Collège Doctoral du Languedoc-Roussillon

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur

Délivré par **Université de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **CBS2**

Et de l'unité de recherche CNRS UMR 5203-INSERM U1191

Spécialité : Biochimie, biologie cellulaire et moléculaire, physiologie et nutrition

Présentée par **Morgane Roussel**

Modulation du trafficking et de la signalisation du récepteur GLP-1 sur la cellule β pancréatique par un traitement chronique aux glucocorticoïdes

Soutenue le 15 décembre 2015 devant le jury composé de

Mr Eric RENARD, Professeur, CHU	Président
Mr Stéphane DALLE, Directeur de recherche, CNRS	Directeur de Thèse
Mr Amar ABDERRAHMANI, PU-PH, Université Lille 2	Rapporteur
Mr Jochen LANG, Professeur, Université Bordeaux	Rapporteur
Mr Bertrand BLONDEAU, Maître de conférence, INSERM	Examinateur
Mr Eric REITER, Directeur de recherche, INRA	Examinateur

UNIVERSITE MONTPELLIER

RESUMES

Modulation du trafficking et de la signalisation du récepteur GLP-1 dans la cellule β pancréatique par un traitement chronique aux glucocorticoïdes

Les cellules β pancréatiques synthétisent et sécrètent l'insuline, unique hormone hypoglycémiante de l'organisme. Ces cellules jouent un rôle central dans l'apparition du diabète, préserver leurs masses fonctionnelles est donc essentiel. Le récepteur GLP-1, appartenant à la classe B de la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), est considéré comme une cible thérapeutique majeure dans le traitement du diabète de type 2. Via son récepteur, le GLP-1 potentialise la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et favorise la survie des cellules β. Les glucocorticoïdes sont des hormones du stress impliquées dans la régulation énergétique, largement utilisés en thérapeutique pour leur propriétés anti-inflammatoire, immunosuppresseur et antiallergique. Néanmoins, les glucocorticoïdes administrés en chronique sont diabétogènes en exerçant notamment des effets délétères sur les cellules β. Nous avons caractérisé l'impact d'une exposition prolongée des cellules β à un glucocorticoïde de synthèse (la dexaméthasone) sur les actions biologiques du glucose et du GLP-1.
Nous montrons qu'une exposition prolongée des cellules β à la dexaméthasone exerce des effets délétères en inhibant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et l'activation des kinases de survie ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases 1/2). A l'inverse, nous démontrons que l'exposition prolongée des cellules bêta à la dexaméthasone favorise le maintien du récepteur GLP-1 à la membrane plasmique, augmente le couplage du récepteur à la protéine Gαs, ce qui se traduit par une production de second messager (AMPc) intracellulaire doublée. Malgré une diminution des effets du glucose, la sécrétion d'insuline et l'activation des kinases ERK1/2 en réponse au GLP-1 ne sont pas affectées. Cette étude révèle qu'une exposition chronique des cellules β aux glucocorticoïdes [1] régule le trafficking du récepteur GLP-1 et favorise son maintien à la surface cellulaire, [2] hypersensibilise la signalisation du récepteur GLP-1 dépendante de la protéine $G\alpha_s$, et [3] pourrait impacter les effets thérapeutiques des molécules ciblant l'activation du récepteur GLP-1.

Mot-clés : Diabète de type 2, cellule β pancréatique, récepteur GLP-1, récepteur glucocorticoïde, signalisation intracellulaire, traffickingde récepteur.

Modulation of GLP-1 Receptor trafficking and signaling in pancreatic beta cells following chronic glucocorticoid treatment

Pancreatic β cells synthesize and secrete insulin, the only hypoglycemic hormone in the body. These cells play a central role in the onset of diabetes. To protect the functional β-cell mass is essential. The GLP-1 receptor, which belongs to the class B of the G protein-coupled receptor (GPCR) family, is a major therapeutic target in type 2 diabetes. Through its receptor, GLP-1 potentiates glucose-induced insulin secretion and improves the survival of pancreatic β cells. Glucocorticoids are stress hormones implied in energetic metabolism and are widely used in therapeutics for their anti-inflammatory, immunosupressive and anti-allergic properties. Neverless, on chronic administration, glucocorticoids can induce metabolic syndrome especially due β cell functional mass impairement. Here, we characterized the impact of a prolonged exposure of pancreatic β cells to a synthetic glucocorticoid (dexamethasone) on biological actions of glucose and GLP-1.
We show that a chronic exposure of β cells to dexamethasone exerted deleterious effects on glucose-induced insulin secretion and ERK1/2 (Extracelllular Regulated Kinases 1/2) activation. In contrast, we observed that the glucocorticoid treatment increased GLP-1 receptor expression at the plasma membrane and improved the $G\alpha_s$ protein coupling leading to an enhancement of cAMP production (2 fold increase). Despite the negative impact on glucose effects, glucocorticoids did not impair neither GLP-1-induced insulin secretion nor ERK1/2 activation. This study reveals that a glucocorticoid chronic exposure [1] regulates GLP-1 receptor trafficking and increases its expression to the plasma membrane, [2] causes supersensitization of $G\alpha_s$-associated signaling, and [3] could impact on therapeutic effects of GLP-1 receptor-based drugs.

Key words: Type 2 diabetes, pancreatic beta cell, GLP-1 receptor, glucocorticoid receptor, intracellular signaling, receptor trafficking.

REMERCIEMENTS

Merci à Amar Abderrahmani et Jochen Lang d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci à Bertrand Blondeau et Eric Reiter d'être les examinateurs de mon travail. Enfin merci à Eric Renard de présider le jury de la soutenance de ma thèse.

Stéphane, presque 5 ans depuis mon stage de M2ster...Je te dois beaucoup...Je te dois ce stage, mon contrat en attendant et puis la thèse...Tu as été pour moi un très bon encadrant. Tu m'as toujours encouragé, m'as fait confiance et m'as accordé l'indépendance dont j'avais besoin. Je retiendrais les longues discussions que nous avons eu pour tenter de trouver une explication aux résultats que je t'apportais. Ces échanges ont participé à me donner finalement envie de continuer. Je garderais aussi un très bon souvenir des congrès que nous avons fait ensemble et de toutes ces histoires que tu as pu nous raconter pendant les longs trajets!

Gyslaine, merci de m'avoir appris à isoler des îlots. Je retiendrais aussi nos échanges scientifiques qui m'ont souvent donné envie de me disperser ☺ . Merci pour ta présence.

Magalie, je tiens à te remercier pour ton aide tout au long de cette thèse que ce soit en microscopie ou avec adobe ;-) oui bien d'autres choses encore ; merci pour ta patience.

Christophe, merci pour ton aide lors des manips sur les îlots humains et surtout pour ta bonne humeur et cette bouffé d'air frais que tu amènes avec toi quand tu viens nous faire un petit coucou!

Nathalie, tu m'as fabriqué le plus beau chapeau qu'il m'est été donné de porter, tu m'as aussi appris beaucoup de choses au labo, et tu as su rester présente et disponible même après ton départ pour m'aider à prendre la relève, merci.

Safia, j'ai été contente de trouver quelqu'un qui partageait mon amour pour le...WB ! En peu de temps tu m'as appris plus que tu ne le penses, merci.

Elodie, tu as été une encadrante merveilleuse pour mon stage de M2, tu as su me consacrer du temps pour m'apprendre la majorité des choses que je sais aujourd'hui, Merci.

Danny, merci pour tout ce que tu m'as permis d'apprendre, nos discussions scientifiques et les moments de franches rigolades!

Merci Michmich pour les moments de rigolades et les supers balades à cheval ☺

Merci à l'équipe de la plateforme de Protéomique et surtout à Serge et Franck pour leur aide sur le projet phoshoprotéo !

Je voulais aussi remercier toutes les personnes que j'ai rencontré au sein de l'institut et surtout les thésards de l'étage (Pierre, Malik, Christelle...)

Juju, mon p'tit bouchon, bien des choses nous séparent...toi qui n'aimes que les *MIN* et moi les *INS*, toi la campagne et moi la ville, toi Christophe Mae et moi ... pas Christophe Mae... ;-). Mais par la force des choses nous avons partagé d'incroyables aventures ensemble... le nettoyage des ***PSM,*** la descente des poubelles et quelquefois même, nous prenions une pause-café. Voilà comment, au fil du temps, bien plus qu'une collègue tu es devenue une amie présente du début à la fin et rien que

pour continuer à t'entendre m'appeler « phacochère » j'aurai accepté une 4ème année (bon à réfléchir parce que t'es quand même une sacré connasse ! :-p). Merci pour tout.

Joy ma Jojoy, notre première conversation sur … le papier toilette triple épaisseur aura été une base solide pour démarrer cette amitié. Fanny, tu étais une de mes premières stagiaires et sans doute la seule à oublier de rajouter du milieu lors du repiquage des cellules ;-). Même si tu n'as passé que 6 mois au labo, un trio est né avec la Jojoy et n'est pas prêt de disparaître. Je voulais vous remercier toutes les deux parce que tout au long de cette thèse vous avez été mes amies, confidentes, mon exutoire et nos fameuses soirées Kwak, ont fait parties des meilleurs moments de ces 3 ans. Merci pour tout.

Tiphaine, la Titi, la TIphtiph, Tiphoune, toi qui n'as jamais aimé les surnoms tu auras été gâtée! J'aurai pu, sur cette page, te remercier pour ta bonne humeur et ta motivation à toute épreuve mais aurais-je été vraiment honnête ? Non, alors je vais faire différemment. Merci pour ta méchanceté, tes sarcasmes et d'avoir essayé de saboter cette thèse en me faisant découvrir Candy Crush… Plus sérieusement merci pour présence, ton aide à chaque étape, et ta patience lors de mon 10000ème changement d'avis sur ma vie sentimentale ☺.

Je voulais aussi remercier Sophie. Nous avons démarré toutes les deux en stage au labo et nous terminons nos thèses à 15 jours d'intervalles c'est pas beau ? Pendant ces années on a été bien bien bien même quand on était pas vraiment bien bien, c'est ça l'effet Soof. C'est plein de bougies pétillantes, de bisous vitaminés et de soleil des îles. On ne peut pas rêver d'une amie plus pleine de pensées positives (oui ce n'est pas très français mais bon je suis hollandaise☺) Et je terminerai par… 15h23 … parce que la dyslexie c'est pas facile à vivre…

Mathilde, mon ancienne super coloque avec qui l'aventure montpellierraine a démarré.Merci pour ta présence et les bons moments passés ensemble.

Marion, malgré la distance qui nous sépare depuis plusieurs années maintenant tu es toujours présente et les rares we ou nous avons pu nous retrouver ont été un vrai bonheur! Merci !

Je voudrais en plus remercier le reste du groupe montpellierrain : Claire, Ben, Paupau, Mika, Val, Alice, Vinc, Flo et les autres. Merci pour tous ces moments de détente, de folie, de chile et d'aventure vous avez été au top!

Hubert, tu as sans doute été la personne la plus importante dans cette période de ma vie. Merci pour les bons moments partagés et les autres… parce que oui : « j'aime me battre » ☺.

Je tiens particulièrement à remercier mes parents, c'est grâce à vous que j'ai pu arriver là ou je suis. Vous m'avez toujours poussé à aller plus loin et m'avez toujours soutenue, je ne vous remercierai jamais assez…

Enfin je voulais remercier Hélios. Tu as été présent tout au long de cette thèse pour m'apporter le soutient dont j'avais besoin. Merci d'avoir accepté ces week-ends ponctués de labo et ces longues journées sans compagnie. Tu es le seul homme à avoir tenu le coup (oui tu n'as pas vraiment eu le choix mais bon…) et si ce manuscrit voit le jour c'est en partie grâce à toi. Merci.

TABLE DES MATIERES

RESUMES **1**
REMERCIEMENTS **2**
AVANT-PROPOS **7**
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **11**
Chapitre 1: Physiologie de la cellule β **13**
A. Introduction 13
1. Anatomie du pancréas 13
a) Pancréas exocrine 13
b) Pancréas endocrine 13
2. Les ilots de Langerhans 15
a) Types cellulaires 15
b) Vascularisation 16
c) Innervation 16
3. La cellule β 17
B. Régulation de la fonction et de la masse des cellules β par le glucose 17
1. Régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose 17
a) Le couplage métabolique 17
b) Les granules d'insuline 19
c) La synthèse d'insuline 20
(1) La transcription du gène de l'insuline 20
(a) Régulation en cis et en trans de la transcription du gène de l'insuline 20
(b) Régulation du gène de l'insuline par le glucose 24
(2) La traduction du messager de l'insuline 25
2. Régulation de la masse par le glucose 27
Chapitre 2: Le GLP-1R un récepteur de la famille des RCPGs **30**
A. Les RCPGs 30
3. Structure et classification 30
a) La classe A ou Rhodopsin-like 32
b) La classe B ou secretin-like 32
c) La classe C ou Melanotrope-glutamate/phéromone 33
4. Activation des RCPGs : la voie dépendante des protéines G 34
5. Régulation de la signalisation/désensibilisation 38

a) Le découplage du récepteur à la protéine G 39
(1) Les protéines impliquées dans le découplage 39
(a) Les GRKs (G protein-coupled receptor kinase) 39
(b) Les β-arrestines 40
(2) Mécanisme de découplage 41
(3) Modulation du découplage 42
b) Internalisation : resensibilisation ou dégradation 43
(1) Clathrine dépendant 43
(2) Clathrine indépendant 43
(3) La super famille des dynamines 44
(a) Modulation de l'internalisation 46
c) GPCR , arrestin et signaling 47
A. Les actions biologiques générales du GLP-1 50
6. Le récepteur du GLP-1 54
7. Le Trafficking du récepteur GLP-1 56
a) Adressage à la membrane 56
b) Internalisation 57
C. Actions Biologiques du récepteur GLP-1 dans la cellule β 60
1. Action sur la fonction des cellules β 60
2. Action sur la masse des cellules β 63
Chapitre 3: Physiopathologie de la cellule β pancréatique 66
A. Introduction 66
3. La cellule β dans le diabète 66
4. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose dans la cellule β 69
D. Effets des glucocorticoïdes 72
1. Les glucocorticoïdes: généralités 72
a) Nature et régulation 72
b) Propriétés 73
2. Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) 74
a) Structure 74
b) Polymorphisme et modifications post traduction du GR 76
3. Mécanismes d'action des GCs 77

a) Les effets génomiques 79
b) Les effets non-génomiques 79
4. Les effets diabétogènes d'un traitement chronique aux GCs 80
a) Observations cliniques : mise en évidence des effets diabétogènes 80
b) Effets moléculaires de l'insulinorésistance cortico-induite au niveau des tissus périphériques 82
c) Effet sur le pancréas endocrine 82
(1) Impact sur la fonction sécrétrice de la cellule β 83
(2) Impact sur masse des cellules β 85
d) GCs et GLP-1 en clinique 86
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS 89
RESULTATS 93
Partie 1 : augmentation de l'expression membranaire du recepteur glp-1 et de sa signalisation suite a un traitement aux glucocorticoïdes 95
A. Contexte scientifique et objectifs 96
B. Resutats principaux 97
Partie 2 : Résultats complémentaires 131
A. Introduction 133
B. Matériels et méthodes complémentaires 133
C. Resultats 142
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES 145
A. Conclusion et discussion 147
B. Perspectives 157
ANNEXE 159
BIBLIOGRAPHIE 171
LISTE DES ABBREVIATIONS 199
TABLE DES ILLUSTRATIONS 203

AVANT-PROPOS

Le glucose est une source d'énergie essentielle au bon fonctionnement de l'organisme. Lors de modifications de l'équilibre glycémique (repas, activité physique, …) se mettent en place des mécanismes d'adaptation qui vont permettre de maintenir une glycémie (concentration plasmatique de glucose) autour d'une valeur moyenne de 5.5mM ou 1g/L chez l'homme.

Les organes principalement impliqués dans le contrôle de la glycémie sont le cerveau, le foie, les muscles, le tissu adipeux et le pancréas. Le foie tient un rôle essentiel puisqu'il est capable de mettre en réserve le glucose sanguin en excès sous forme de glycogène par le processus de glycogénogénèse. Il peut aussi libérer le glucose dans la circulation sanguine par 2 mécanismes : la néoglucogenèse correspondant à la production de glucose *de novo* c'est-à-dire à partir d'AA (Acides aminés) et la glycogénolyse, une hydrolyse du glycogène. Le muscle squelettique est également capable de stocker le glucose sous forme de glycogène. Lorsque les capacités maximales de stockage sont atteintes, le glucose est transformé en AG (Acides gras) et stocké dans les adipocytes sous forme de triglycérides. Ces mécanismes de stockage ou de libération du glucose sont essentiels à l'adaptation de l'organisme aux variations de l'apport nutritionnel et ils sont finement régulés par un système hormonal et notamment les hormones pancréatiques qui jouent un rôle important.

Lors de la prise alimentaire, les cellules intestinales absorbent le glucose et libèrent dans la circulation sanguine à travers des transporteurs GLUT2 (glucose transporter 2). La glycémie va alors augmentée d'une valeur basale (4.8 mM) jusqu'à un pic à 7.8 mM au bout d'une heure (Singhal et al. 2002). Les cellules instinales vont alors sécréter les hormones incrétines que sont le GIP (glucose-dependant insulinotropic polypeptide) et le GLP-1 (glucagon like peptide-1). Une fois dans la circulation systémique, le glucose et les 2 hormones vont agir au niveau de certaines cellules du pancréas, sensibles aux variations de la glycémie et responsables de la sécrétion de 2 hormones aux rôles opposés, qui vont aller agir au niveau des tissus périphériques précédemment cités pour gérer les réserves de glucose. Le glucagon est une hormone hyperglycémiante, il va donc agir en temps de jeun en mobilisant les réserves de glucose et en augmentant la production de glucose *de novo*. L'insuline est la seule hormone de l'organisme capable d'avoir une action hypoglycémiante, elle va agir au niveau du métabolisme glucidique mais également lipidique et protéique. Au niveau du foie

et du muscle elle agit à l'inverse du glucagon en favorisant le stockage du glucose et inhibe aussi la

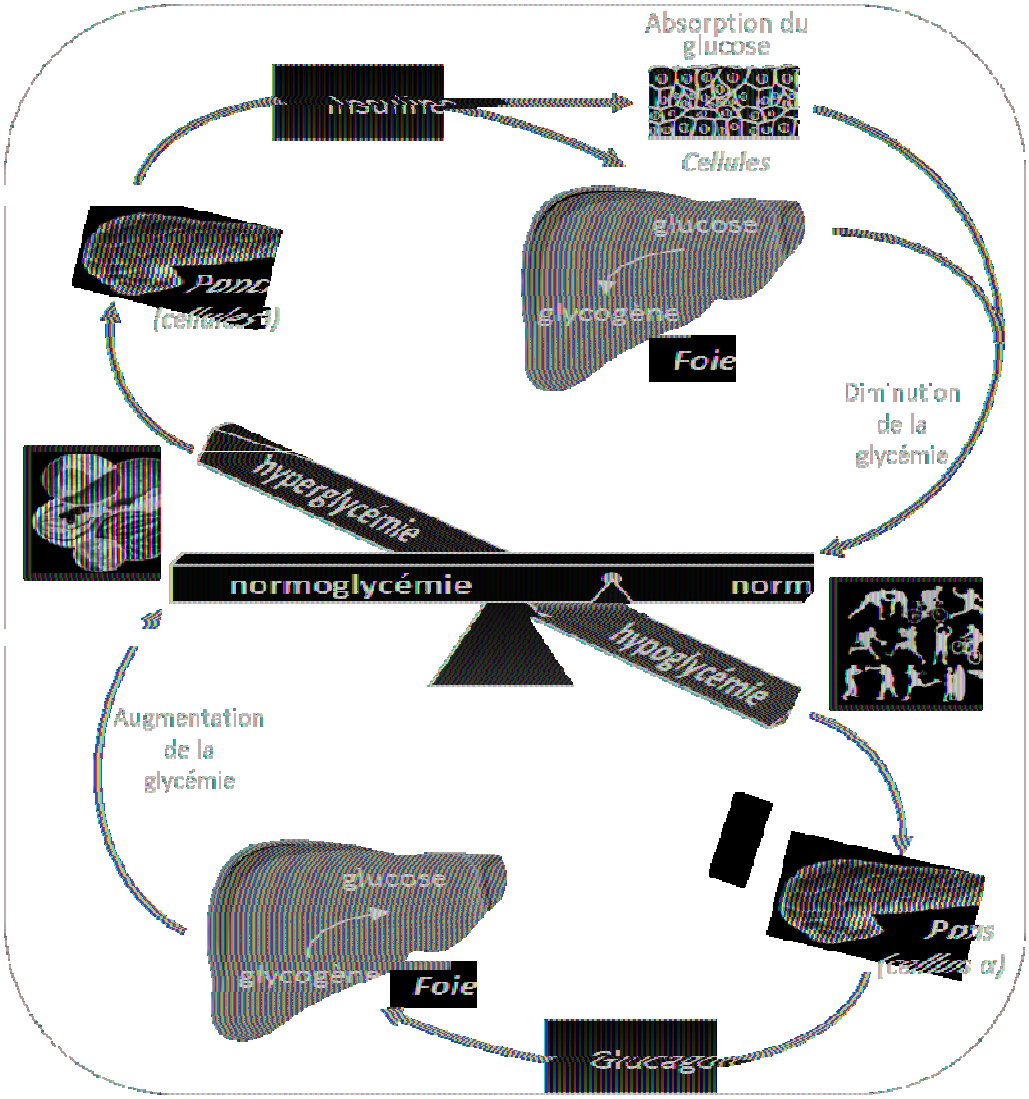


Figure 1 : Représentation simplifiée de la régulation de l'homéostasie glucidique.

néoglucogénèse hépatique (Fig 1). Elle améliore la capture du glucose dans les cellules adipeuses et musculaires en augmentant l'expression des transporteurs GLUT4 ainsi que leur localisation membranaire revue dans Gould et al. (1993).

En cas de dysfonctionnement de ces mécanismes de régulation de la glycémie on est en présence d'hypo- ou d'hypoglycémie qui peuvent avoir des conséquences dramatiques. Les effets de l'hypoglycémie se divisent en 2 catégories. Tout d'abord les symptômes causés par la sécrétion d'adrénaline comprennent entre autre des tremblements, palpitations, transpirations et les nausées. Le manque d'apport de glucose au niveau du cerveau va alors provoquer des troubles de la concentration, somnolence, vision embrouillée, troubles de la parole ou encore des maux de tête. Une hypoglycémie sévère peut également mener à un état comateux, des convulsions et la mort du patient. Les effets de l'hyperglycémie sont visibles sur le plus long terme et peuvent être caractérisés par des microangiopathies, des rétinopathies, ou encore des néphropathies.

Le diabète de type 2 (DT2) constitue un problème majeur de santé publique. Les hyperglycémies répétées et prolongées ainsi que le déséquilibre du diabète provoquent une altération des nerfs et des vaisseaux induisant la détérioration de plusieurs organes. En France, le diabète est la principale cause de maladies cardiovasulaires et rénales, de cécité et d'amputation (Morel et al 2014). En 2014, 16.7% des diabétiques souffrent de troubles cardiovasculaires, 20% de troubles visuels et 19% de néphropathies.

Le DT2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique due à une résistance à l'insuline des tissus périphériques ainsi qu'à un défaut de la masse fonctionnelle des cellules β productrices d'insuline. Plusieurs facteurs comme l'hyperglycémie chronique, l'hyperlipidémie ou encore la présence de cytokines proinflammatoires jouent un rôle dans la diminution de la masse et de la fonction de ces cellules. Il a également été mis en évidence que les glucocorticoïdes (GCs) présentaient des effets diabétogènes pour les tissus cibles de l'insuline mais également pour les cellules β.

Dans cette introduction nous allons tout d'abord décrire les mécanismes moléculaires de la cellule β pancréatique en conditions physiologiques. Ensuite nous nous focaliserons sur un récepteur important pour la cellule qui est le récepteur GLP-1 membre de la super famille des Récepteurs couplés aux protéines G. Enfin nous aborderons les mécanismes

d’altéraction de la masse fonctionnelle des cellules β et nous traiterons plus particulièrement des effets diabétogènes des GCs.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1: Physiologie de la cellule β

A. Introduction

1. Anatomie du pancréas

Le pancréas, situé au niveau du rétropéritoine entre le duodénum et la rate, est composé de 4 parties : la tête, l'isthme, le corps et la queue. Chez l'homme il mesure de 14 à 18 cm de long et pèse entre 50 et 100 g. C'est un organe complexe appelé amphicrine puisqu'il est constitué d'un tissu exocrine produisant les enzymes nécessaires à la digestion et d'un tissu endocrine sécrétant les deux hormones régulatrices de l'homéostasie glucidique (Fig 2).

a) Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine représente 98% du pancréas total. Il est composé:

- des acinis : structures lobulaires sécrétant les enzymes digestives.
- des cellules canalaires : structures ramifiées sécrétant le suc digestif.

Le pancréas est traversé par le canal pancréatique principal encore appelé canal de Wirsung. Il collecte les sucs et enzymes fabriqués, pour les déverser dans le duodénum au travers d'un orifice commun avec l'abouchement de la voie biliaire avec laquelle il se réunit au niveau de l'ampoule de Vater avant d'atteindre le duodénum (Fig 2).

b) Pancréas endocrine

Le pancréas endocrine représente le 1% restant du pancréas total. Il est composé d'îlots de Langerhans : petits amas cellulaires compacts et sphériques répartis dans le parenchyme exocrine. Chez l'Homme, le pancréas est constitué de 1 à 2 millions d'îlots de Langerhans. Leur taille est très variable puisqu'elle peut aller de 50 à 400µm (Ricordi et al. 1990). Ils sont composés de quelques dizaines à 5000 cellules.

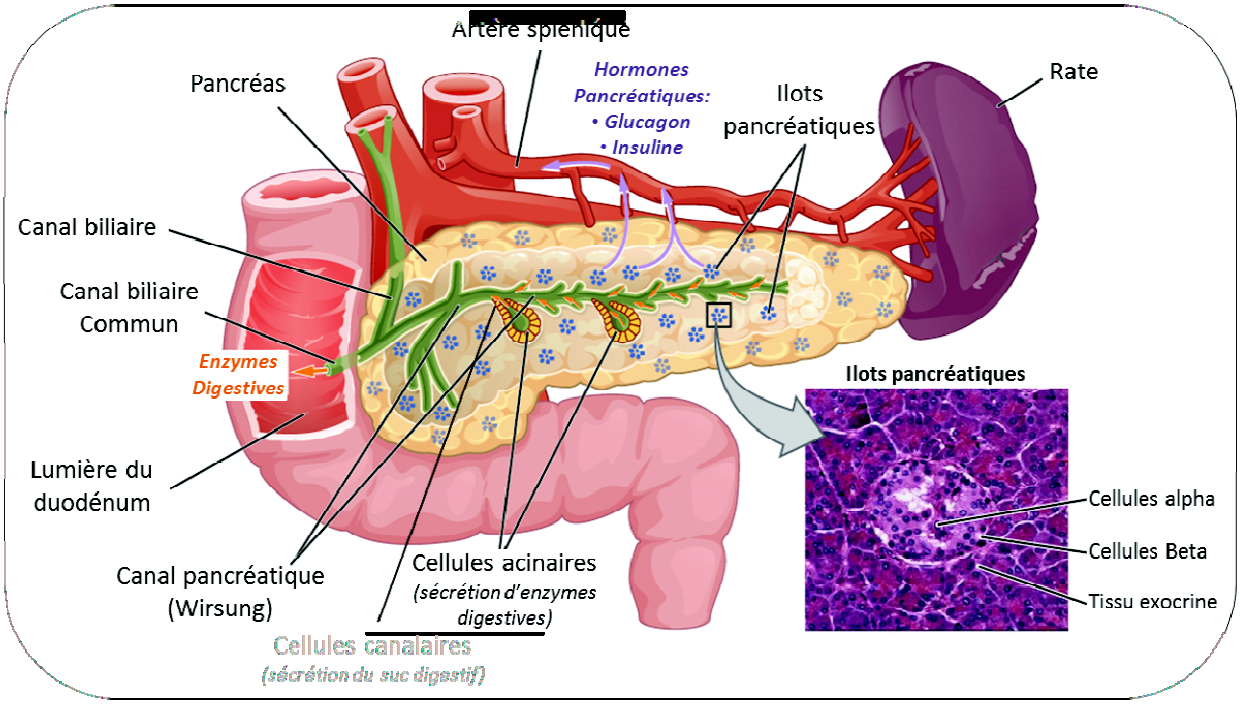


Figure 2 : Le pancréas



Figure 3 : Architecture de l'îlot de Langerhans. A : Images confocales de coupes d'îlots de souris (à gauche) et d'îlots humains (à droite). B : La ligne blanche délimite les régions du manteau et du cœur et montre un arrangement en forme de « U » de l'îlot humain. Les cellules β so marquées en rouge, les cellules α en vert et les cellules δ (A) en bleu.

2. Les ilots de Langerhans

a) Types cellulaires

Les îlots sont composés de 4 principaux types cellulaires endocriniens :

Les cellules β sont les cellules majoritaires de l'îlot (environ 50-70% chez l'Homme et 60-80% chez la souris) (Cabrera et al. 2006; Bosco et al. 2010). Elles sécrètent l'insuline, unique hormone hypoglycémiante de l'organisme. Ces cellules sécrètent également du zinc, qui est compléxé à l'insuline, de l'acide γ-aminobutyrique (GABA), de l'amyline (ou islet amyloid polypeptide, IAPP), de l'ATP, de la sérotonine,…

Les cellules α représentent 20-40% de l'îlot chez l'Homme et 10-20% chez la souris (Cabrera et al. 2006; Bosco et al. 2010). Elles sécrètent le glucagon, hormone hyperglycémiante.

Les cellules δ décrites par Bloom (1931) représentent 2 à 5% de l'îlot et sécrètent la somatostatine, hormone inhibant la sécrétion des hormones insuline et glucagon.

Les cellules PP découvertes chez l'homme par Larsson et al. (1975) représentent 1 % de l'îlot et sécrètent le polypeptide pancréatique (PP).

Les cellules « ghrelin » : ce dernier type cellulaire sécrétant la ghrelin a été identifié dans les îlots humains (Wierup et al. 2002; revue dans Wierup et al. 2014)

On notera que le ratio cellules β / cellules α est moins élevé chez l'Homme que chez la souris (Bosco et al. 2010; Dolenšek et al. 2015). Ceci s'explique entre autre par des variations d'architecture de l'îlot entre les espèces. En effet l'îlot de souris a une conformation « manteau-cœur » c'est-à-dire que le contour de l'îlot est composé de cellules non-β et le cœur de cellules β (Brissova et al. 2005; Cabrera et al. 2006; Bosco et al. 2010) (Fig 3A). Dans l'îlot humain, l'architecture semble dépendre de la taille de l'îlot. Les plus petits conservent une conformation similaire à celle des îlots de souris alors que les plus gros adoptent des conformations plus complexes. Les cellules α sont retrouvées en couronne autour de l'îlot mais également le long des vaisseaux pénétrants dans l'îlot (Bosco et al. 2010). Par conséquent, plus la taille de l'îlot augmente plus la proportion de cellules β/α diminue. De plus il a été proposé une structure trilaminaire composée d'une couche de cellules β entourées par deux couches de cellules α. Cette structure peut-être arrangée sous forme de U ou de O permettant une meilleure communication des différents types cellulaires composants l'îlot (Bosco et al. 2010) (Fig 3B).

b) Vascularisation

La vascularisation au sein de l'îlot est très développée. Elle est constituée d'artérioles qui pénètrent au centre de l'îlot où elles se ramifient en un réseau de capillaires se dirigeant des cellules centrales (cellules β) aux cellules périphériques (cellules non-β). Cette disposition permet aux cellules β d'agir sur les cellules non-β via leurs facteurs sécrétés. Bien que les îlots ne représentent que 1% du pancréas, le réseau de capillaires y est environ 5 fois plus dense que dans le tissu exocrine et est également 10 fois plus fenestré (Henderson and Moss 1985; Jansson and Carlsson 2002).

c) Innervation

Le pancréas endocrine présente une riche innervation. Les nerfs pénètrent dans l'îlot en association avec les artères pancréatiques. Il existe des différences anatomiques de l'innervation entre les îlots de rongeurs et humains revue dans Barker et al. (2013). Chez la souris, les fibres nerveuses sympathiques inervent préférentiellement les cellules α tandis que les fibres parasympathiques atteignent les cellules α et β de manières équivalentes. Dans les îlots humains, l'inervation parasympathique est moins importante dans les cellules β. Les fibres sympathiques ne sont quant à elles plus associées aux cellules endocrines mais aux cellules musculaires lisses elles-mêmes associées aux capillaires. Le flux sanguin dans les îlots humains est directement contrôlé par le système nerveux alors que les îlots de rongeurs contiennent peu de cellules musculaires lisses (Rodriguez-Diaz et al. 2011).

Les sécrétions du pancréas endocrine sont majoritairement régulées par :

- Le système parasympathique (acétylcholine) stimule majoritairement la sécrétion d'insuline par les cellules β et modestement la sécrétion de glucagon (Ahrén 2000).
- Le système sympathique (noradrénaline ou norépinephrine) inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose et stimule la sécrétion de glucagon par les cellules α (Ahrén 2000).

3. La cellule β

La cellule β pancréatique est l'unique cellule capable de synthétiser et de sécréter la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme : l'insuline. Cette sécrétion est modulée en fonction de la concentration plasmatique en nutriments, majoritairement le glucose et permet le maintien de l'homéostasie glucidique. L'insuline va agir au niveau de tissus cibles comme le muscle, le foie ou le tissu adipeux ou elle va stimuler l'absorption et le stockage du glucose.

B. Régulation de la fonction et de la masse des cellules β par le glucose

1. Régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Les agents stimulants de la sécrétion d'insuline peuvent être classés en 2 catégories. Les stimuli primaires, qui possèdent la capacité de déclencher la sécrétion d'insuline et les stimuli secondaires, qui ont un effet potentialisateur uniquement en présence d'un stimulus primaire. Le glucose, stimulus primaire, est le sécrétagogue physiologique le plus important pour la cellule β. Il a ce que l'on appelle un effet permissif puisqu'aucune autre molécule physiologique n'a le pouvoir de déclencher la sécrétion d'insuline si la glycémie est trop basse.

a) Le couplage métabolique

Les cellules β ont pour mission de convertir de faibles variations de glycémie (4.5 à 8mM chez l'Homme) en sécrétion d'insuline rapide et conséquente afin de maintenir l'homéostasie glucidique. Ce processus démarre par l'entrée de glucose dans la cellule via le transporteur de type GLUT. Si l'isoforme prédominante chez le rat est GLUT2, chez l'homme les isoformes GLUT1 et GLUT3 sont majoritaires (McCulloch et al. 2011; De Vos et al. 1995). Cette différence peut se révéler importante puisque les transporteurs ont des affinités différentes pour le glucose (Rorsman et Braun 2013) puisque les K_m pour GLUT 1, 2 et 3 sont respectivement 6, 11 et 1 mM. Ces propriétés des transporteurs pourraient expliquer que les

humains sécrètent de l'insuline en réponse à de plus faibles doses de glucose (3 mM) que les îlots de souris (6 mM) (Doliba et al. 2012; Henquin et al. 2006; Hedeskov 1980). Dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate, réaction catalysée par l'enzyme GK (glucokinase). Sous cette forme le glucose est alors métabolisé par le processus de glycolyse aboutissant notamment à la formation d'ATP et de pyruvate. Ce dernier, une fois dans la mitochondrie, est transformé en acétylCoA et entre dans le cycle de Krebs. Les phénomènes de glycolyse et de cycle de Krebs produisent des équivalents réduits comme le NADH et le FADH2 qui alimentent la chaine respiratoire mitochondriale. Leur oxydation va augmenter la concentration cytosolique d'ATP et surtout le rapport ATP/ADP (Fig 4).

La voie déclenchante induite par le glucose

L'augmentation du rapport ATP/ADP agit sur les canaux K_{ATP} (canaux potassiques dépendants de l'ATP). Ces canaux sont des complexes hétéro-octamériques constitués de 4

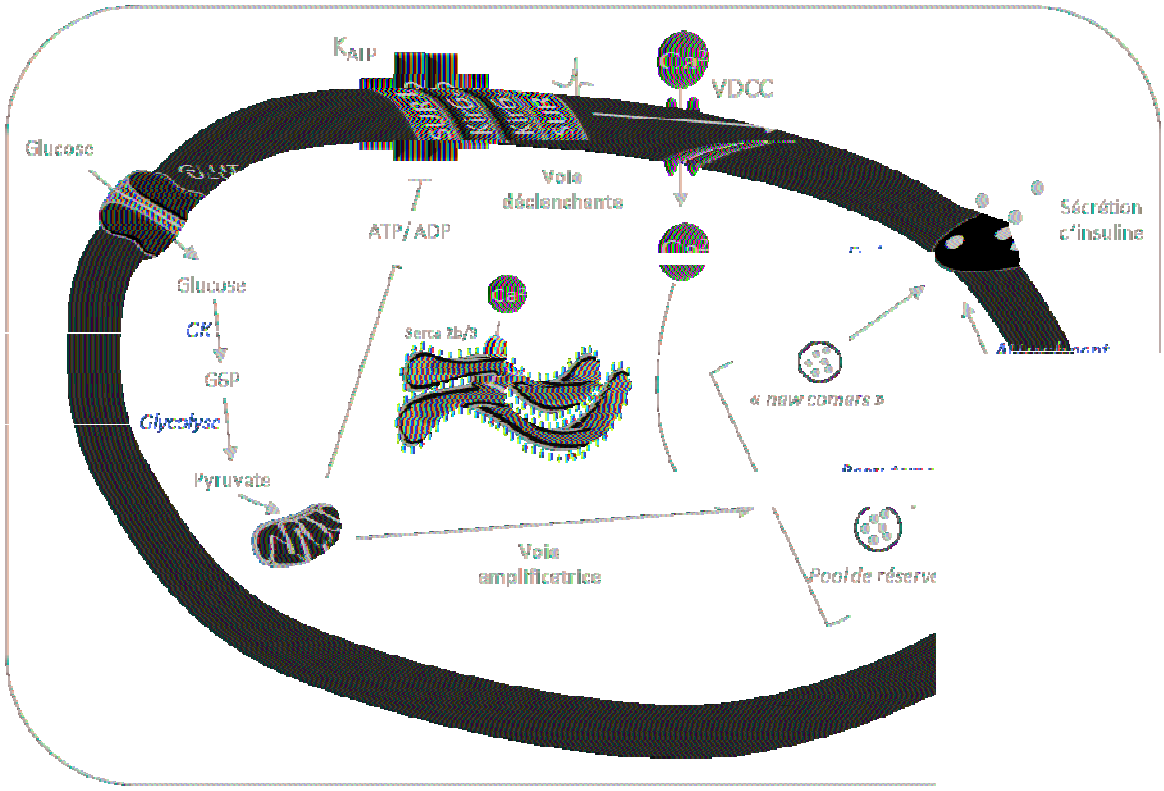


Figure 4 : La sécrétion d'insuline induite par le glucose.

sous-unités Kir6.2 (Inward-rectifier potassium ion channels) formant le pore du canal, entouré de 4 sous-unités régulatrices Sur1, récepteurs aux sulfonylurées. En absence de glucose, le rapport ATP/ADP est faible, l'ATP et le Mg-ADP se lient à SUR1. Dans cette conformation, les interactions entre SUR1 et Kir6.2 sont telles que l'affinité de ce dernier

pour l'ATP est très basse et la plupart des canaux sont ouverts. Le potentiel de membrane plasmique est alors maintenu à un niveau hyperpolarisé. L'augmentation du rapport ATP/ADP induite par la métabolisation du glucose dans la cellule, déclenche la fermeture des canaux et entraine une dépolarisation membranaire et l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (Fig 4). Dans les cellules de souris, plus de 95% des canaux K_{ATP} sont fermés lors d'une stimulation à 10 mM de glucose (Ashcroft et al 1988; Rolland et al. 2002).
Plusieurs canaux calciques sont impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose : les canaux L, P/Q et T. Cependant les canaux majoritairement impliqués sont les canaux calciques voltage-dépendants de type L (Rorsman et Braun 2013). Ils interviennent dans les 2 phases de sécrétion (Davalli et al. 1996; Ohta et al. 1993). En parallèle, le glucose augmente également la concentration de calcium dans le réticulum endoplasmique via les pompes SERCA2b et SERCA3 (sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase) qui sont activées par l'augmentation d'ATP dans les cellules (Gilon et al. 2014).

