-4.69396
Ebstein-Barr virus LMP1 signaling	-4.51780
LDL- influence on CD14 and TLR4	-4.42221
Nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor (NLR) signaling pathways	-4.40546
TRAF6 mediated induction of NFkB and MAP kinases upon TLR7/8 or 9 activation	-4.29722
MyD88 dependent cascade initiated on endosome	-4.26416
C-type lectin receptor signaling pathway	-4.26416
Toll Like Receptor 7/8 (TLR7/8) Cascade	-4.23149
Toll Like Receptor 9 (TLR9) Cascade	-4.13574
PID CERAMIDE PATHWAY	-4.10964
TLR4 signaling and tolerance	-4.08161
Toll-like receptor signaling related to MyD88	-3.86140
PID NFKAPPAB ATYPICAL PATHWAY	-3.84633
RIP-mediated NFkB activation via ZBP1	-3.84633
IkBA variant leads to EDA-ID	-3.83793
Toll Like Receptor 4 (TLR4) Cascade	-3.81394
Toll Like Receptor 10 (TLR10) Cascade	-3.70593
Toll Like Receptor 5 (TLR5) Cascade	-3.70593
MyD88 cascade initiated on plasma membrane	-3.70593
Prostate cancer	-3.70593
Canonical NF-kB pathway	-3.63912
Death Receptor Signaling	-3.62522
RANKL/RANK signaling pathway	-3.56201
Toll-like receptor signaling pathway	-3.52669
Toll-like receptor signaling pathway	-3.49808
Neovascularisation processes	-3.48728
ZBP1(DAI) mediated induction of type I IFNs	-3.46838
Altered glycosylation of MUC1 in tumor microenvironment	-3.46834
Insulin resistance	-3.38703
Vitamin D in inflammatory diseases	-3.38686
Novel intracellular components of RIG-I-like receptor pathway	-3.35459
Yersinia infection	-3.35452
Toll-like Receptor Cascades	-3.32407
Modulators of TCR signaling and T cell activation	-3.31559
PID NFKAPPAB CANONICAL PATHWAY	-3.30951

PID IL12 2PATHWAY	-3.27736
MyD88:MAL(TIRAP) cascade initiated on plasma membrane	-3.25532
Toll Like Receptor TLR6:TLR2 Cascade	-3.25532
MAP kinase activation	-3.20306
Toll Like Receptor TLR1:TLR2 Cascade	-3.17981
Toll Like Receptor 2 (TLR2) Cascade	-3.17981
TRAF6 mediated NF-kB activation	-3.16584
TAK1-dependent IKK and NF-kappa-B activation	-3.08627
Adipocytokine signaling pathway	-3.02902
Interleukin-1 family signaling	-3.00962
NO/cGMP/PKG mediated neuroprotection	-2.99907
RIG-I-like receptor signaling pathway	-2.96366
NF-kB is activated and signals survival	-2.95745
Interleukin-17 signaling	-2.93182
Interleukin-1 (IL-1) structural pathway	-2.91617
Chagas disease	-2.83479
PID CD40 PATHWAY	-2.80374
PID AVB3 OPN PATHWAY	-2.80374
Diseases of Immune System	-2.80374
Diseases associated with the TLR signaling cascade	-2.80374
regulation of lipid storage	-2.76186
Antiviral and anti-inflammatory effects of Nrf2 on SARS-CoV-2 pathway	-2.75134
NRP1-triggered signaling pathways in pancreatic cancer	-2.72545
Resistin as a regulator of inflammation	-2.70082
Signal transduction through IL1R	-2.70082
Mitochondrial immune response to SARS-CoV-2	-2.70082
IL-1 signaling pathway	-2.68985
p75NTR signals via NF-kB	-2.68148
Quercetin and Nf-kB / AP-1 induced apoptosis	-2.68148
DDX58/IFIH1-mediated induction of interferon-alpha/beta	-2.64069
Shigellosis	-2.57226
Interleukin-1 signaling	-2.53799
NOD1/2 Signaling Pathway	-2.51524
T-cell antigen receptor (TCR) pathway during Staphylococcus aureus infection	-2.46077
LTF danger signal response pathway	-2.45916
SARS-CoV-1 activates/modulates innate immune responses	-2.39090
negative regulation of lipid storage	-2.33215
STING pathway in Kawasaki-like disease and COVID-19	-2.33215
p75 NTR receptor-mediated signalling	-2.27878
Head and neck squamous cell carcinoma	-2.13375
TNF-alpha/NF-kappa B signaling complex 5	-2.11526
Fluid shear stress and atherosclerosis	-2.09160
miRNA regulation of prostate cancer signaling pathways	-2.07568
vasculature development	-9.37783
tube morphogenesis	-9.07283
blood vessel development	-8.53988
blood vessel morphogenesis	-8.46543
angiogenesis	-7.32799
regulation of angiogenesis	-5.78998
regulation of vasculature development	-5.67734
positive regulation of angiogenesis	-4.23189
positive regulation of vasculature development	-4.23189
apoptotic signaling pathway	-9.37743
intrinsic apoptotic signaling pathway	-7.97173
extrinsic apoptotic signaling pathway	-4.82833
intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage	-3.71327
epithelial cell apoptotic process	-3.56201
endothelial cell apoptotic process	-3.18575
Overview of nanoparticle effects	-2.45916

extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors	-2.27713
regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand	-2.17246
Photodynamic therapy-induced AP-1 survival signaling	-2.01506
regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	-9.30918
positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	-5.39458
Nuclear receptors meta-pathway	-9.26482
Nuclear receptors meta-pathway	-9.26482
Glucocorticoid receptor pathway	-6.68265
Apoptosis	-9.04580
Apoptosis	-9.04580
Apoptosis	-6.68183
Apoptosis modulation and signaling	-3.86615
PID NFAT 3PATHWAY	-3.65137
BH3-only proteins associate with and inactivate anti-apoptotic BCL-2 members	-3.46834
Host-pathogen interaction of human coronaviruses - apoptosis	-3.38686
Oxidative damage response	-3.32592
PID CASPASE PATHWAY	-2.83720
Prion disease pathway	-2.75134
Apoptosis - multiple species	-2.75134
Intrinsic Pathway for Apoptosis	-2.68985
response to glucocorticoid	-2.61642
TP53 network	-2.45916
Fas ligand pathway and stress induction of heat shock proteins	-2.24130
response to corticosteroid	-2.20721
response to nicotine	-2.10713
Pathways in cancer	-8.86877
FoxO signaling pathway	-5.75324
Small cell lung cancer	-5.56247
Small cell lung cancer	-5.39343
Chromosomal and microsatellite instability in colorectal cancer	-4.58905
Pancreatic cancer	-4.46065
Pancreatic adenocarcinoma pathway	-3.96753
Colorectal cancer	-3.27407
Cellular senescence	-2.95026
Non-small cell lung cancer	-2.93182
Melanoma	-2.93182
Chronic myeloid leukemia	-2.80968
Endometrial cancer	-2.58756
Breast cancer	-2.52369
Thyroid cancer	-2.51524
Gastric cancer	-2.48779
Endometrial cancer	-2.43062
Melanoma	-2.28828
Glioma	-2.10953
Cholesterol biosynthesis pathway	-8.76127
Cholesterol metabolism	-8.68977
Cholesterol metabolism	-8.30237
Cholesterol synthesis disorders	-8.08556
Cholesterol biosynthesis	-8.08502
sterol biosynthetic process	-7.47599
cholesterol biosynthetic process	-6.90710
secondary alcohol biosynthetic process	-6.90710
cholesterol metabolic process	-6.28056
Steroid biosynthesis	-6.22553
lipid biosynthetic process	-6.08882
Cholesterol metabolism with Bloch and Kandutsch-Russell pathways	-6.05851
secondary alcohol metabolic process	-5.89659
sterol metabolic process	-5.75324
Metabolism of lipids	-5.62362