La voie amplificatrice induite par le glucose

La sécrétion d'insuline peut également être amplifiée par le glucose. En effet, le métabolisme du glucose produit des signaux capables d'augmenter l'efficacité du calcium cytosolique sur les acteurs qui déclenchent l'exocytose (Gembal et al. 1993; Henquin 2000; Henquin et al. 2006). Les signaux responsables de cette voie amplificatrices sont assez mal connus même si plusieurs candidats ont été proposés. Parmis eux les protéines PKA (Protein kinase A), PKC (Protein kinase C), la phospholipase A2, la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), l'AMPc le NADPH ou les intermédiaires du cycle de Krebs (Maechler 1999; Bertrand et al. 2002; Henquin et al. 2009). Malgré le nombre de candidats proposés, la significativité du rôle de chacun reste encore controversée.

b) Les granules d'insuline

Le profil insulinosécrétoire de la cellule β est biphasique. La première phase correspond à un pic de sécrétion rapide et transitoire tandis que la seconde est progressive et soutenue. Ce phénotype serait dû à l'existence de plusieurs pools de granules. En effet après sa synthèse, l'insuline est stockée dans des granules prenant naissance au niveau du trans-golgi. Ils sont ensuite répartis au sein de différents pools. La première phase de sécrétion d'insuline est

due à une faible fraction de granules « compétents » (1-5%) et immédiatement mobilisables appelée RRP (Readily Releasable Pool). Ces granules sont déjà accolés à la membrane et forment un complexe avec les protéines SNARE et d'autres protéines régulées par le calcium, ils sont alors rapidement mobilisables et fusionnent selon un mécanisme dépendant du calcium (Daniel et al. 1999). La seconde phase serait due à un second pool de granules, majoritaire, éloigné de la membrane. Les granules de ce pool de réserve doivent être transportées à la membrane avant d'être exocytées. Elles devront également devenir « compétentes » par des modifications dépendantes de l'ATP et du calcium. C'est ce que l'on appelle le « priming » ou conditionnement, étape qui rendra aptes les vésicules à fusionner avec la membrane plasmique (Rorsman and Renström 2003). Néanmoins, il semblerait qu'un pool de granules soit capable d'être recruté et libéré directement (new comers) sans avoir subit le processus de « priming » lors de la deuxième phase de sécrétion (Ohara-Imaizumi et al. 2007) (Fig 4).

c) La synthèse d'insuline

(1) La transcription du gène de l'insuline

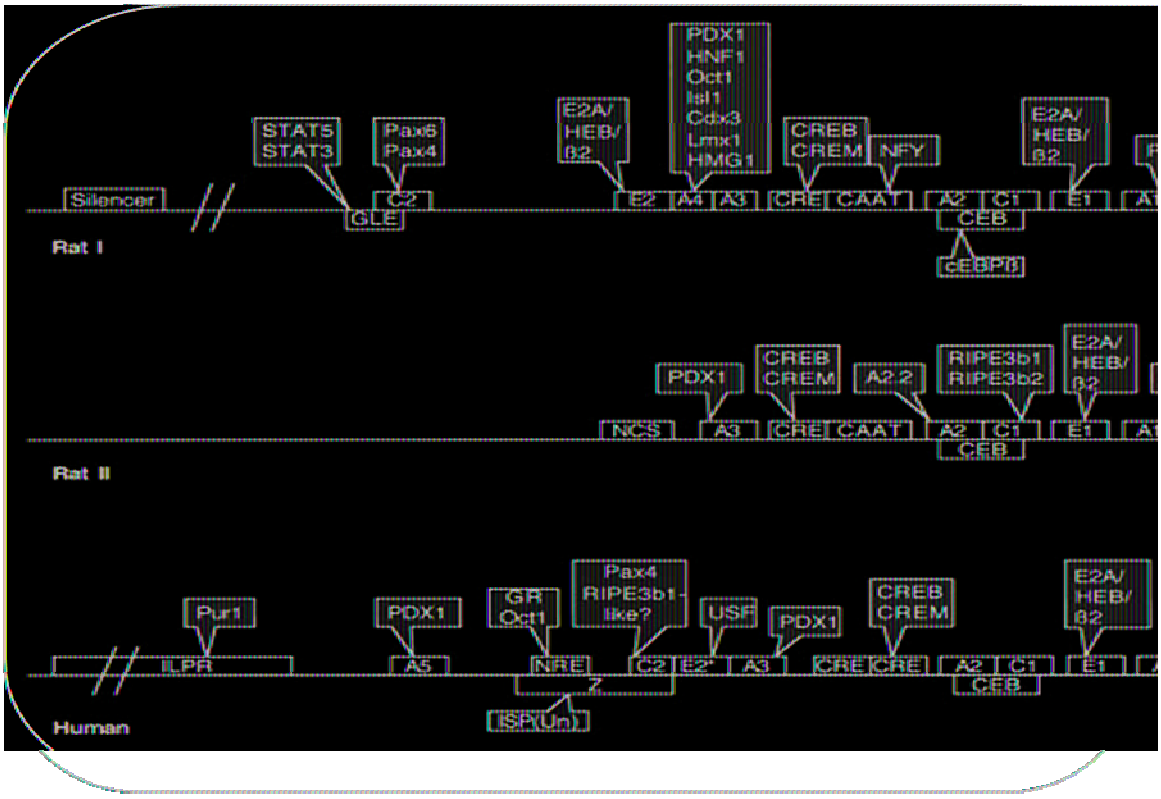
(a) Régulation en cis et en trans de la transcription du gène de l'insuline

La molécule mature d'insuline est constituée de 2 chaînes polypeptidiques associées par 2 ponts disulfures. Le gène à l'origine de cette molécule contrôle la synthèse d'un précurseur polypeptidique : la pré-pro-insuline (Chan et al. 1976). Dans la plupart des espèces la pré-pro-insuline existe en une version de gène. Chez l'humain, il est localisé sur le bras court du chromosome 11 (Harper et al. 1981). Chez le rat, les gènes I et II de l'insuline sont localisés sur le chromosome 1 (Soares et al. 1985) tandis que chez la souris les gènes I et II sont situés respectivement sur les chromosomes 19 (Davies et al. 1994) et 7 (Duvillié et al. 1998).

La régulation de la transcription du gène de l'insuline s'effectue au niveau de la région régulatrice 5' flanquante située en amont de l'exon 1 (German et al. 1995). Cette région comporte un promoteur et un activateur eux même composés de séquences d'ADN (acide désoxyribonucléique) appelées « boites » cis régulatrices. Les facteurs de transcription vont aller agir au niveau de ces boites pour contrôler l'expression des gènes: c'est la régulation en

trans. Nous verrons dans la partie « b. regulation du gène de l'insuline par le glucose » que la transcription des gènes peut être modulée.

Les séquences cis régulatrices les plus courantes peuvent être divisées en plusieurs catégories selon leurs modes d'action : les boites A, E, C1, C2, CRE, ILPR revue dans (Melloul et al. 2002a; Magnan et al. 2005).



Tiré de Melloul et al, 2012

Figure 5 : Organisation des régions promotrices et activatrices du gène de l'insuline de rat I et II et humaine.

Les boites A (A1-A5) sont des séquences riches en AT et contiennent des motifs TAAT (à l'exception d'A2). Ces boites ont la capacité de lier un facteur de transcription majeur de la cellule β : PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1) encore appelé IPF-1, STF-1, IDX-1, GSF et IUF-1. En plus d'activer la transcription du gène de l'insuline (Petersen et al. 1994; Ohlsson, Karlsson, and Edlund 1993), il intervient dans la transcription de gènes spécifiques de la cellule β comme : Glut-2 (Waeber et al. 1996), glucokinase (Watada et al. 1996), IAPP

(Islet Amyloid Polypeptide) et somatostatine. La boite A2 contient des motifs GGAAAT et sa fonction n'est pas encore bien connue.

Les boites E (E1, E2 et E2L) contiennent les séquences consensus CANNTG. Elles jouent un rôle dans la médiation de la spécificité tissulaire de l'expression des gènes. Elles vont fixer un hétérodimère composé de IEF-1 (insulin enhancer factor-1) et de protéines HLH (Helix-Loop-Helix) de classe I (ubiquitaires) comme E12/E47. Cet hétérodimère va, à son tour, lier BETA2/NeuroD, un facteur de transcription de la famille des HLH de classe II (exprimé spécifiquement dans le pancréas et les cellules neuro-endocrines) (Murre et al. 1989). La protéine BETA2/NeuroD est un important régulateur de l'expression du gène de l'insuline (Naya, Stellrecht, and Tsai 1995) et du développement du pancréas. En effet les souris délétées pour le gène BETA2/NeuroD sont diabétiques et meurent quelques jours après la naissance (Naya et al. 1997).

On notera que la boite E2 n'existe pas chez l'Homme ou elle est remplacée par la boite E2L fixant une protéine HLH particulière USF (Upstream stimulatory factor) (Read, Clark, and Docherty 1993).

L'élément C1 ou RIPE3b fixe un facteur de transcription spécifique de la cellule β identifié en 2002 : MafA (Kataoka et al. 2002; Olbrot et al. 2002). C'est un activateur de la transcription du gène de l'insuline (Kataoka et al. 2004; Matsuoka et al. 2004). L'invalidation de MafA chez la souris montre son importance dans la fonction des cellules β matures. En effet on peut observer chez ces souris une diminution de l'expression des gènes insuline 1, insuline 2, PDX-1, NeuroD et Glut2. De plus ces souris présentent une intolérance au glucose et développent un diabète (Zhang et al. 2005). Enfin il a été montré plus récemment que le facteur de transcription était déficient dans les cellules β de patients atteints de diabète de type 2 (Butler et al. 2012).

L'élément C2 contient chez l'Homme un motif CAGG (Read, Masson, and Docherty 1997) capable de fixer deux facteurs de transcription : PAX4 et PAX6 (paired-box 4/6). Tandis que PAX6 agit comme un activateur (Sander et al. 1997), PAX4 agit comme un répresseur essentiellement pendant la phase embryonnaire (Fujitani et al. 1999; Smith et al. 1999).

Chez le rat l'élément C2 a été retrouvé sur le gène I de l'insuline cependant le motif humain CAGG est remplacé par le motif CACC.

L'élément de réponse à l'AMPc (Adénosine monophosphorique cyclique) **ou CRE** (cAMP response element). Cet élément se retrouve dans l'ensemble des gènes ayant la capacité de

répondre à l'AMPc. Le second messager active PKA (Protein kinase A) qui va phosphoryler le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding protein). Une fois activé, CREB se lie à la protéine CBP (CREB binding protein) et stimule la transcription du gène de l'insuline en se fixant sur l'élément CRE.

Il existe également d'autres facteurs de transcription pouvant se fixer sur cet élément, il s'agit des protéines CEM (CRE modulators). Un épissage alternatif permet la générations de plusieurs isoformes pouvant agir comme activateurs ou répresseurs de la transcription du gène de l'insuline (Foulkes, Borrelli, and Sassone-Corsi 1991). Les CEM activateurs vont agir directement via des composants de la machinerie transcriptionnelle de base. Les CEM stimuleraient la transcription du gène de l'insuline de manière plus efficace de CREB. Les CEM répresseurs agissent en entrant en compétition avec les CEM activateurs ou CREB (Inada et al. 1999). (Daniel et al. 1998). Dans la cellule β pancréatique, l'activation du facteur CREB est à mettre en relation avec l'induction d'un facteur represseur particulier : ICER (Inducible cAMP early repressor) revue dans (Salvi et al. 2014). Il ne régule pas directement l'expression de gènes mais agit comme un represseur passif en entrant en compétition avec CREB. Il va alors réprimer l'induction de gènes tels que IRS2 ou NeuroD et réduire la production d'insuline par les cellules β. Une surexpression anormale d'ICER (retrouvée notamment dans des conditions en cas d'hyperglycémie), induit un défaut de sécrétion d'insuline (Abderrahmani et al. 2006) qui pourrait participer à la dégradation de la fonction des cellules β lors d'un DT2.

L'élément ILPR (Insulin-linked polymorphic region) **ou VNTR** (variable number of tandem repeats) **ou HVR** (Hypervariable region) n'est présent que chez l'humain. La séquence consensus ACAGGGGT(G/C)(T/C)GGGG contient un nombre variable de répétitions. Cet élément présente un fort polymorphisme qui a conduit à définir 3 classes (I, II ou III) par ordre croissant du nombre de répétitions. Alors que la classe I (~40 répétitions) pourrait jouer un rôle dans la prédisposition au diabète de type I (Bennett et al. 1996), la classe III (~157 répétitions) serait impliquée dans le diabète de type 2 (Ong et al. 1999).

L'essentiel de la répression du gène de l'insuline s'effectue en trans. Les facteurs BETA3, c-Jun, c/EBPβ ne vont pas agir en se fixant sur la séquence E1 mais en interagissant avec les transactivateurs et protéines HLH, bloquant ainsi leur activité (Melloul, Marshak, et Cerasi 2002b; Petersen et al. 1994; Ohlsson, Karlsson, et Edlund 1993).

Il a été décrit qu'une répression en cis via une séquence NRE (negative regulatory element) soit capable de fixer des protéines nucléaires comme le récepteur des glucocorticoïdes (Clark et al. 1995; Goodman et al. 1996).

(b) Régulation du gène de l'insuline par le glucose

Le glucose est un puissant agent stimulateur de la biosynthèse d'insuline. Son action s'effectue en augmentant la transcription du gène de l'insuline mais aussi la stabilité des ARNm produits.

Trois facteurs de transcription ont été démontrés comme ayant un rôle important dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline : PDX-1, NeuroD1 et MafA. Ces trois facteurs vont agir en synergie pour moduler l'expression du gène en fonction de la concentration en glucose. Ils agissent respectivement au niveau des séquences régulatrices en cis A3, E1 et C1 précédemment décrites (Melloul, Marshak, et Cerasi 2002b).

PDX-1. A de faibles concentrations de glucose, PDX-1 a une localisation périnucléaire et est associé aux protéines HDCA-1 et 2 pour inhiber la transcription du gène (Mosley and Ozcan 2004). Lorsque la concentration de glucose augmente, PDX-1 phosphorylé transloque dans le noyau, se dissocie des protéines HDCA-1 et 2 et se lie à l'histone acétyl transférase P300. La conséquence est une hyperacétylation de l'histone H4 et l'induction de la transcription du gène (Mosley, Corbett, and Ozcan 2004). Les protéines susceptibles de phosphoryler PDX-1 sont : p38/SAPK (stress-activated protein kinase)(Macfarlane et al. 1997; Macfarlane et al. 1999) , Pi3K (phosphoinositide 3-kinase) (Wu et al. 1999), PKC (protein kinase C) (Furukawa et al. 1999), MAPK (mitogen-activated protein kinase) ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases 1/2 ou p42/44 MAP kinases) (Arnette et al. 2003; Khoo et al. 2003)et PAS (per-arnt-sim) (An et al. 2006).

NeuroD1. Comme pour PDX-1, le glucose favorise la translocation nucléaire de NeuroD1 ainsi que sur sa capacité de transactivation via des modifications post-traductionnelles. Les protéines ERK1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2) (Khoo et al. 2003) et GSK3β (glycogen synthase kinase 3) (Marcus, Kintner, and Harris 1998) vont médier l'action du glucose par la phosphorylation, l'action de p300 par l'acétylation (Qiu et al. 2004) et l'action d'OGT (O-linked GlcNAc transferase) par la O-glycosylation de NeuroD1 (Andrali, Qian, and Ozcan 2007).

MafA régule la transcription du gène de l'insuline de manière glucose dépendante (Sharma and Stein 1994). Les fortes concentrations de glucose induisent une accumulation de MafA dans la cellule via l'augmentation de son niveau d'ARNm et de la protéine (K. Kataoka et al. 2004). Cet effet passe par la O-glycosylation d'une protéine encore inconnue (Vanderford, Andrali, and Ozcan 2007).

(2) La traduction du messager de l'insuline

La traduction de l'ARNm aboutit à la formation de la pré-pro-insuline de 11.5kDa. Ce polypeptide comporte dans sa partie N-terminale un peptide signal de 25AA lui permettant de passer dans la lumière du réticulum (Steiner et al. 1980). Ce passage est gouverné par un complexe d'interactions faisant intervenir le peptide signal, le complexe SRP (signal recognition particle) et un récepteur au SRP au niveau de la membrane du réticulum (Gilmore, Blobel, et Walter 1982; Gilmore, Walter, et Blobel 1982; Kreil 1981). Le glucose va pouvoir stimuler la traduction des ARNm dans un délai très court après l'augmentation de sa concentration. Il va favoriser l'interaction de l'ARNm avec le récepteur du SRP ainsi que l'élongation de la chaine en cours de formation (Welsh et al. 1986). Arrivé dans la lumière du réticulum le peptide signal de la pré-pro-insuline est clivé, formant ainsi la pro-insuline. C'est un peptide de 9kDa composé des chaines A et B de l'insuline reliées entre elles par le peptide-C. Après son passage dans le réticulum il est transporté dans des microvésicules jusqu'au cis-golgi ou il sera converti en insuline. Cette maturation se poursuit dans des vésicules recouvertes de clathrine issues du trans-golgi et est catalysée par 2 endopeptidases (les prohormones convertases 1 et 3) et la carboxypeptidase H. L'action de l'ensemble de ces enzymes va mener à la libération de la protéine d'insuline et du peptide-C. Les vésicules perdent alors le revêtement et deviennent lisses et matures. L'insuline se complexe avec le zinc pour former des microcristaux représentant la forme de stockage de l'insuline. L'insuline et le peptide-C contenus dans les mêmes vésicules seront donc sécrétés de manière équimolaire (Fig 6).

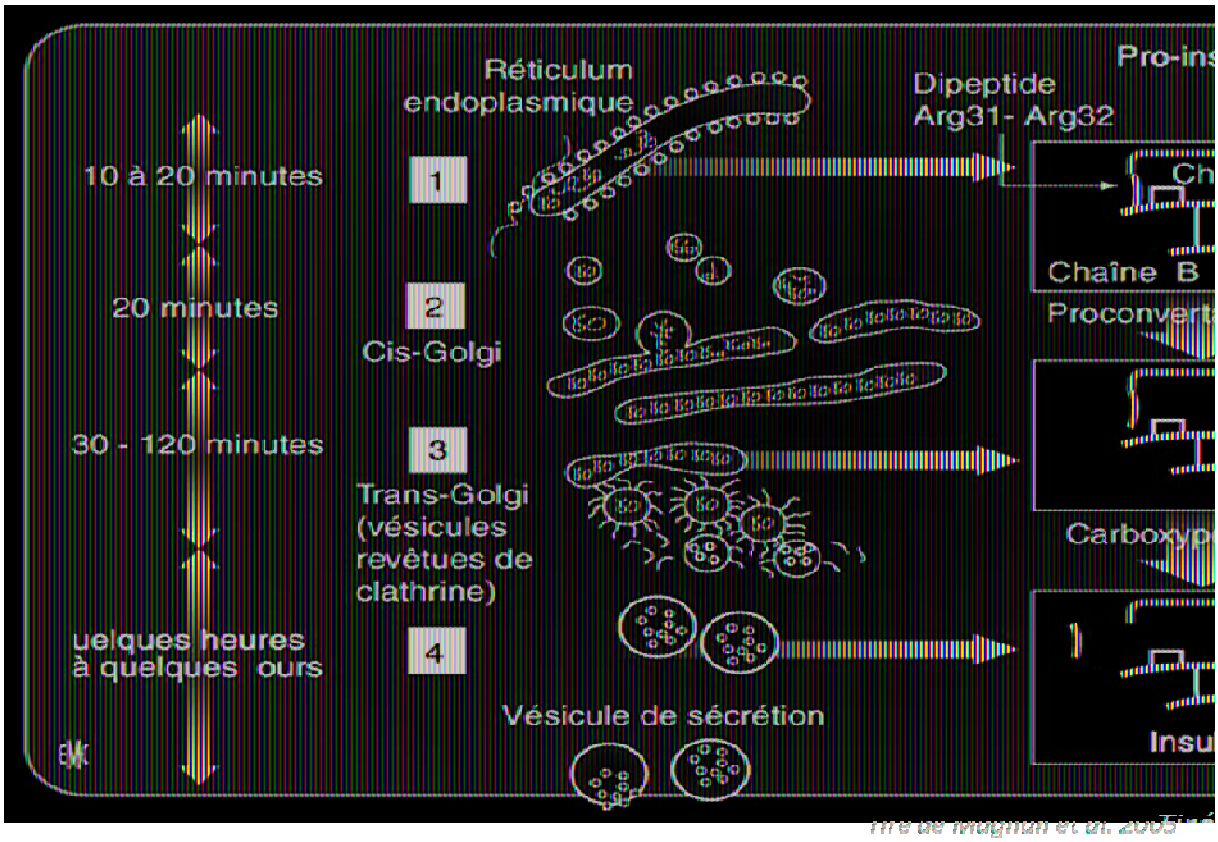


Figure 6 : Traduction de l'ARN messager de l'insuline.

2. Régulation de la masse par le glucose

Tout au long du développement, la masse cellulaire β va pouvoir s'adapter aux variations de la demande insulinique et maintenir ainsi une régulation optimale de l'homéostasie glucidique. Par exemple, dans les cas d'obésité, à l'adolescence ou encore durant la grossesse où la demande en insuline est accrue, la masse fonctionnelle des cellules β va augmenter afin d'éviter une augmentation chronique de la glycémie. Ce phénomène de plasticité du pancréas est rendu possible grâce à un ensemble de processus. La néogenèse et la prolifération vont permettre une augmentation du nombre de cellules β tandis que l'apoptose induit une diminution de la masse β cellulaire. Le glucose, en plus de ses effets sur la fonction des cellules β, exerce des effets sur le contrôle de la masse de ces cellules en faisant varier ces différents paramètres revue dans (Mohammed Bensellam, Laybutt, et Jonas 2012).

La prolifération, la néogenèse et l'apoptose

La prolifération correspond à la réplication de cellules β différenciées exprimant le gène de l'insuline (Dadon et al. 2012). La néogenèse se définie au contraire par la différentiation de cellules précurseurs en cellules β pancréatiques. Plusieurs processus sont possibles en fonction du type cellulaire de départ. En effet la néogenèse peut se produire à partir de cellules progénitrices ou précurseurs, mais aussi à partir de cellules déjà différenciées qui se dédifférencient (en cellules progénitrices) puis se redifférencient. Il existe aussi le processus de transdifférenciation qui ne nécessite pas de passage par le stade dédifférencié. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est maintenue à un faible niveau durant la vie fœtale ou chez l'adulte. C'est un processus physiologique essentiel à la dégradation de cellules excédentaires, infectées ou endommagées.

La dualité des effets du glucose sur la masse β cellulaire

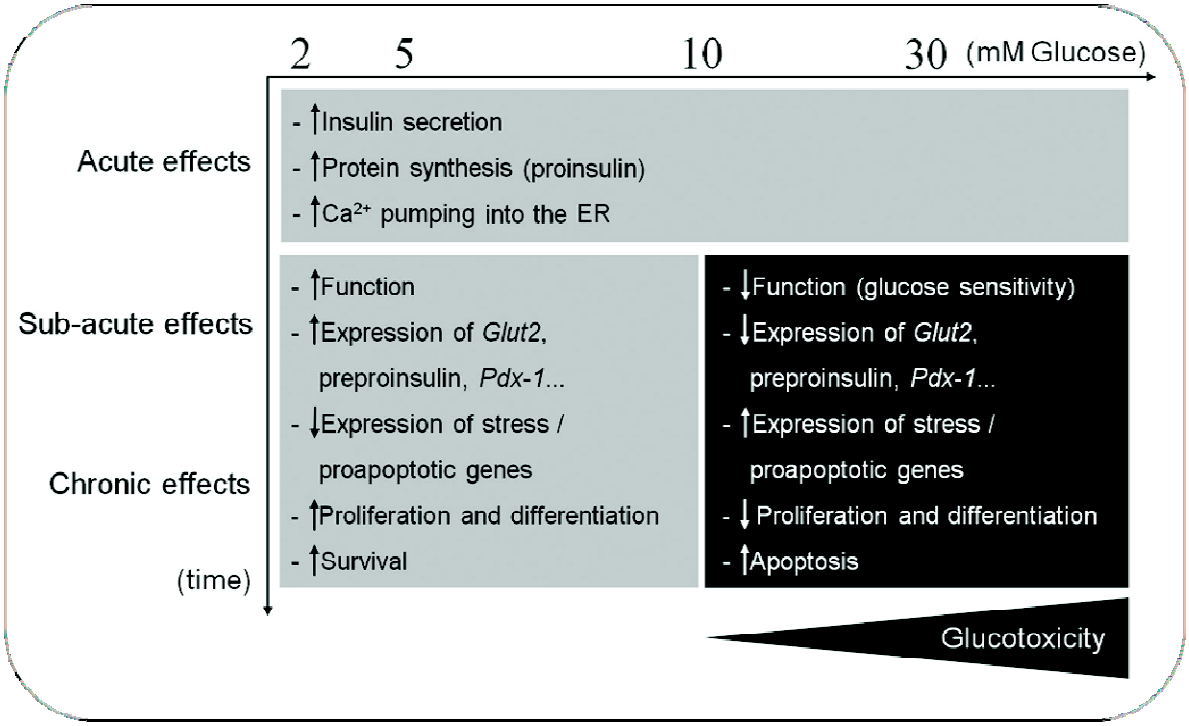
In vitro, la concentration optimale de glucose pour la survie des cellules β de rongeurs se situe aux alentours de 10 mM (Borg et al. 1975; Ling, Hannaert, et Pipeleers 1994). Le maintien de cette concentration physiologique préserve les cellules de l'apoptose par la repression de gènes impliqués dans le stress cellulaire comme le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique ou encore par la répression de gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques (Bensellam et al. 2009; Elouil et al. 2007; Jonas et al. 1999) (Fig 7). D'autre

part il a été montré que le glucose (culture d'îlots de souris à une concentration de 15 mM comparé à 2 mM) favorise la survie des cellules β par l'activation de la voie PI3K/Akt (Srinivasan et al. 2002). Le glucose peut également favoriser la survie des cellules β en induisant le facteur IRS-2 via une régulation transcriptionnelle. Cette augmentation intervient dans des cellules β primaires d'îlots de rats cultivées à des concentrations physiologiques de glucose (5-15 mM) et est corrélée à la phophorylation d'IRS-2 ainsi qu'à l'activation d'Akt (Lingohr et al. 2006). Une étude menée par le laboratoire a également impliqué les kinases ERK1/2 dans les effets anti-apoptotiques du glucose (Costes et al. 2006). En effet, 24 ou 48 h de culture de cellules MIN-6 ou d'îlots de rats à une concentration obtimale de glucose (10 mM) induit la phosphorylation des kinases ERK1/2 qui vont activer le facteur de transcription CREB (cAMP-responsive element-binding) impliqué dans la survie des cellules β par l'induction des gènes bcl-2 et IRS-2 .

Les effets bénéfiques du glucose ont également été observés sur des rats perfusés, ou dès 24h la perfusion de glucose entraine une augmentation du nombre de cellules β par néogénèse (Bernard et al. 1999). Une perfusion plus longue (6 jours) induit des effets durables sur la masse et font intervenir la néogénèse mais aussi la réplication et l'hyperplasie (Topp, McArthur, et Finegood 2004). Des résultats similaires ont été obtenus sur des îlots humains ou une courte exposition au glucose stimule la prolifération des cellules β (Maedler et al. 2006).

Si le maintien de concentrations physiologiques de glucose est essentiel à la survie des cellules β, une culture en conditions d'hypo ou d'hyperglycémie chroniques va au contraire induire l'expression de gènes déclenchant une perte de la différenciation cellulaire et une augmentation de l'apoptose (Iwashima et al. 1994; Jonas et al. 1999; Laybutt et al. 2002). Que ce soit in vivo ou in vitro, une exposition prolongée à de fortes concentrations de glucose induit des effets toxiques pour la cellule β pancréatique : c'est le phénomène de glucoctoxicité (Fig 7). En effet diverses études sur des îlots de rats et des îlots humains ont montré que plusieurs jours de culture à des concentrations élevées de glucose provoquent l'apparition d'apoptose dans les cellules β (Maedler 2006; M. Bensellam et al. 2009; Jonas et al. 2009). Les mécanismes par lesquels la glucotoxicité peut induire l'apoptose sont nombreux revue dans Bensellam et al. (2012). Parmis eux on peut compter le stress oxydatif. Le stress oxydatif intervient lorsque la concentration de ROS (Reactive oxygen species)

cellulaire est anormalement augmentée, soit par un défaut des défenses antioxydantes de l'organisme soit par augmentation de production des ROS. L'équilibre redox est alors romptu, causant des dommages cellulaires qui jouent un rôle dans le développement de compliqcation dans le diabète de type 2. En effet il a été montré que l'utilisation d'anti-oxydants permet de prévenir les effets délétères induit par de fortes concentrations chroniques de glucose (Kaneto et al. 1996; Y. Tanaka et al. 1999). De plus, une augmentation de la production de ROS a été détectée dans des lignées cellulaires β, dans des îlots de rongeurs et humains cultivés à de fortes concentrations de glucose (Tanaka et al. 2002; Sakai et al. 2003; Zraika et al. 2006). Mais l'effet toxique du glucose ne s'arrête pas là puisqu'il va, entre autre, être à l'origine d'un stress du RE (réticulum endoplasmique), d'une inflammation, d'une hypoxie ou encore de dépôts de plaques amyloides.



Tiré de Benseliam et al, 2012

Figure 7 : Effets du glucose sur la cellule β pancréatique. ER : Endoplasmic reticulum, Glut2 : Glucose transporter 2., Pdx-1 : Pancreatic and duodenum homeobox-1.

Chapitre 2: Le GLP-1R un récepteur de la famille des RCPGs

Le GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) peut moduler les effets du glucose sur la fonction et la survie des cellules β. Le peptide agit via son récepteur, le GLP-1R (GLP-1 receptor), qui fait partie de la classe B de la superfamille des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G)

A. Les RCPGs

La superfamille des RCPGs est l'une des familles de récepteurs la plus représentée dans le génome (International Human Genome Sequencing Consortium et al. 2001; Venter et al. 2001). Les RCPGs fixent une multitude de ligands allant des photons aux protéines en passant par des peptides (Lagerström et Schiöth 2008). La diversité se retrouve également dans les récepteurs puisqu'il existe plus de 800 RCPGs qui interviennent dans des processus physiologiques variés tels que la vision, la fonction neuronale, cardiovasculaire, endocrine ou encore reproductive. Cette diversité de fonction fait de cette famille une cible principale de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques puisqu'elle représente plus de 50% des médicaments sur le marché (Ma et al. 2002), la classe I représentant 26.8% (Overington et al. 2006) revue dans (Shukla, Singh, et Ghosh 2014). Les stratégies actuelles visent à améliorer les thérapies existantes en développant de nouveaux agonistes biaisés activant sélectivement l'une ou l'autre des voies sous le récepteur (Katritch, Cherezov, et Stevens 2013; Violin et al. 2013). Ces différentes voies seront détaillées dans la partie consacrée à l'étude des RCPGs.

3. Structure et classification

Malgré la diversité de séquence et de fonction, 2 caractéristiques sont communes à tous les membres de la superfamille des RCPGs. Tout d'abord ils possèdent une structure à 7 domaines trans-membranaires (TM 1 à 7) de 25 à 35 résidus possédant un fort pourcentage d'hydrophobicité. Ces domaines sont reliés entre eux par 3 boucles cytoplasmiques (ICL1 à 3) et 3 boucles extracellulaires (ECL1 à 3). Les boucles ECL 1 et ECL 2 contiennent une

cystéine permettant la formation d'un pont disulfure. Le 1er domaine transmembranaire (TM1) est prolongé dans le domaine extracellulaire par une extrémité N-terminale tandis que le dernier domaine (TM7) est prolongé dans le cytosol par une extrémité C-terminale (Fig 8). Comme leur nom l'indique, la deuxième caractéristique de cette famille est l'interaction avec une protéine G, et sera détaillée dans la partie « 2. Activation des RCPGs : la voie dépendante des protéines G » de ce chapitre.

Il existe plusieurs systèmes de classification des RCPGs selon les différences de structure, de fixation du ligand ou encore de leur rôle physiologique (Kumari, Pant, et Pardasani 2009). La classification la plus couramment utilisée a été établi en 1994 par Kolakowski (1994) et définie 7 classes (de A à F et O) divisées elles-mêmes en sous-classes pour l'ensemble des RCPGs (vertébrés et invertébrés compris). Il existe également une classification proposée par Bockaert et Pin en 1999,(Bockaert et Pin 1999) tenant compte des différences structurales et du mode de liaison des ligands (Bockaert et Pin 1999). Récemment un système de classification nommé GRAFS a vu le jour, dont les initiales correspondent aux noms de chacun des groupes (Glutamate, Rhodopsine, Adhésion, Frizzled/taste et Sécrétine) (Fredriksson et al. 2003). Ce dernier système est basé sur l'analyse phylogénétique des GPCRs. Dans ce chapitre nous nous intéresserons aux 3 classes principales définies par Kolakowski que sont les classes : A pour Rhodopsin-like, B pour Secretin-like et C pour Melanotrope-glutamate/phéromone.

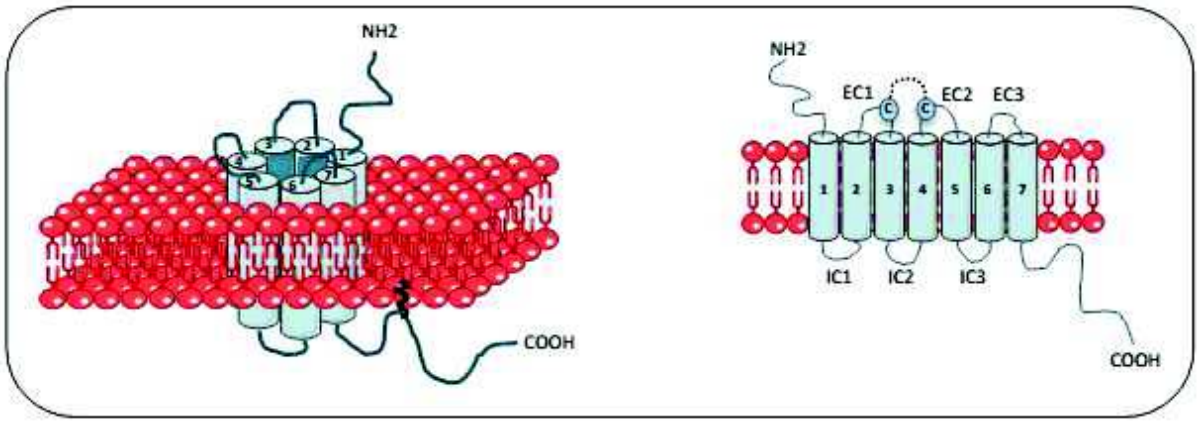


Figure 8 : Structure schématique générale des récepteurs cuplés aux protéines G.

a) La classe A ou Rhodopsin-like

Elle est la classe la mieux caractérisée et comportant le plus grand nombre de récepteurs. Une multitude de ligands ont été répertorié comme les photons, les hormones, les glycoprotéines, etc et plus de 50% d'entre eux sont impliqués dans la reconnaissance de stimuli sensoriels. La classe A comporte 3 sous-groupes déterminés par la nature des ligands. Le groupe A.a fixe de petites molécules, le groupe A.b fixe des neuropeptides et le groupe A.c fixe des glycoprotéines. Les membres de cette classe comportent plusieurs caractéristiques communes même s'il peut exister quelques exceptions. Au niveau structural ils présentent une extrémité N-terminale relativement courte ainsi qu'une cystéine sur chaque boucle ICL1 et ICL2 formant un pont disulfure. Ils partagent également les séquences consensus NSxxNPxxY et DRY respectivement dans les TM7 et à l'interface du TM3 et i2 (Fig 9). Ce dernier motif serait impliqué dans l'activation du RCPG (Fredriksson et al. 2003; Rovati, Capra, et Neubig 2007). Un AA aspartate identifié au niveau du domaine TM2 est aussi conservé et aurait un rôle dans la reconnaissance du ligand et le couplage à la protéine G (Ceresa et Limbird 1994). La fixation du ligand aux récepteurs de cette classe est particulière puisqu'il vient se loger dans une cavité formée par l'ensemble des domaines TM (Baldwin 1994). On notera que le groupe A.c fait exception car le ligand se fixe sur la partie N-terminale du récepteur.

b) La classe B ou secretin-like

Les RCPGs de classe B ne présentent que peu d'homologie avec les autres récepteurs de la famille, comme ceux de la classe A, avec qui ils partagent seulement 12 % d'homologie de séquence. Cette famille regroupe les récepteurs du GLP-1, du GLP-2, du glucagon, du GIP (Glucose-dependent insulinotropic peptide), de l'hormone parathyroïdienne, de la calcitonine, de la GHRH (Growth hormone releasing hormone), du VIP (Vasoactive intestinal polypeptide) et du PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (Mayo et al. 2003a). Ils lient des peptides relativement grands tels que des hormones ou des neuro-peptides. Ils possèdent une extrémité N-terminale de taille importante puisqu'elle peut atteindre 300AA dont certains résidus, très conservés, participent à la création de ponts disulfures (Fig 9). Contrairement aux récepteur de classe A c'est cette partie extracellulaire qui est impliquée dans la fixation du ligand (Miller et al. 2007).

c) La classe C ou Melanotrope-glutamate/phéromone

La classe C regroupe les récepteurs du calcium, du goût, des phéromones, $GABA_B$, RAIG (Retinoic acid-inducible orphan GPCR), et les récepteurs métabotropiques du glutamate. Le domaine N-terminal de cette classe est encore plus grand que celui de la classe B puisqu'il atteint 500AA et se replie pour former 2 lobes impliqués dans la fixation du ligand. On retrouve certains AA conservés entre les classes A et C au niveau de l'extrémité C-terminale. Cette famille a tout de même la particularité d'avoir la boucle IC3 plus courte et très conservée (Pin et al. 2003) (Fig 9).

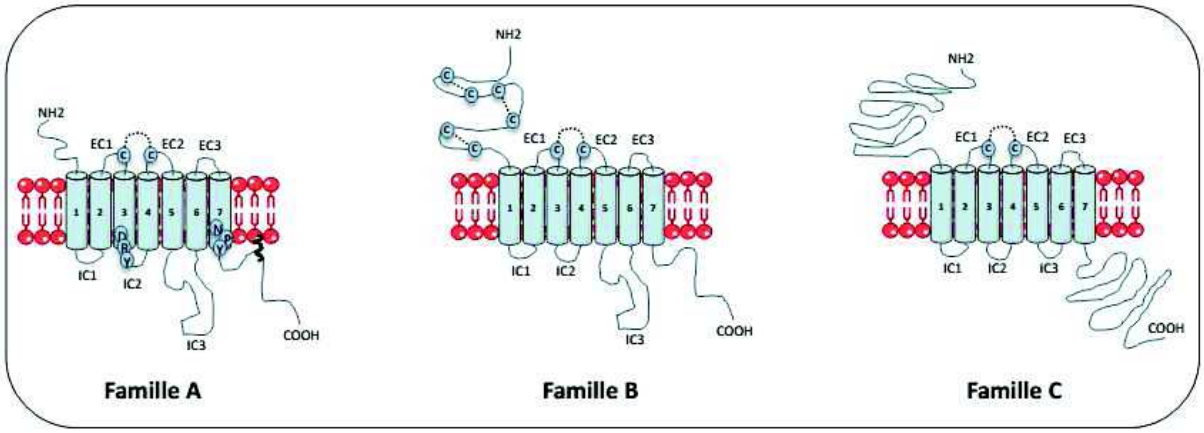


Figure 9 : Les 3 classes principales de RCPGs.

La fixation du ligand sur son récepteur déclenche des voies de signalisations intracellulaires aboutissant à des effets biologiques. Dans le cas des RCPGs, cette activation fait intervenir une protéine G hétérotrimérique couplée au récepteur.

4. Activation des RCPGs : la voie dépendante des protéines G

Une fois activé par son ligand, le RCPG va activer la protéine G hétérotrimérique à laquelle il est couplé. La protéine G est composée de 3 sous-unités α, β et γ et possède une activité GTPasique. A l'état inactif, la sous-unité α lie une molécule GDP (guanosine diphosphate) sur son domaine GTPase. Le couplage avec le récepteur entraine le départ du GDP et la fixation de GTP (guanosine triphosphate) responsable de la dissociation de la sous-unité Gα du dimère Gβ/γ. Chacun de leur côté, les sous-unités Gα et Gβ/γ vont déclencher l'activation de différents effecteurs. La sous-unité α, par l'hydrolyse de son GTP, active ses effecteurs et retourne à un état inactif complexé au dimère Gβ/γ. Le retour à l'état inactif de la sous-unité Gα liée à Gβ/γ, est accéléré par l'action des RGS (Regulator of G-protein signaling).

L'origine de l'interaction entre le récepteur activé et la protéine G reste controversée. En effet un premier modèle propose que la protéine G, située à la membrane plasmique diffuse latéralement pour venir se coupler au récepteur activé (Tolkovsky et Levitzki 1978). Le second propose un couplage constitutif ou la fixation du ligand déclencherait un changement conformationnel de la protéine G (Galés et Bouvier 2007). En effet, des études de FRET (Fluorescence resonance energy transfer) ont montré une intéraction basale entre le récepteur α2-adrénergique et la protéine $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$. Des changements conformationnels sont également observés (Galés et al. 2006).