Regulation of cholesterol biosynthesis by SREBP (SREBF)	-5.52033
alcohol biosynthetic process	-5.47687
Activation of gene expression by SREBF (SREBP)	-5.30486
Metabolism of steroids	-5.02271
Sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) signaling	-4.67822
small molecule biosynthetic process	-4.60873
steroid metabolic process	-4.02939
steroid biosynthetic process	-3.95382
organic hydroxy compound biosynthetic process	-3.87281
Cholesterol biosynthesis with skeletal dysplasias	-3.83793
Cholesterol biosynthesis pathway in hepatocytes	-3.30710
Fatty Acids and Lipoproteins Transport in Hepatocytes	-3.21276
PPARA activates gene expression	-3.15519
Regulation of lipid metabolism by PPARalpha	-3.10675
alcohol metabolic process	-2.99852
Mevalonate arm of cholesterol biosynthesis pathway	-2.95745
Statin inhibition of cholesterol production	-2.80374
SREBF and miR33 in cholesterol and lipid homeostasis	-2.52853
Cholestasis	-2.45916
Unfolded protein response	-8.54608
Photodynamic therapy-induced unfolded protein response	-5.38485
intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress	-4.69396
response to endoplasmic reticulum stress	-3.47234
Endoplasmic reticulum stress response in coronavirus infection	-3.04211
cellular response to unfolded protein	-3.02902
integrated stress response signaling	-2.80374
endoplasmic reticulum unfolded protein response	-2.79909
Response of EIF2AK1 (HRI) to heme deficiency	-2.76638
PERK regulates gene expression	-2.75134
ER-nucleus signaling pathway	-2.70082
regulation of response to endoplasmic reticulum stress	-2.64069
positive regulation of response to endoplasmic reticulum stress	-2.55935
cellular response to topologically incorrect protein	-2.46214
Unfolded Protein Response (UPR)	-2.34518
ATF4 activates genes in response to endoplasmic reticulum stress	-2.02133
interleukin-11-mediated signaling pathway	-8.16658
ncRNAs involved in STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma	-6.70321
Interleukin-6 signaling	-6.30958
Regulatory circuits of the STAT3 signaling pathway	-6.23203
Immune response to tuberculosis	-5.82794
Interleukin-6 family signaling	-5.70903
IL6 signaling pathway	-5.23382
Interleukin-11 signaling pathway	-5.16470
cellular response to interleukin-6	-5.01321
PID IL6 7 PATHWAY	-4.96792
CD4-positive or CD8-positive, alpha-beta T cell lineage commitment	-4.83672
response to interleukin-6	-4.76962
JAK-STAT signaling pathway	-4.69411
Interleukin-27 signaling	-4.67050
Type II interferon signaling	-4.54997
RAF-independent MAPK1/3 activation	-4.51780
type II interferon-mediated signaling pathway	-4.50006
Interleukin-35 Signalling	-4.50006
T-helper 17 cell differentiation	-4.34602
Interleukin-20 family signaling	-4.33116
T cell lineage commitment	-4.24426
PID IL27 PATHWAY	-4.24426
interleukin-6-mediated signaling pathway	-4.20554
T-helper 17 type immune response	-3.84633

interleukin-9-mediated signaling pathway	-3.83793
cellular response to interleukin-9	-3.83793
positive T cell selection	-3.79346
alpha-beta T cell lineage commitment	-3.64580
response to interleukin-9	-3.63912
Leptin signaling pathway	-3.60386
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-3.49958
cellular response to type II interferon	-3.46982
T-helper 17 cell lineage commitment	-3.46834
MAPK1 (ERK2) activation	-3.46834
Interleukin-9 signaling	-3.46834
interferon-mediated signaling pathway	-3.43499
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	-3.33613
MAPK3 (ERK1) activation	-3.31875
Interleukin-21 signaling	-3.31875
Type III interferon signaling	-3.31875
Mammary gland development pathway - Involution (Stage 4 of 4)	-3.31875
Other interleukin signaling	-3.23594
type III interferon-mediated signaling pathway	-3.18575
cellular response to type III interferon	-3.18575
T cell selection	-3.08627
response to type III interferon	-3.06610
IL-10 anti-inflammatory signaling pathway	-3.06610
response to type II interferon	-2.90115
T-helper cell lineage commitment	-2.85801
Regulation of IFNG signaling	-2.85801
FOXP3 in COVID-19	-2.76638
Interferon type I signaling pathways	-2.72545
PID IL2 1PATHWAY	-2.68985
Interleukin-12 family signaling	-2.62093
positive regulation of homotypic cell-cell adhesion	-2.60244
CD4-positive, alpha-beta T cell lineage commitment	-2.60244
IL-6-type cytokine receptor ligand interactions	-2.60244
IL-9 signaling pathway	-2.60244
Overview of interferons-mediated signaling pathway	-2.51524
PID IFNG PATHWAY	-2.39090
IL-5 signaling pathway	-2.39090
IL-2 signaling pathway	-2.31398
Inactivation of CSF3 (G-CSF) signaling	-2.11526
IL-7 signaling pathway	-2.11526
IL-3 signaling pathway	-2.04501

Analyse de l'enrichissement fonctionnel des voies réalisée à l'aide de Metascape.