Les différentes protéines G

Les RCPGs peuvent être couplés à une ou plusieurs protéines G. Lors d'une étude de clonage par homologie réalisée par Milligan et al. (2006), 35 gènes codants pour des sous-unités de protéines G ont été identifiés dont 16 correspondent aux sous-unités α, 5 aux β et 14 aux γ. Les sous-unités α se divisent en 4 familles elles-mêmes divisées en plusieurs sous-familles (les actions de chacune des sous-unités sont volontairement très schématiques et diffèrent selon le sous-groupe concerné, l'ensemble de leurs actions apparait dans la figure 10:

- $G\alpha_s$: activatrice de l'AC (Adénylate cyclase)
- $G\alpha_{i/o}$: inhibitrice de l'AC
- $G\alpha_{q/11}$: activatrice de PLC (Phospholipase C)
- $G\alpha_{12/13}$: activatrice de PLD (Phospholipase D)

Il existe également 5 sous-unités β et 12 γ. La diversité dans les différentes sous-unités et la multitude de combinaisons de trimères disponibles expliquent en partie la palette d'effets cellulaires et biologiques induites par les RCPGs.

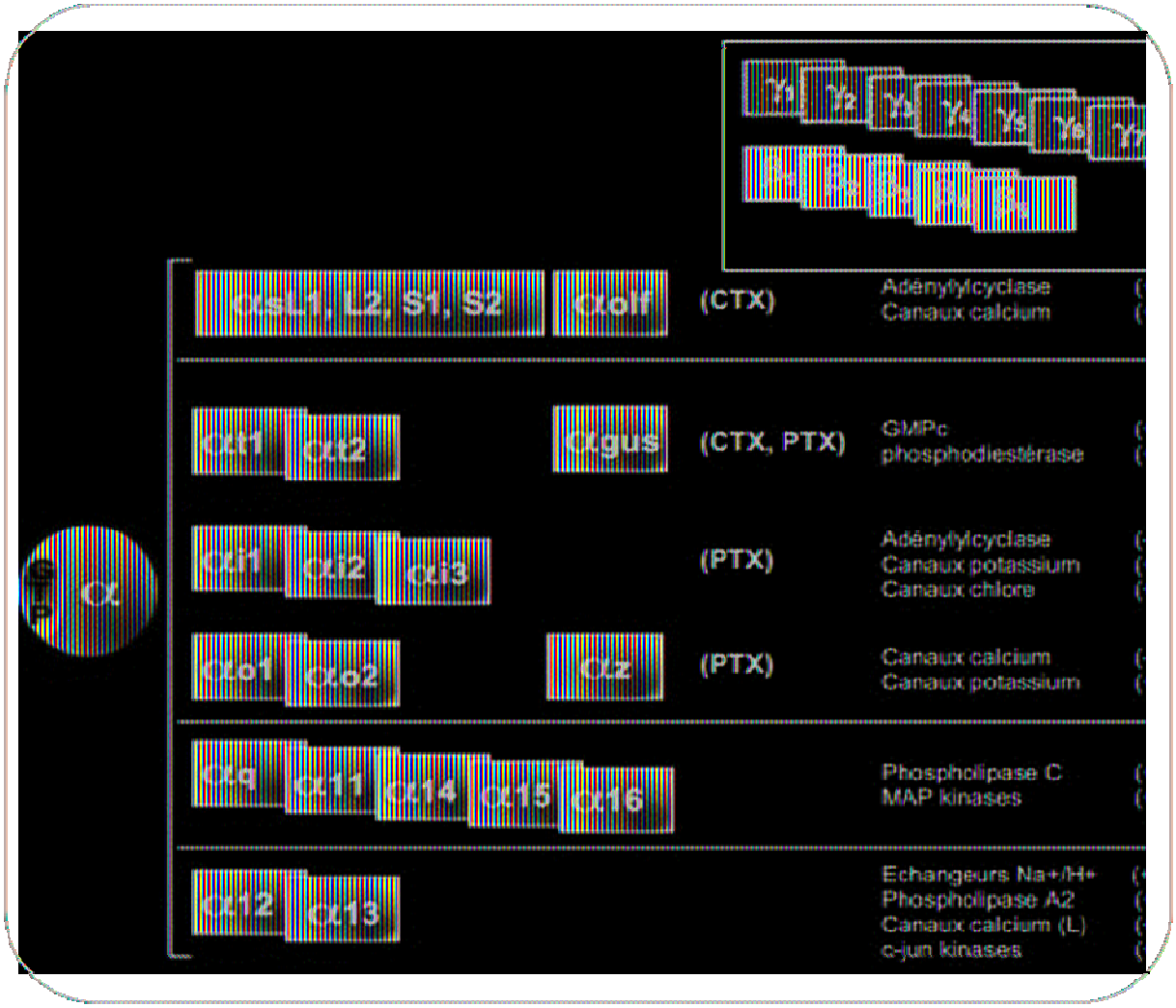


Figure 10 : Les différentes familles des protéines G

Les effecteurs principaux des sous-unités Gα

- La phopholipase C est une enzyme activée par les sous-unités $G\alpha_{q/11}$. Elle catalyse la synthèse de DAG (Diacylglycérol) et d'IP3 (inositol 1, 4, 5 triphosphate) à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate) membranaire. L'IP3 va agir sur

l'ouverture des canaux calciques du réticulum et augmenter la concentration de calcium cytosolique. Cette élévation aura pour conséquence l'activation d'effecteurs comme la calmoduline. Le DAG est quant à lui est un activateur de PKC membranaire.

- L'AC est positivement régulée par la protéine $G\alpha_s$ et négativement par la protéine $G\alpha_{i/o}$. C'est une enzyme qui synthétise le messager secondaire appelé AMPc à partir d'ATP (adénosine triphosphate). Il existe 9 isoformes d'AC transmembranaires (1 à 9) (Willoughby et Cooper 2007) qui sont toutes exprimées dans les cellules β pancréatiques. De plus, quelques isoformes sont régulées par le calcium. Les ACs 5 et 6 sont inhibées par l'ion et pourraient intervenir dans le feedback négatif de la production d'AMPc. Les ACs 1 et 8 sont au contraire stimulées par le calcium. Une étude récente montre que l' AC8 en particulier intervient au niveau de la cellule β dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose mais aussi dans l'hypothalamus pour la régulation de l'homéostasie glucidique (Raoux et al. 2015). De plus elle intervient entre autre dans la production d'AMPc et la signalisation calcique induite par l'activation du récepteur GLP-1 (Roger et al. 2011). Elle a également été proposée comme une cible potentielle de la synergie des effets entre le GLP-1 et le glucose dans la signalisation β cellulaire (Delmeire et al. 2003). En plus des 9 isoformes transmembranaires il existe une forme soluble (sAC) exprimée dans la lignée cellulaire β pancréatique INS-1 qui serait impliquée dans la production d'AMPc induite par le glucose et serait responsable de l'activation des kinases ERK1/2 (Ramos et al. 2008).

Les sous-unités Gβ/γ sont également capables d'activer des effecteurs comme la phospholipase A2, certaines ACs, et les voies MAPK et PI3K par l'intermédiaire de Src (L. M. Luttrell et al. 1997). Elles pourraient également avoir un rôle dans la désensibilisation du récepteur en activant certaines GRKs (G-protein-coupled receptor kinase) (Clapham et Neer 1997).

Inhibition de la production d'AMPc

La quantité d'AMPc intracellulaire est en équilibre constant entre sa production par les ACs et sa dégradation par les PDEs (phosphodiesterases), enzymes responsables de

l'hydrolyse de l'AMPc ou GMPc en 5'-AMP ou 5'-GMP. Il existe 11 sous-familles de PDEs et plus de 50 isoformes (Conti et Beavo 2007). Les PDEs 1, 3 et 4 sont les plus étudiées dans la régulation de l'AMPc dans les îlots. PDE1C, isoforme majoritaire de la famille des PDEs, est impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Han et al. 1999). L'isoforme PDE3 est capable de dégrader l'AMPc et le GMPc. L'isoforme PDE3B est le plus exprimé dans l'îlot et participerait à plus de 70% de l'activité totale des PDEs (Degerman et al. 2011). Il est le régulateur majoritaire de la sécrétion d'insuline dans les cellules β (Parker et al. 1995; Härndahl et al. 2002). L'implication de la famille PDE4 dans la fonction de la cellule β reste à confirmer dans la mesure où les différentes études, selon la méthode d'invalidation utilisée, obtiennent des résultats contradictoires (Waddleton et al. 2008; Parker et al. 1995). D'autres isoformes, bien que minoritaires ont été identifiées dans les îlots de rats et humains et pourraient jouer un rôle important. On peut notamment citer les PDE10A et 8B impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Cantin et al. 2007; Dov et al. 2008) et la PDE8B est également impliquée dans les oscillations d'AMPc et d'insuline (Tian et al. 2012). L'AMPc produit va alors activer les protéines PKA et Epac.

Cette voie étant majoritairement utilisée par le récepteur GLP-1, nous détaillons plus particulièrement les 2 protéines activées par l'AMPc que PKA et Epac.

Les protéines activées par l'augmentation d'AMPc

PKA

PKA, effecteur majeur de l'AMPc dans la cellule β est une holoenzyme composée de 4 sous-unités : 2 sous-unités catalytiques (C) et 2 sous-unités régulatrices (R). Les sous-unités C sont initialement phosphorylées en thréonine 197 (Cheng et al. 1998; Cauthron et al. 1998) ce qui les rendent pleinement actives. Cependant cette phosphorylation déclenche son interaction avec la sous-unité R qui inhibe son activité via la formation d'une holoenzyme hétérotétramèrique inactive R_2C_2. La fixation de l'AMPc sur la sous-unité R induit un changement conformationnel et libère la sous-unité C qui va alors activer par phosphorylation diverses protéines cytosoliques et nucléaires. PKA a une activité dynamique qui a été démontrée comme jouant un rôle direct sur les oscillations d'AMPc et de calcium dans la cellule (Ni et al. 2011).

Epac

Si la PKA a d'abord été reconnu comme le seul effecteur de l'AMPc, il est apparu que certains effets sur l'exocytose étaient indépendant de la kinase (Renström, Eliasson, et Rorsman 1997). Peu après ce médiateur a été identifié par (Ozaki et al. 2000). La famille Epac comprend 2 membres Epac 1 et 2. Ce sont des facteurs d'échanges du GTP qui catalyse l'échange GDP/GTP sur les GTPases de la famille Ras, Rap 1 et 2. Même s'ils ne possèdent pas plus de 50% d'homologies de séquences, Epac 1 et 2 partagent des domaines fonctionnels identiques : le domaine de fixation à l'ADN appelé CNB (cyclic-nucleotide-binding) et le DEP (Dishevelled, Egl-10, and Pleckstrin) faisant partie de la sous-unité régulatrice, REM (Ras exchange motif) et GEF (Guanine exchange factor) composant la sous-unité catalytique (revue dans Bos 2006). La différence majeure se trouve dans le fait que Epac 1 possède 1 site de fixation à l'AMPc alors qu'Epac 2 en possède 2.

A l'état inactif, la détermination de la structure d'Epac par cristallographie suggère que la sous-unité régulatrice auto-inhiberait la sous-unité catalytique par encombrement stérique (Rehmann et al. 2003; Rehmann et al. 2006). La fixation de l'AMPc sur le domaine CNB de la sous-unité régulatrice provoquerait une modification de conformation libérant l'accès au site catalytique permettant l'action GTPasique. Toutefois la structure d'EPAC après fixation de l'AMPc n'est toujours pas déterminée empêchant la confirmation de cette hypothèse.

Epac 2 est exprimé dans les cellules β (Gloerich et Bos 2010) à l'inverse d' Epac 1 (Shibasaki et al. 2007). On notera qu'il existe 2 formes d'Epac2 : Epac2A et Epac2B dont seule la première est exprimée dans les cellules β (Niimura et al. 2009). Dans la suite du manuscrit nous ferons un raccourci en employant le terme Epac 2 pour Epac 2A.

5. Régulation de la signalisation/désensibilisation

La durée d'activation d'un RCPG est finement régulée afin d'éviter une stimulation excessive des voies de signalisation sous-jacentes : c'est la désensibilisation. Ce mécanisme est fortement lié au phénomène d'internalisation ou endocytose. En effet l'internalisation, faisant diminuer l'expression membranaire des RCPGs, a au départ joué un rôle central dans la désensibilisation. Cependant l'accumulation de données confirmant le recyclage des

récepteurs à la membrane ainsi que l'existence de voies de signalisation déclenchées par des récepteurs internalisés modifient cette vision. Le phénomène de désensibilisation comprend alors les étapes de découplage du récepteur à la protéine G, son internalisation (down-régulation) suivie de sa dégradation par les lysosomes.

a) Le découplage du récepteur à la protéine G

La désensibilisation intervient rapidement après l'activation d'un RCPG par son ligand et démarre par l'étape de découplage du récepteur de la protéine G. Plusieurs protéines jouent un rôle central dans ce phénomène.

(1) Les protéines impliquées dans le découplage

(a) Les GRKs (G protein-coupled receptor kinase)

Les GRKs sont des protéines sérine/thréonine kinases capables de phosphoryler les RCPGs. La première GRK identifiée est la GRK2. Elle porte alors le nom de β-ARK (β-adrenergic receptor kinase) car elle est impliquée dans la phosphorylation du récepteur β2-adrénergique (Benovic et al. 1986). Toutes les GRKs ont une structure similaire composée d'un domaine central catalytique conservé et entouré des domaines N et C-terminaux régulateurs. La partie N-terminale de taille relativement constante participerait à la reconnaissance du RCPG. La partie C-terminale plus variable est le siège des modifications post-traductionnelles et serait impliquée dans l'adressage aux membranes des récepteurs (Inglese et al. 1993). La famille des GRKs contient 7 membres divisés en 3 sous-familles selon leurs similarités de fonction et de séquence (J. A. Pitcher, Freedman, et Lefkowitz 1998) revue dans (Reiter et Lefkowitz 2006).

- **GRKs 1 et 7** sont exprimées respectivement dans les bâtonnets et les cônes de la rétine.
- **GRKs 2 et 3** sont exprimées dans la majorité des tissus de mammifères. Elles partagent un domaine homologue de la pleckstrine (substrat de la PKC dans les plaquettes). Ce domaine reconnait spécifiquement des phospholipides

membranaires et les sous-unités Gβγ de la protéine G permettant ainsi la liaison du GRK à la membrane plasmique.

- **GRKs 4, 5 et 6** sont également exprimées de façon ubiquitaire chez les mammifères exceptée GRK4 dont l'expression est restreinte aux testicules, reins et cerebellum. Ces 3 membres sont constitutivement liés à la membrane plasmique.

Certaines GRKs comme la GRK2 possèdent dans cette région un domaine « RGS-like » leur permettant d'inhiber l'activation de protéines $G\alpha_q$.

Une étude a montré que la phosphorylation des RCPGs par les GRKs n'était pas suffisante à la désensibilisation du récepteur (J. Pitcher et al. 1992) suggérant l'implications d'autres protéines. Quelques années plus tôt a été identifiée une nouvelle famille de protéines régulatrices, capables de se lier aux RCPGs phosphorylés par les GRKs, les β-arrestines (Lohse et al. 1990).

(b) Les β-arrestines

La famille des arrestines est composée de 4 membres : les arrestines 1 à 4. Les arrestines 1 et 4 sont essentiellement exprimées dans la rétine (Kühn 1978) tandis que les arrestines 2 et 3 (plus couramment appelées β-arrestine 1 et 2) sont ubiquitaires. Si le KO simultané des 2 β-arrestines est létal (Kohout et al. 2001) le KO de la β-arrestine 1 (Conner et al. 1997), le KO de la β-arrestine 2 (Bohn et al. 1999) sont viables. Ces observations suggèrent une compensation, une redondance de fonction entre les deux isoformes. Les β-arrestines 1 et 2 présentent 78% d'homologie de séquence et leurs structures sont semblables puisqu'elles sont composées de 2 domaines : un domaine N-terminal et un domaine C-terminal. Le premier est responsable de la localisation nucléaire des 2 β-arrestines et contient les régions d'interaction avec les protéines Src, MDM1 et IκBα (L. Ma et Pei 2007). Le domaine C-terminal contient les domaines de fixation aux protéines IP6, TRAF6, clathrine, AP2 et JNK3. La β-arrestine 2 possède en plus une séquence NES (Nuclear Export signal) (Figure 11)**.** Dans la lignée de cellules HEKs (Human embryonic kidney), à l'état de repos, la β-arrestine 1 est localisée dans le cytosol et le noyau tandis que la β-arrestine 2 n'est retrouvée que dans le

cytosol (R. H. Oakley et al. 2000; Scott et al. 2002; P. Wang et al. 2003). Cette différence est notamment due à la présence de la séquence NES dans la structure de la β-arrestine 2.

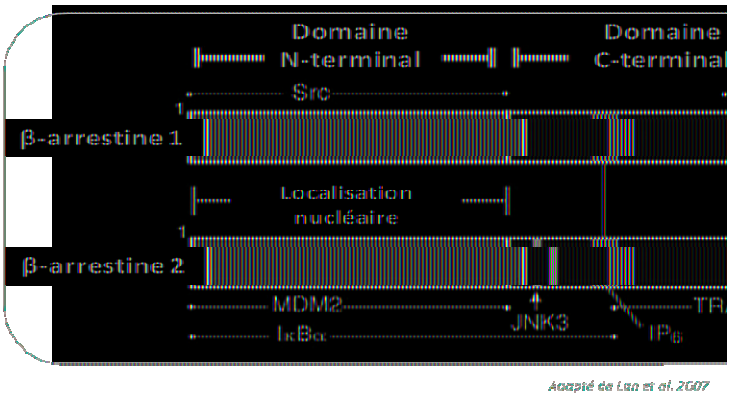


Figure 11 : Représentations schématiques des β-arrestines 1 et 2.

A l'origine découvertes pour être impliquées dans la désensibilisation de plusieurs GPCRs, d'où leur nom « arrestines », elles jouent également un rôle dans leur internalisation et la transduction du signal des RCPGs.

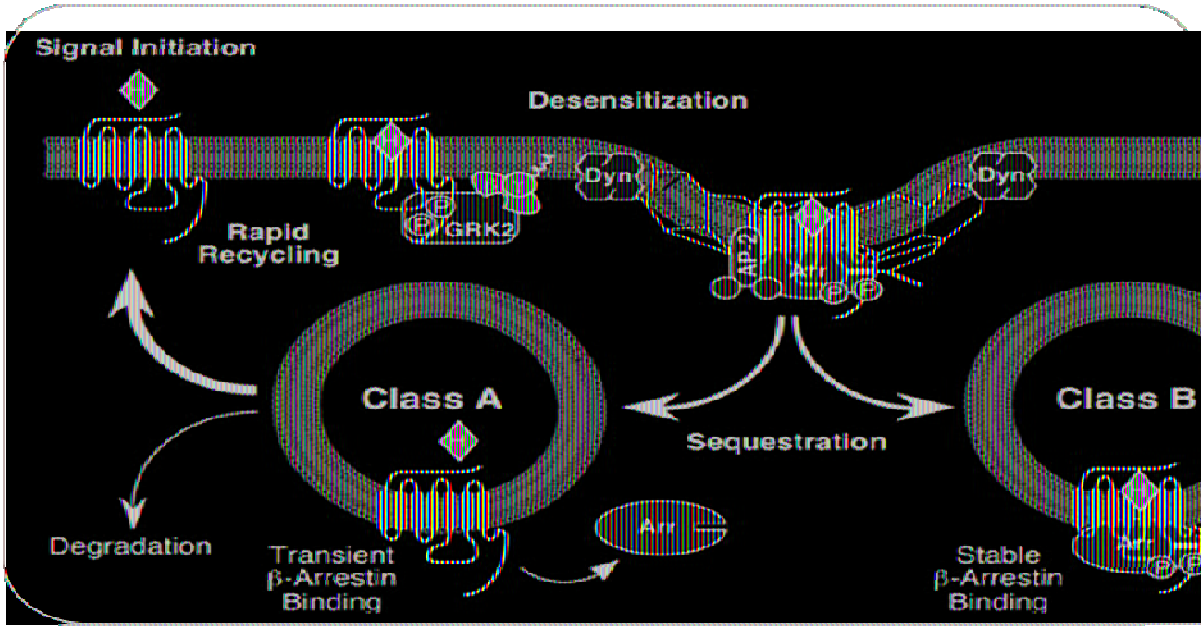
(2) Mécanisme de découplage

Après l'activation d'un RCPG par son ligand comme détaillé précédemment, il existe un mécanisme de régulation de la fonction biologique. En effet des protéines appelées GRKs phosphorylent le récepteur sur des résidus de la queue C-terminale et/ou sur la 3ème boucle intracellulaire, ce qui va déclencher le recrutement des β-arrestines. A l'état inactif les β-arrestines sont phosphorylées : β-arrestine1 par ERK1/2 en serine 412 (Lin et al. 1999) et β-arrestine2 par la kinase caséine II en thréonine 383 et sérine 361 (Lin et al. 2002). Lors de son recrutement la β-arrestine est déphosphorylée ce qui lui permet de se fixer au récepteur et de recruter des partenaires protéiques comme la clathrine (Lin et al. 1997). L'arrestine va alors découpler la protéine G de son récepteur et inhiber la production d'AMPc. De plus il a été montré que les β-arrestines potentialisent leur action en interagissant avec les PDEs pour augmenter la dégradation d'AMPc (Perry et al. 2002). En plus des GRKs, certaines protéines comme PKA et PKC, activées par l'augmentation de messagers secondaires suite à la stimulation d'un RCPG, vont phosphoryler le récepteur sur les boucles intracellulaires et la

queue C-terminale. Tout d'abord impliqué dans la désensibilisation, la phosphorylation induite par PKC jouerait également un rôle dans l'internalisation des RCPGs revue dans (Marchese et al. 2003).

(3) Modulation du découplage

L'affinité de la β-arrestine pour son récepteur varie selon la classe du récepteur et l'état d'ubiquitination de la protéine d'échaffaudage. Elle est faible pour les récepteurs de classe A, sa fixation est alors rapide et transitoire permettant un recyclage rapide du récepteur. Pour les récepteurs de classe B l'affinité est plus forte et la fixation prolongée jusque dans les vésicules endocytées (Oakley et al. 2000). Cette différence d'affinité serait due à la présence, au niveau de la queue C-terminale du récepteur, d'une région riche en clusters de Sérine-Thréonine. Les récepteurs de la classe A contiendraient moins de cluster que ceux de la classe B (Oakley et al. 2000; Oakley et al. 2001). De plus, la stabilité du complexe β-arrestine/récepteur activé est corrélée à la longévité d'ubiquitination de l'arrestine. Lors de la stimulation des récepteurs de classe A, l'ubiquitination est transitoire tandis que pour les récepteurs de classe B elle est prolongée (Perroy et al. 2004; Sudha K. Shenoy et Lefkowitz 2003) revue dans (DeWire et al. 2007; Kendall et al. 2009) (Fig 12).



Tiré de Kendall et al, 2009

Figure 12 : Rôles des β-arrestines 1 et 2 dans la désensibilisation des RCPGs.

b) Internalisation : resensibilisation ou dégradation

Suite à la phosphorylation du récepteur et le recrutement des β-arrestines, il existe deux modes d'internalisation : un mode dépendant de la clathrine (S. S. Ferguson 2001) et un mode indépendant (Chini and Parenti 2004), faisant tous les deux intervenir la dynamine dans leur processus.

(1) Clathrine dépendant

Après leur activation, la majorité des RCPGs sont internalisés par endocytose de puits recouvert de clathrine dépendemment des β-arrestines (Luttrell et al. 2002). Les GRKs impliqués dans la phosphorylation du récepteur et le recrutement des β-arrestines seraient les GRKs 2 et 3 (Kim et al. 2005). Une fois recrutées, les protéines d'échaffaudage moléculaire vont servir d'adaptateurs pour les éléments participants à la formation des endosomes. Parmi eux on peut compter la clathrine (Goodman et al. 1996), l'AP2 (Laporte et al. 1999), ARF6 (ADP-ribosylation factor6), ARNO (ARF Nucleotide binding site opener) (Claing et al. 2001) et NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) (McDonald et al. 1999). En plus de l'internalisation induite par la fixation du ligand sur son récepteur, les RCPGs peuvent avoir un trafficking constitutif, c'est-à-dire sans activation par le ligand. Un même récepteur pourra alors adopter un comportement différent selon s'il est activé ou non. Si l'on prend l'exemple de PAR1R, son internalisation lié à la fixation du ligand mène à sa dégradation tandis que son internalisation constitutive mène au recyclage (Shapiro and Coughlin 1998). Une étude récente a d'ailleurs démontré que la phosphorylation de la β-arrestine-2 en ser 14 et thr 276 est essentielle à la séquestration intracellulaire de plusieurs RCPGs induite par l'activation des kinases ERK1/2 (Paradis et al. 2015).

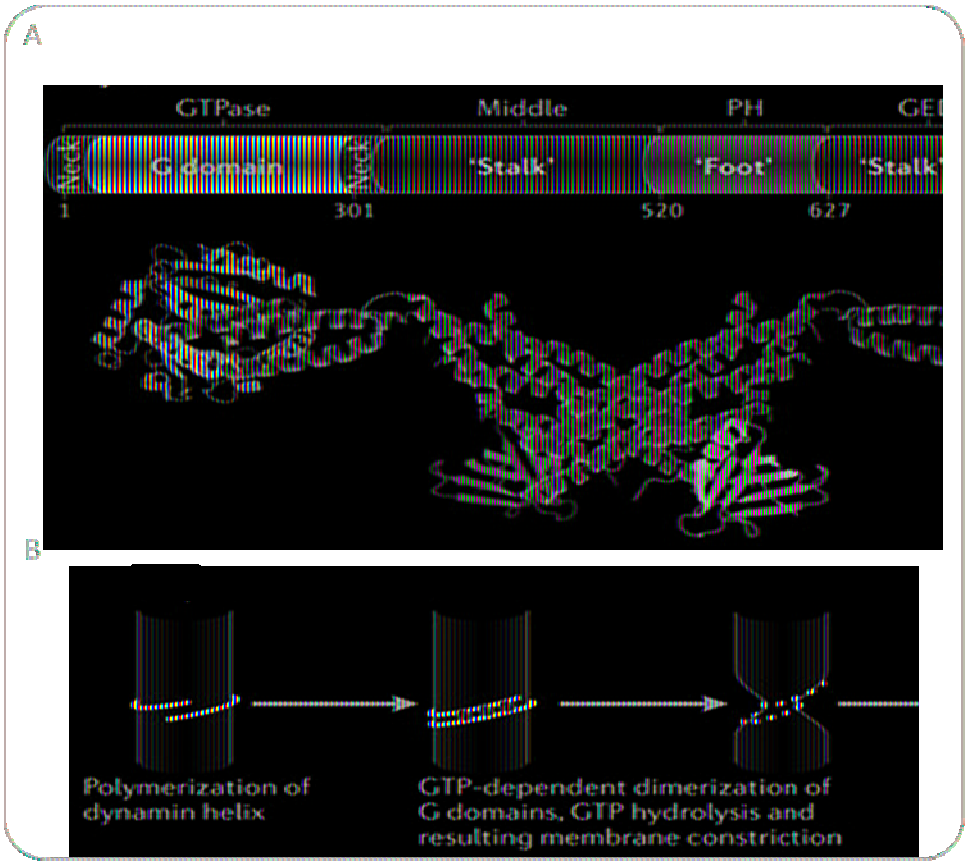
(2) Clathrine indépendant

En plus de l'endocytose dépendant de la clathrine, il existe un second type d'endocytose impliquant les protéines cavéolines. Au niveau de la membrane plasmique se situe des régions planes particulières appelées « radeaux lipidiques » riches en lipides et protéines tels que les glycosphingolipides et le cholesterol tandis que la membrane plasmique environnante est plus largement composée de phospholipides (Brown and London 1998). Il

existe également des régions, non plus planes mais invaginées de même composition que les rafts appelées cavéoles. Ces micro-domaines spécialisés sont considérés comme une sous-famille des radeaux lipidiques. Identifiées en microscopie électronique, ces régions de 50 à 85 nM de diamètre (Palade and Bruns 1968; Yamada 1955) doivent leur forme et leur structure à la présence de protéines particulières : les cavéolines (1, 2 et 3) qui s'assemblent en oligomères et forment un manteau cytoplasmique autour de l'invagination. Les cavéoles contiennent tous les composants moléculaires nécessaires à la formation, au docking et à la fusion de vésicules (Schnitzer, Liu, and Oh 1995). Certains RCPGs possèdent un motif de fixation à la cavéoline (Couet et al. 1997). Ils vont pouvoir être internalisés via des vésicules non recouvertes de clathrine mais de cavéoline. La scission de ces invaginations est dépendante de l'hydrolyse de GTP, là encore réalisé par la dynamine. La façon dont les RCPGs se dirigient vers ces régions reste floue. L'acylation et en particulier la palmitoylation pourrait être un signal d'adressage pour plusieurs protéines (Okamoto et al. 1998). Cependant la plupart des RCPGs possède cette modification sans pour autant se situer au niveau des rafts/cavéoles.

(3) La super famille des dynamines

Les membres de la superfamille des dynamines sont des GTPases mécano chimiques c'est à dire qu'elles convertissent l'énergie de l'hydrolyse en énergie mécanique. Elles sont impliquées dans le remodelage des membranes dépendant des nucléotides et interviennent dans l'étape finale de fission des vésicules de la membrane plasmique en formant des oligomères. Cette superfamille comprend entre autre les protéines MxA (Myxovirus resistance proteins), GBPs (Guanylate binding proteins) et surtout les 3 dynamines nommées 1, 2 et 3 (revue dans Faelber et al. 2013) qui nous intéressent plus particulièrement. Ce sont des protéines tétramériques composées de 5 domaines : le domaine G, GED (GTPase effector domain), « stalk », PH (pleckstrin homology), PRD (proline rich domain) (S. M. Ferguson et al.2012)(Figure13).



Tiré de Ferguson et al. 2012

Figure 13 : Structure et mode d'action des dynamines. A : Structures linéaires et tri-dimensionnelles schématiques de la dynamine. B : Représentation des différentes étapes de la fission par la dynamine

Au départ identifiées comme intervenant dans l'endocytose des vésicules recouvertes de clathrine (Takei et al. 1995; De Camilli, Takei, and McPherson 1995), il s'avère qu'elles assurent également leur fonction au niveau du « col » des cavéoles où l'hydrolyse du GTP médie la fission et ainsi la création d'une vésicule ou cavéosome (Oh, McIntosh, and Schnitzer 1998; Henley et al. 1998). La dynamine 1, initialement connue pour être exclusivement neuronales a récemment été découverte dans la cellule β (J. Lu et al. 2008). La dynamine 2 est ubiquitaire et a également été détectée dans les cellules β lors de la même étude. Plus tard une autre équipe a montré son implication dans la fonction des cellules β puisque les îlots de souris invalidées en dynamine 2 (spécifiquement dans les cellules β) présentent un défaut de sécrétion d'insuline ainsi que du métabolisme glucidique (Fan et al. 2015). Les avis divergent quant au rôle de chacune. En effet dans une étude de (Artalejo, Elhamdani, and Palfrey 2002) réalisée sur des cellules neuro-endocrines, les auteurs montrent une implication différentielle des isoformes 1 et 2 dans l'internalisation. La première serait impliquée dans le mécanisme d'endocytose indépendant de la clathrine tandis que la seconde interviendrait dans l'endocytose clathrine dépendante. Dans les cellules β pancréatiques, au contraire il a été montré que les isoformes 1 et 2 avaient des rôles redondant dans l'internalisation clathrine dépendante et indépendante (J. Lu et al. 2008) . Enfin la dynamine 3 est exprimée uniquement au niveau du cerveau, des poumons, du cœur et des testicules.

(a) Modulation de l'internalisation

Il existe plusieurs niveaux de régulation de l'internalisation des RCPGs :

- Au niveau des GRKs : il a par exemple été montré que GRK2 pouvait interagir avec PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) ce qui potentialise l'endocytose du récepteur (Naga Prasad et al. 2002; Naga Prasad et al. 2005).
- Au niveau des β-arrestines : leur ubiquitination par la protéine MDM2 (mouse double minute 2) est essentielle pour le processus d'endocytose. Comme nous l'avons vu précédemment la stabilité de l'ubiquitination diffère selon la classe de récepteur (Sudha K. Shenoy and Lefkowitz 2003).
- Au niveau du récepteur : là encore l'ubiquitination a un rôle important. Médiée par le recrutement de ligases E3 par les β-arrestines, cette modification est

nécessaire à l'adressage des RCPGs aux lysosomes et leur dégradation (Shenoy et al. 2001).

Devenir des RCPGs après internalisation

Une fois endocytés dans des vésicules, les récepteurs ont deux options. La première est le recyclage à la membrane menant à la resensibilisation du récepteur qui retrouve sa fonctionnalité à lier son ligand. La deuxième est la dégradation. Transportés dans les lysosomes les récepteurs sont protéolysés, c'est ce que l'on appelle le processus de « down-regulation » du signal. L'orientation vers l'une ou l'autre de ces voies semble dépendante du récepteur. En plus de ces deux destins certains RCPGs pourront, une fois endocytés, déclencher une deuxième voie de signalisation.C'est par exemple le cas du récepteur GLP-1 (Kuna et al. 2013).

c) GPCR , arrestin et signaling

En plus de la voie canonique dépendante des protéines G, l'activation des GPCRs peut déclencher la voie dépendante des β-arrestines. En effet si au départ ces dernières ont été impliquées dans le phénomène de désensibilisation, une étude de (L. M. Luttrell et al. 1999) a révélé l'interaction de la β-arrestine 1 avec la protéine Src. Plusieurs autres protéines ont ensuite été identifiées interagissant avec les protéines d'échafaudage (Xiao et al. 2007) appuyant leur rôle dans l'initiation de nouvelles voies de signalisation.

Activation des MAP Kinases

La famille des MAP Kinases regroupe les sérine/thréonine kinases ERK1/2, p38 et JNK dont l'activation va médier des réponses cellulaires telles que l'activation du cycle cellulaire, la régulation de la transcription, l'apoptose.

Kinases ERK1/2

Le rôle des β-arrestines dans la cascade d'activation des Kinases ERK1/2 est le plus étudié. Cette voie comprend, au premier niveau les MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) c-Raf1 et B-Raf, qui activent les MAPKK (MAP kinase kinase) MEK 1/2 activant elles-mêmes les MAPK (MAP kinase) ERK1/2. Une étude sur le récepteur de classe B PAR2 a montré la formation d'un complexe entre le récepteur, la β-arrestine 1 et les membres de la cascade (DeFea et al. 2000). Une autre étude a donné des résultats similaires avec le récepteur de l'angiotensine II

AT1 mais avec la β-arrestine 2 (Luttrell et al. 2001). Le contact avec l'arrestine semble être direct avec c-Raf et ERK1/2 contrairement à MEK1. Dans les cellules β-pancréatiques la β-arrestine 1 a été montré comme participant à l'activation tardive de ERK1/2 via le récepteur PACAP et induisant la transcription du gène IRS2 (Broca et al. 2009). La voie dépendante des protéines G active également ERK1/2 via la production d'AMPc, mais de manière différente. La voie β-arrestine, de par la formation du complexe, séquestre les kinases ERK1/2 dans le cytosol tandis que la voie protéine G induit une translocation nucléaire des kinases (DeFea et al. 2000; Luttrell et al. 2001). Dans le cas des récepteurs β2-adrénergique et Neurokinine NK1, cette voie peut également être activée par l'intermédiaire du recrutement de Src qui phosphorylerait directement les kinases ERK1/2 (L. M. Luttrell et al. 1999; DeFea et al. 2000).

Autres MAP Kinases JNK et p38

Une autre kinase activée par la voie dépendante des β-arrestines est JNK3. Cette dernière a été retrouvée dans le cytosol sous sa forme active, phosphorylée dans un complexe impliquant la β-arrestine 2 (McDonald et al. 2000). Enfin même si aucune interaction n'a été mise en évidence, l'activation de p38 a été reportée comme dépendante de la voie « arrestine » par plusieurs études (Bruchas et al. 2006; W. E. Miller et al. 2003; Sun et al. 2002).

Activation des Kinases

Les β-arrestines ont aussi la capacité d'activer d'autres kinases comme la PI3K et Akt (ou PKB) ce qui aura pour conséquence de promouvoir la croissance cellulaire et de protéger de l'apoptose (Povsic et al. 2003). Enfin les β-arrestines peuvent intervenir dans le réarrangement du cytosquelette en activant la petite protéine G RhoA via le récepteur $AT1_AR$ (Barnes et al. 2005).

Activation de signaux nucléaires

Comme nous l'avons vu les β-arrestines peuvent transiter entre le cytosol et le noyau ce qui leur permet d'activer des réponses transcriptionnelles. Une des familles de facteurs de transcription régulée par les β-arrestines est NF-κB régulant entre autre l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la prolifération et l'apoptose (Karin et al. 2005). Des études ont montré que les β-arrestines se lient à IκBα et MDM2 régulant les facteurs de transcription NF-κB et p53 (Shenoy et al. 2001; Gao et al. 2004; Wang et al. 2003). Il a également été montré que β-arrestine-1 transloque dans le noyau, recrute des cofacteurs

comme p300 et induit la transcription de certains gènes comme *p27* et *c-fos* (Kang et al. 2005).

A. Les actions biologiques générales du GLP-1

Le glucose administré par voie orale augmente la sécrétion d'insuline de plus de 50% par rapport à la voie intraveineuse (Mcintyre et al 1964; Nauck et al. 1986). Cet « effet incrétine » est due à la sécrétion des hormones incrétines par les cellules endocrines intestinales lors du passage du bol alimentaire : le GIP (Glucose-dependent insulinotropic peptide ou gastric inhibitory polypeptide) et le GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) (Mojsov et al. 1986; Kim et al. 2008). Nous parlerons uniquement du GLP-1 dans la suite de ce manuscrit.

Synthèse et sécrétion

Le GLP-1 est une hormone polypeptidique synthétisée à partir du gène du proglucagon. Ce gène est exprimé dans les cellules α pancréatiques, les cellules L endocrines intestinales et dans quelques neurones (Mojsov et al. 1986; Novak et al. 1987; Drucker et al. 1988). Traduit en précurseur protéique du même nom, il est ensuite converti en GLP-1 par la PC 1/3 (prohormone convertase 1/3) (Mojsov et al. 1986; Rouillé et al. 1995). Depuis longtemps le GLP-1 était montré comme étant sécrété uniquement par les cellules L, mais de récents résultats montrent qu'il peut également être sécrété par les cellules α. Cette sécrétion a essenciellement été observée dans des conditions de stress métabolique ou inflammatoire de l'îlot. En effet une étude a montré qu'une exposition aux cytokines (IL-6) augmente l'expression de GLP-1 dans les cellules α (Ellingsgaard et al. 2011). Il est également montré que la destruction de cellules β chez le rat, provoque une amplification du niveau de GLP-1 dans le pancréas (Nie et al. 2000). De plus la sécrétion de GLP-1 a été montré comme étant augmentée dans les îlots de patients diabétiques de type 2 (Marchetti et al. 2012). Cependant dans cette même étude les auteurs montrent une stimulation de la production de GLP-1 en réponse au glucose et arginine par des îlots de patients sains. Du GLP-1 a également été détecté dans le milieu de culture d'une lignée de cellules α (Whalley et al. 2011). Ces résultats suggérent la possiblité que les cellules α sécrètent le GLP-1 en conditions physiologiques mais la question reste ouverte.

Plusieurs formes de GLP-1 sont sécrétées in vivo, produits d'un épissage alternatif:

- Les deux formes inactives : les GLP-1 (1-37) et GLP-1 (1-36)NH_2.
- Les deux formes actives : Les GLP-1 (7-37) et GLP-1 (7-37)NH_2.

Chez l'Homme, la forme majoritaire circulante est le GLP-1 (7-37)NH_2 (Orskov et al. 1994).

Métabolisme

La sécrétion de GLP-1 par les cellules L est stimulée par des facteurs nutritifs, nerveux et endocrines. Chez l'homme cette sécrétion, suite à l'ingestion de nutriments, est biphasique :

-Première phase ou phase précoce : 10-15 minutes

-Seconde phase ou phase tardive : 30-60 minutes

Contrairement à la seconde phase qui correspond à une activation directe des cellules L par les nutriments digérés (Roberge and Brubaker 1991), la première phase intervient trop rapidement pour être due à une stimulation directe. Dans ce cas le nutriments stimulent la sécrétion de GLP-1 de manière indirecte via des médiateurs neuronaux ou endocrines comme le GRP (Gastrin releasing peptide) (Bruzzone et al. 1983), l'acétycholine ou le GIP (Rocca and Brubaker 1999; Brubaker and Anini 2003).

Actions biologiques générales

Le GLP-1 a de larges actions biologiques dont la liste que je présente n'est pas exhaustive. Tout d'abord sur le pancréas, il stimule la sécrétion d'insuline de façon dépendante du glucose par les cellules β et diminue la sécrétion de glucagon par les cellules α (Heller et al. 1997). Il agit aussi au niveau de l'estomac en diminuant la vidange gastrique (Willms et al. 1996; Meier et al. 2002) tandis qu'au niveau du cerveau il diminue l'appétit. Il stimule les fonctions cardiaques et a une action de cardioprotection (Barragán et al. 1999). Sur les muscles et le tissu adipeux il augmente la sensibilité à l'insuline (Young et al. 1999), la captation et le stockage du glucose et diminue sa production dans le foie.

La dégradation du GLP-1

Une fois sécrété, le GLP-1 a une demi-vie très courte (environ 2 minutes) du fait de son inactivation par l'enzyme protéolytique DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) (Deacon et al. 1995). Il est alors métabolisé en GLP-1 (9-37) ou GLP-1 (9-36)NH_2. L'enzyme, ubiquitaire est notamment exprimée à la surface des cellules endothéliales adjacentes aux sites de sécrétion du GLP-1 (Hansen et al. 1999). La conséquence est que plus de la moitié du GLP-1 délivré dans la circulation portale est inactivé avant d'atteindre la circulation systémique. En

plus de la forme membranaire l'enzyme DPP-4 existe sous une forme circulante (Mentlein 1999).

Le GLP-1 en thérapeutique

L'ensemble des propriétés du GLP-1 font de lui une molécule intéressante pour le traitement du diabète de type 2. Du fait de sa courte demi-vie il ne peut être prescrit en thérapeutique. Deux classes de molécules ont donc vu le jour : les analogues stables du GLP-1 et des inhibiteurs de l'enzyme DPP-4. Parmi les molécules analogues on trouve l'exenatide et le liraglutide (Knudsen et al. 2000; Toso et al. 2010). L'exenatide est la forme synthétique de l'exendin-4, agoniste naturel du GLP-1R découvert dans la salive du lézard Gila monster (Eng 1992). Il comporte 53% d'homologie avec le GLP-1 (Göke et al. 1993). Le remplacement d'une Alanine en Guanine au niveau du site de clivage de la DPP-4 lui confère une résistance naturelle et une demi-vie de 2.4H dans le plasma humain (T. Perry and Greig 2003). Le liraglutide est composé d'un peptide GLP-1 couplée à une molécule d'albumine. C'est l'encombrement stérique créé par l'ajout de l'albumine qui lui confère la résistance et une demi-vie de 13H ("dic.212283.pdf" 2015). (Figure14)

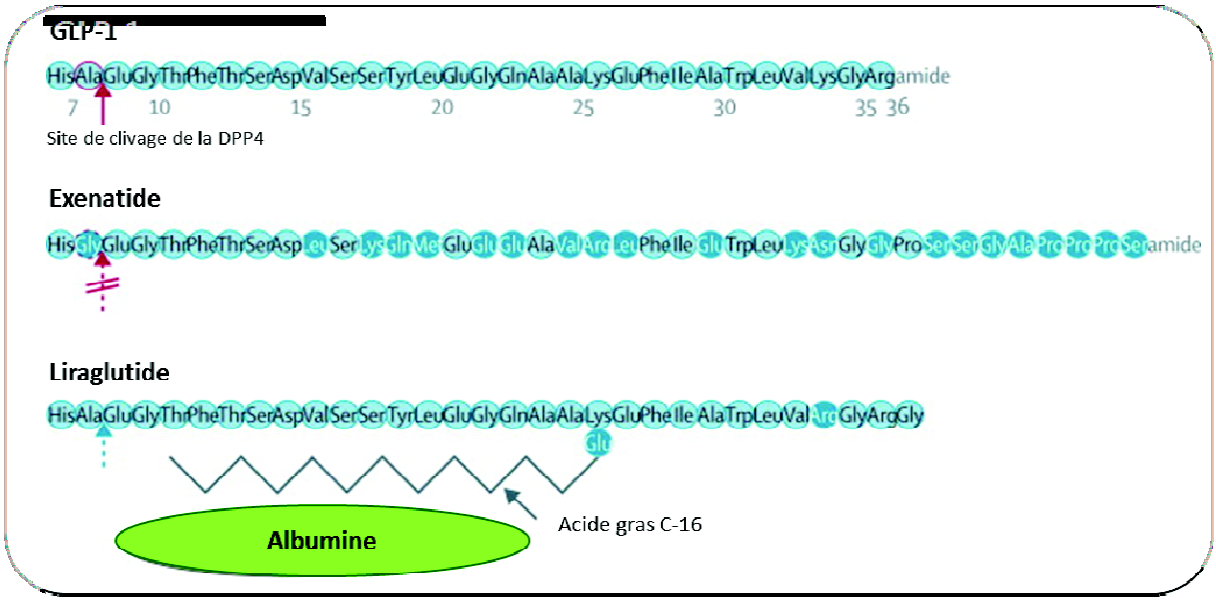


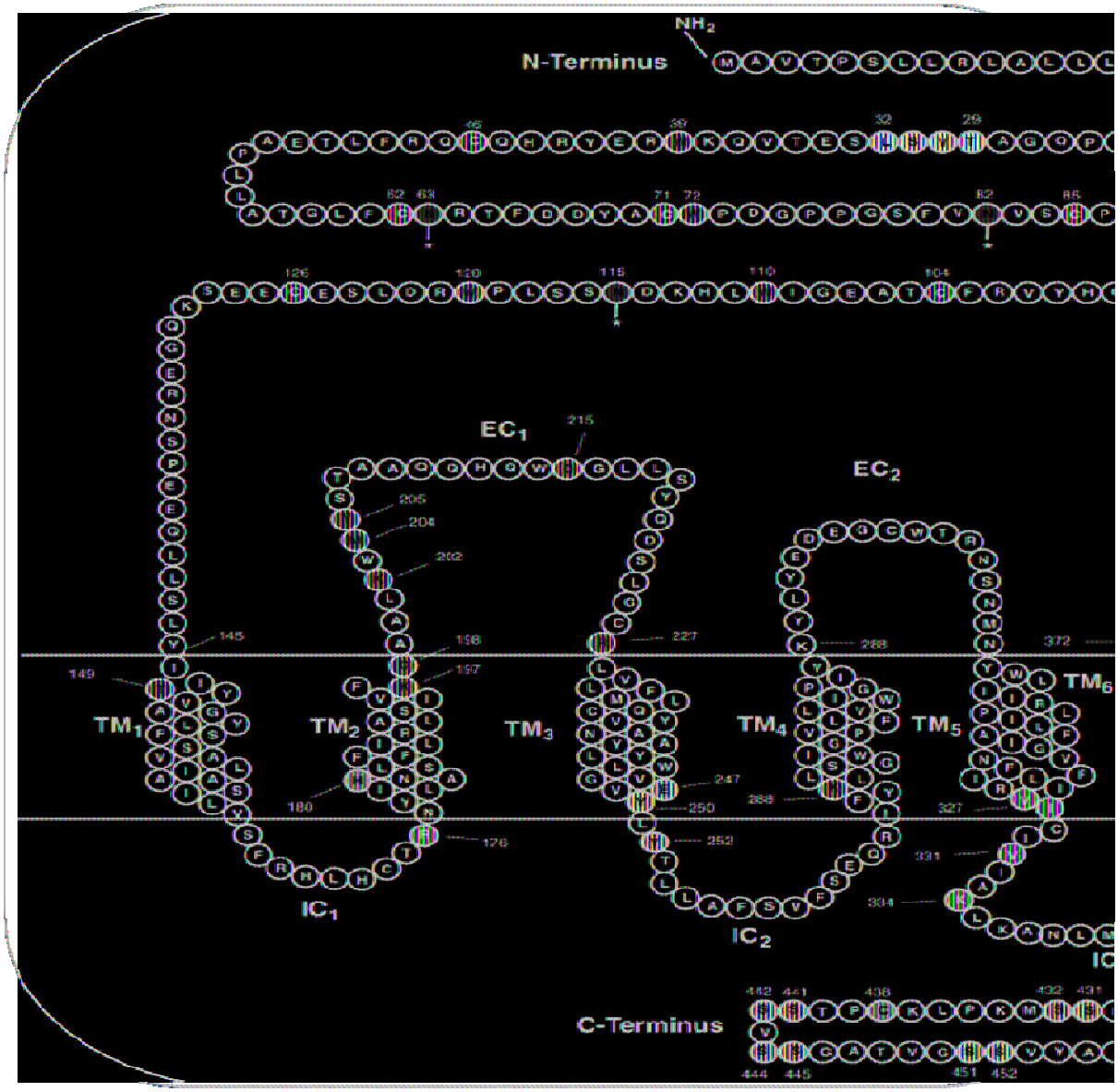
Figure 14 : Structures linéaires du GLP-1, Exenatide et Liraglutide.

6. Le récepteur du GLP-1

Le récepteur GLP-1 est un RCPG (récepteur couplé aux protéines G) à 7 domaines transmembranaires. Il appartient à la classe B incluant les récepteurs du glucagon, GLP-2 et GIP. Chez l'Homme il est issu d'un gène de 40kb situé sur le chromosome 6.

Le récepteur est un peptide de 463 acides aminés qui présente 90% d'homologie de séquence entre le rat et l'humain (Fig 16). Il est exprimé dans un grand nombre de tissus dont, entre autre, les cellules α, β et δ pancréatiques, le cœur, l'estomac, l'intestin, le cerveau et le poumon (Wei and Mojsov 1995; Bullock, Heller, and Habener 1996). Son expression dans le muscle et le tissu adipeux est contestée dans la plupart des espèces excepté chez le chien (Sandhu et al. 1999).

La plupart des études sur le récepteur GLP-1 ont été menées chez le rat et ont amener à déterminer le rôle de certains résidus dans les diverses fonctions du récepteur telles que son adressage à la membrane, son interaction avec le ligand, son couplage à la protéine G ou encore son internalisation et son résumés dans la figure 15.



Tiré de Doyle et al, 2006; Thorens et al, 1992

Figure 15 : Structure du récepteur GLP-1. En jaune apparaissent les 6 résidus cystéine conservés dans les récepteur de classe B, en bleu sont montrés les résidus inervenant dans l'interaction du récepteur avec son ligand. Les sites de glycosylation sont colorés en gris, en marron apparait l'AA qui participe à l'affinité du ligand pour son récepteur et la production d'AMPc (Heller et al. 1997) Enfin en violoet sont signalés les résidus impliqués dans l'internalisation du récepteur

7. Le Trafficking du récepteur GLP-1

a) Adressage à la membrane

La partie du récepteur la plus impliquée dans l'expression à la surface membranaire du récepteur est la partie N-terminale. Plusieurs domaines dans la séquence en AA du récepteur GLP-1, au niveau de cette partie N-terminale, sont identifiés comme essentiels dans sa synthèse et son adressage à la membrane plasmique.

- Le peptide signal : comme tous les RCPGs de classe B, le récepteur GLP-1 possède un peptide signal. D'une longueur de 23 AA, ce peptide est clivé durant la synthèse du récepteur GLP-1 comme il est également le cas pour d'autre récepteurs de la classe B comme CRF_1 (Alken et al. 2005), PACAP, VIP (Couvineau et al. 2004) et le récepteur de l'hormone parathyroïdienne (Shimada et al. 2002). Le rôle de ce peptide n'est pas complètement élucidé. Il peut parfois avoir un rôle dans la synthèse et non dans l'adressage comme pour le récepteur CRF_1. Comme pour le récepteur VIP (Couvineau et al. 2004), le peptide signal du récepteur GLP-1 est essentiel non pour la synthèse mais pour l'expression membranaire du récepteur (Huang, Wilkinson, and Willars 2010). En effet, la délétion du peptide signal du récepteur dans la lignée de cellules HEK, abolie son expression membranaire. De plus la mutation d'un résidu au niveau du site de clivage du peptide signal empêchant le clivage de celui-ci, bloque également l'adressage à la membrane.

- La région HRASP (Hydrophobic region after the SP) : cette zone en aval du peptide signal (Gly^{27}- Trp^{39}) serait quant à elle impliquée dans la synthèse et l'adressage du récepteur. Elle participerait à l'insertion de la protéine dans le RE (réticulum endoplasmique) en fixant le SRP (Signal Recognition Particle) permettant ainsi la synthèse du récepteur (Huang, Wilkinson, and Willars 2010). De plus lors d'une étude réalisée par (Thompson and Kanamarlapudi 2014), des délétions au niveau de la séquence ont montrés sa nécessité dans le trafficking du récepteur à la membrane.

Les modifications post-traductionnelles du récepteur ont également un rôle à jouer dans son adressage à la membrane. Dans le RE, le récepteur est glycosylé au niveau de 3 sites : Asn^{63}, Asn^{82} et Asn^{115} permettant son adressage à la membrane (Q. Chen, Miller, and Dong 2010; Whitaker et al. 2012).

La partie C-terminale du récepteur est également impliquée dans son trafficking. En effet les travaux de (Thompson and Kanamarlapudi 2015b) montrent qu'une délétion entre les AA 411-418 bloque l'adressage du récepteur. Même observation pour des mutations sur les AA 408-410, déjà connus pour leurs rôles dans la fixation du ligand et l'activité du récepteur montré par (Vázquez et al. 2005).

b) Internalisation

L'internalisation du récepteur GLP-1 après la fixation de son ligand est essentielle pour moduler son effet biologique, comme détaillé dans la partie « b. internalisation : dégradation et resensibilisation ». La manière dont le récepteur GLP-1 endocyte est encore soumise à controverse. Certaines études ont tout d'abord montré que l'internalisation du récepteur est dépendante de la clathrine et de la présence de 4 sites de phosphorylation en sérine situés dans la partie C-terminale du récepteur au niveau des AA 431 et 450 (Widmann et al. 1996; Widmann et al. 1997).

Cependant la dépendance de la cavéoline-1 dans l'internalisation du GLP-1R commence à émerger. Tout d'abord il possède la séquence classique de fixation à la cavéoline **préciser**. Plusieurs études montrent que son internalisation survient rapidement et est totale au bout de 15 à 60 minutes (Thompson and Kanamarlapudi 2015a; Syme, Zhang, and Bisello 2006). Une colocalisation avec la cavéoline-1 est observée (Syme, Zhang, and Bisello 2006). L'utilisation d'un mutant pour la cavéoline-1 confirme son implication en bloquant l'internalisation du récepteur. A l'inverse les mutants pour la β-arrestine 1 et la clathrine n'ont pas d'impacts significatifs sur cette internalisation (Thompson and Kanamarlapudi 2015a)

L'implication des protéines β-arrestines dans l'internalisation du récepteur GLP-1 reste encore à préciser. Différents travaux ont tout d'abord montré l'implication de la β-arrestine 2 dans l'internalisation du récepteur GLP-1 (Jorgensen et al. 2005; Roed et al. 2015). L'expression d'une protéine de fusion entre le récepteur et la protéine dans la lignée cellulaire HEK augmente l'internalisation du récepteur (Jorgensen et al. 2005). Cependant une absence de recrutement ou un recrutement partiel des β-arrestines associé à

l'internalisation du récepteur suggère qu'il puisse utiliser un mode d'internalisation indépendant des protéines d'échafaudage moléculaire (Syme, Zhang, and Bisello 2006; Jorgensen et al. 2007). De plus une étude de (Sonoda et al. 2008) impliquant la β-arrestine 1 dans la fonction de la cellule β n'a observé aucun changement d'expression de surface du récepteur GLP-1 lors d'une invalidation de la protéine β-arrestine 1.

La dynamine intervient dans les deux types d'internalisation : dépendant et indépendant de la clathrine, comme vu précédemment. Plusieurs études ont démontré son implication dans l'internalisation du récepteur GLP-1. La transfection dans la lignée HEK d'une forme dominant double négatif de dynamine (K44A-dynamin) montre un blocage partiel de l'internalisation du récepteur impliquant une augmentation de la production d'AMPc induite par l'exendine-4 (Thompson et al. 2015a; Syme et al. 2006).

Il peut être recyclé/resensibilisé ou impliqué dans de nouvelles voies de signalisations intracellulaires. Mais il peut également être dégradé. Selon ses besoins la cellule peut donc adapter le trafficking du récepteur. Ce processus d'internalisation fait intervenir plusieurs parties du récepteur lui-même, des interactions avec diverses protéines et des modifications post-traductionnelles.

L'internalisation du récepteur GLP-1 peut être modulée par plusieurs facteurs. Son interaction avec le récepteur GIP par exemple inhibe son internalisation (Roed et al. 2015). De plus, certains domaines (AA 419-435) ont la capacité d'inhiber l'internalisation du récepteur (Vázquez et al. 2005).

Suite à son internalisation le récepteur peut induire une seconde vague d'activation. Une étude de (Kuna et al. 2013) a montré que suite à son activation par le GLP-1, le récepteur colocalise avec l'AC dans les endosomes et reste capable de stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Il est même suggéré que l'internalisation du récepteur serait essentielle à sa pleine activation (Roed et al. 2015). Cependant là encore ces résultats s'opposent aux observations de potentialisation de la signalisation du récepteur en absence d'internalisation (Syme et al. 2006). Il est tout de même à noter une certaine nuance dans la différence entre ces deux études. En effet la première étudie l'internalisation suite à l'activation du récepteur par son agoniste tandis que la seconde étude se concentre sur le trafficking constitutif du récepteur.

Le rôle de la dynamine-1 dans l'internalisation du récepteur a été confirmé par l'utilisation de la forme dominante négative de la protéine lors de plusieurs études (Roed et al. 2015; Syme, Zhang, and Bisello 2006)

C. Actions Biologiques du récepteur GLP-1 dans la cellule β

Le récepteur GLP-1, comme tous les récepteurs de la superfamille des RCPGs va activer des voies de signalisation dépendante des protéines G. La fixation du GLP-1 sur son récepteur peut induire le couplage de celui-ci avec plusieurs protéines G : $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, et $G\alpha_o$. Il peut alors activer plusieurs effecteurs comme l'AC, la PLC ou le Ca^{2+} intracellulaire, médiants eux-mêmes plusieurs voies de signalisation comme les MAPK, PKA/Epac2, PKC et PI3K (Baggio and Drucker 2007). Le récepteur GLP-1 va également être capable, comme certains récepteurs, d'induire des voies de signalisation non plus dépendantes des protéines G mais des β-arrestines. L'ensemble des voies activées par la fixation du GLP-1 sur son récepteur va impacter sur la fonction mais également sur la masse des cellules β pancréatiques.

1. Action sur la fonction des cellules β

Le GLP-1 est un peptide possédant des propriétés insulino-sécrétrices dépendante de la présence de glucose. Ce rôle a notamment été confirmé par une étude réalisée sur les souris invalidées pour le récepteur GLP-1. Les animaux se caractérisent alors par une augmentation du glucose sanguin (à jeun et postprandial) ainsi qu'une diminution du niveau d'insuline en réponse au glucose (Scrocchi et al. 1996). Pour agir au niveau de la cellule β pancréatique il va tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment, activer la voie dépendante de la protéine $G\alpha_s$. L'augmentation de la concentration intracellulaire en messager secondaire (AMPc) va activer les protéines PKA et Epac2 qui vont participer à la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1.

La PKA est un régulateur important de la sécrétion d'insuline agissant à plusieurs niveaux. Tout dabord elle peut induire la phosphorylation en sérine 1448 de la sous-unité SUR1 des canaux K_{ATP} et faciliter leur fermeture (Light et al. 2002). Par ce biais, le GLP-1 induit la dépolarisation de la membrane plasmique et déclenche la voie activatrice de la sécrétion d'insuline. De plus, la PKA phosphoryle les canaux VDCCs de type L ce qui augmente l'influx de calcium et potentialise l'exocytose des granules d'insuline (Lester et al. 1997; Leiser et al. 1996). Elle peut également activer l'ouverture des canaux IP_3R (Inositol 1, 4, 5 triphosphate receptors) du réticulum endoplasmique et ainsi augmenter la concentration de calcium

cytoplasmique (Tsuboi et al. 2003). La voie PKA peut également impacter directement sur l'exocytose des granules d'insuline en interagissant avec des régulateurs de l'exocytose. En effet la protéine phosphoryle la synapsine-1, protéine associée aux vésicules d'insuline (Lester et al. 2001). De plus, elle régule le « priming » des vésicules d'insuline via la phosphorylation des protéines RIM (Lonart et al. 2003).

La production d'AMPc peut également induire l'activation d'Epac2. Une première étude a mis en évidence l'implication d' Epac2 dans la sécrétion d'insuline induite par l'activation du récepteur GLP-1 (Ozaki et al. 2000). Depuis, 3 effets ont été décrits. Il serait tout d'abord impliqué dans le « priming » de vésicules d'insuline augmentant ainsi le stock du pool de vésicules immédiatement disponible pour la sécrétion. Pour cela, il interagit avec les protéines Rim2 et Piccolo, impliquées dans le « docking » des vésicules (Ozaki et al. 2000). Enfin il impacterait sur la fermeture des canaux potassiques (G. Kang et al. 2006) en s'associant à Sur1, sous unité des canaux (Ozaki et al. 2000).

Parmi les effets direct de l'AMPc on peut noter sa capacité à augmenter le pool de RRP ainsi que la mobilisation des granules (Rorsman et al. 2003).

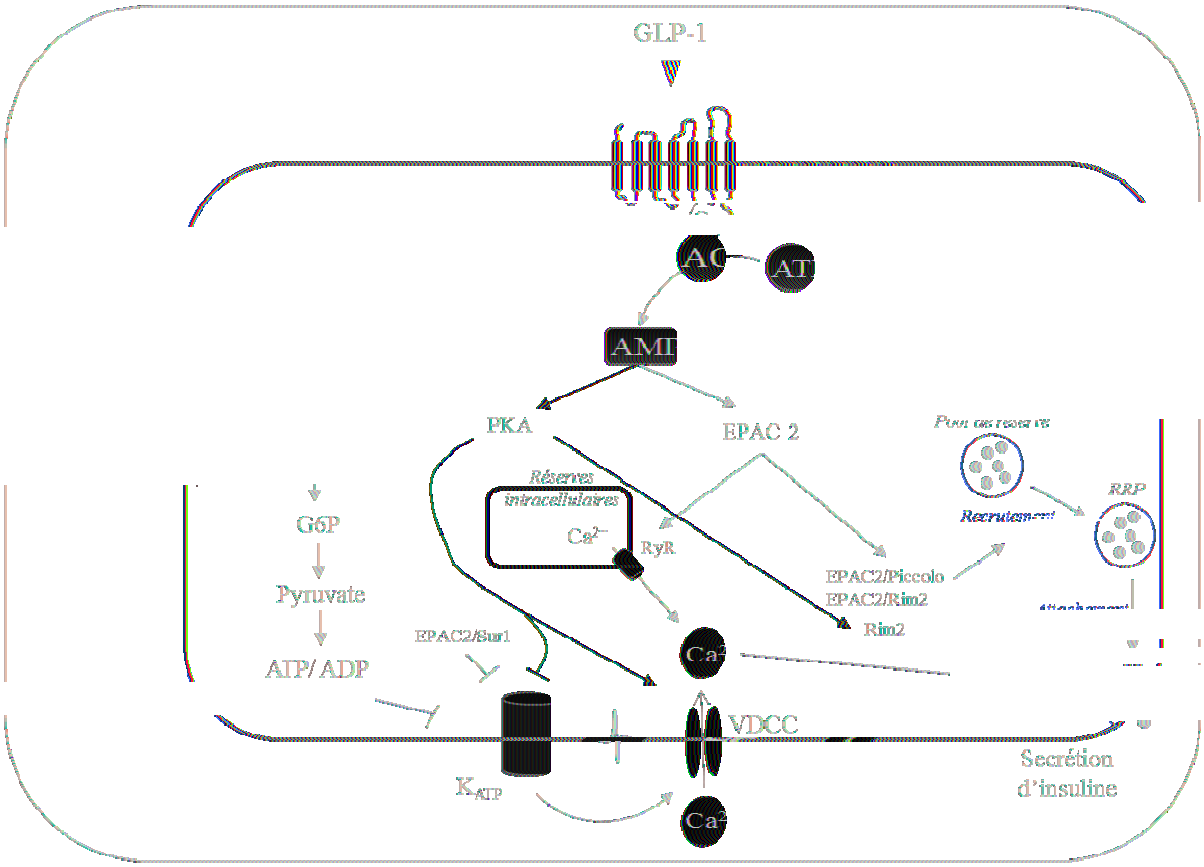


Figure 16 : Action du GLP-1 sur la fonction des cellules β ; la voie dépendante de la protéines G

La voie arrestine dépendante

Le récepteur GLP-1 peut également moduler la fonction des cellules β via la voie dépendante des β-arrestines. En effet il a été montré que le récepteur peut s'associer avec la β-arrestine 1 (Sonoda et al. 2008) et activer les phosphorylations de CREB et des kinases ERK1/2 (Sonoda et al. 2008) (Fig 17). L'invalidation de la protéine β-arrestine 1 induit une diminution de la phosphorylation de ces deux protéines ainsi qu'une diminution de l'expression d'IRS2, cible de CREB impliquée dans la croissance et la fonction β cellulaire. Cette étude met également en lumière l'implication de la β-arrestine 1 dans la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1 et cet effet serait dépendant de la production d'AMPc (Fig 17). Une étude récente du laboratoire, à laquelle j'ai participé, démontre également l'implication de la β-arrestine 2 dans la fonction de la cellule β puisque des souris invalidées pour la protéine se caractérisent par une intolérance au glucose et une diminution de la concentration plasmatique en insuline. Si la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est normale chez ces souris nous avons tout de même pu observer une diminution du contenu en insuline (Ravier et al. 2014).

2. Action sur la masse des cellules β

Le GLP-1 va agir sur la masse des cellules β en stimulant la prolifération et la néogénèse et en inhibant l'apoptose.

Action du GLP-1 dépendante des protéines G

Le GLP-1 peut stimuler la prolifération des cellules β via plusieurs mécanismes dépendant de l'activation de PKA comme par exemple la transcription du facteur Pdx-1 (Jhala et al. 2003). On peut citer aussi l'activation de la voie β-caténine/TCL2 (T-cell factor-like 2)/Wnt qui augmente l'expression de la cycline D1 (Liu et al. 2013; Loder et al. 2008). Cette dernière peut également être stimulé par la voie cAMP/PKA qui active la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP-responsive element binding protein) impliqué dans la survie et la prolifération des cellules β (M.-J. Kim et al. 2006). CREB va également médier la prolifération des cellules en stimulant l'expression d'IRS2 (Insuline receptor substrat 2) ce qui provoque l'activation de la voie PI3K/Akt impliquée dans la prolifération (Jhala et al. 2003). Le GLP-1 peut également activer cette voie via la transactivation du récepteur EGF dépendamment de Src (Buteau et al. 2003).

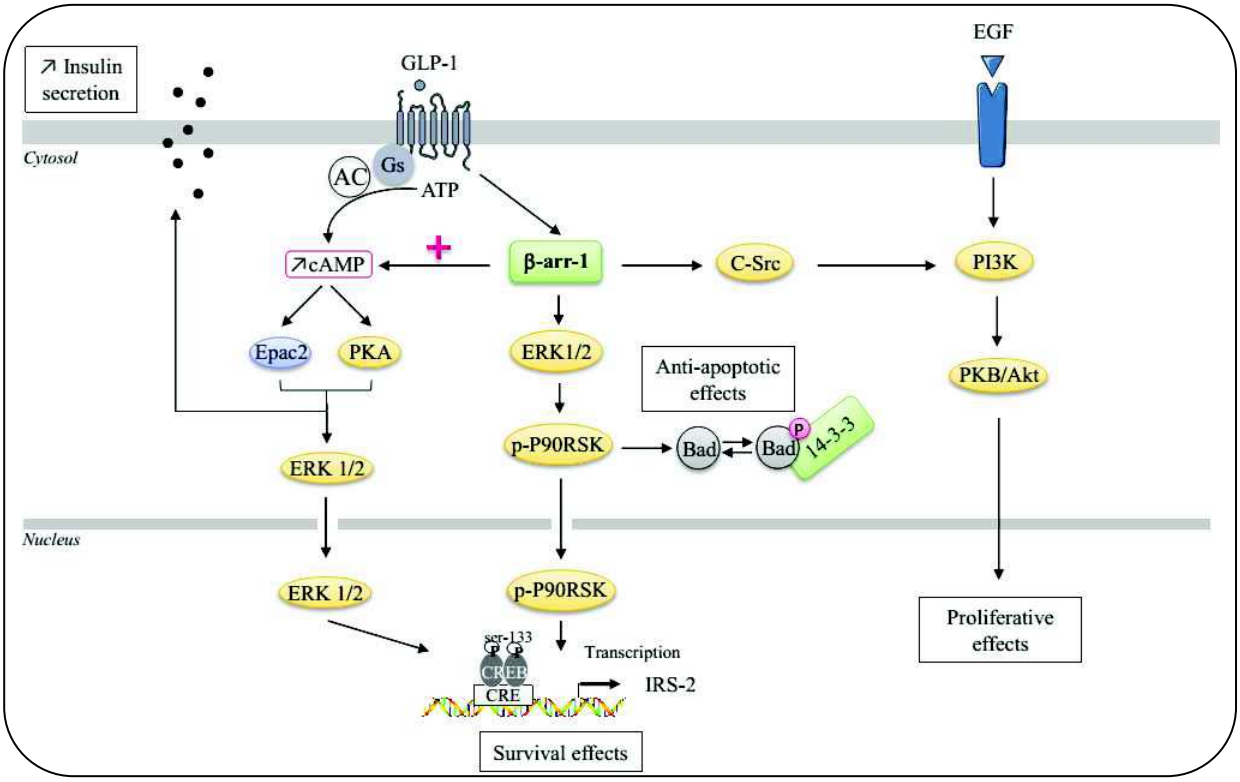


Figure 17 : Rôle de la β-arrestine 1 dans la signalisation du récepteur GLP-1.

Action du GLP-1 indépendante des protéines G

En plus des effets du GLP-1 médiés par la protéine, il peut agir via les β-arrestines. Il a par exemple été démontré dans une étude réalisée par (Talbot et al. 2012) que la β-arrestine 1 active le recrutement de Src provoquant la transactivation du récepteur à l'EGF et l'activation de la voie PI3K. De ce fait la β-arrestine 1 va médier l'action du GLP-1 sur la prolifération des cellules β. Une autre étude menée par le laboratoire a montré que la protéine est également impliquée dans les effets anti-apoptotiques du GLP-1 (Quoyer et al. 2010) (Fig 17). Elle va phosphoryler les kinases ERK1/2, qui vont à leur tour activer la protéine P90RSK de la famille des RSK (Ribosomal s6 kinase). Cette dernière phosphoryle la protéine pro-apoptotique bad en sérine 112 ayant pour conséquence sont inactivation par liaison à la protéine 14-3-3 (Fig 17). Une seconde étude réalisée par le laboratoire implique également la β-arrestine 2 dans la régulation de la masse des cellules β puisque les îlots de souris invalidées pour la β-arrestine 2 présentent une taille diminuée et moins de cellules β (Ravier et al. 2014).

Malgré les nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération des cellules β induites par le GLP-1, l'effet de l'hormone reste faible. En effet la cellule mettrait en place des mécanismes négatifs de régulation pour limiter l'action de celui-ci. Inhiber ces facteurs négatifs de régulation (comme le facteur DUSP14), favorise l'action du GLP-1 sur la prolifération des cellules β (Klinger et al. 2008).

Chapitre 3: Physiopathologie de la cellule β pancréatique

A. Introduction

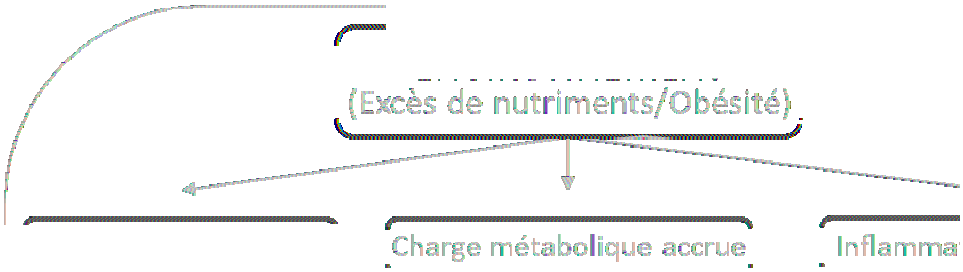
3. La cellule β dans le diabète

Comme décrit dans « l'avant-propos » de ce manuscrit, l'homéostasie glucidique est finement régulée. Un défaut de régulation persistant peut mener à l'apparition d'une hyperglycémie chronique caractéristique du diabète. Le diabète atteint des proportions de l'ordre de l'épidémie avec plus de 387 millions de personnes atteintes dans le monde en 2014. Il existe deux formes principales de diabètes: le diabète de type 1 (DT1) et le diabète de type 2 (DT2). Leur apparition est due à l'association de gènes de prédisposition et de facteurs environnementaux.

Le DT1 est une pathologie représentant 5 à 10% des cas de diabète. Il résulte de la destruction auto-immune massive de cellules β pancréatiques. On assiste alors à une déficience de la production et sécrétion d'hormone hypoglycémiante ne permettant plus le maintien de l'homéostasie glucidique. Des injections d'insuline sont alors la seule alternative médicale pour les patients atteints de DT1.

Le DT2 représente quant à lui 85 à 90% des cas de diabète et est considéré aujourd'hui comme une épidémie mondiale. C'est une pathologie métabolique qui résulte de l'interaction entre des facteurs génétiques et environnementaux. A l'heure actuelle, plus de 60 mutations génétiques ont été associées au DT2 dont la majorité code pour des protéines impliquées dans la signalisation des cellules β (Voight et al. 2010; Rosengren et al. 2012). L'hyperglycémie chronique, caractéristique du DT2 est provoquée par 2 évènements interdépendants : une résistance à l'insuline des tissus périphériques et un défaut de la fonction et de la masse des cellules sécrétant l'insuline que sont les cellules β. Dans des conditions physiologiques de demande accrue en insuline, les cellules β sont capables de s'adapter en augmentant leur fonction ainsi que leur masse, afin de palier à la demande : c'est le phénomène de compensation. Mais lors de conditions de résistance à l'insuline persistantes et de prédispositions génétiques ce phénomène laisse place à un épuisement

des cellules β, leurs fonctions ainsi que leur masses diminuées ne permettent plus de compenser, menant ainsi à une hyperglycémie chronique et à un diabète (Prentki et al. 2006). La sécrétion d'insuline peut être altérée à différentes étapes allant de la captation du glucose par les transporteurs GLUT, à l'exocytose des granules d'insuline. Une hyperglycémie prolongée peut par exemple inhiber l'expression de GLUT2, de la glucokinase et des VDCC (Weir et al. 2001). De plus certaines études ont observé une diminution de la masse plutôt qu'une diminution de la fonction des cellules. Deux équipes ont montré une diminution de la masse β pancréatique sur des pancréas de patients diabétiques de type 2 (Butler et al. 2003; Rahier et al. 2008). En parallèle une autre étude confirme une diminution de la masse que les îlots de pancréas de diabétiques associée à une diminution de la fonction et de l'expression de GLUT 1 et 2 ainsi que de la glucokinase (Del Guerra et al. 2005). Enfin une pancréatectomie de 50% sur l'Humain a montré une augmentaion de l'intolérance au glucose (Menge et al. 2008).



Figure

En plus de ces deux formes p
1 à 5 % des cas de diabète. Il
et les diabètes néonataux. L
causé par une mutation génic
des facteurs de transcription
PDX1, HNF-1β, et NeuroD1
glucokinase (22%). Le diabète
transitoire (DNNT) ou définitif

codant pour les protéines 6q ZAC, INS, Kir6.2 et SUR1, les deux dernières étant les sous-unités du canal potassique.

4. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose dans la cellule β

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée indispensable à l'organisation tissulaire au cours du développement et de la vie adulte. Mais en situation de stress cellulaire, ce processus peut également être impliqué dans la physiopathologie : c'est notamment le cas pour les cellules β dans le DT2. Ces cellules sont soumises à un ensemble de stimuli pro-apoptotiques qui gouvernent l'initiation de l'apoptose ayant pour effecteurs principaux les caspases. Bien que les mécanismes responsables de l'apoptose des cellules β dans le DT2 ne soient pas totalement élucidés, la communauté scientifique s'accorde sur les effets délétères de l'hyperglycémie chronique (ou glucotoxicité) (Rhodes 2005; Robertson 2004), de l'excès de lipides (ou lipotoxicité) (Poitout et al. 2008) et de la toxicité des cytokines pro-inflammatoires (Donath et al 2011) (Fig 18). De nombreuses études ont également démontré la toxicité de la protéine amyloïdogénique IAPP (Islet amyloid polypeptide) (ou protéotoxicité) (Haataja et al. 2008; Westermark and Westermark 2008; Costes et al. 2014)) revue dans (Halban et al. 2014).

Les caspases

La famille des caspases comprend 14 membres divisés en deux groupes : les caspases initiatrices (caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, et 12) et les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7, et 14). Synthétisées sous formes de précurseurs inactifs (les procaspases), elles sont activées par clivage et forment des hétérotétramères (Chowdhury, Tharakan, and Bhat 2008). Une fois les caspases initiatrices activées, elles vont cliver les caspases effectrices et les rendre actives. Ces dernières vont alors dégrader un certain nombre de substrats tels que la protéine PARP (Poly-ADP ribose polymerase), enzyme nucléaire impliquée dans la détection d'ADN endommagé et sa réparation (Fig 19)

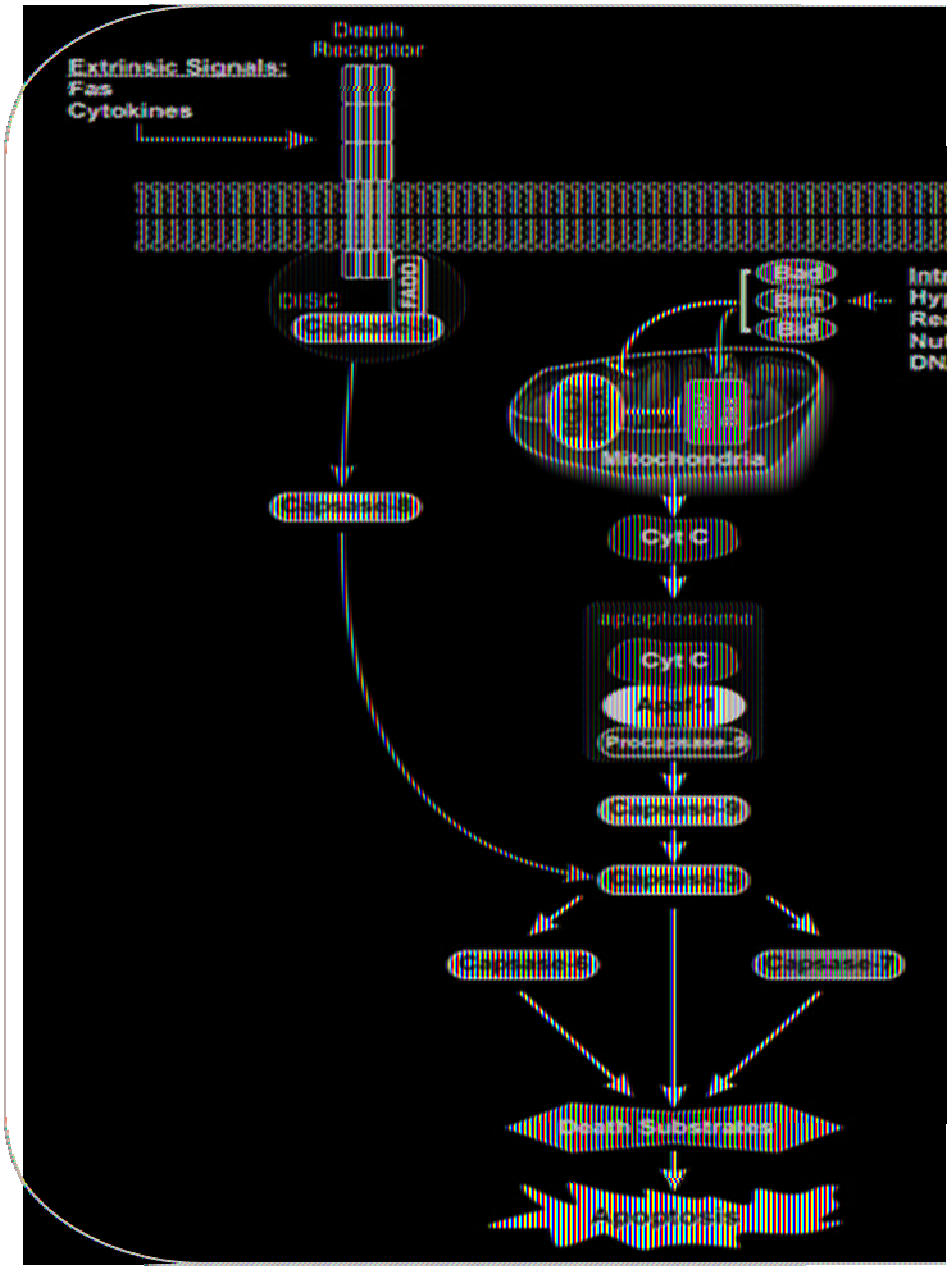
Les mécanismes intrinsèques

Le mécanisme d'apoptose intrinsèque est déclenché par une multitude de stress cellulaires comme les dommages à l'ADN, la déprivation en nutriments, le stress oxydatif ou le stress du réticulum endoplasmique. Les principaux régulateurs de cette voie d'apoptose sont les

membres de la famille BCL-2 (B cell lymphoma). Ils sont divisés en 2 groupes selon leur fonctionnalité : les protéines pro-apoptotiques et les protéines anti-apoptotiques. Les protéines pro-apoptotiques sont divisées en 2 sous-groupes, le groupe contenant un domaine BH regroupe les protéines Bak, Bax et Bok et le groupe contenant seulement un domaine BH3 regroupe entre autre Bim, Bad, Bid ou encore Bik (Strasser 2005). Les protéines anti-apoptotiques comprennent les membres Bcl-2, Bcl-xl ou Mcl-1. En conditions normales, les protéines pro-apoptotique sont inactives et les protéines anti-apoptotiques sont constitutivement actives au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (S.-L. Chan and Yu 2004). Lors d'un stimulus intrinsèque, les protéines pro-apoptotiques s'associent avec les protéines anti-apoptotiques et les inactivent. Elles forment ensuite des structures qui perméabilisent la membrane externe de la mitochondrie provoquant la perte du potentiel de membrane et la libération de protéines telles que le cytochrome C. Ce dernier forme alors un complexe appelé apoptosome avec les protéines Apaf-1, pro-caspase 9 et dATP qui active la caspase 3 et induit la mort cellulaire par apoptose (Boatright and Salvesen 2003) (Fig 19).

Les mécanismes extrinsèques

La mort cellulaire par apoptose peut également être déclenchée par des stimuli extracellulaires et être médiée par l'activation des récepteurs de mort, dont la super famille des récepteurs au TNF fait partie. La fixation du ligand induit la formation d'un complexe DISC (Death inducing signaling complex) à la membrane ainsi que le recrutement de la molécule adaptatrice FADD (Fas associated death domain) qui s'associe à la procaspase 8. Dans le complexe DISC, l'oligomérisation de la procaspase 8 déclenche son activation en caspase 8 et, sa libération du complexe afin d'activer à son tour d'autres caspases comme la caspase 3 revue dans (Lalaoui et al. 2015) (Fig 19)



Tiré de Emamaullee et al. 2006

Figure 19 : Schéma des voies intrinsèques et extrinsèques conduisant à l'activation de l'apoptose cellulaire.

D. Effets des glucocorticoïdes

1. Les glucocorticoïdes: généralités

a) Nature et régulation

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes dérivées du cholestérol. Leur synthèse et sécrétion par les glandes cortico-surrénales, sont régulées par l'axe HPA (hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien). En réponse au stress le cortex cérébral sécrète les catécholamines : adrénaline et noradrénaline. Elles agissent au niveau de l'hypothalamus en stimulant la sécrétion de CRH (Corticotrope releasing Hormone) encore appelé CRF (Corticolibérine). Celle-ci cible les cellules corticotropes de l'hypophyse qui synthétisent et sécrètent la POMC (pro-opiomelanocortin), précurseur de l'ACTH (Adrenocorticotrophic hormone). Cette dernière agit au niveau de la zone fasciculée du cortex surrénalien pour stimuler la sécrétion des glucocorticoïdes (Fig 20). Chez l'homme le seul glucocorticoïde est le cortisol et chez le rongeur, la corticostérone. La sécrétion de glucocorticoïdes est circadienne et est corrélée avec la sécrétion d'ACTH avec un taux sanguin maximal atteint au réveil. Toute variation chronique du taux de GCs amène à des pathologies telles que le syndrome de Cushing (augmentation) ou d'Addison (diminution) qui serons détaillés plus loin dans ce chapitre. Les GCs exercent un rétrocontrôle négatif sur leur propre sécrétion en agissant sur hypothalamus et l'hypophyse (Fig 20).

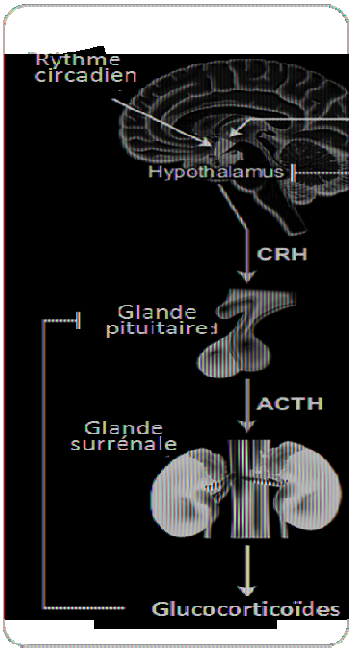


Figure 20 : Synthèse et sécrétion des glucocorticoïdes

b) Propriétés

Les GCs jouent un rôle physiologique essentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique en impactant sur le métabolisme glucidique, lipidique et protéique (McMahon et al. 1988; McKay et al. 2003). Ils stimulent la néoglucogenèse hépatique et stimulent l'action des hormones hyperglycémiantes sur les réserves de glycogène élevant ainsi la glycémie. Ils vont de plus inhiber l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux en impactant la signalisation insulinique. L'augmentation de la concentration de glucose sanguin est encore amplifiée par l'utilisation des triglycérides qui servira de substrat à la néoglucogenèse. Dans les muscles ils vont augmenter la protéolyse et diminuer la synthèse protéique augmentant ainsi la libération d'AA.

Utilisés à des doses supraphysiologiques, les GCs ont de nombreuses propriétés, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs et antiallergiques (Rafacho et al. 2014a) qui valent à leur récepteur d'être la plus importante cible thérapeutique avec le récepteur histamine H1 (Overington, Al-Lazikani, and Hopkins 2006). Les GCs sont, entre autre, prescrits dans le cas d'arthrose ou lors de greffe. En dermatologie, ils sont la thérapie la plus utilisée pour le traitement de l'eczéma. Enfin ils sont utilisés sous forme d'inhalation pour traiter l'asthme et les allergies.

Malgré la longue liste d'effets bénéfiques, une utilisation prolongée de fortes doses de GCs peut conduire à des effets néfastes. Dyslipidémie, hyperphagie, obésité et atrophie musculaire sont quelques-uns des troubles engendrés par une corticothérapie prolongée (respectivement Taskinen et al. 1983; Debons et al. 1986; Rockall et al. 2003; Prelovsek et al. 2006). Mais dans ce chapitre nous nous concentrerons uniquement sur les effets diabétogènes des GCs revu dans (Ortsater, Sjoholm, and Rafacho 2012; Van Raalte, Ouwens, and Diamant 2009; Rafacho, Ortsäter, et al. 2014b), sur leur mécanisme d'action et leur possible implication dans la signalisation GLP-1.

2. Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)

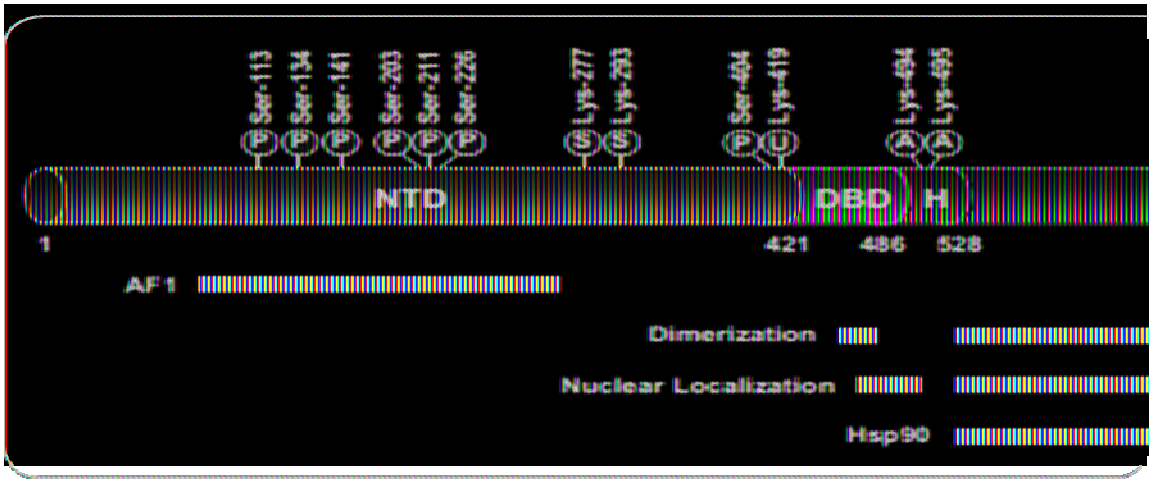
a) Structure

Le large spectre d'action des GCs est médié par le GR (Glucocorticoid receptor), facteur de transcription membre de la super famille des récepteurs nucléaires (Evans 1988). Ce récepteur ubiquitaire, essentiel à la survie (Cole et al. 1995), module la transcription de 10 à 20% du génome humain (Lu et al. 2007; Galon et al. 2002).

Le GR est une protéine modulaire composée de 4 domaines principaux (Kumar and Thompson 2005) :

- Le NTD (N-terminal transactivation domain). Il a une fonction d'activation de la transcription (AF1). Zone d'interaction avec les corégulateurs et la machinerie de transcription, c'est également le site principal de modifications post-traductionnelles.
- Le DBD (DNA-binding domain) en position centrale. Il contient 2 motifs en doigts de zinc qui reconnaissent et fixent les séquences d'ADN cibles du GR que sont les GRE (Glucocorticoid-responsive element) (Bledsoe et al. 2002). Il est également impliqué dans la dimérisation.
- Le LBD (Ligand-binding domain) en position C-terminale. Sa structure composée de 12 hélices α et de 4 feuillets β forme une poche hydrophobe pour la fixation des GCs. Dans ce domaine se situe également la deuxième fonction d'activation de la transcription (AF2).
- La région « hinge » pour charnière, région flexible séparant le DBD du LBD.

Les GRs possèdent des signaux de localisation nucléaire (NL1 et NL2) respectivement situés au niveau de la région DBD/hinge et du LBD.



Tiré de Oakley et al, 2013

Figure 21 : Structure générale du récepteur aux glucocorticoïdes et modifications post-traductionnelles.

b) Polymorphisme et modifications post traduction du GR

Le gène des GRs *NR3C1*, produit par épissage alternatif, 5 isoformes transcriptionnelles dont les deux principales sont les protéines GRα et GRβ. Leurs compositions sont identiques jusqu'à l'AA 727, puis diffèrent au niveau C-terminal ou l'isoforme GRα possède 50AA supplémentaire et l'isoforme GRβ seulement 15 (Oakley et al. 2011). Après la fixation des GCs, l'isoforme GRα, cytoplasmique, transloque dans le noyau ou elle exerce son action transcriptionnelle. L'isoforme GRβ quant à elle est constitutivement nucléaire et exerce elle-même une action d'inhibiteur dominant-négatif sur l'isoforme GRα sans fixation d'un agoniste. Cependant l'antagoniste RU486 ou Mifepristone peut s'y fixer et moduler son activité (Lewis-Tuffin et al. 2007). De trop fortes concentrations d'isoforme GRβ pourraient être impliquées dans le phénomène de résistance aux glucocorticoides. Ces deux isoformes transcriptionelles possèdent chacune 8 isoformes traductionnelles (Kino et al. 2009) qui ne seront pas développées ici.

Les deux isoformes GRα et GRβ peuvent subir des modifications post-traductionnelles revues dans (Oakley et al. 2013):

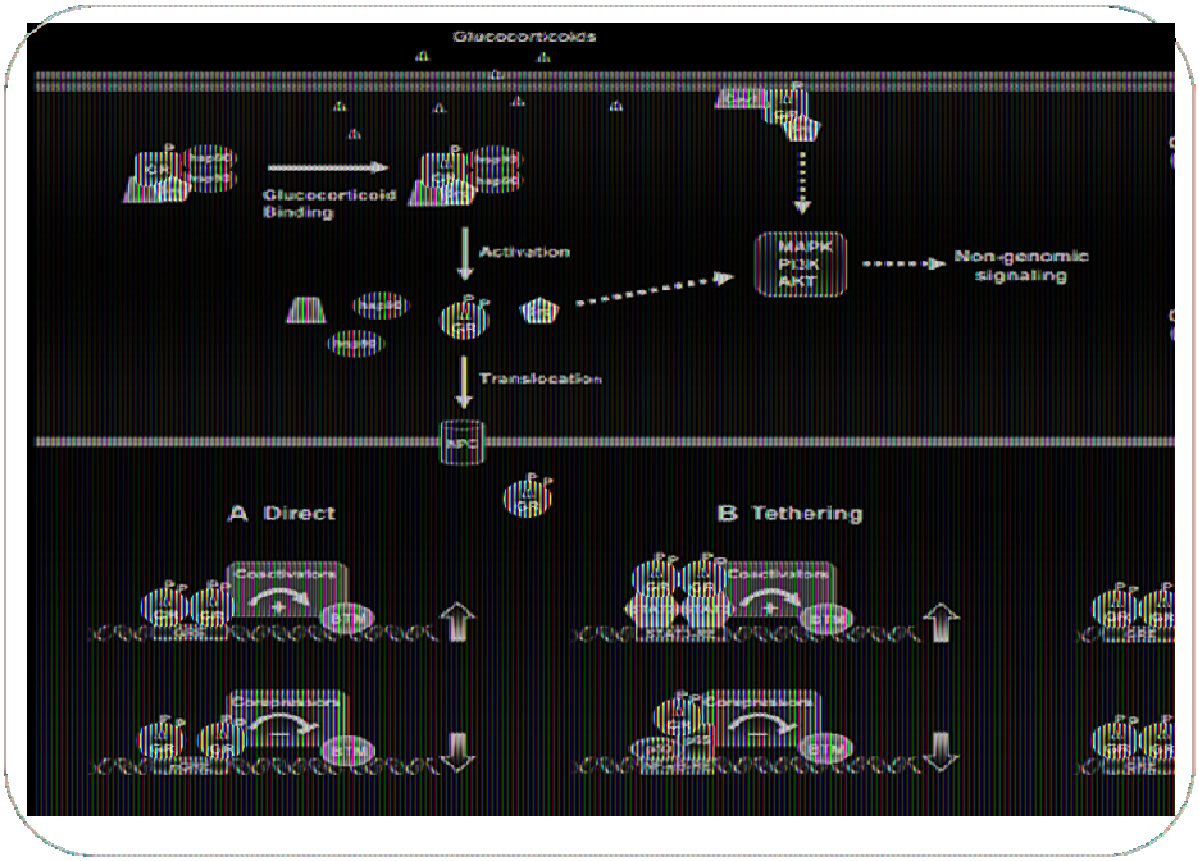
- La phosphorylation est la modification post-traductionnelle la plus étudiée : l'isoforme GRα est phosphorylée sur au moins 7 résidus sérine (Beck et al. 2009; Galliher-Beckley et al. 2009; Kumar et al. 2008). Ces phosphorylations peuvent moduler l'activité transcriptionnelle du GR (Webster et al. 1997) et tout défaut dans la phosphorylation pourrait induire des pathologies. Principalement situées dans le domaine AF1, les phosphorylations pourraient jouer sur le recrutement de cofacteurs (W. Chen et al. 2008; Galliher-Beckley et al. 2008). De plus la phosphorylation interviendrait dans la localisation du GR ainsi que dans sa dégradation.
- Les GRs peuvent subir d'autres modifications post-traductionnelles comme l'ubiquitination qui jouerait un rôle dans la répression de leur activité transcriptionnelle (Deroo et al. 2002). Ces récepteurs peuvent également être sumoylés ce qui modulerait leur activité (Holmstrom et al 2003; Holmstrom et al. 2008; Druker et al. 2013). Enfin l'acétylation serait impliquée plus spécifiquement

dans la diminution de l'action inhibitrice des GCs sur NFκB (Charmandari et al. 2011).

3. Mécanismes d'action des GCs

Sécrétés dans la circulation systémique, les GCs existent sous 2 formes : le cortisol (ou corticostérone chez le rongeur) qui est majoritairement lié à la protéine CBG (Corticosteroid binding globulin) (Breuner and Orchinik 2002) et la cortisone (ou DHC (Dehydrocorticostérone) chez le rongeur), forme inactive principalement libre. Contrairement au cortisol, les glucocorticoïdes de synthèse utilisés en thérapeutique circulent non-liés à la CBG. La forme active du cortisol, c'est-à-dire libérée de la CBG, diffuse passivement au travers de la membrane plasmique pour fixer son récepteur. Une fois dans la cellule, la biodisponibilité du cortisol (et non des peptides synthétiques) est contrôlée par 2 enzymes. La 11β-HSD2 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2) oxyde le cortisol en cortisone (métabolite inactif), la 11β-HSD1 (11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1) ayant une action inverse. A l'état inactif, le GR est essentiellement cytoplasmique et est associé à plusieurs protéines telles que des protéines chaperonnes (hsp90, hsp70 et p23) ou des immunophilines de la famille des FK506 (FKBP51 et FKBP52) (Grad and Picard 2007; Pratt and Toft 1997). Cette conformation assure une haute affinité du récepteur pour son ligand. La fixation du ligand sur son récepteur déclenche la dissociation du complexe protéique libérant ainsi les 2 signaux de translocation nucléaire du GR, l'ensemble transloque alors dans le noyau (Fig 22).

On notera que le cortisol peut également lier le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) avec une affinité comparable à celle du GR. Cependant dans les cellules cibles possédant le MR, l'enzyme 11β-HSD2 empêche une activation excessive du récepteur en inactivant le cortisol. Les GCs de synthèse ont par contre une très faible affinité pour le MR. Récepteur nucléaire, il partage de nombreuses homologies structurales et fonctionnelles avec le GR.



Tiré de Oakley et al. 2013

Figure 22 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

a) Les effets génomiques

Une fois dans le noyau le GR peut réguler l'expression des gènes selon 3 voies (Fig 22):

La voie directe

La voie directe est caractérisée, comme son nom l'indique, par la fixation directe du GR sur les séquences d'ADN du gène cible GRE qui peuvent être de 3 types:

- **GRE « simple »** : Deux GR homodimérisés se fixent sur une séquence consensus GRE GGAACAnnnTGTTCT. Les récepteurs sont chacun situés sur une moitié (6 paires de bases) de ce palindrome imparfait et sont séparés par 3 nucléotides $(n)_3$. De cette manière le GR stimule la transcription de gènes cibles tels que β-arrestine 1 (Oakley et al. 2012), SGK1 (Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1)(Itani et al. 2002) ou GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) (Wang et al. 2004) via le recrutement de coactivateurs et de complexes de remodelage de la chromatine (Oakley et al. 2011).
- **nGRE « simple »** : Deux récepteurs, non dimérisés, se fixe sur une seconde séquence consensus appelée nGRE (negative glucocorticoid-responsive element) CTCC$(n)_{0\text{-}2}$GGAGA. Cette fois-ci le recrutement de corépresseurs et d'histones déacétylase induit une répression de gènes cibles tels que β-arrestine 2 (Oakley et al. 2012) ou l'ostéocalcine (Barnes 2011).
- **GRE « composite »** : dans ce cas le GR, fixé sur le GRE, interagit avec des facteurs de transcription de proximité eux-mêmes lié à l'ADN.

La voie indirecte ou « tethering » GRE

En absence de séquence cible le GR se fixe sur des facteurs de transcription, eux-mêmes liés à l'ADN (Oakley et al. 2011). L'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes dans l'asthme par exemple est médiée par cette voie. Le GR va agir entre autre sur les facteurs de transcription NFκB ou AP-1 (Activator protein-1).

b) Les effets non-génomiques

Les effets génomiques arrivent après quelques heures de traitement aux GCs. Il a été mis en évidence l'existence d'effets intervenant quelques secondes à quelques minutes après le

début du traitement : ce sont les effets non-génomiques. La dissociation du complexe dont le GR fait partie lors de son état non-lié libère des protéines qui vont pouvoir médier les effets non-génomiques des GCs. Ils peuvent avoir une action sur les voies de signalisation impliquant MAPKs, PKB ou PI3K. Libéré de son complexe formé avec le GR, la protéine c-Src active des kinases (dont PI3K et ERK1/2) qui phosphorylent l'annexine 1, diminuant l'activité de la phospholipase A2 et impacte négativement sur la sécrétion d'acide arachidonique (Croxtall et al 2000; Solito et al. 2003).

Enfin les GCs peuvent altérer les propriétés physico-chimiques des membranes plasmiques en se liant aux phospholipides les composants. Ils pourraient entre autre altérer la fluidité membranaire ou le transport ionique. Il faut noter que les concentrations de GCs utilisées doivent être élevées (3-10 mg/kg contre 1 mg/kg dans la majorité des études in vivo de la littérature). Ces effets ne sont alors pas médiés par le GR et sont qualifiés d'effets aspécifiques.

4. Les effets diabétogènes d'un traitement chronique aux GCs

a) Observations cliniques : mise en évidence des effets diabétogènes

Le diabète cortico-induit est une forme particulière d'intolérance au glucose qui survient lorsque le taux de GCs est anormalement élevé. Ce phénomène peut être due à une production endogène augmentée de GCs soit causée par une tumeur de la glande pituitaire (80-85% des syndromes de Cushing) soit par un dérèglement de l'axe HPA (syndrome de cushing sous-clinique). Mais le plus souvent une corticothérapie chronique est en cause.

Le syndrome de Cushing

Les patients atteints du syndrome de Cushing partagent un phénotype similaire à celui des patients atteints de syndrome métabolique (Anagnostis et al. 2009). En effet les patients développent une prise de poids rapide, souffrent d'hypertension, de résistance à l'insuline ainsi que d'une hyperglycémie. De plus une étude menée par (Biering et al. 2000) montre que 32% de patients atteint du syndrome de Cushing développent un diabète.

Le syndrome de Cushing sous-clinique

Dans ce syndrome les patients ont également un taux élevé de GCs mais sans développer d'effets métaboliques comme c'est le cas pour le syndrome de Cushing. Une récente étude de (Di Dalmazi, Vicennati, et al. 2012) sur des patients classés en deux groupes, selon leur taux de cortisol après injection de dexaméthazone, a permis de montrer que les patients appartenant au premier groupe (corticol >138nM) ont développé plus de diabète, d'ostéoporose et de maladie cardiaque que les patients du second groupe (cortisol<50nM).

Les corticothérapies

Il existe des corticothérapies dispensants de faibles dose de glucocorticoides de synthèse (< 7.5mg / jour). Ce traitement induit des corticolémies comparables à des valeurs « normales » non pathologiques. Dans ce cas le développement du diabète n'est que rarement observé (van der Goes et al. 2010). L'administration chronique de doses plus fortes (>30mg / jour) amène plus d'effets indésirables. Une étude réalisée sur des patients traités à la prednisolone pour des rhumatismes a montré que plus de 80% des patients ont une hémoglobine glyquée (HbA1c) supérieure à la normale (HbA1c=48 mM) selon l'IFCC (International federation of clinical chemistry). Chez 23% de ces patients l'HbA1c dépassent 57mmol/mol, valeur considérée comme facteur de risque important pour le développement du DT2 (Origuchi et al. 2011). La fonction des cellules β a également été analysée lors de plusieurs études cliniques réalisées chez des patients sains (Raalte et al. 2010; Kalhan and Adam 1975) en réponse à un traitement ponctuel (1 jour) ou chronique (2 semaines) à la prednisolone chez des patients sains (Raalte et al. 2010). Cette étude révèle que les 2 types de traitements affectent la fonction cellulaire β incluant la sensibilité au glucose ou le rapport $AUC_{c\text{-}pep}/AUC_{gluc}$ (Area under curve). Ce paramètre représente le rapport entre la concentration de c-peptide (équivalente à celle de l'insuline) et la glycémie. Dans cette étude l'augmentation de la glycémie observée chez les patients n'est pas corrigée par une augmentation de sécrétion d'insuline démontrant un défaut de fonction de la cellule β. Enfin les GCs administrés sous forme d'inhalation pour le traitement de l'asthme sont également à considérés comme facteurs de risque pour le développement du DT2 même si les résultats d'études sont moins tranchés que pour l'administration orale de GCs. Une étude de Suissa et al. (2010) montre une légère augmentation du risque de développement de DT2 tandis que

d'autres études ne montrent pas de résultats significatifs (Dendukuri et al. 2002; O'Byrne et al. 2012).

Pour exercer leurs effets diabétogènes les GCs vont agir sur 2 processus importants dans le développement du DT2 : en induisant ou aggravant la résistance des tissus cibles à l'insuline et en impactant négativement sur les cellules productrices de l'hormone hypoglycémiante que sont les cellules β pancréatiques.

b) Effets moléculaires de l'insulinorésistance cortico-induite au niveau des tissus périphériques

L'ensemble des résultats de la littérature présentés ici sont issus d'études *in vivo* réalisées chez le rat traité chroniquement (5-11 jours) à des doses équivalentes de déxaméthasone (1-1.5mg/kg). Tout d'abord une diminution de l'assimilation du glucose dépendante de l'insuline est observée dans le muscle et le tissu adipeux (Ishizuka et al. 1997; Sakoda et al. 2000; Burén et al. 2002). Une étude de (Caro et al. 1982) montre une diminution de l'expression du récepteur à l'insuline dans les hépatocytes. De plus une réduction de la liaison de l'insuline à son récepteur est observée dans les hépatocytes (50 à 70%) et les adipocytes (45 à 50%) (Olefsky et al. 1975). Mais la signalisation post-récepteur est également atteinte puisqu'une diminution de la phosphorylation en tyrosine du récepteur ainsi que d'IRS1 est observée dans le foie de rats traités ainsi que l'interaction IRS1/PI3K induite par l'insuline dans le muscle squelettique (Saad et al. 1993). Ces résultats *in vivo* sont confirmés par des études *in vitro*. Des adipocytes et myocytes cultivés en présence de déxaméthasone montrent une diminution de l'assimilation du glucose due à un impact sur la signalisation insulinique ou l'expression du transporteur du glucose (Ishizuka et al. 1997; Sakoda et al. 2000; Burén et al. 2002).

c) Effet sur le pancréas endocrine

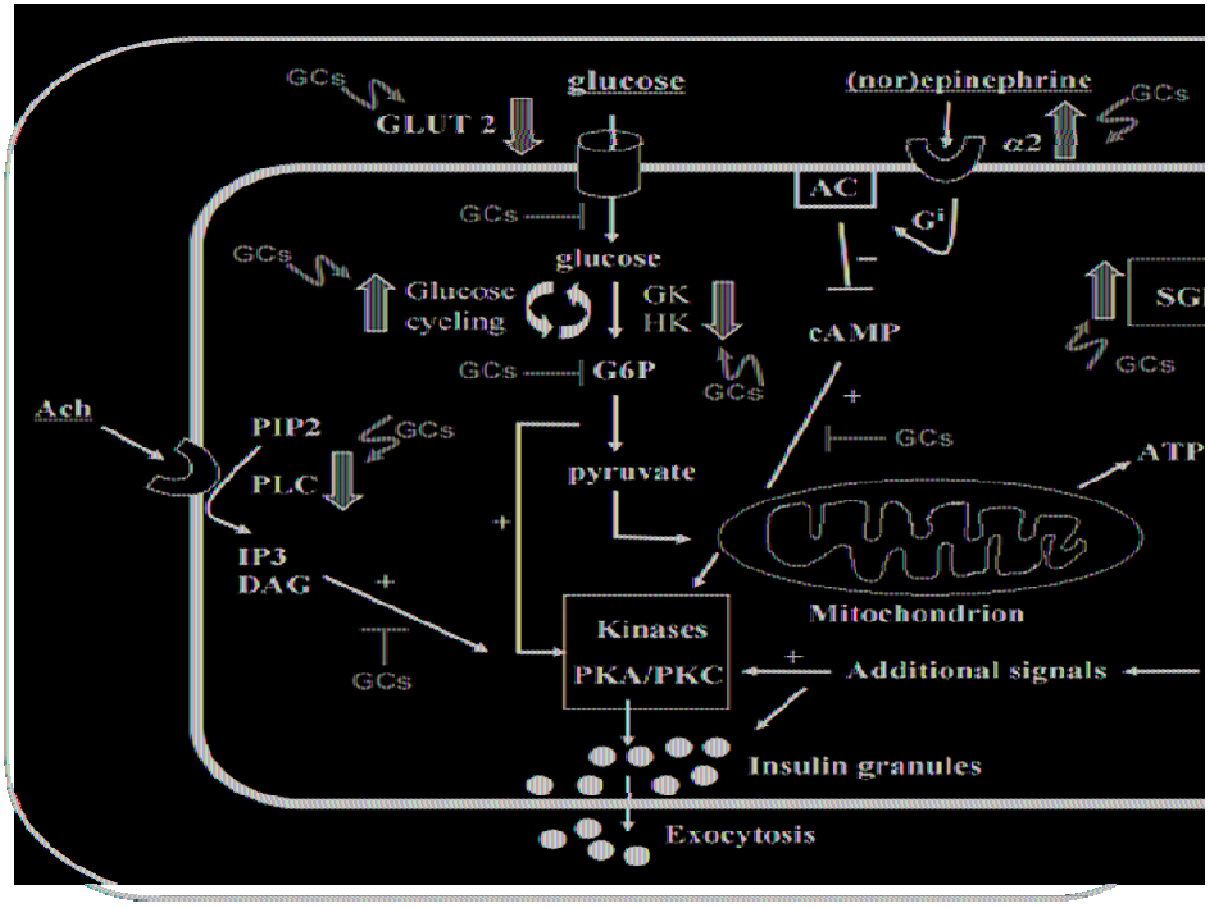
Les GCs peuvent être responsables de l'induction d'hyperglycémie en induisant l'insulino-résistance des tissus cibles mais aussi en impactant sur les cellules productrices d'insuline, les cellules β (revue dans Van Raalte et al. 2009).

(1) Impact sur la fonction sécrétrice de la cellule β

De nombreuses études ont mis en évidence l'effet des GCs sur la sécrétion d'insuline des cellules β matures (Brunstedt and Nielsen 1981; Lambillotte, Gilon, and Henquin 1997) et des cellules en cours de développement (B. Valtat et al. 2011). Ils ont tout d'abord des effets sur le métabolisme du glucose puisque les niveaux d'expression de GLUT2 (Gremlich, Roduit, and Thorens 1997; Ogawa et al. 1992) et de la glucokinase (Borboni et al. 1996) sont diminués par un traitement GCs. Ces effets ont pour conséquence de diminuer la synthèse d'ATP et donc limite la fermeture des canaux potassiques et la dépolarisation de la membrane, bloquant ainsi l'influx de calcium.

Les glucocorticoïdes modifient également les changements de concentrations calciques. En effet, dans des cellules « normales », l'augmentation de glucose dans la cellule induit une réponse en trois phases : tout d'abord une légère diminution de la concentration cytoplasmique de calcium, puis une augmentation rapide et transitoire suivie par des oscillations. Dans les îlots de souris traités aux glucocorticoïdes, des changements sont observés et 2 paternes de réponses apparaissent. Le premier voit sa seconde phase soutenue suivie par des oscillations d'amplitudes supérieures et de fréquence diminuée, le deuxième paterne a également la seconde phase soutenue et est suivie par de courtes et rapides oscillations. La concentration moyenne en calcium intracellulaire se trouve alors légèrement diminuée. Cependant la concentration de calcium à l'état basal n'est pas modifiée par le traitement et aucune désynchronisation n'est observé entre les îlots traités (Lambillotte, Gilon, and Henquin 1997).

Mais les GCs peuvent aussi avoir des effets sur la sécrétion d'insuline autres que sur la voie déclenchante. En effet, en augmentant l'expression de la protéine SGK1 (Serum and Glucocorticoid inducible kinase 1), ils vont potentialiser l'action des canaux $K_v1.5$ induisant une repolarisation de la membrane et une diminution de la fonction sécrétoire (Ullrich et al. 2005). Ils peuvent également agir négativement sur le récepteur adrénergique α2 ce qui diminue la production d'AMPc et l'activité de la PKA sur la sécrétion d'insuline (Hamamdzic et al. 1995).



Tiré de Van Raalte et al. 2009

Figure 23 : Rôles des GCs dans la fonction des cellules β pancréatiques

(2) Impact sur masse des cellules β

Une étude *in vivo* montre qu'un traitement de 5 jours à l'hydrocortisone sur des rats augmente la masse des cellules β (tant en augmentant le nombre d'îlots que leur taille mais sans signe d'hyperplasie des cellules β). Une multiplication par plus de 6 fois de la prolifération des cellules β dans l'îlot est observée et il en découle une augmentation de 28% de la masse de cellules β dans l'îlot (Jörns et al. 2010). Il a de plus été mesuré une induction de facteurs prolifératifs ou oncogéniques tels que TGF-β et H-ras (Roma et al. 2012). Il semblerait que ces effets surviennent dans les premiers temps de traitement pour palier des effets hyperglycémiques et compenser l'insulinorésistance cortico-induite. Lorsque le traitement se prolonge on assiste alors à une phase ou les effets apoptotiques des GCs s'ajoutent aux effets prolifératifs (Jörns et al. 2010). Plusieurs voies menant à la mort des cellules β sont induites et/ou amplifiées par les GCs revue dans Rojas et al. (2015). Les GCs, dans la lignée de cellules β pancréatiques INS-1, augmentent l'expression de facteurs pro-apoptotiques comme Bax, et diminuent au contraire celle de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ainsi que la phosphorylation de BAD (Ranta et al. 2006). Ces effets sont médiés par le GRs mais peuvent en partie être provoqués par la libération de HSP90 lors de la liaison du GC sur son récepteur. HSP90 active PP2B (Protein-phosphatase 2B), lequel déphosphoryle BAD (Ranta et al. 2006). L'inhibition de PKB par les GCs ainsi que l'augmentation de l'expression, la phosphorylation et la localisation nucléaire de FOXO1 (protéine pro-apoptotiques) font partie des voies induisant l'apoptose dans la cellule β (Kaiser et al. 2013). En se fixant sur leurs récepteurs les GCs peuvent également activer la voie JNK et p38 (Fransson et al. 2014). L'activation de ces voies pourrait mener à l'augmentation du niveau de ROS (Reactive oxygen species) et à l'induction d'un stress oxydatif cellulaire. Les GCs ont également un rôle négatif dans le développement des cellules β chez le foetus. En effet une étude réalisée sur des souris en gestation, a montré qu'un régime réduite en nutriment induisait une élévation du taux de cortisole chez la mère. Ils observent que les foetus présentent également une augmentation de cortisol corrélée à une diminution de l'expression de gènes essentiels à la fonctions des cellule β comme *Pdx1, Pax6, Kir6.2, Sur1* ou encore *Glut2* et *Gk* (B. Valtat et al. 2011). De plus une diminution de la masse cellulaire β de 50% est observée chez les nouveaux-nés (Valtat et al. 2011). Plus tard il a été montré que

les effets négatifs des GCs sur les cellules β sont liés à la surexpression du corégulateur des GRs, PGC-1α (proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 α) (Valtat et al. 2013).

Même si dans cette thèse nous nous concentrons sur les effets des GCs sur la cellule β pancréatique, il faut savoir qu'ils peuvent avoir un effet sur les autres cellules de l'îlot comme par la cellule α. Durant le développement, le nombre de cellules α est diminué chez des fœtus dont la femelle rat gestante est traitée aux GCs (Dumortier et al. 2011). Ces effets sont inverses aux effets observés à l'âge adulte ou des rats traités à la déxaméthasone (1mg/kg) pendant 5 jours montrent une augmentation de 50% de leur masse de cellules α (Rafacho et al. 2014). En conséquence une hyperglucagonémie est également observée chez ces animaux. Ces résultats sont confirmés chez l'Homme où la majorité des études cliniques montrent une augmentation de la fonction des cellules α sous traitement GCs de synthèse (Marco et al. 1973; Wise et al. 1973; Van Raalte et al. 2013) même si certaines n'ont pas observé d'effets (Larsson et al. 1999). Les GCs ont aussi des effets sur les cellules δ sécrétrices de somatostatine, qui selon les modèles ou les traitements utilisés, donnent des résultats contradictoires. Certaines études démontrent une augmentation d'expression de somatostatine dans le pancréas après traitement in vivo (Papachristou et al. 1994). Selon les doses utilisées in vitro le résultat peut être identique (pour de faibles doses : 10^{-10}M) ou inverse (pour de plus fortes doses : 10^{-5}/10^{-8}M) (Papachristou et al. 1994).

d) GCs et GLP-1 en clinique

Une étude comparative des effets du GLP-1 sur la glycémie à jeun de patients atteints du syndrome de Cushing (ayant développés un diabète) et de patients atteints de diabète de type 2 "classique" a été menée par (Ritzel et al. 2007). Il ne ressort de cette étude aucune différence de stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β, ni d'inhibition de la sécrétion de glucagon par les cellules α. Cependant une étude récente a été réalisée sur des patients sains pré-diabétiques de type 2, glucotolérants. Après un traitement à la déxaméthasone, la réponse insulinique au GLP-1 a été mesurée et il apparait que la première phase de réponse n'est pas modifiée cependant la seconde est réduite sans modifier la réponse sécrétoire maximale des cellules β , mesurée après une infusion d'arginine (Eriksen et al. 2015). Ce résultat suggère donc que seuls les effets insulinotropes des hormones incrétines sont diminués. Mais cette diminution de l'effet du GLP-1 est-elle

due à un défaut des voies de signalisation induite par l'activation du récepteur dans les cellules β ou à un défaut de sécrétion de GLP-1 par les cellules L intestinales. En effet 2 études réalisées *in vitro* sur une lignée de cellules L et *in vivo* sur des souris traitées à la dexaméthasone révèlent une diminution de la production de GLP-1 induisant une diminution de la concentration de GLP-1 circulant (Sato et al. 2015a; Kappe et al. 2015). Aucune étude moléculaire n'a pour le moment été menée pour définir l'impact des GCs sur la signalisation du récepteur GLP-1 dans la cellules β pancréatique.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS

Le diabète de type 2 se caractérise entre autre par une diminution de la masse fonctionnelle β pancréatique. En plus de la glucolipotoxicité ou encore de l'inflammation qui participent à une altération de la masse fonctionnelle des cellules β, on peut ajouter les glucocorticoïdes. Le récepteur GLP-1 est une cible thérapeutique majeure dans le traitement du diabète de type 2 notamment grâce à son action positive sur la masse et la fonction des cellules β. Cependant certains patients ne répondent plus ou pas à ce type de traitement. Comprendre plus précisément les mécanismes d'activation mais aussi de désensibilisation du récepteur GLP-1 est donc d'une grande importance.

L'objectif principal de mon projet de thèse a été de mieux comprendre les voies de signalisation activées par la fixation du GLP-1 sur son récepteur qu'elles soient dépendante des protéines G ou des β-arrestines. Mais aussi l'impact du trafficking du récepteur sur son activation.

Partie 1 : Si les effets délétères des glucocorticoïdes sur les cellules β sont relativement bien caractérisés, leurs effets sur la signalisation GLP-1 est peu connue. Dans ce contexte, la première partie de ce travail de thèse a été consacré à l'étude des effets d'un traitement aux glucocorticoïdes sur la signalisation et le trafficking du récepteur GLP-1 avec pour objectifs spécifiques de définir l'impact des glucocorticoïdes sur :

1. La fonction des cellules β pancréatiques dépendante de l'activation du récepteur GLP-1
2. La production d'AMPc induite par l'activation du récepteur GLP-1
3. L'expression et la répartition du récepteur GLP-1

Partie 2 : Dans une seconde partie nous avons porté notre attention sur les protéines susceptibles d'être impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation du récepteur GLP-1 dans les cellules β pancréatiques en étudiant :

1. L'impact des glucocorticoïdes sur l'expression de ces protéines.
2. Le rôle de ces protéines dans la production d'AMPc induite par le GLP-1.

RESULTATS

Partie 1 : augmentation de l'expression membranaire du recepteur glp-1 et de sa signalisation suite a un traitement aux glucocorticoïdes

Article : Enhancement of GLP-1 receptor cell-surface expression and $G\alpha_s$ signaling in pancreatic β-cells following glucocorticoid treatment

Morgane Roussel[1], Gyslaine Bertrand[1], Julia Mathieu[1,3], Fabienne Charrier-Savournin[3], Eric Trinquet[3], Magalie Ravier[1], and Stéphane Dalle[1,2]

A. Contexte scientifique et objectifs

Le récepteur GLP-1 est une des cibles thérapeutiques majeures dans le traitement du diabète de type 2 appartenant à la classe B de la super famille des RCPGs (Mayo et al. 2003b). Via son récepteur, le GLP-1 protège la fonction et la masse des cellules β pancréatiques exposées à un environnement diabétogène comprenant entre autre des excès de lipides, glucides et cytokines inflammatoires. Ce récepteur couplé à la protéine $G\alpha_s$, active l'AC responsable de la synthèse du messager secondaire, l'AMPc. L'augmentation de la concentration intracellulaire de ce dernier active deux effecteurs : PKA et EPAC2. Par l'intermédiaire de certaines kinases telles que ERK1/2 ou PI3K et de facteurs de transcription comme CREB, PKA et EPAC2 vont activer des programmes moléculaires régulant la survie, la fonction et même la prolifération des cellules β. Le récepteur GLP-1 peut également activer une voie dépendante de la β-arrestine 1 qui participe au moins aux anti-apoptotiques du GLP-1.

Les GCs jouent un rôle physiologique essentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique en modulant les métabolismes glucidiques, lipidiques et protéiques. Il agissent via le récepteur GR, qui se comporte comme un facteur de transcription membre de la super famille des récepteurs nucléaires (Evans 1988). En thérapeutique, le GR est l'une des cibles les plus utilisées car les GCs possèdent de nombreuses propriétés aussi bien anti-inflammatoire, qu'immunosuppresseur ou antiallergique. Néanmoins, malgré la liste importante de ces effets bénéfiques, un traitement chronique avec de fortes doses de GCs peut avoir des effets diabétogènes y compris sur la cellule β pancréatique. Si des études cliniques montrent que les GCs pourraient également moduler l'action du GLP-1 sur ces cellules, aucunes données moléculaires ne sont actuellement connues. Dans cette première étude nous nous sommes justement intéressés à l'impact d'un traitement aux GCs sur la signalisation induite par la fixation du GLP-1 sur son récepteur.

B. Resutats principaux

Malgré une diminution des effets du glucose sur l'activation des kinases ERK1/2 et sur la fonction cellulaire β après un traitement à la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse), les effets du GLP-1 sur ces mêmes paramètres sont préservés dans la lignée cellulaire INS-1E. Ces résultats sont associés à une augmentation du couplage du récepteur GLP-1 avec la protéine $G\alpha_{s,}$ puisque nous observons une augmentation de la production d'AMPc induite par le peptide dans la lignée de cellules INS-1E et dans des îlots de souris. Ces effets sont bloqués par l'utilisation d'un antagoniste du récepteur GR, le RU486, confirmant que les actions des GCs sont médiées par le récepteur GR. Nous montrons également que la production d'AMPc induite par la forskoline (un activateur direct de l'AC) ou par le glucagon n'est pas modulée par les GCs. Enfin, le traitement à la dexaméthasone induit un changement dans la distribution subcellulaire du récepteur GLP-1 puisque nous avons observé un enrichissement à la membrane du récepteur.

Enhancement of GLP-1 receptor cell-surface expression and $G\alpha_s$ signaling in pancreatic β-cells following glucocorticoid treatment

Morgane Roussel[1], Gyslaine Bertrand[1], Julia Mathieu[1,3], Fabienne Charrier-Savournin[3], Eric Trinquet[3], Magalie Ravier[1], and Stéphane Dalle[1,2]

From: [1]INSERM U1191, Institute of Functional Genomic (IGF), CNRS UMR5203, Montpellier University, 34000 Montpellier, France; [2]Department of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition, University Hospital of Montpellier, 34000 Montpellier, France; [3] Cisbio Bioassays, BP 84175 Parc Marcel Boiteux, 30200 Codolet, France

Address correspondence to:
Stéphane Dalle PhD
Institut de Génomique Fonctionnelle
INSERM U1191, CNRS UMR5203, Université de Montpellier
141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France
E-mail: stephane.dalle@igf.cnrs.fr
Tel: + 33 4 34 35 92 03
Fax: + 33 4 67 54 24 32

Count of words, figures and references:
Abstract: 250
Text: (Introduction, Materials/Methods, Results, Discussion)
Figures: 5
Online supplemental Material: Figures: 0

ABSTRACT

Deciphering the behavior of the signaling pathways linked to activated GLP-1 receptor (GLP-1R) within β-cells is of importance. Here, we studied whether glucocorticoids may regulate GLP-1 actions in β-cells, in addition to its adverse effects on β-cell function. We report that while exposure of β-cells to glucocorticoids (dexamethasone, 100 nM, 24 h) decreased glucose effects, it did not impair insulin secretion and ERK1/2 phosphorylation/activation in response to GLP-1. This was associated with an enhancement of $G\alpha_s$-associated signaling by the GLP-1R, as a 2.5-fold enhanced cAMP production in response to GLP-1 (20 nM, 20 min) was observed in glucocorticoid-treated β-cells. Glucocorticoid effects were mediated through the nuclear glucocorticoid receptor (GR), as determined by using a GR antagonist (RU-486, 1 μM). In contrast, the cAMP production induced by an adenylyl cyclase activator (forskolin, 100 nM, 20 min), or by glucagon (20 nM, 20 min) were not modified by the glucocorticoid exposure. This specific enhancement of cAMP production by GLP-1 was not due to inactivation of phosphodiesterases shown using a phosphodiesterase inhibitor (IBMX, 1 mM). The chronic exposure of β-cells to glucocorticoids changed the subcellular distribution of the GLP-1R with an increase in the steady-state GLP-1R β-cell surface expression, while cellular GLP-1R expression remained apparently unaffected. These findings represent a hitherto unknown mechanism (increased levels of GLP-1R β-cell surface expression), whereby the chronic activation of GRs, belonging to the family of nuclear receptors, [1] causes enhancement of $G\alpha_s$-associated signaling by the GLP-1R, and [2] may therefore regulate the β-cell responsiveness to GLP-1R-based drugs.

INTRODUCTION

The glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor (GLP-1R) is a G protein-coupled receptor (GPCR), and its mechanism of action has been studied extensively (Thorens 1995; Doyle et al. 2007). The GLP-1R belongs to the class II (or B) secretin/glucagon/vasoactive intestinal peptide superfamily of GPCR (Thorens 1992; Mayo et al. 2003). Following GLP-1 stimulation of the GLP-1R, the Gα-subunit $G\alpha_s$, through exchange of GTP for GDP, activates adenylyl cyclase, generating cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Drucker et al. 1987; Thorens 1995; Doyle et al. 2007) which leads to the activation of protein kinase A (PKA) and exchange protein directly activated by cAMP (Epac, also known as GEF) pathways (Ozaki et al. 2000; Wang et al. 2001). In β-cells, GLP-1 is known to potentiate glucose-stimulated insulin secretion and to activate numerous protein kinases (i.e. phosphoinositide-3-kinase (PI3K), Akt/PkB, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2, or p42/44 MAP kinases) (Thorens 1995; Doyle et al. 2007; Arnette et al. 2003; Gomez et al. 2002a). Strategies based on the activation of GLP-1R in β-cells are extensively developed for type 2 diabetes treatment (Drucker 2013; Doyle et al. 2007). Therefore, deciphering the behavior of the signaling pathways linked to activated GLP-1R within the β-cells is of importance.

Glucocorticoids are primary stress hormones and regulate a wide variety of biological processes and function to maintain homeostasis (McMahon et al. 1988; McKay et al. 2003). Because of their powerful anti-inflammatory and immunosuppressive actions, synthetic glucocorticoids are one of the most widely prescribed drugs worldwide, serving in the treatment of acute and chronic inflammatory diseases, autoimmune diseases, organ transplant rejection, and cancers of the lymphoid system (Rafacho et al. 2014a; Overington et al. 2006). Both the physiological and pharmacological actions of glucocorticoids are mediated by the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-

dependent transcription factors. GR activation enhances or represses transcription of target genes by binding specific elements of DNA, termed glucocorticoid response elements (GREs). However, chronic administration of glucocorticoids is well described to exert side effects including steroid-induced diabetes (Ortsater et la. 2012; Van Raalte et al. 2009; Rafacho et al. 2014b). Dexamethasone administration in humans and in animals, but also hypercortisolism in Cushing syndrome are known to induce a state of hyperglycemia (Anagnostis et al. 2009; Origuchi et al. 2011; Di Dalmazi et al. 2012). Glucocorticoid-induced hyperglycemia is due to insulin resistance and impaired β-cell mass and function (reviewed in (Van Raalte et al. 2009).

In contrast to its well documented inhibitory effect on glucose-induced insulin secretion (Lambillotte et al. 1997; Gremlich et al.1997; Ullrich et al. 2005), whether chronic exposure of β-cells to glucocorticoids attenuates the effectiveness of GLP-1 to stimulate insulin secretion and to activate regulators of β-cell function and survival is unknown. As the exact role of glucocorticoids on β-cells is difficult to evaluate when administered in living animals (Rafacho et al. 2014; Gremlich et al. 1997), we have treated INS-1E β-cells and isolated mouse islets. Despite a decreased glucose effect, we observed that neither insulin secretion nor ERK1/2 phosphorylation induced by GLP-1 were affected by a dexamethasone (a synthetic glucocorticoid) exposure. We further found that exposure of β-cells to dexamethasone increased GLP-1R localization at the β-cell surface and enhanced GLP-1R signaling through $G\alpha_s$ to cAMP. Our study therefore reveals a previously unidentified mechanism leading to an enhancement of cell responsiveness to GLP-1R activation in response to a chronic activation of the GRs in β-cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials- Glucagon-like peptide-1-(7–36) amide (GLP-1-(7–36) amide) and glucagon were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Dexamethasone, RU-486 (or mifepristone), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), a potent phosphodiesterase inhibitor, forskolin, and anti-β-actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Dexamethasone and RU-486 stock solutions were prepared in absolute ethanol and added to the medium at final ethanol concentration of 0.004%. Z-VAD(OMe)-FMK, an irreversible and cell permeable broad-spectrum caspase inhibitor, was purchased from MP biomedicals (Santa Ana, CA). Anti-GLP-1-receptor antibody was obtained from Abcam (Cambridge, United Kingdom). Anti-p44/42 mitogen-activated protein kinase (ERK1/2), and anti-rabbit IgG HRP (horseradish peroxidase-linked) antibodies were purchased from Cell Signaling (New England Biolabs, Beverly, MA). Anti-ERK1/2 antibody was purchased from Transduction Laboratories (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Affinipure donkey anti-rabbit CY3-conjugated IgG was obtained from Jackson immunoresearch (Newmarket, Suffolk). RPMI-1640 media, and fetal calf serum (FCS) were purchased from Life Technologies (Gibco BRL, Grand Island, NY). Insulin and cAMP HTRF (Homeogeneous Time Resolved Fluorescence) kits were obtained from Cisbio Bioassays (Codolet, France). All other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Cell culture, mice islet isolation and culture- The rat β-cell line INS-1E was provided by P. Maechler (Cell Physiology and Metabolism Department, University of Geneva, Geneva, Switzerland), and cultured as monolayer at 37°C in humidified atmosphere with 5% CO_2, using RPMI 1640 medium containing 11.1 mM glucose and supplemented with 7.5% heat-inactivated FCS, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 50 μM β-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin. Male C57BL/6J mice

were from Charles River Laboratories (St. Aubin les Elbeuf, France). All animals were maintained on a 12 h light/dark cycle, and were provided free access to water and standard rodent diet (4% fat). Principles of laboratory animal care, and European Union guidelines on animal laboratory care were followed. Pancreatic islets were isolated from mice weighing 30–35 g on the day of killing following digestion of total pancreas with collagenase and subsequent separation by hand picking as described (Ravier et al. Diabetologia 2014). Islets were kept in culture at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 in RPM1 1640 medium containing 11.1 mM glucose supplemented with 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, and 10% heat-inactivated FCS.

Insulin secretion and cAMP production- INS-1E cells (75% confluence), or islets (20 islets) were incubated 24 h in RPMI culture medium supplemented with 100 nM dexamethasone or 0.004% absolute ethanol (vehicule). Following a 2 h stabilization period at 37 °C in Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) buffer (135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH_2PO_4, 0.5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM $CaCl_2$, 5 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.1% bovine serum albumine (BSA), pH 7.4) for INS-1E cells, or in KRB buffer (120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 $MgCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, 24 mM $NaHCO_3$, 0.1% BSA, containing 16.7 mM glucose, pH 7.4) for islets, INS-1E cells or islets were incubated 20 min (for cAMP production) or 1 h (for insulin secretion) in KRB buffers containing the test agents as indicated in figure legends. For cAMP production evaluation, 0.5 mM (for islets) or 1 mM (for INS-1E cells) 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) was added during the stimulation period. Following stimulation, cells were lysed for cAMP production measurement by HTRF technology. Supernatants were collected to measure the insulin secretion by HTRF technology. Insulin content was determined after extraction in acid-ethanol.

Western Blot analysis- To determine expression levels of cellular proteins, INS-1E cells (75% confluence) were incubated 24 h in RPMI medium supplemented with 100 nM dexamethasone or vehicule. To determine phosphorylation levels of ERK1/2, INS-1E cells (75% confluence) were incubated 24 h in RPMI medium supplemented with 100 nM dexamethasone or vehicule, and then stabilized 2 h in KRB buffer at 37 °C. Following the stabilization period, cells were stimulated 20 min in KRB buffer containing GLP-1 (20 nM) and/or glucose (8.3 mM). Following experiments, INS-1E cells were washed with cold PBS, and lysed in a cold lysis buffer (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM Na_3VO_4, 10 mM pyrophosphate, 100 mM NaF, 1% triton X-100, 0.1% SDS, 1 mg/ml bacitracin). After 30 min incubation, cell lysates were centrifuged at 12,000 rpm for 30 min. Supernatants were denatured by boiling for 5 min in Laemmli's sample buffer and resolved by SDS-PAGE. Samples were normalized for protein content by a BiCinchoninic acid protein assay, and equal amounts of lysate proteins were analyzed by Western blotting. Nitrocellulose membranes were blocked, probed with the specific antibodies, and incubated with horseradish peroxidase-linked secondary antibody followed by chemiluminescence detection. Band densities were analysed using ImageJ (National Instituts of Health, Bethesda).

Immunocytochemistry and imaging- INS-1E cells were cultured on coverslips in RPMI medium. At 75% confluence, cells were incubated 24 h with dexamethasone or vehicule. After 2 h stabilization period at 37 °C in KRB buffer, cells were fixed 20 min with 3.7% paraformaldehyde and permeabilized 20 min in 0.2% TritonX-100. Cells were then blocked 15 min with 3% BSA and incubated overnight at 4°C in a moist chamber with the first antibody before being incubated at room temperature (RT) for 1 h with the secondary antibody and DAPI for nuclear staining. Coverslips were finally mounted with Mowiol and imaged using a Zeiss AxioImager ApoTome microscope (Carl Zeiss, Marly le Roi, France).

For TIRF microcopy, a ×100 lens with a 1.49 numerical aperture and a 561 nm laser as excitation source were used (Roper Scientific, Evry, France). The emitted light was filtered at 590 nm. Images were collected using a charge-coupled device camera (Quantem; Roper Scientific) and the MetaMorph software (Molecular Devices, Downingtown, PA, USA). The analysis of fluorescence intensity was performed using the ImageJ software.

Nuclear staining for detection of apoptosis- After 24 h exposure with 100 nM dexamethasone or vehicule, cells were incubated 20 min at RT with 10 µg/ml of Hoechst (bisBenzimide H33342 trihydrochloride) solution, and fixed with 3.7% paraformaldehyde during 20 min. After wash, coverslips were mounted with Mowiol. Apoptotic cells were identified by the presence of condensed nuclei stained in blue, visualized using a Zeiss AxioImager microscope, and quantified compared to the total number of nuclei in 5 areas by slide.

Statistical analysis- Results are expressed as mean ± S.E.M for *n* independent experiments. Statistical differences between groups were evaluated by Student's *t* test or by ANOVA, followed by the Newman-Keuls test or a Bonferroni post test for multiple comparisons using GraphPad Prism software. Differences were considered significant at $p < 0.05$ (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

RESULTS

Glucocorticoids exert adverse effects on glucose-, but preserve GLP-1-induced insulin secretion and ERK1/2 phosphorylation.

Following GLP-1 stimulation of the GLP-1R, cAMP production leads to the activation of PKA and Epac pathways potentiating glucose-stimulated insulin secretion (Thorens 1995; Doyle et al. 2007; Arnette et al. 2003; Gomez et al. 2002a; Kaihara et al. 2013; Seino 2012), and activating, by cascade of phosphorylation events, numerous protein kinases such as ERK1/2 (Doyle et al. 2007; Arnette et al. 2003; Gomez et al. 2002a). We first investigated whether glucocorticoids regulate the GLP-1 actions by treating the rat β-cell line (INS-1E) with the synthetic glucocorticoid dexamethasone (Dexa). We used 100 nM Dexa, a Dexa concentration widely used in previous studies (Lambillotte et al. 1997; Gremlich et al.1997; Ullrich et al. 2005). Consistent with previous studies reporting adverse effects of glucocorticoids on glucose-induced intracellular [Ca^{2+}] oscillations and insulin secretion (Lambillotte et al. 1997), glucose-induced insulin secretion was found to be significantly decreased in INS-1E cells treated with Dexa for 24 h (Fig. 1A). Phosphorylation of ERK1/2 induced by glucose was also found to be markedly attenuated in INS-1E treated with Dexa (Fig. 1B). Surprisingly, despite decreased glucose effects, neither insulin secretion nor ERK1/2 phosphorylation induced by GLP-1 were impaired in Dexa-treated β-cells (Fig. 1A and B).

Glucocorticoids enhance cAMP production in response to GLP-1 in INS-1E cells.

Next, we evaluated the impact of the chronic glucocorticoid exposure on the signaling capacity of GLP-1R. In control non-Dexa treated-INS-1E cells, GLP-1 increases cAMP production by ~ 3 fold compared to glucose (Fig. 2A). Notably, when cells were exposed for

24 h to Dexa, GLP-1-mediated cAMP production was further enhanced by 2.5 fold compared with non-Dexa-treated cells (Fig. 2A). We next investigated whether the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors (Evans 1988), was necessary for the regulatory event. The ability of Dexa to enhance GLP-1-mediated cAMP production was prevented by a co-treatment with the glucocorticoid antagonist RU-486 (Fig. 2B). These findings demonstrate that chronic activation of the GRs in INS-1E cells significantly enhances Gαs activation and downstream cAMP production upon GLP-1R stimulation.

To determine whether the presence of glucose was required, we tested the effects of GLP-1 alone on cAMP production in Dexa-treated INS-1E cells. We observed that, even under these extra-physiological conditions, GLP-1-mediated cAMP production was enhanced by ~2 fold in Dexa-treated cells compared with non-Dexa-treated cells, and prevented by the RU-486 co-treatment (Fig. 2C). Significant effects of 24 h Dexa treatment on GLP-1-mediated cAMP production were also seen for lower GLP-1 concentrations <10 nM (i.e. 0.1 nM and 1 nM) (Fig. 2D).

Long term glucocorticoid treatments were shown to induce β-cell death (Ranta et al. 2006). We observed that very few INS-1E cells displayed pyknotic nuclei (i.e. ~ 1.2%) when treated 24 h with Dexa (Fig. 2E). The RU-486 co-treatment significantly reduced the number of INS-1E cells displaying pyknotic nuclei (Fig. 2E). To determine whether the enhanced cAMP production following Dexa treatment was due to apoptosis, we performed a co-treatment with the pan caspase inhibitor Z-VAD(OMe)-FMK which reduced apoptosis by 50% (data not shown). As seen in Fig. 2F, the Z-VAD(OMe)-FMK co-treatment did not block the ability of Dexa to enhance GLP-1-mediated cAMP production.

Glucocorticoids enhance cAMP production in response to GLP-1 in mouse pancreatic islets.

To strengthen our observations from INS-1E cells (Fig. 2), experiments were performed in mouse islets of Langerhans. GLP-1-mediated cAMP production in the presence of 16.7 mM glucose was found to be enhanced by ~1.5 fold in Dexa-treated islets compared with non-Dexa-treated islets (Fig. 3).

Glucocorticoids do not modulate cAMP production in response to forskolin nor glucagon receptor activation.

Because forskolin requires functional adenylyl cyclase to generate cAMP (Awad et al. 1983), we used forskolin as a control to evaluate the activity of the adenylyl cyclases. As shown in Fig. 4A, the treatment of INS-1E cells with Dexa had no further effect on cAMP production induced by forskolin.

Most interesting, another class II (or B) GPCR, glucagon receptor (GcgR), when activated, induced cAMP production (Fig. 4B), but a 24 h-Dexa treatment failed to significantly enhance cAMP in response to glucagon (Fig. 4B), indicating that glucocorticoids most likely exert specific regulation toward GLP-1R.

Glucocorticoids increase GLP-1R localization at the β-cell surface.

It can be speculated that the enhanced cAMP production from activated GLP-1R shown here in Dexa-treated INS-1E cells is due to the presence of excess of cellular GLP-1R expression, and/or the subcellular redistribution of GLP-1R leading to the enrichment of the receptor on the β-cell surface. As shown in Fig. 5A, 24 h of Dexa exposure was without apparent effect on cellular GLP-1R protein expression.

We next evaluated whether glucocorticoids may regulate the subcellular distribution of GLP-1R. In Dexa-treated INS-1E cells, we observed an increased number of cells displaying a ring fluorescence staining (Fig. 5B), indicating clear changes in the subcellular GLP-1R distribution with an increase in the steady-state GLP-1R β-cell surface expression. To validate these findings further, we imaged the distribution of GLP-1R by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy, the technic of choice to measure events close to the plasma membrane (Ravier et al. 2008). As seen in Fig. 5C and D, Dexa exposure increased the GLP-1R expression at the β-cell surface, as the fluorescence intensity at the plasma membrane was significantly increased by ~1.5 fold in Dexa-treated cells.

DISCUSSION

Adverse effects of chronic glucocorticoid administration include β-cell dysfunction, hyperglycemia and steroid-induced diabetes (Ortsater et al. 2012; Van Raalte et al. 2009; Rafacho et al. 2014b). In this study, we first confirmed that a chronic Dexa exposure exerted a clear inhibitory action on glucose-induced insulin secretion. This result is consistent with the findings using β-cell lines and isolated pancreatic islets which displayed impaired glucose metabolism, affected glucose-induced [Ca^{2+}] oscillations, post-translational degradation of the glucose transporter GLUT2 and inhibition of insulin secretion in response to Dexa exposure (Lambillotte et al. 1997; Gremlich et al.1997; Ullrich et al. 2005). It is interesting to note that glucose-induced ERK1/2 phosphorylation, which also required glucose metabolism (Briaud et al. 2003; Costes et al. 2006) was found to be inhibited by Dexa. By contrast, we showed that despite decreased glucose effects, neither insulin secretion nor ERK1/2 phosphorylation induced by GLP-1 were affected by glucocorticoid exposure. Dexa exposure increased expression levels of GLP-1R at the β-cell surface and enhanced GLP-1R signaling through $G\alpha_s$ to cAMP.

Long term glucocorticoid treatments were reported to inactivate phosphodiesterases in other types of cells (Ahlström et al. 2005). GLP-1R-generated cAMP is sensitive to changes in phosphodiesterase activities (Cooper 2003). The enhancement of cAMP generation induced by GLP-1 observed in Dexa-treated INS-1E cells were more likely not due to inactivation of phosphodiesterases, as IBMX, a phosphodiesterase inhibitor, was used during the incubations with glucose and/or GLP-1 for the measurement of cAMP production (Fig. 2A). Moreover, Dexa treatment had no effect on cAMP basal levels (data not shown), and cAMP generation was not affected when forskolin was used as an activator (Fig. 4A), indicating that Dexa does not seem to modulate phosphodiesterase activities in β-cells.

We observed that chronic Dexa exposure increased the amount of steady-state GLP-1R at the β-cell surface by 50% compared to controls. We can hypothesize that the glucocorticoid-induced redistribution of GLP-1R into the β-cell plasma membrane could result from either decreased constitutive endocytosis or increased recycling from endosomes to the cell surface. Moreover, this finding also suggests that chronic glucocorticoid exposure may enhance GLP-1R/$G\alpha_s$/cAMP signaling by "trapping" the GLP-1R at the β-cell plasma membrane. In future experiments, it will be of interest to measure GLP-1R internalization following GLP-1 stimulation in β-cells exposed to glucocorticoids. It could be further hypothesized that the enhanced cAMP production from activated GLP-1R shown here in Dexa-treated INS-1E cells might be due to supersensitization of GLP-1R/Gαs signaling caused by an impairment of the normal process of GLP-1R desensitization.

Since the effect of Dexa could be inhibited by the glucocorticoid receptor antagonist RU-486, transcriptional activation of a single gene or a set of genes is required to increase the amount of GLP-1R at the β-cell surface and subsequent enhancement of GLP-1R signaling through $G\alpha_s$ to cAMP. Although we do not know which gene products are responsible the Dexa effects, possible candidates may include components of the ubiquitin-proteasome degradation system and/or endocytosis machinery. In muscle, Dexa was shown to activate the protein proteasome degradation system and the expression of ubiquitin (Tiao et al. 1996). Activation of the proteasome degradation system and the expression of ubiquitin in β-cells following glucocorticoid treatments may lead to downregulation of key components involved in GLP1-R subcellular localization, desensitization and/or internalization processes.

Taking the assumption that our findings might be generalized from the GLP-1R to any GPCR which uses common molecules as part of its signaling apparatus, it is tempting to speculate that enhancement of GPCR/$G\alpha_s$ signaling caused by chronic glucocorticoid could play a role

in some of the adverse effects seen during glucocorticoid treatment. It can be further speculated that this cross-talk between nuclear GRs and cell surface GPCRs, defining a mechanism whereby chronic stimulation of the GR leads to heterologous enhancement of $G\alpha_s$ signaling is specific to some GPCRs and possibly cell context specific. In β-cells, we observed that glucocorticoids exert some specific regulation toward GLP-1R as Dexa treatment at least failed to significantly enhance cAMP in response to activated GcgR.

Glucocorticoid therapy provides beneficial inflammatory and immunosuppressive effects (Rafacho et al. 2014a) Overington et al. 2006). However, when administered in excess or for long periods, glucocorticoids exert several adverse effects including insulin resistance, β-cell dysfunction leading to hyperglycemia (Delaunay et al. 1997; Ortsater et al. 2012; Rojas et al. 2015). Although the exact prevalence of steroid-induced diabetes is still largely unknown, the widespread use of glucocorticoid may represent a major clinical problem. Here, we confirmed that prolonged exposure of β-cells to glucocorticoid induces major β-cell dysfunction. Our studies revealed an enhancement of GLP-1R signaling through $G\alpha_s$ to cAMP and no reduction of insulin secretion stimulation, ERK1/2 activation by GLP-1 in β-cells following glucocorticoid exposure. Reduction of insulinotropic properties of GLP-1 after glucocorticoid-induced insulin resistance were reported (Eriksen et al. 2015). On the contrary, preserved insulinotropic actions of GLP-1 has been reported in a patient with Cushing's disease and diabetes due to endogenous hypercortisolism (Ritzel et al. 2007). Patients with type 2 diabetes whose glycemic controls were worsened due to glucocorticoid therapy were successfully treated with GLP-1 analogs (i.e. exenatide) administration (Matsuo et al. 2013). The effects of glucocorticoids are well known to have a great variability between subjects, due to different GR sensitivity which is mostly genetically determined (Bamberger et al. 1996; DeRijk et al. 2002). Together, these observations raise the possibility that the existence of the mechanism whereby chronic stimulation of GRs leads to heterologous enhancement of

$G\alpha_s$ signaling by the GLP-1R in β-cells *in vivo* may rely on genetic contributions to phenotypic differences of GRs sensitivity.

In summary, we have shown that chronic glucocorticoid exposure regulates GLP-1R at the β-cell surface and supersensitizes β-cells to GLP-1R-mediated cAMP production. These findings provide a cross-talk between nuclear and cell surface receptors in β-cells, and define a mechanism whereby chronic activation of the GRs leads to heterologous enhancement of $G\alpha_s$ signaling by the GLP-1R which could exert major impact on the tonic regulation of β-cell responsiveness to GLP-1R-based therapies.

Acknowledgments

The authors acknowledge E. Robert for help with INS-1E experiments and measurement of apoptosis. This work was supported by grant obtained from the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM, Paris, France), and by collaborative contract with CisBio Bioassays (Codolet, France).

REFERENCES

Ahlström, Mikael, Minna Pekkinen, Minna Huttunen, et Christel Lamberg-Allardt. 2005. « Dexamethasone down-Regulates cAMP-Phosphodiesterase in Human Osteosarcoma Cells ». *Biochemical Pharmacology* 69 (2): 267‑75. doi:10.1016/j.bcp.2004.09.012.

Anagnostis, Panagiotis, Vasilios G. Athyros, Konstantinos Tziomalos, Asterios Karagiannis, et Dimitri P. Mikhailidis. 2009. « The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94 (8): 2692‑2701. doi:10.1210/jc.2009-0370.

Arnette, Don, Tara Beers Gibson, Michael C. Lawrence, Bridgette January, Shih Khoo, Kathleen McGlynn, Colleen A. Vanderbilt, et Melanie H. Cobb. 2003. « Regulation of ERK1 and ERK2 by Glucose and Peptide Hormones in Pancreatic Beta Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32517‑25. doi:10.1074/jbc.M301174200.

Awad, J. A., R. A. Johnson, K. H. Jakobs, et G. Schultz. 1983. « Interactions of Forskolin and Adenylate Cyclase. Effects on Substrate Kinetics and Protection against Inactivation by Heat and N-Ethylmaleimide ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (5): 2960‑65.

Bamberger, C. M., H. M. Schulte, et G. P. Chrousos. 1996. « Molecular Determinants of Glucocorticoid Receptor Function and Tissue Sensitivity to Glucocorticoids ». *Endocrine Reviews* 17 (3): 245‑61. doi:10.1210/edrv-17-3-245.

Briaud, Isabelle, Melissa K. Lingohr, Lorna M. Dickson, Christian E. Wrede, et Christopher J. Rhodes. 2003. « Differential Activation Mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by Glucose in Pancreatic Beta-Cells ». *Diabetes* 52 (4): 974‑83.

Brunstedt, J., et J. H. Nielsen. 1981. « Direct Long-Term Effect of Hydrocortisone on Insulin and Glucagon Release from Mouse Pancreatic Islets in Tissue Culture ». *Acta Endocrinologica* 96 (4): 498‑504.

Cooper, Dermot M. F. 2003. « Regulation and Organization of Adenylyl Cyclases and cAMP ». *The Biochemical Journal* 375 (Pt 3): 517‑29. doi:10.1042/BJ20031061.

Costes, Safia, Christophe Broca, Gyslaine Bertrand, Anne-Dominique Lajoix, Dominique Bataille, Joel Bockaert, et Stéphane Dalle. 2006. « ERK1/2 Control Phosphorylation and Protein Level of cAMP-Responsive Element-Binding Protein: A Key Role in Glucose-Mediated Pancreatic Beta-Cell Survival ». *Diabetes* 55 (8): 2220‑30. doi:10.2337/db05-1618.

Delaunay, F., A. Khan, A. Cintra, B. Davani, Z. C. Ling, A. Andersson, C. G. Ostenson, J. Gustafsson, S. Efendic, et S. Okret. 1997. « Pancreatic Beta Cells Are Important Targets for the Diabetogenic Effects of Glucocorticoids ». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (8): 2094‑98. doi:10.1172/JCI119743.

DeRijk, R. H., M. Schaaf, et E. R. de Kloet. 2002. « Glucocorticoid Receptor Variants: Clinical Implications ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 81 (2): 103‑22.

Di Dalmazi, Guido, Uberto Pagotto, Renato Pasquali, et Valentina Vicennati. 2012. « Glucocorticoids and Type 2 Diabetes: From Physiology to Pathology ». *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012 (décembre). doi:10.1155/2012/525093.

Doyle, Máire E., et Josephine M. Egan. 2007. « Mechanisms of Action of Glucagon-like Peptide 1 in the Pancreas ». *Pharmacology & Therapeutics* 113 (3): 546‑93. doi:10.1016/j.pharmthera.2006.11.007.

Drucker, Daniel J. 2013. « Incretin Action in the Pancreas: Potential Promise, Possible Perils, and Pathological Pitfalls ». *Diabetes* 62 (10): 3316‑23. doi:10.2337/db13-0822.

Drucker, DJ, J Philippe, S Mojsov, WL Chick, et JF Habener. 1987. « Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell

line ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (10): 3434‑38.

Eriksen, Marie, David H. Jensen, Siri Tribler, Jens J. Holst, Sten Madsbad, et Thure Krarup. 2015. « Reduction of Insulinotropic Properties of GLP-1 and GIP after Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance ». *Diabetologia* 58 (5): 920‑28. doi:10.1007/s00125-015-3522-y.

Evans, RM. 1988. « The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily ». *Science (New York, N.Y.)* 240 (4854): 889‑95.

Gomez, Edith, Catrin Pritchard, et Terence P. Herbert. 2002a. « cAMP-Dependent Protein Kinase and Ca2+ Influx through L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Mediate Raf-Independent Activation of Extracellular Regulated Kinase in Response to Glucagon-like Peptide-1 in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48146‑51. doi:10.1074/jbc.M209165200.

———. 2002b. « cAMP-Dependent Protein Kinase and Ca2+ Influx through L-Type Voltage-Gated Calcium Channels Mediate Raf-Independent Activation of Extracellular Regulated Kinase in Response to Glucagon-like Peptide-1 in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50): 48146‑51. doi:10.1074/jbc.M209165200.

Gremlich, S, R Roduit, et B Thorens. 1997. « Dexamethasone Induces Posttranslational Degradation of GLUT2 and Inhibition of Insulin Secretion in Isolated Pancreatic Beta Cells. Comparison with the Effects of Fatty Acids ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3216‑22.

Kaihara, Kelly A., Lorna M. Dickson, David A. Jacobson, Natalia Tamarina, Michael W. Roe, Louis H. Philipson, et Barton Wicksteed. 2013. « β-Cell–Specific Protein Kinase

A Activation Enhances the Efficiency of Glucose Control by Increasing Acute-Phase Insulin Secretion ». *Diabetes* 62 (5): 1527‑36. doi:10.2337/db12-1013.

Lambillotte, C., P. Gilon, et J. C. Henquin. 1997. « Direct Glucocorticoid Inhibition of Insulin Secretion. An in Vitro Study of Dexamethasone Effects in Mouse Islets ». *The Journal of Clinical Investigation* 99 (3): 414‑23. doi:10.1172/JCI119175.

Matsuo, Koji, Takuo Nambu, Yuki Matsuda, Yugo Kanai, Shin Yonemitsu, Seiji Muro, et Shogo Oki. 2013. « Evaluation of the Effects of Exenatide Administration in Patients with Type 2 Diabetes with Worsened Glycemic Control Caused by Glucocorticoid Therapy ». *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 52 (1): 89‑95.

Mayo, Kelly E, Laurence J Miller, Dominique Bataille, Stéphane Dalle, Burkhard Göke, Bernard Thorens, et Daniel J Drucker. 2003. « International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family ». *Pharmacological Reviews* 55 (1): 167‑94. doi:10.1124/pr.55.1.6.

McKay, Lorraine I., et John A. Cidlowski. 2003. « Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids ». http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/books/NBK13780/.

McMahon, M., J. Gerich, et R. Rizza. 1988. « Effects of Glucocorticoids on Carbohydrate Metabolism ». *Diabetes/Metabolism Reviews* 4 (1): 17‑30.

Origuchi, Tomoki, Satomi Yamaguchi, Akiyo Inoue, Yoshie Kazaura, Naomi Matsuo, Norio Abiru, Atsushi Kawakami, et Katsumi Eguchi. 2011. « Increased Incidence of Pre-Diabetes Mellitus at a Department of Rheumatology: A Retrospective Study ». *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 21 (5): 495‑99. doi:10.1007/s10165-011-0433-8.

Ortsater, Henrik, Ake Sjoholm, et Alex Rafacho. 2012. « Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess ». In *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*, édité par Sameh Magdeldin. InTech.

http://www.intechopen.com/books/state-of-the-art-of-therapeutic-endocrinology/regulation-of-glucocorticoid-receptor-signaling-and-the-diabetogenic-effects-of-glucocorticoid-exces.

Overington, John P., Bissan Al-Lazikani, et Andrew L. Hopkins. 2006. « How Many Drug Targets Are There? » *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (12): 993‑96. doi:10.1038/nrd2199.

Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, et al. 2000. « cAMP-GEFII Is a Direct Target of cAMP in Regulated Exocytosis ». *Nature Cell Biology* 2 (11): 805‑11. doi:10.1038/35041046.

Rafacho, Alex, Luiz M. Gonçalves-Neto, Junia C. Santos-Silva, Paloma Alonso-Magdalena, Beatriz Merino, Sebastião R. Taboga, Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero, Angel Nadal, et Ivan Quesada. 2014. « Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats ». *PloS One* 9 (4): e93531. doi:10.1371/journal.pone.0093531.

Rafacho, Alex, Henrik Ortsäter, Angel Nadal, et Ivan Quesada. 2014a. « Glucocorticoid Treatment and Endocrine Pancreas Function ». *Journal of Endocrinology*, septembre, JOE ‑ 14‑0373. doi:10.1530/JOE-14-0373.

———. 2014b. « Glucocorticoid Treatment and Endocrine Pancreas Function: Implications for Glucose Homeostasis, Insulin Resistance and Diabetes ». *The Journal of Endocrinology* 223 (3): R49‑62. doi:10.1530/JOE-14-0373.

Ranta, Felicia, Diana Avram, Susanne Berchtold, Martina Düfer, Gisela Drews, Florian Lang, et Susanne Ullrich. 2006. « Dexamethasone Induces Cell Death in Insulin-Secreting Cells, an Effect Reversed by Exendin-4 ». *Diabetes* 55 (5): 1380‑90. doi:10.2337/db05-1220.

Ravier, Magalie A., Takashi Tsuboi, et Guy A. Rutter. 2008. « Imaging a Target of Ca2+ Signalling: Dense Core Granule Exocytosis Viewed by Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy ». *Methods (San Diego, Calif.)* 46 (3): 233‑38. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.016.

Ritzel, R. A., N. Kleine, J. J. Holst, B. Willms, W. Schmiegel, et M. A. Nauck. 2007. « Preserved GLP-1 Effects in a Diabetic Patient with Cushing's Disease ». *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 115 (2): 146‑50. doi:10.1055/s-2007-955096.

Rojas, Joselyn, Mervin Chávez-Castillo, Mervin Chávez-Castillo, Mayela Cabrera, Mayela Cabrera, Valmore Bermúdez, et Valmore Bermúdez. 2015. « Glucococorticoid-Induced Death of Pancreatic Beta Cells: An Organized Chaos ». *JOP. Journal of the Pancreas* 16 (1): 11‑19.

Seino, S. 2012. « Cell Signalling in Insulin Secretion: The Molecular Targets of ATP, cAMP and Sulfonylurea ». *Diabetologia* 55 (8): 2096‑2108. doi:10.1007/s00125-012-2562-9.

Thorens, B. 1992. « Expression Cloning of the Pancreatic Beta Cell Receptor for the Gluco-Incretin Hormone Glucagon-like Peptide 1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (18): 8641‑45.

———. 1995. « Glucagon-like Peptide-1 and Control of Insulin Secretion ». *Diabète & Métabolisme* 21 (5): 311‑18.

Tiao, G., J. Fagan, V. Roegner, M. Lieberman, J. J. Wang, J. E. Fischer, et P. O. Hasselgren. 1996. « Energy-Ubiquitin-Dependent Muscle Proteolysis during Sepsis in Rats Is

Regulated by Glucocorticoids ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (2): 339‑48. doi:10.1172/JCI118421.

Ullrich, Susanne, Susanne Berchtold, Felicia Ranta, Guiscard Seebohm, Guido Henke, Adrian Lupescu, Andreas F. Mack, et al. 2005. « Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Mediates Glucocorticoid-Induced Inhibition of Insulin Secretion ». *Diabetes* 54 (4): 1090‑99.

Van Raalte, D. H., D. M. Ouwens, et M. Diamant. 2009. « Novel Insights into Glucocorticoid-Mediated Diabetogenic Effects: Towards Expansion of Therapeutic Options? » *European Journal of Clinical Investigation* 39 (2): 81‑93. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02067.x.

Wang, X., J. Zhou, M. E. Doyle, et J. M. Egan. 2001. « Glucagon-like Peptide-1 Causes Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein Translocation from the Cytoplasm to the Nucleus of Pancreatic Beta-Cells by a Cyclic Adenosine Monophosphate/protein Kinase A-Dependent Mechanism ». *Endocrinology* 142 (5): 1820‑27. doi:10.1210/endo.142.5.8128

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Glucocorticoids do not impair GLP-1 induced-insulin secretion and ERK1/2 phosphorylation. For insulin secretion, INS-1E cells treated or not with Dexa (100 nM) during 24 h were then stabilized 2 h in KRB buffer and incubated 1 h at 37°C with or without glucose (8.3 mM) and GLP-1 (20 nM). Insulin secretion was measured on supernatant, and the concentration was reported to the insulin content (A). For ERK1/2 phosphorylation evaluation, INS-1E cells treated or not with Dexa (100 nM) during 24 h were then stabilized 2 h in KRB buffer and stimulated 20 min with or without glucose (8.3 mM) and GLP-1 (20 nM). Lysates were subjected to western blotting with antibodies against p-ERK1/2 (1/1000), total ERK1/2 (1/1000) and β-actin (1/5000). Quantifications of 4 independent experiments are shown and each column (or square) represents the mean +/- SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.

Figure 2. Glucocorticoids enhance cAMP production in response to GLP-1 in INS-1E cells. INS-1E cells treated 24 h with vehicule (white bars) or 100 nM Dexa (black bars), then subjected to a 2 h stabilization period in KRB buffer, and incubated 20 min with or without GLP-1 (20 nM) in the presence of glucose (8.3mM) (A). Cells were co-treated 24 h with RU-486 (1 μM) (B and C). After co-treatment and a 2 h stabilization period, cells were incubated 20 min with or without 20 nM GLP-1 alone (C). Effects of 24 h Dexa treatment (100 nM) on cAMP production induced by various GLP-1 concentrations (D). Quantifications of 4 to 6 independent experiments are shown and each column (or square) represents the mean +/- SEM. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001. INS-1E cells were treated with or without Dexa (100 nM) and co-treated with RU-486 (1 μM). Nuclei were labeled with Hoechst and fixed. Pyknotic nuclei are indicated with white arrows. Quantification of β-cell death is expressed as ratio of pyknotic nuclei on total number of nuclei in 5 areas by slide (E). Effect of 24 h Dexa

(100 nM) and Z-VAD (20 μM) co-treatment on cAMP production was measured in response to 20 min GLP-1 (20 nM) in presence of glucose (8.3 mM) following 2 h quiescent period in KRB buffer (F). ***p<0.001.

Figure 3. Glucocorticoids enhance cAMP production in response to GLP-1 in mouse pancreatic islets.

20 mouse islets were incubated 24 h with vehicule (white bars) or 100 nM Dexa (black bars), then stabilized 1 h in KRB buffer containing glucose (10 mM) and finally stimulated with or without GLP-1 (20 nM) in the presence of 16.7 mM glucose.

Figure 4. Glucocorticoid do not modulate cAMP production in response to forskolin nor glucagon. Effect of 24 h Dexa treatment on cAMP production was measured in response to 20 min forskolin (100 nM) (A) and glucagon (20 nM) treatments following 2 h stabilization period in KRB buffer (B). Quantifications of 3 independent experiments are shown and each column (or square) represents the mean +/- SEM.

Figure 5. Glucocorticoids increase β-cell surface expression of GLP-1R. INS-1E cells were treated with or without Dexa (100 nM) for 24 h. Identical amounts of lysates proteins (25-30 μg) were subjected to western blot analysis with antibody against GLP-1R and β-actin (A). Representative immunofluorescence stainings of GLP-1R from INS-1E cells treated with Dexa (100 nM) for 24 h or not analyzed by epifluorescence (B) or TIRF microscopy (C). Nuclei were labeled with DAPI. Quantifications are expressed as ratio of GLP-1R fluorescence intensity on area (D). **p<0.01.

Figure 1

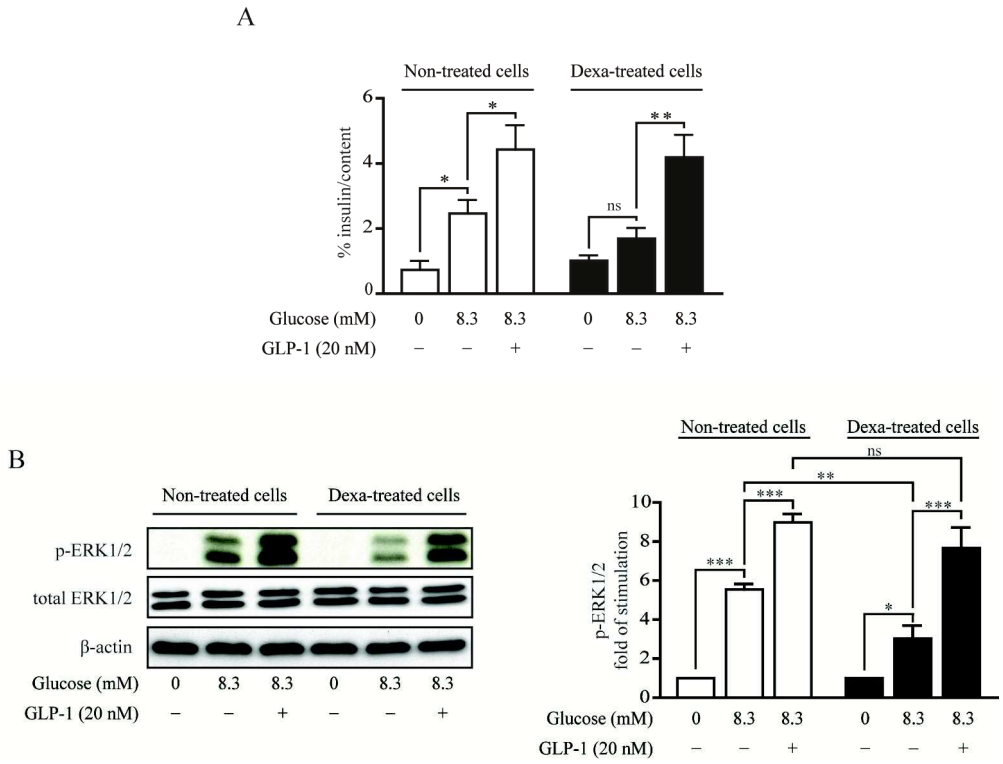

A
Non-treated cells
Dexa-treated cells
% insulin/content
6
4
2
0
*
*
**
ns
Glucose (mM) 0 8.3 8.3 0 8.3 8.3
GLP-1 (20 nM) – – + – – +
B
Non-treated cells
Dexa-treated cells
p-ERK1/2
total ERK1/2
β-actin
Glucose (mM) 0 8.3 8.3 0 8.3 8.3
GLP-1 (20 nM) – – + – – +
Non-treated cells
Dexa-treated cells
p-ERK1/2 fold of stimulation
10
8
6
4
2
0
ns
**
***
***
***
*
Glucose (mM) 0 8.3 8.3 0 8.3 8.3
GLP-1 (20 nM) – – + – – +

Figure 2

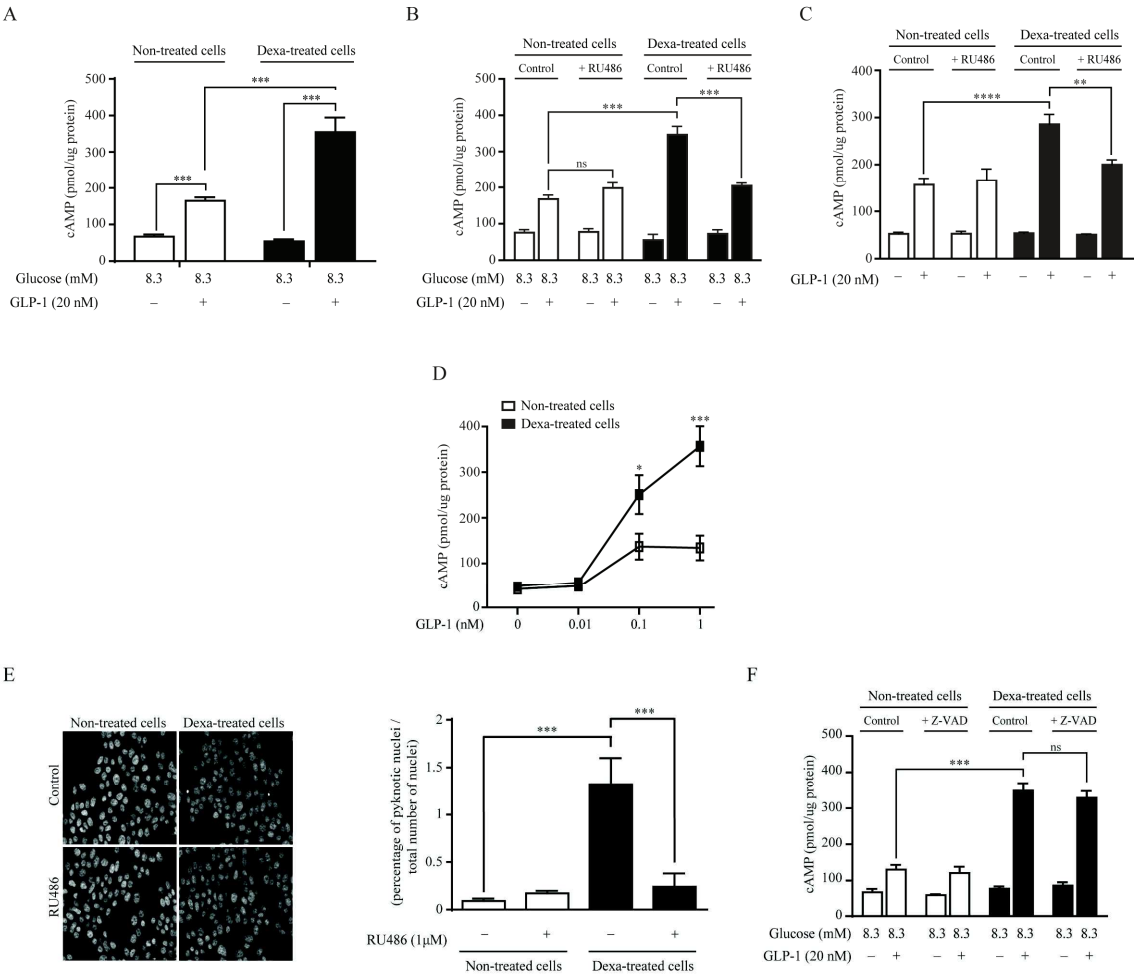

A
Non-treated cells
Dexa-treated cells
cAMP (pmol/ug protein)
Glucose (mM) 8.3 8.3 8.3 8.3
GLP-1 (20 nM) – + – +
B
Non-treated cells
Dexa-treated cells
Control
+ RU486
ns
C
****
**
GLP-1 (20 nM)
D
Non-treated cells
Dexa-treated cells
GLP-1 (nM) 0 0.01 0.1 1
E
Control
RU486
(percentage of pyknotic nuclei / total number of nuclei)
RU486 (1μM)
F
+ Z-VAD
ns

Figure 3

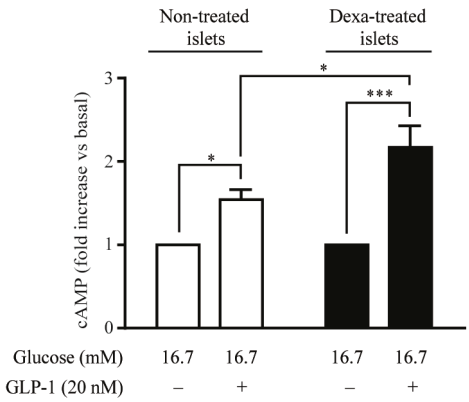

Non-treated islets
Dexa-treated islets
cAMP (fold increase vs basal)
0
1
2
3
*
*
***
Glucose (mM)
16.7
16.7
16.7
16.7
GLP-1 (20 nM)
–
+
–
+

Figure 4

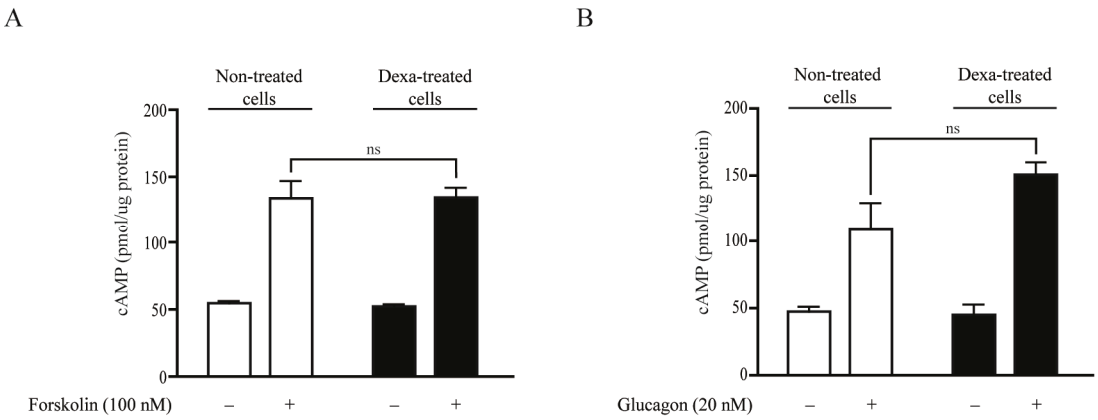
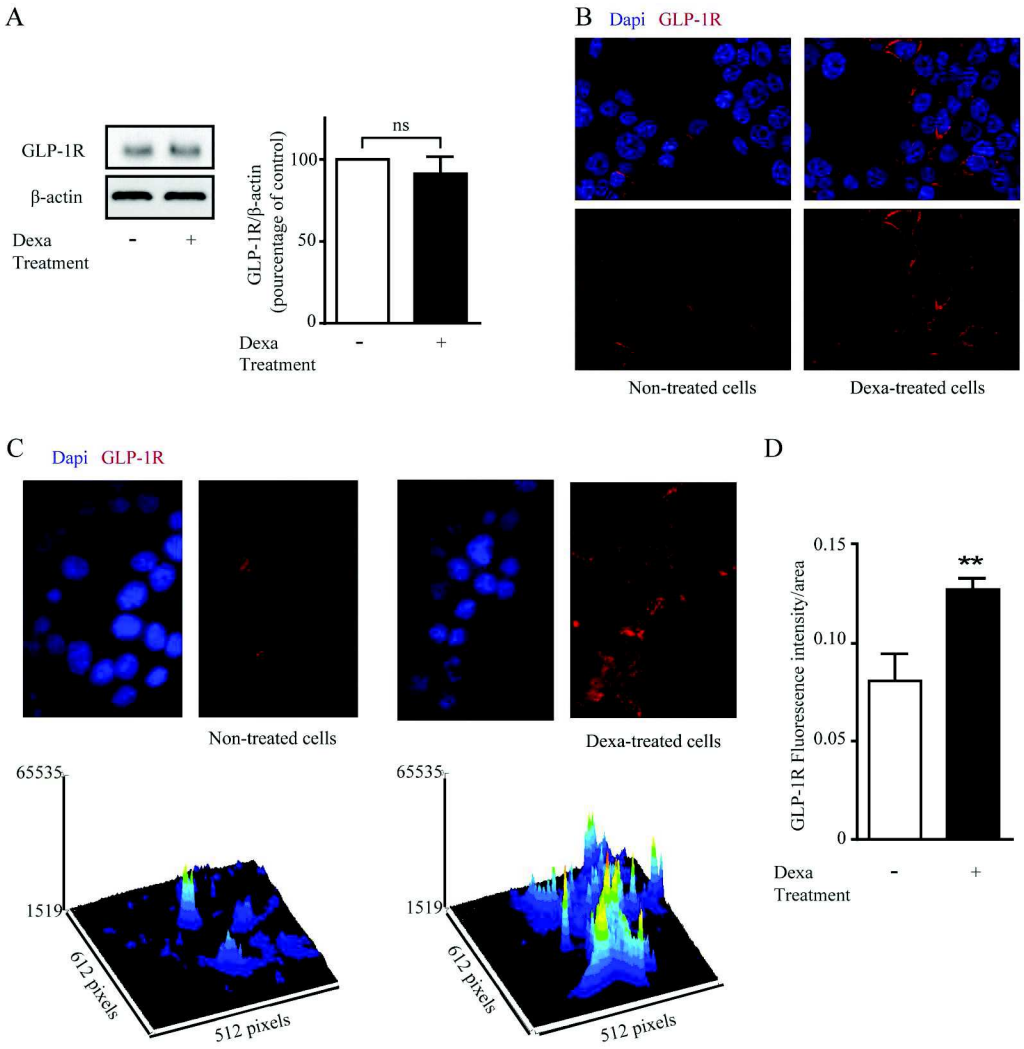

A
Non-treated cells
Dexa-treated cells
ns
cAMP (pmol/ug protein)
200
150
100
50
0
Forskolin (100 nM)
–
+
–
+
B
Non-treated cells
Dexa-treated cells
ns
cAMP (pmol/ug protein)
200
150
100
50
0
Glucagon (20 nM)
–
+
–
+

Figure 5


A
GLP-1R
β-actin
Dexa Treatment
- +
GLP-1R/β-actin (pourcentage of control)
ns
100
50
0
Dexa Treatment
- +
B Dapi GLP-1R
Non-treated cells
Dexa-treated cells
C Dapi GLP-1R
Non-treated cells
Dexa-treated cells
65535
1519
612 pixels
512 pixels
65535
1519
612 pixels
512 pixels
D
GLP-1R Fluorescence intensity/area
0.15
0.10
0.05
0
**
Dexa Treatment
- +

Partie 2 : Résultats complémentaires

Effet des glucocorticoïdes sur l'expression de protéines susceptibles d'être impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation du récepteur GLP-1

A. Introduction

Lors de l'étude précédente, nous avons montré que les glucocorticoïdes pouvaient moduler le trafficking et la signalisation du récepteur GLP-1. En effet malgré des effets négatifs sur la phosphorylation des kinases ERK1/2 et de la sécrétion d'insuline induites par le glucose, les glucocorticoïdes sont capables d'augmenter la production d'AMPc induite par le peptide GLP-1 et ainsi de maintenir la fonction de la cellule à un niveau comparable à celui des cellules non traitées. L'augmentation de la production d'AMPc en réponse au GLP-1 sur les cellules traitées aux GCs est associée à une augmentation du récepteur à la surface des cellules β.

L'expression à la membrane d'un récepteur est finement modulée par les mécanismes d'adressage, d'endocytose et d'internalisation. Quels sont alors les mécanismes d'action impactés par les glucocorticoïdes permettant d'expliquer cette modulation de la répartition du récepteur GLP-1 ? Dans cette partie nous avons donc étudié l'effet des glucocorticoïdes sur l'expression de plusieurs protéines susceptibles d'être impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation du récepteur GLP-1. Enfin nous avons étudié les conséquences de modulation d'expression de ces protéines sur la signalisation du récepteur GLP-1.

B. Matériels et méthodes complémentaires

Matériels. Les anticorps dynamine 1 et dynamine 2 ont été commandés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps de la β-arrestine 1 provient de l'entreprise Transduction Laboratories (BD Biosciences Pharmigen, San Diego, CA) et ceux des protéines GRK 2, GRK 5 et β-arrestine 2 de chez Abcam (Cambridge, Royaume-Unis). Les invalidations des protéines β-arrestine 2 et dynamine 2 ont été réalisés avec la technologie « silencer select » de la marque Life Techonologies, Ambion (Gibco BRL, Grand Island, NY). La lipofectamine 3000, l'opti-MEM ainsi que le contrôle negatif silencer select proviennent également de la marque Life Techonologies, Ambion (Gibco BRL, Grand Island, NY).

siRNA. La veille de la transfection, les cellules sont ensemencées à une concentration de 350000 cellules/ml en plaques 6 puits (2 ml/puits) dans un milieu RPMI 1640 contenant 11.1mM glucose, 7.5% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 50 µM β-mercaptoethanol et dépourvue en antibiotiques. Le jour de la transfection, 3 µl de lipofectamine 3000 sont mélangés à 100 µl d'opti-MEM (solution A). Des solutions de « silencer select » β-arrestine 2 ou dynamine 1 respectivement sont préparées avec de l'opti-MEM (solution B). Pour les conditions « control », les solutions B sont préparées en remplaçant le silencer select des protéines par la même concentration de silencer select « negative control #1 » fourni par Life Technologies. Les deux solutions sont mélangées à volumes équivalents, la solution finale (200 µl) est alors vortexée et incubée à température ambiante pendant 5 min. Le milieu des cellules est retiré et remplacé par 800 µl d'opti-MEM auxquels seront ajoutés les 200 µl de solution de silencer select pour atteindre une concentration finale de 10 et 50 nM pour le silencer select de la β-arrestine 2 ou dynamine 1 respectivement. Le tout est placé à 37°C, 5% de CO_2 pendant 24 h, puis le milieu est changé et les cellules laissées incuber 24 h supplémentaires. L'expression des protéines est alors analysée par western blot comme détaillé dans le « Materials and Methods » de l'article. Pour la détermination de la production d'AMPc, les cellules sont mises en quiescence 2h et stimulées 20 min en présence de 1 mM d'IBMX comme détaillé précedemment. 5 µl d'échantillons sont alors prélevés et dosés par la technique HTRF.

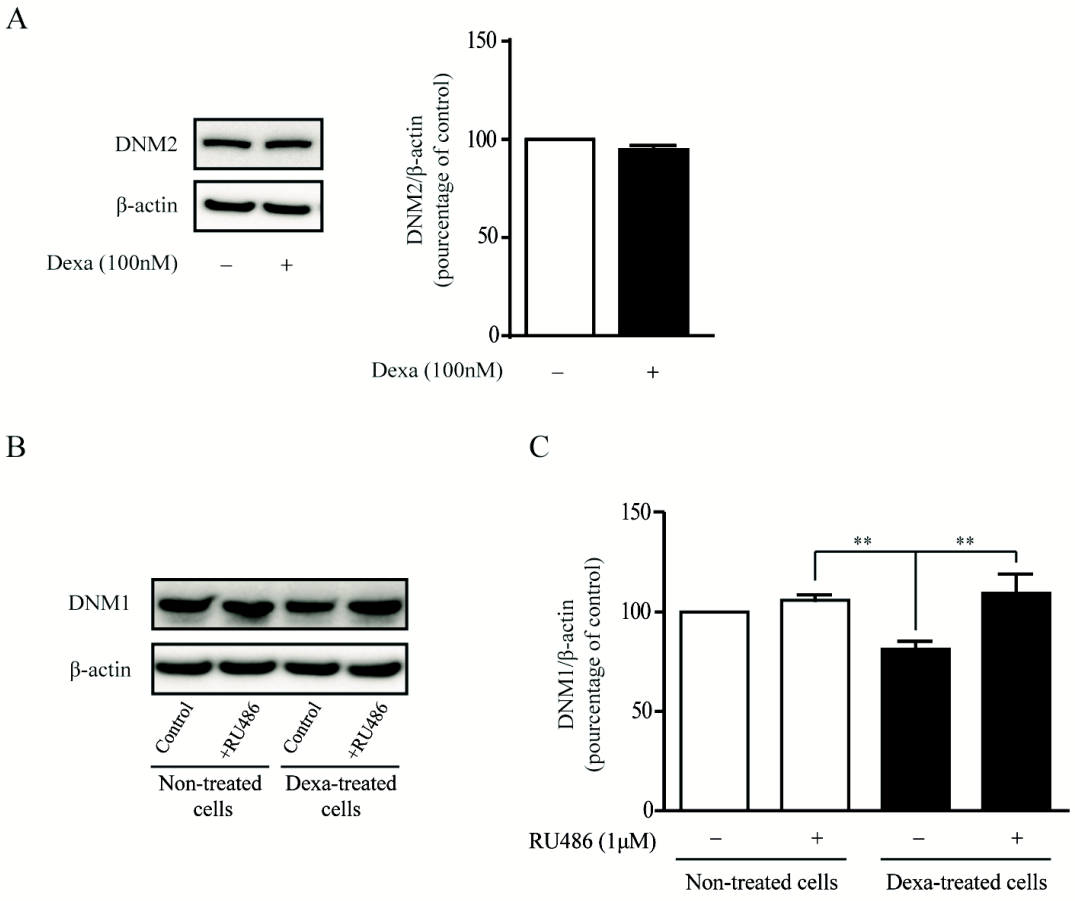


Figure1 : Les glucocorticoïdes modulent l'expression de la dynamine 1 mais pas celle de la dynamine 2. Les cellules β pancréatiques INS-1E sont exposées 24 h à la dexaméthasone (Dexa) ou à son véhicule (Ethanol absolu 0.004%). L'expression de la dynamine 2 est alors analysée par wertern blot à partir du dépôt de quantités identiques de lysats protéiques (~25-30 mg) (Test de student sur 3 expérences) (A). Les cellules sont exposées 24 h à un co-traitement à la Dexa (100 nM) et au RU486 (1 µM). La dynamine 1 est détectée par western blot. L'histogramme représente la moyenne de 5 expériences et un test " one-way anova" est réalisé (B). Histogramme blanc : traitement Ethanol absolu 0.004%; Histogramme noir : traitement Dexa. L'intensité des bandes est analysée et quantifié grâce au logiciel *image j et l*es tests statistiques réalisés avec GraphPad Prism. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

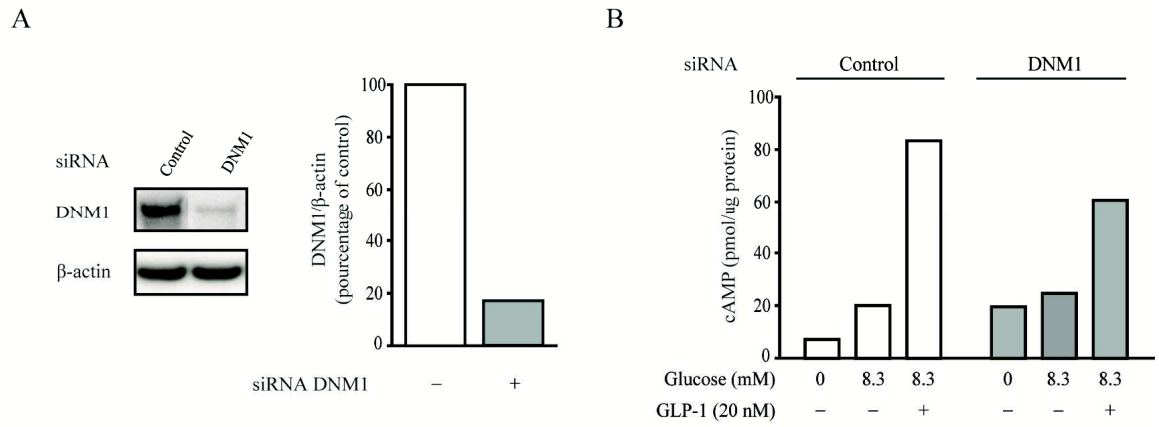


Figure2 : L'invalidation de la dynamine 1 impacte la production d'AMPc induite par le GLP-1. La lignée de cellules INS-1E est invalidée en dynamine 1 (DNM1) par transfection de 50 nM de siRNA DNM1. Au bout de 48 h de culture les cellules sont lysées et la quantité de dynamine 1 est évaluée par western blot (A). A la suite de 48 h de transfection les cellules sont misent en quiescence 2 h dans du tampon Krebs dépourvu en glucose. Elles sont ensuite incubées 20 min dans du tampon Krebs contenant ou non du glucose (8.3 mM) et/ou du GLP-1 (20 nM). La concentration intracellulaire d'AMPc est ensuite analysée par HTRF (B). Histogrammes blancs : traitement siRNA contrôle ; histogrammes gris : traitement siRNA DNM1. Cette expérience est préliminaire, seule une expérience a été réalisée, d'où l'absence de barre d'erreur.

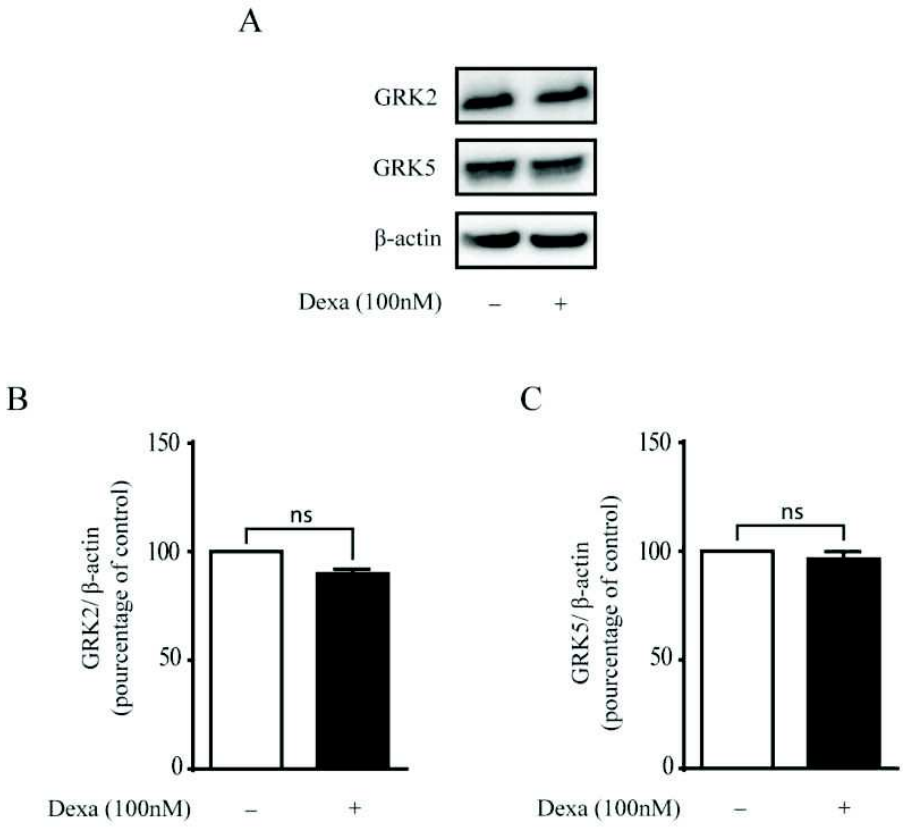


Figure3: Les glucocorticoïdes ne modulent pas l'expression des protéines GRK 2 et 5. La lignée de cellules INS-1E sont traité 24 h à la Dexa (100 nM). L'expression des GRK 2 et 5 est détectée par immunoblot (A). La quantification de l'intensité des bandes ciblant GRK 2 (B) et GRK 5 (C) est effectuée grâce au logiciel image J. L'ensemble des résultats présentés représente une moyenne de 3 expérimentations, un test de student a été réalisé grâce au logiciel GraphPad Prism.

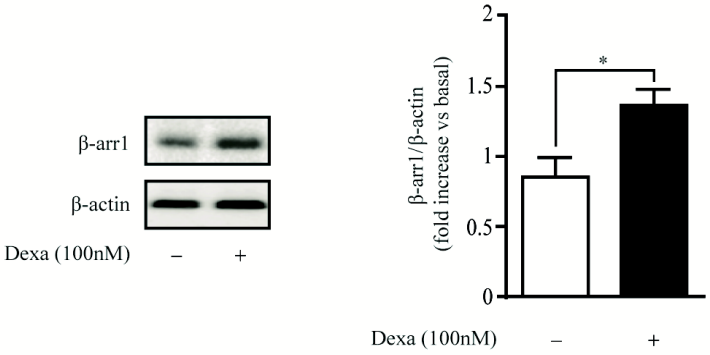


Figure4 : Les glucocorticoïdes augmentent l'expression de la protéine β-arrestine 1. La lignée de cellules INS-1E est soumise à un traitement de 24 h à la Dexa (100 nM). L'expression de la β-arrestine 1 est ensuite détectée par western blot et la moyenne de 5 expériences est représentée en histogramme et un test de student est réalisé. *p<0.05.

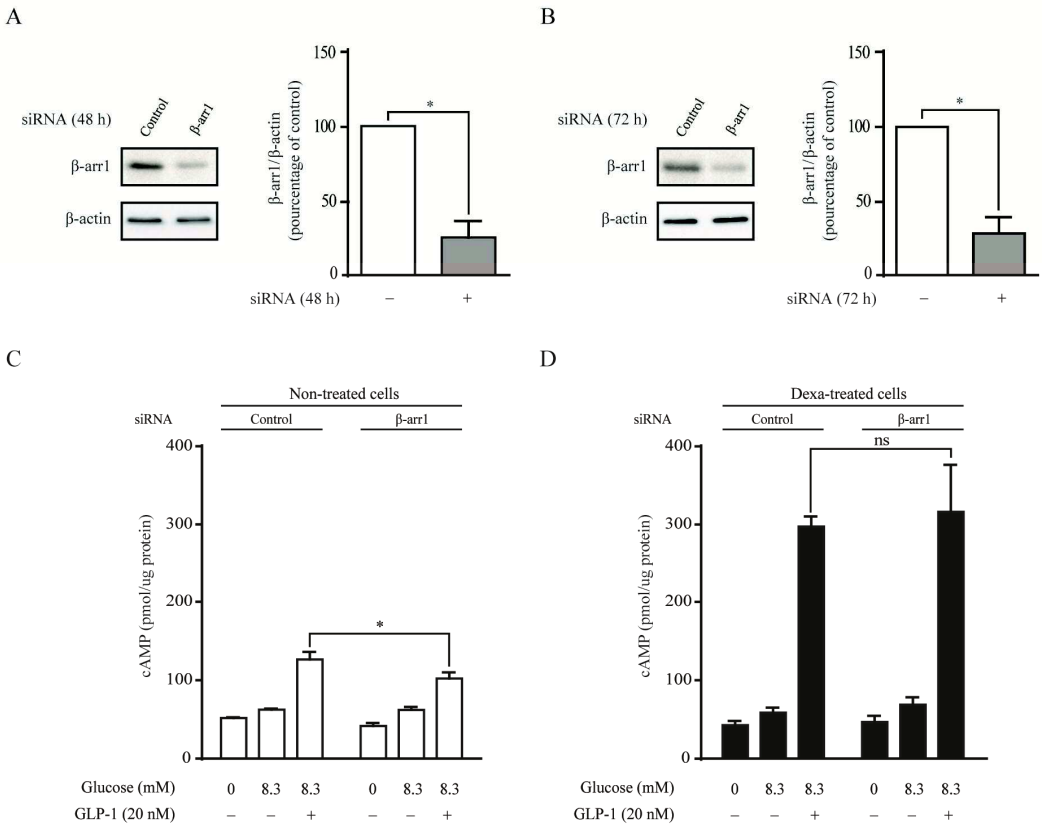


Figure5 : La modulation de l'expression de la β-arrestine 1 n'impacte pas la production d'AMPc induite par le GLP-1 dans les cellules INS-1E traitées aux glucocorticoïdes. Les cellules INS-1E sont transfectées 48 h (A) ou 72 h (B) avec 100 nM de siRNA β-arrestine 1, le taux d'invalidation de la protéine est mesuré par western blot et les moyennes respectivement de 3 et 4 expériences sont représentées par histogramme. Des tests de student sont réalisés. Histogrammes blanc : traitement siRNA contrôle ; Histogramme gris : traitement siRNA β-arr1. Après 48 h de transfection, les cellules sont mises en quiescence 2 h dans du tampon KRB puis incubées 20 min avec ou sans glucose (8.3 mM) +/- GLP-1 (20 nM) (C). Les cellules ont également été traitées 24 h avec ou sans Dexa (100 nM), après les 48 h de transfection (D). La production d'AMPc est ensuite analysée par HTRF sur les lysats cellulaires, puis des tests statistiques "2-way anova" sont réalisés sur 5 expériences indépendantes (C,D). *p<0.05.

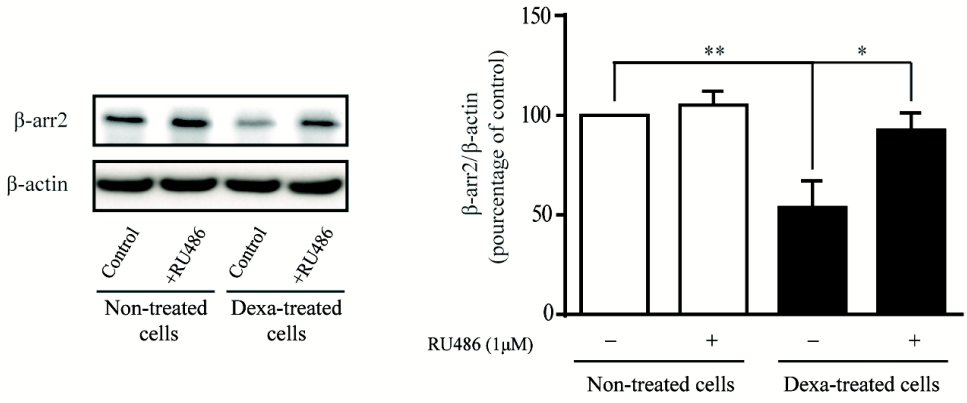


Figure6 : Les glucocorticoïdes diminuent l'expression de la β-arrestine 2 dans les cellules INS-1E. Les cellules INS-1E subissent un co-traitement de 24 h à la Dexa (100 nM) et au RU486 (1μM). Des quantités identiques de lysats sont déposées en western blot. Un test statistique "one way anova" est réalisé sur les moyennes de 5 expériences. Histogramme blanc : traitement Ethanol absolu 0.004%; histogramme noir : traitement Dexa. *p<0.05 ** p<0.01.

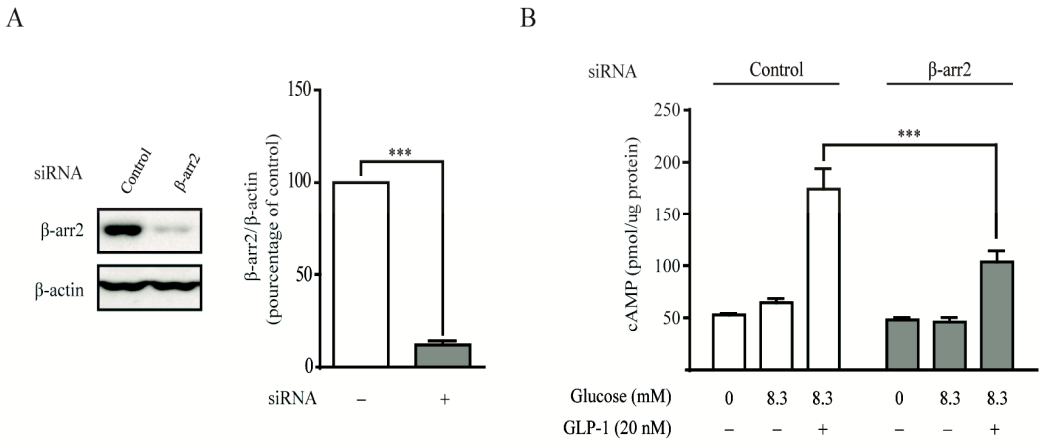


Figure7 : La modulation de l'expression de la β-arrestine 2 impacte sur la production d'AMPc induite par le GLP-1. Après 24 h de transfection avec le siRNA β-arr2, les lysats de cellules INS-1E sont analysés par western blot. Les moyennes de 3 expérimentations sont représentées dans un histogramme et un test de student est réalisé (A). Une mise en quiescence de 2 h des cellules dans du tampon Krebs puis une incubation de 20 min dans ce même tampon complémenté ou non avec du glucose (8.3 mM) et du GLP-1 (20 nM) est réalisée à la suite de la transfection. La concentration d'AMPc est ensuite analysée par HTRF (B) Un test de "2-way anova" est réalisé sur 4 expériences. Histogrammes blanc : traitement siRNA contrôle ; Histogramme gris : traitement siRNA β-arr2. ***p<0.001.

C. Resultats

Les glucocorticoides modulent l'expression de la dynamine 1.

Nous avons tout d'abord étudié l'effet d'un traitement de 24 h à la dexaméthasone (100nM) sur l'expression de protéines connues pour être impliquées dans l'internalisation, les dynamines 1 et 2, dans la lignée de cellules INS-1E. On ne constate aucune modification dans l'expression de la dynamine ubiquitaire, la dynamine 2 (Fig 1A). Cependant le traitement diminue de 30% l'expression de la dynamine 1 (Fig 1B). Cet effet est bloqué par le co-traitement au RU486 ou Mifepristone, antagoniste du GR (Fig 1B).

L'invalidation de la dynamine 1 impacte la production d'AMPc induite par le GLP-1.

Afin de déterminer le rôle de cette protéine dans la signalisation GLP-1, nous avons alors réalisé des expériences de siRNA pour invalider la protéine dynamine 1. La transfection diminue de plus de 80% l'expression de la protéine dynamine 1 (Fig 2A). A la suite de la transfection des cellules sont incubées 20 min avec ou sans glucose (8.3 mM) +/- GLP-1 (20 nM). Nous pouvons observer que l'invalidation impacte négativement sur la production d'AMPc induite par le GLP-1 (Fig 2B).

Les glucocorticoïdes ne modifient pas l'expression des protéines GRKs 2 et 5.

Par la suite nous nous sommes intéressés aux effets d'un traitement à la déxaméthasone sur l'expression des protéines impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs, les GRKs 2 et 5 et les β-arrestines 1 et 2. A la suite d'un traitement de 24 h à la Dexa (100 nM), nous n'avons observé aucune modification de l'expression des GRKs 2 et 5.

Les glucocorticoïdes modulent l'expression de la protéine β-arrestine 1.

Nous avons ensuite pu montrer que 24 h de traitement à 100nM de Dexa augmente de 30% l'expression de la β-arrestine 1 (Fig 4). Afin de préciser le rôle de la protéine dans la signalisation du récepteur GLP-1, nous avons réalisé une invalidation de la β-arrestine 1 par siRNA dans les cellules INS-1E et avons constaté une diminution de plus de 70% de l'expression totale de la protéine après 48 h (Fig 5A) et 72 h de transfection (Fig 5B). Après 72 h transfection, les cellules ont été mises en quiescence 2 h dans un tampon Krebs puis incubées 20 min avec +/- de glucose (8.3 mM) et +/- du GLP-1 (20 nM). Nous constatons

alors une diminution de 30% de la production d'AMPc induite par le peptide dans les cellules invalidées partiellement pour la β-arrestine 1 (Fig 5C). Ces résultats confirment les résultats précédemment obtenus par (Sonoda et al. 2008).

Dans un second temps nous avons vérifié si les effets des GCs sur la production d'AMPc induite par le GLP-1 est liée à l'augmentation de l'expression de la β-arrestine 1. Après 48 h de transfection nous avons traité les cellules INS-1E 24 h à la Dexa (100 nM), puis les avons mises en quiescence dans du tampon KRB pour 2 h et enfin les avons incubées dans ce même tampon complémenté en glucose (8.3 mM) et GLP-1 (20 nM) pendant 20 min. Nous n'avons observé aucune modification significative des effets des glucocorticoïdes sur la production d'AMPc induite par le GLP-1 (Fig 5D).

Les glucocorticoïdes diminuent l'expression de la β-arrestine 2 dans les cellules INS-1E.

Au contraire de l'expression de la β-arrestine 1, l'expression de la β-arrestine 2 est diminuée de presque 50% par le traitement aux glucocorticoïdes et cet effet est bloqué par le RU486 (Fig 6).

La modulation de l'expression de la β-arrestine 2 impacte sur la production d'AMPc induite par le GLP-1.

Dans les cellules invalidées pour la β-arrestine 2 (invalidation de près de 90% de la protéine par siRNA) (Fig 7A), la production d'AMPc induite par 20 nM de GLP-1 est significativement diminuée par rapport aux cellules contrôles (Fig 7B)

CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Conclusion et discussion

Tout au long de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la signalisation et au trafficking du récepteur GLP-1 et à la manière dont ils peuvent être modulés. Dans la première partie, nous avons étudié plus particulièrement les effets d'un agent diabétogène: les glucocorticoïdes (GCs).

Plusieurs études ont démontré un rôle des GCs dans la régulation de la fonction et de la masse des cellules β pancréatiques induite par le glucose. Au niveau clinique, les effets délétères des corticothérapies sur la fonction cellulaire β pancréatique ont été étudié en chronique et en ponctuel sur des patients sains et montrent une diminution des paramètres comme la sensibilité au glucose, l'index insulinogénique, ou le rapport $AUC_{c\text{-}pep}/AUC_{gluc}$ (Raalte et al. 2010). Au niveau moléculaire, de nombreuses études réalisées *in vivo* ou *in vitro* sur des îlots pancréatiques ou lignées cellulaires murines, ont montré un défaut du métabolisme glucidique de la cellule β, conduisant à un défaut de la fonction sécrétrice (revue dans Van Raalte, Ouwens, et Diamant 2009). Si dans les premiers temps de traitement, les GCs ont un effet bénéfique en augmentant la masse des cellules β entre autre en amplifiant la prolifération (Jörns et al. 2010; Roma et al. 2012), une prolongation du traitement amène à l'activation de voies apoptotiques (Jörns et al. 2010; revue dans Rojas et al. 2015). En plus de leurs effets sur la masse β pancréatique, les GCs peuvent agir sur la fonction. En effet ils vont agir à plusieurs étapes de la métabolisation du glucose en diminuant l'expression des transporteurs GLUT2 (Ogawa et al. 1992; Gremlich, Roduit, and Thorens 1997), et de la glucokinase (Borboni et al. 1996). Ils modifient également le profil des oscillations de calcium induite par la métabolisation du glucose et diminuent la concentration intracellulaire moyenne de l'ion (Lambillotte, Gilon, and Henquin 1997). L'ensemble de ces actions aura pour conséquence une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Zawalich et al. 2006; Lambillotte, Gilon, and Henquin 1997; Brunstedt and Nielsen 1981; Gremlich, Roduit, and Thorens 1997).

Une des cibles actuelles pour le traitement du diabète de type 2 est le récepteur GLP-1. En effet l'activation de ce récepteur dans la cellule β pancréatique déclenche des voies de signalisation régulant la survie et la fonction. Quelques études cliniques ont vu le jour afin de déterminer l'impact des GCs sur l'action des analogues stables du GLP-1. En 2007 une étude

de Ritzel et al. (2007) étudiant les effets du GLP-1 dans le cas d'un diabète cortico-induit ou d'un diabète de type 2 « classique », ne constate aucune variation d'efficacité du peptide. Plus tard, une autre étude réalisée sur des patients pré-diabétiques remarque une diminution des effets insulinotropes du peptide après un traitement aux GCs (Eriksen et al. 2015). L'action des GCs sur les effets du peptide se situe-t-elle au niveau des cellules productrices du GLP-1 que sont les cellules L intestinales ou bien impactent-ils la signalisation du récepteur au niveau de la cellule β ? Peu de données sont disponibles à l'heure actuelle pour répondre à cette question mais 2 études réalisées *in vitro* et *in vivo* apportent des éléments de réponse. En effet, elles montrent que les GCs diminuent la production et la sécrétion de GLP-1 par les cellules L (Sato et al. 2015b; Kappe et al. 2015). Mais quels sont les effets des GCs sur la signalisation du récepteur GLP-1? C'est ce que nous avons cherché à savoir durant ce projet de thèse et nous nous sommes plus particulièrement intéressés à leur impact moléculaire sur la signalisation du récepteur GLP-1 au sein de la cellule β pancréatique.

Quel est l'impact des glucocorticoïdes sur la production d'AMPc induite par le GLP-1? Afin de répondre à cette question nous avons regardé l'impact d'un traitement aux GCs sur la production du messager secondaire, l'AMPc. Nous avons alors pu constater une augmentation de la production d'AMPc induite par le GLP-1 dans les cellules INS-1E. Qu'elle soit en présence ou en absence de glucose, cette augmentation est réversée par l'utilisation du RU486 encore appelé Mifepristone, un antagoniste du GR. Si l'action des GCs est généralement médié par leur récepteur, ils peuvent agir indépendamment de celui-ci et par exemple modifier les propriétés physico-chimiques des membranes plasmiques. L'action des GCs sur la production d'AMPc induite par le GLP-1 s'effectue donc via le GR, facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires. En plus de ce résultat sur la lignée INS-1E nous avons réalisé l'expérience sur des îlots de souris et confirmé l'effet potentialisateur des GCs sur la génération d'AMPc induite par le GLP-1.

La concentration d'AMPc intracellulaire est un équilibre entre sa production par l'AC et sa dégradation par les PDEs.

Quels sont les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des ACs ? Pour étudier cette question nous avons stimulé nos cellules avec la forskoline, un activateur direct de l'AC,

c'est-à-dire qu'elle ne passe pas par un récepteur mais va au contraire se lier directement à l'enzyme (Awad et al. 1983). Or nous n'observons aucun effet du traitement sur la production d'AMPc induite par la forskoline suggérant que les glucocorticoïdes agissent la production d'AMPc en amont de l'enzyme.

Quels sont les effets des glucocorticoïdes sur l'expression des PDEs ? Il a précédemment été montré que les GCs pouvaient diminuer l'activité des PDEs dans les cellules d'ostéosarcomes humains (Ahlström et al. 2005). Dans notre étude, nous ne constatons aucune augmentation de la concentration d'AMPc basale suggérant que le taux d'expression des PDEs n'est pas diminué à l'issu du traitement aux GCs. De plus, lors de nos expériences de stimulation, nous avons utilisé l'IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), un inhibiteur large spectre de PDEs, qui provoque une accumulation d'AMPc dans la cellule et permet alors de détecter toutes variations de concentration. En effet, l'BMX appartenant à la famille des méthylxanthines, inhibe 9 des 11 familles des PDEs (les familles non concernées étant les PDEs 8 et 9) (Yves 2013)**.** Comme nous l'avons vu dans la partie « activation des RCPGs : la voie dépendante des protéines G », les PDEs principalement impliquées dans la régulation de l'AMPc dans les îlots sont les PDEs 1, 3 et 4 (Han et al. 1999; Degerman et al. 2011; Parker et al. 1995; Waddleton et al. 2008). L'ensemble de ces faits suggèrent que l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire n'est pas principalement due à l'inhibition des PDEs par les glucocorticoïdes. Cependant on notera que l'isoforme PDE8B, non inhibée par l'IBMX, intervient aussi dans les oscillations d'AMPc dans la cellule β pancréatique, et pourrait être impliquée dans notre étude. Afin de déterminer le réel impact des GCs sur les PDEs dans nos expériences, il serait intéressant de mesurer la concentration d'AMPc sans ajout d'IBMX, comme réalisé dans l'étude de (Shao et al. 2014) sur la lignée de cellules β-pancréatiques MIN-6. Cependant dans les tests de stimulation des cellules INS-1E que nous avons effectué sans IBMX, la quantité d'AMPc était insuffisante pour détecter des variations de concentrations.

Existe-t-il un lien entre l'augmentation de la production d'AMPc et l'apoptose? Le caractère toxique des GCs sur la cellule β étant connu, nous avons également mesuré la viabilité des cellules et avons constaté une apoptose significative à la fin du traitement. Afin de s'assurer que l'augmentation de la concentration d'AMPc n'était pas une conséquence directe de l'induction de l'apoptose dans les cellules, nous avons bloqué partiellement la mort cellulaire

programmée par l'utilisation d'un agent inhibiteur de caspases. Nous avons alors pu constater que cette inhibition n'avait aucun impact sur la production d'AMPc induite par le GLP-1.

Quel est l'impact des GCs sur la fonction de la cellule β? L'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc va déclencher l'activation de 2 effecteurs, PKA et EPAC2, qui à leur tour vont activer diverses protéines dont les kinases ERK1/2. Dans cette étude nous avons pu mettre en évidence que le traitement aux GCs pouvait moduler l'activité de ces kinases ERK1/2. Tout d'abord nous montrons que les GCs diminuent leur niveau de phosphorylation de base et en réponse à une stimulation au glucose. Des résultats similaires sont observés sur la fonction de la cellule β, qui se voit diminuée en réponse au glucose après 24 h de traitement aux GCs. Ces résultats confirment les effets diabétogènes des GCs précédemment décrits, sur la cellule β pancréatique (Zawalich et al. 2006; Lambillotte, Gilon, and Henquin 1997; Brunstedt and Nielsen 1981; Gremlich, Roduit, and Thorens 1997). Malgré ces effets néfastes sur la signalisation glucidique, les GCs n'ont pas d'effets sur l'activation/la phosphorylation des kinases ERK1/2 et la sécrétion d'insuline en réponse au GLP-1. Il apparait donc que le doublement de la production d'AMPc induit par le GLP-1 dans les cellules traitées aux GCs soit capable de compenser les effets délétères de ces mêmes GCs sur la fonction de la cellule β en réponse au glucose.

Comment les GCs sont-ils capables de potentialiser la réponse au GLP-1 dans la cellule β pancréatique? Les résultats précédents suggèrent que l'impact des glucocorticoïdes sur la production d'AMPc induite par le GLP-1, se situe en amont de l'AC. Dans la suite de l'étude nous avons donc porté notre attention sur le récepteur GLP-1 lui-même. Tout d'abord, nous avons vérifié le niveau d'expression du récepteur à la suite du traitement aux GCs. Il s'avère que nous n'avons constaté aucune modification de son expression protéique par western blot. Nous avons également réalisé des expériences d'immunofluorescence du récepteur GLP-1 afin d'étudier sa répartition au sein des cellules INS-1E. Les observations microscopiques nous ont permis de détecter une augmentation de la fluorescence à la périphérie de la cellule, suggérant un enrichissement des récepteurs à la membrane plasmique. Afin de préciser ce résultat nous avons utilisé une technique de microscopie particulière appelé TIRF (Total internal reflection fluorescence) (Ravier, Tsuboi, and Rutter 2008). Cette technique permet d'étudier spécifiquement des évènements membranaires et

sub-membranaires puisque le rayon d'excitation ne pénètre qu'une couche d'environ 150 nm. Nous avons alors observé une augmentation de la quantité de fluorescence, reflétant le nombre de récepteurs exprimés dans la zone sub-membranaire/membranaire. L'ensemble de ces observations suggèrent donc bien un changement de répartition du récepteur GLP-1 au sein de la cellule β pancréatique. On peut alors possible de suggérer que cet enrichissement à la membrane ait pour conséquence une augmentation de la fixation du ligand sur son récepteur, couplage à la protéine $G\alpha_s$, et de la production d'AMPc induite par le peptide.

Une étude de (Panjwani et al. 2013) a mis en évidence le caractère quelquefois aspécifique des anticorps anti-GLP-1. En effet il a pu observer (notamment avec l'anticorps que nous avons utilisé) qu'en présence de cellules KO pour le récepteur GLP-1, une bande au poids moléculaire attendu restait présente. Afin de confirmer l'exactitude de nos résultats, nous avons réalisé un siRNA pour le récepteur GLP-1 dans les cellules INS-1E, et avons constaté la disparition partielle de la bande par western blot. Lors des expériences de microscopie, nous avons marqué des cellules dispersées d'îlots de souris et nous avons pu observer une colocalisation du marquage des récepteurs GLP-1 avec les cellules insuliniques et non avec les cellules α. De plus, aucun marquage pour le récepteur n'a pu être détecté dans les cellules HEKs ne comportant pas le récepteur. L'ensemble de ces résultats suggère que l'anticorps que nous avons utilisé est spécifique du récepteur GLP-1.

L'expression membranaire d'un récepteur est finement régulée par les processus d'adressage, de désensibilisation et d'internalisation. L'augmentation d'expression membranaire du récepteur GLP-1 suggère que l'un ou l'autre de ces mécanismes soit modifié par les GCs. Nous avons donc dirigé notre étude sur l'internalisation du récepteur.

Quel est l'impact des glucocorticoïdes sur l'internalisation du récepteur GLP-1? Le processus par lequel le récepteur GLP-1 internalise est controversé. Si certaines études montrent l'implication des vésicules recouvertes de clathrine et de la présence de 4 sites de phosphorylation sur la queue C-terminale du récepteur (Widmann, Dolci, and Thorens 1996; Widmann, Dolci, and Thorens 1997b) d'autres mettent en cause un mode dépendant de la cavéoline (Syme, Zhang, and Bisello 2006; Thompson and Kanamarlapudi 2015a). Nous avons donc choisi de regarder l'expression de protéines intervenant dans les deux modes

d'internalisation : les dynamines (Syme, Zhang, and Bisello 2006; Thompson and Kanamarlapudi 2015a). Cette famille regroupe 3 membres : les dynamines 1, 2 et 3. La dynamine 3 ayant une expression réduite à certains organes excluant le pancréas, ne sera pas étudiée. La dynamine 2, protéine ubiquitaire, a notamment été récemment impliquée dans la régulation de la fonction cellulaire β lors d'une étude de Fan et al. (2015). Dans le cadre de notre étude sur les INS-1E, nous n'avons observé aucune modulation de l'expression de la protéine par les GCs. A l'inverse nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression de la dynamine 1. Les dynamines interviennent dans la dernière étape de l'internalisation en catalysant le processus de fission permettant la formation des vésicules. Une diminution de l'expression de la dynamine 1 aurait donc pour conséquence de diminuer l'internalisation des récepteurs et de provoquer leur rétention à la membrane. Ce résultat concorde donc avec l'observation précédente impliquant les GCs dans une modulation non pas de l'expression mais de la répartition des récepteurs dans la cellule.

Lors d'une étude réalisée par (Syme, Zhang, and Bisello 2006), l'utilisation d'un dominant négatif pour la dynamine 1 dans des cellules HEKs entraine une diminution de l'internalisation constitutive du récepteur GLP-1 et une augmentation de la production d'AMPc induite par le GLP-1. Une seconde étude montre au contraire que l'internalisation a une importante contribution dans la production d'AMPc et que son inhibition, à l'aide du même outil (dominant négatif pour la dynamine 1), diminue au contraire la formation du messager secondaire (Roed et al. 2015). En effet il a aussi été montré qu'il pouvait exister une 2ème vague de signalisation à l'intérieur des endosomes (Kuna et al. 2013). Ces deux dernières études suggèrent que l'internalisation du récepteur GLP-1 est nécessaire à la pleine activation des voies de signalisation en aval. Qu'en est-il dans les cellules β pancréatiques ?

La diminution de l'expression de la dynamine 1 est-elle en lien avec l'augmentation de la production de l'AMPc? Pour répondre à cette question nous avons invalidé spécifiquement la protéine dynamine 1 par siRNA afin de mimer les effets de notre traitement GCs. Etonnamment, les études préliminaires (n=1) montrent que l'invalidation de la dynamine 1 diminue la production d'AMPc induite par le GLP-1, en accord avec l'étude de Roed et al. (2015).

En résumé, les GCs provoquent une augmentation de la production d'AMPc induite par le GLP-1. D'autre part ils induisent la séquestration du récepteur GLP-1 au niveau de la membrane plasmique. Cependant la seule diminution de la dynamine 1 semble induire une diminution de la synthèse d'AMPc stimulée par le GLP-1. Si le seul fait de bloquer l'internalisation ne suffit pas à expliquer l'augmentation de la production d'AMPc, on peut imaginer que les GCs sont également capable de bloquer le découplage du récepteur à la protéine $G\alpha_s$. Les récepteurs présents à la membrane, en plus d'être augmentés en nombre, seraient également fonctionnellement plus actifs.

Quel est l'impact des glucocorticoïdes sur la désensiblisation du récepteur GLP-1? Deux familles de protéines jouent un rôle majeur dans le découplage des RCPGs des protéines G, ce sont les GRKs et les β-arrestines 1 et 2.

Il a tout d'abord été montré qu'un traitement à la déxaméthasone de cellules pulmonaires de rat, entraine une diminution de l'expression de GRK2 (Mak et al. 2002). De plus une seconde étude réalisée dans les cellules β, sur un autre récepteur de classe B, le récepteur GIP, a montré une implication de la GRK 2 dans la modulation de la sécrétion d'insuline (Tseng et al. 2000). Enfin une étude de (Jorgensen et al. 2005), implique les GRK 2, 3 et 5 dans la désensibilisation du récepteur GLP-1 dans la lignée COS-7. L'effet le plus prononcé a été retrouvé lors de la co-expression de GRK5 et de la β-arrestine 2 diminuant de 10 fois la production d'AMPc intracellulaire. Nous avons donc vérifié l'implication des GRK 5 et 2 dans la médiation des effets des GCs sur le récepteur GLP-1. Le traitement aux GCs n'impacte ni l'expression de GRK5 ni de GRK2. Par la suite nous pourrions vérifier que l'expression d'autres GRKs comme GRK3 ne soient pas modifiées par les GCs. Il serait également intéressant de mesurer d'éventuels changements d'activité enzymatique des GRKs par la technique décrite par Benovic et al. (1986).

La seconde famille de protéines impliquées dans la désensibilisation des RCPGs est la famille des β-arrestines et plus particulièrement les membres β-arrestines 1 et 2. Nous avons pu mettre en évidence une modulation de leurs expressions qui sont respectivement augmentée et diminuée pour la β-arrestines 1 et 2. Les mêmes résultats avaient été observé dans une étude de Oakley et al. (2012) sur une lignée de cellules d'adénocarcinomes humains. Ils avaient également montré que ces modulations d'expression étaient dues à des

effets génomiques des GCs. Dans le cas de l'augmentation de la protéine β-arrestine 1, le GR se fixe sur une séquence GRE de l'intron 1 du gène de la protéine, tandis que la répression du gène de la β-arrestine 2 s'effectue par la fixation du GR sur une séquence nGRE de l'intron 11 du gène.

Nous avons tout d'abord réalisé une invalidation de la β-arrestine 1 par siRNA en absence et en présence du traitement. En absence de traitement, nous confirmons les résultats obtenus par Sonoda et al. (2008). En effet l'invalidation de la protéine provoque une diminution d'environ 30% de la production d'AMPc induite par le GLP-1. Cependant lorsque nous traitons les cellules INS-1E aux GCs, nous n'observons pas d'effet significatif de l'invalidation de la protéine sur la production d'AMPc induite par le peptide par rapport aux cellules transfectées avec le siRNA « contrôle». Si la β-arrestines 1 médie la production d'AMPc induite par le GLP-1, l'augmentation de son expression par les GCs ne semble pas suffisante pour induire un doublement de production d'AMPc par l'activation du récepteur GLP-1.

Nous avons donc reporté notre attention sur la β-arrestines 2. Afin de mimer les effets des GCs sur l'expression de cette protéine, nous l'avons invalidé dans des cellules INS-1E. De façon suprenante, la diminution d'expression de la β-arrestine 2 impacte également négativement sur la production d'AMPC induite par le GLP-1, résultat similaire à celui que nous avions obtenu avec l'invalidation de la dynamine 1 et de la β-arrestine 1. Afin de confirmer ce résultat sur un modèle plus physiologique nous avons mesuré la production d'AMPc dans des îlots de souris KO pour la β-arrestine 2. Ces expériences sont à reproduire pour avoir un nombre suffisant de réplicas, mais les premiers résultats suggèrent une diminution de cette production en accord avec les résultats observés sur la lignée INS-1E.

En résumé, notre étude première montre que :

- Les GCs augmentent la production d'AMPc induite par le GLP-1, ce qui permet à la cellule de compenser les effets délétères des GCs sur l'activation des kinases ERK1/2 et la fonction des cellules β induite par le glucose.
- L'augmentation de production d'AMPc est corrélée à un enrichissement à la membrane du récepteur GLP-1.

L'augmentation de la production d'AMPc induite par le GLP-1 dans la cellules β traitées aux GCs pourrait donc être due à une diminution de l'internalisation et une augmentation de la fixation du GLP-1 sur son récepteur.

Dans la seconde étude nous avons pu montrer que :

- Les GCs diminuent l'expression de la β-arrestine 2 et de la dynamine 2, protéines susceptibles d'être impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs.
- Pour autant, une diminution d'expression de ces protéines, réalisée par siRNA, provoque une diminution de la production d 'AMPc induite par l'activation du récepteur GLP-1.

On pourrait alors imaginer qu'il existerait dans la cellule β différents pool d'AMPc différemment régulés par les GCs. Le premier pool, dépendant du couplage du récepteur GLP-1 à la protéine $G\alpha_s$, serait augmenté par le traitement aux GCs, permettant le maintien de l'activité des kinases ERK1/2 ainsi que la sécrétion d'insuline induites par le GLP-1. Le second pool, dépendant des β-arrestines 1 et 2 ainsi de la dynamine 1 (impliquée dans l'internalisation), serait diminué par les GCs et pourrait être engagé dans les effets délétères des GCs sur la cellule β comme l'apoptose.

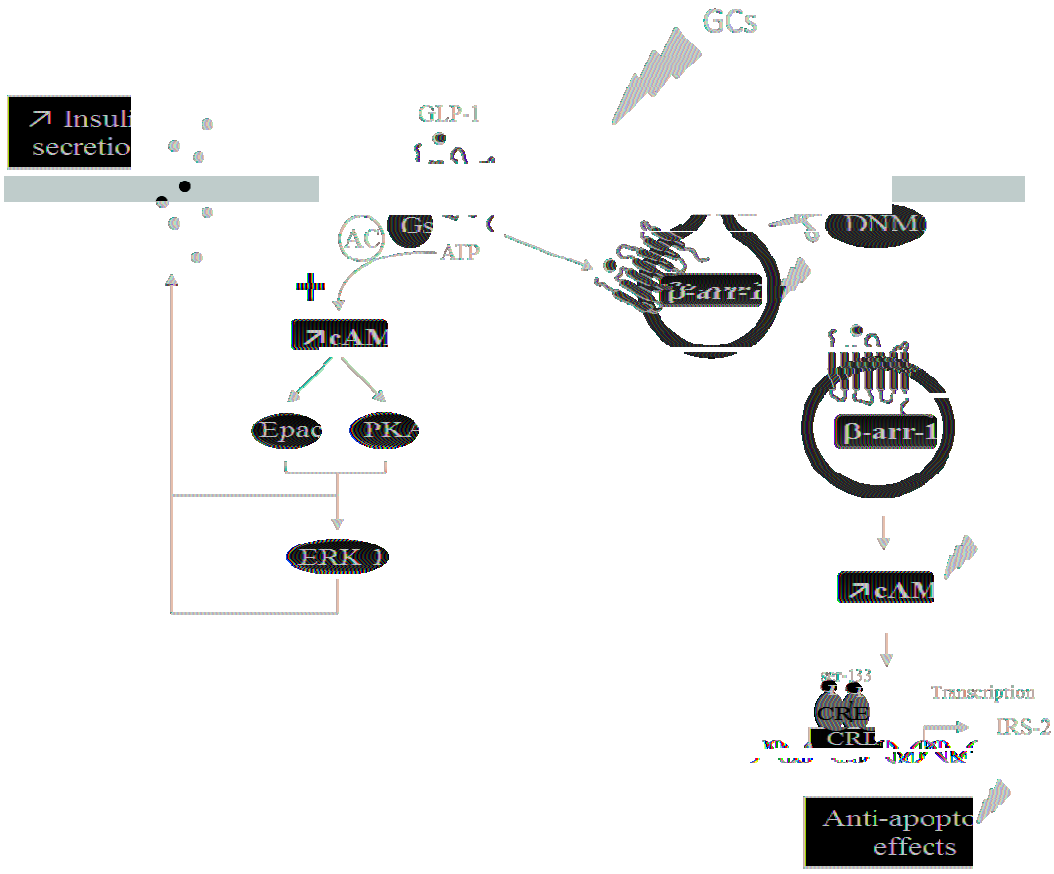


Schéma d'hypothèse du rôle des glucocorticoïdes sur la signalisation du récepteur GLP-1 dans la cellule β pancréatique.

En effet il a précédemment décrit par l'équipe, que la β-arrestine 1 était impliquée dans les actions anti-apoptotiques du GLP-1 sur la cellule β en médiant la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique bad induisant son inactivation (Quoyer et al. 2010). La protéine β-arrestine 2 pourrait également être impliquée dans ce processus puisqu'il a été montré que les souris invalidées pour la protéine présentent une diminution de la masse cellulaire β. Ces résultats montrent la nécessité de la β-arrestine 2 dans le maintient de la masse des cellules ce qui suggére soit un rôle dans les mécanismes de néogénèse/prolifération ou au contraire dans l'inhibition de l'apoptose.

B. Perspectives

Afin de conclure la première étude qui fera l'objet d'une publication d'ici la fin de l'année, nous souhaitons réaliser des expériences complémentaires. Tout d'abord nous voulons vérifier que l'induction de l'enrichissement à la membrane du récepteur GLP-1 par les GCs est réversible par le RU486 et est donc bien un effet GR-médié. Nous voudrions également confirmer ces résultats sur des îlots murins. Enfin il serait important de vérifier l'effet des GCs sur la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1 dans l'îlot.

Même si l'ensemble des résultats de cette étude n'a pas permis de déterminer le mécanisme par lequel les GCs potentialise les effets du GLP-1 sur la cellule β pancréatique, il a permis d'ouvrir des perspectives quant au rôle de la β-arrestine 2 dans la signalisation du récepteur GLP-1.

Une seconde étude a donc vu le jour. Dans cette optique nous avons défini un ensemble d'expériences à réaliser. Tout d'abord il serait intéressant de vérifier l'interaction de la protéine avec le récepteur GLP-1 par immunoprécipitation. Une étude de (Jorgensen et al. 2005) suggère en effet l'interaction de la protéine β-arrestine 2 avec le récepteur par l'utilisation une protéine de fusion entre les 2 protéines dans la lignée de cellules COS-7, cependant ce résultat est à confirmer dans les cellules β pancréatiques. De plus nous souhaiterions déterminer le rôle de la β-arrestine 2 dans la désensibilisation et l'internalisation du récepteur via l'utilisation d'une molécule de GLP-1 fluorescente nous permettant de suivre les changements de répartition du récepteur. Ensuite il serait important de déterminer le rôle de la β-arrestine 2 dans la signalisation du récepteur en regardant l'impact de son invalidation sur l'activation des kinases ERK1/2, du facteur de transcription CREB dans la lignée de cellules INS-1E. Enfin nous aimerions étudier plus précisément l'impact d'une invalidation sur la production d'AMPc induite par le GLP-1. En effet la technique de microscopie TIRF couplée à l'utilisation d'une sonde nous permet de visualiser les variations de concentrations d'AMPc dans les pools sub-membranaires et nous apporterait peut-être des premiers éléments de réponse sur la présence de ces différents pools modulés différemment par le récepteur GLP-1.

ANNEXE

Diabetologia (2014) 57:532–541
DOI 10.1007/s00125-013-3130-7

ARTICLE

β-Arrestin2 plays a key role in the modulation of the pancreatic beta cell mass in mice

Magalie A. Ravier · Michele Leduc · Joy Richard · Nathalie Linck · Annie Varrault · Nelly Pirot · Morgane M. Roussel · Joël Bockaert · Stéphane Dalle · Gyslaine Bertrand

Received: 8 August 2013 / Accepted: 13 November 2013 / Published online: 7 December 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract
Aims/hypothesis Beta cell failure due to progressive secretory dysfunction and limited expansion of beta cell mass is a key feature of type 2 diabetes. Beta cell function and mass are controlled by glucose and hormones/neurotransmitters that activate G protein-coupled receptors or receptor tyrosine kinases. We have investigated the role of β-arrestin (ARRB)2, a scaffold protein known to modulate such receptor signalling, in the modulation of beta cell function and mass, with a specific interest in glucagon-like peptide-1 (GLP-1), muscarinic and insulin receptors.

Methods β-arrestin2-knockout mice and their wild-type littermates were fed a normal or a high-fat diet (HFD). Glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion were assessed in vivo. Beta cell mass was evaluated in pancreatic sections. Free cytosolic [Ca^{2+}] and insulin secretion were determined using perifused islets. The insulin signalling pathway was evaluated by western blotting.
Results *Arrb2*-knockout mice exhibited impaired glucose tolerance and insulin secretion in vivo, but normal insulin sensitivity compared with wild type. Surprisingly, the absence of ARRB2 did not affect glucose-stimulated insulin secretion or GLP-1- and acetylcholine-mediated amplifications from perifused islets, but it decreased the islet insulin content and beta cell mass. Additionally, there was no compensatory beta cell mass expansion through proliferation in response to the HFD. Furthermore, *Arrb2* deletion altered the islet insulin signalling pathway.
Conclusions/interpretation ARRB2 is unlikely to be involved in the regulation of insulin secretion, but it is required for beta cell mass plasticity. Additionally, we provide new insights into the mechanisms involved in insulin signalling in beta cells.

Keywords β-Arrestin · GLP-1 · High-fat diet · Insulin secretion · Pancreatic beta cell mass · Pancreatic islet biology

Abbreviations

ACh	Acetylcholine
ARRB	β-Arrestin
AU	Arbitrary units
$[Ca^{2+}]_c$	Free cytosolic Ca^{2+} concentration
FOXO1	Forkhead box O1
GIPR	Gastric inhibitory polypeptide receptor
GLP-1R	Glucagon-like peptide-1 receptor
GPCR	G protein-coupled receptor
GSIS	Glucose-stimulated insulin secretion
GSK3	Glycogen synthase kinase 3

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00125-013-3130-7) contains peer-reviewed but unedited supplementary material, which is available to authorised users.

M. A. Ravier · M. Leduc · J. Richard · N. Linck · A. Varrault · M. M. Roussel · J. Bockaert · S. Dalle · G. Bertrand (✉)
CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier, France
e-mail: gyslaine.bertrand@igf.cnrs.fr

M. A. Ravier · M. Leduc · J. Richard · N. Linck · A. Varrault · M. M. Roussel · J. Bockaert · S. Dalle · G. Bertrand
Inserm, U661, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France

M. A. Ravier · M. Leduc · J. Richard · N. Linck · A. Varrault · M. M. Roussel · J. Bockaert · S. Dalle · G. Bertrand
Institut de Génomique Fonctionnelle, Universités de Montpellier 1 & 2, Montpellier, France

N. Pirot
Inserm, U896, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Centre Régional de Lutte Contre le Cancer Val d'Aurelle Paul Lamarque, Montpellier, France

N. Pirot
Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Université Montpellier 1, Montpellier, France

H&E	Haematoxylin and eosin
HFD	High-fat diet
IR	Insulin receptor
ND	Normal diet
PDX1	Pancreas/duodenum homeobox protein 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
RTK	Receptor tyrosine kinase

Introduction

Type 2 diabetes is characterised by a chronic hyperglycaemia due to defects in both insulin sensitivity and secretion. It is now established that beta cell failure results from a progressive secretory dysfunction and a limited expansion of the beta cell mass [1–3]. Beta cell function and mass are tightly controlled by glucose and are modulated by hormones and neurotransmitters that activate G protein-coupled receptors (GPCRs) or receptor tyrosine kinases (RTKs) [4, 5]. The neurohormonal amplification of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and also beta cell mass adaptation are mainly controlled by the incretin gastrointestinal hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the parasympathetic neurotransmitter acetylcholine (ACh), which both act through the activation of GPCRs [4, 6, 7]. The incretin GLP-1 binds the specific GLP-1 receptor (GLP-1R) that is positively coupled to the adenylyl cyclase through Gαs, leading to cAMP production [8]. ACh binds to M3 muscarinic receptors [6, 9] that are coupled via Gq/11-proteins to phospholipase C. This results, on the one hand, in inositol 1,4,5-triphosphate production and Ca^{2+} mobilisation from the endoplasmic reticulum and, on the other hand, to diacylglycerol production and protein kinase C activation [6]. In addition, several lines of evidence suggest a direct autocrine effect of insulin on beta cells [5, 10–12]. The insulin signalling pathway is mainly mediated through the insulin receptor (IR)/IRS/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt cascade [5, 11, 13]. It plays a critical role in the maintenance of the beta cell mass and a role in its own secretion has also been proposed [5, 10–12].

The β-arrestins (ARRBs) are ubiquitously expressed cytosolic proteins that were originally identified as negative regulators of GPCR signalling via desensitisation and internalisation processes. However, it is now well established that ARRBs can also act as multifunctional scaffolding proteins to elicit G-protein-independent signalling pathways by linking the activated GPCRs to various additional catalytically active effectors [14–17], and are strongly involved in several GPCR-mediated physiological effects [16, 18]. The two ARRBs isoforms, ARRB1 and ARRB2, share a high degree of structural homology, but they display specific functions in several physiological processes [16–19]. In addition, the roles of ARRBs are not only restricted to the regulation of GPCRs but also extend to RTK signalling pathways [14, 20]. Indeed, insulin has been shown in hepatocytes to promote the formation of a signalling complex in which ARRB2 was required to scaffold Src and Akt to the IR to ensure a full Akt activation [21].

We and others have shown that ARRB1 mediates GPCR signalling for GLP-1 [22–25], pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) [25] and M3 muscarinic agonists [26], and could be involved in the regulation of insulin secretion as well as beta cell survival and proliferation [27]. By contrast, little is known concerning the role of ARRB2 in beta cells. Only a recent study has reported that its deletion impaired glucose-induced insulin secretion in mice [28], though the impact on agonist-activated GPCRs and RTKs was not explored. In the present study, we have used *Arrb2*-knockout ($Arrb2^{-/-}$) mice to investigate the impact of *Arrb2* deletion on beta cell function and mass, with a specific interest in GLP-1, M3 and IR.

Methods

Materials The sources of primary and secondary antibodies used are listed in the electronic supplementary material (ESM) Table 1. GLP-1 was from Bachem (Bubendorf, Switzerland). The protease inhibitor mixture was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). All other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Animals The original heterozygous ($Arrb2^{+/-}$) mice were obtained from R. J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA). Mice were subsequently backcrossed onto C57BL/6J background (Charles River, Lyon, France). $Arrb2^{-/-}$ mice and their wild-type littermates ($Arrb2^{+/+}$) were generated by breeding heterozygous animals. Mouse genotyping was performed by PCR (ESM Fig. 1a) and verified by western blot (ESM Fig. 1b). All animal studies complied with the authorisation of the Ministry of Agriculture, France (D34-172-13). The mice were fed either with a standard normal diet (ND, 5% kJ% fat), or a high-fat diet (HFD, 45% kJ% fat; D12451; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA). Except when stated, all experiments were performed using 6- to 7-month-old female mice.

Glucose and insulin tolerance test measurements Glucose tolerance tests were performed on overnight-fasted mice by i.p. injection of glucose or by re-feeding tests. Insulin tolerance tests were performed on mice fasted for 4 h by i.p. injection of insulin (Umuline; Lilly, Giessen, Germany). Blood glucose levels were measured using an OneTouch Ultra glucometer (LifeScan, Issy les Moulineaux, France). Plasma insulin and glucagon levels were determined using a

sensitive rat insulin and glucagon RIA kits (Millipore, St Charles, MO, USA).

Islet isolation Islets were isolated after collagenase digestion of the pancreas [25], and were used either immediately after isolation or after an overnight culture in RPMI-1640 containing 10 mmol/l glucose and 7.5% (vol./vol.) FCS. The medium used for the experiments was a bicarbonate KRB supplemented with 1.1 mmol/l glucose [25].

Free cytosolic Ca^{2+} concentration, insulin secretion and content measurements For free cytosolic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_c$), cultured islets were loaded with 2 μmol/l Fura2-Leak-Resistant-AM (Tef Labs, Austin, TX, USA) for 2 h, placed into a temperature-controlled perifusion chamber and excited every 3 s at 340 and 380 nm; the emitted light was recorded at 510 nm. Insulin secretion from cultured islets was examined by perifusion or static incubation [29]. Islet or pancreas insulin content was determined after extraction in acid–ethanol. Insulin concentrations were determined using a rat insulin RIA kit (Millipore).

Western blot Immunoblots were performed on cell lysates from pancreatic islets as previously described [25]. Briefly, freshly isolated islets were harvested in cold lysis buffer and equal amounts of proteins were subjected to western blotting [25] with primary antibodies of interest (ESM Table 1).

Real-time quantitative RT-PCR Total RNA from mouse islets was extracted and DNase-treated using the RNAeasy microkit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative RT-PCR experiments were performed as previously described [25]. Primer sequences are listed in ESM Table 2.

Histological analysis and immunostaining of pancreases Pancreases were spread into flat embedding cassettes, fixed with 4% (vol./vol.) paraformaldehyde, paraffin embedded and longitudinally sectioned through the pancreatic head-to-tail axis (4 μm thickness). Three pancreatic sections per mouse, separated by at least 100 μm, were stained with haematoxylin and eosin (H&E), and scanned using a NanoZoomer slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan). The islet numbers were quantified and the area of each islet was measured with the NDP.view software, version 1.2 (http://ndp-view.software.informer.com/1.2/). For immunohistochemistry, deparaffinised pancreatic sections were boiled in 10 mmol/l citrate buffer for 30 min before blocking with 1% BSA-PBS 30 min at room temperature. Sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (ESM Table 1), followed by 1 h at room temperature with secondary antibodies (ESM Table 1) and DAPI. Sections were mounted in Mowiol (Sigma-Aldrich) and imaged using a Zeiss AxioImager microscope (Carl Zeiss, Marly le Roi, France).

Statistical analysis Data are presented as mean ± SEM. Statistically significant differences between groups were assessed by Student's *t* test or by ANOVA, followed by the Newman–Keuls test or a Bonferroni post test for multiple comparisons using GraphPad Prism software version 5.0 (www.graphpad.com/scientific-software/prism/). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

$Arrb2^{-/-}$ mice displayed glucose intolerance and reduced plasma insulin responses Body weight (not shown) and food intake (ESM Fig. 2b) were not significantly different between $Arrb2^{+/+}$ and $Arrb2^{-/-}$ mice, but $Arrb2^{-/-}$ mice displayed glucose intolerance. Indeed, after an i.p. glucose injection, blood glucose levels were higher at 15 and 30 min (Fig. 1a) in $Arrb2^{-/-}$ vs $Arrb2^{+/+}$ mice, while insulin tolerance tests showed similar insulin sensitivities (Fig. 1b). By contrast, glucose intolerance was associated with decreased plasma insulin levels 15 min after the i.p. injection of glucose (Fig. 1c). Similarly, fasted (Fig. 1f), postprandial (re-fed; Fig. 1f) and fed (Fig. 1d) blood glucose levels were increased while plasma insulin levels were reduced in re-fed and fed states (Fig. 1e, g) in $Arrb2^{-/-}$ vs $Arrb2^{+/+}$ mice. However, there were no significant differences in fed plasma glucagon levels between $Arrb2^{-/-}$ and $Arrb2^{+/+}$ mice (0.024±0.003 vs 0.028±0.003 pmol/l, respectively). Therefore, $Arrb2^{-/-}$ mice displayed glucose intolerance associated with decreased plasma insulin levels, suggesting reduced insulin secretion rather than defective insulin action.

$Arrb2^{-/-}$ islets displayed normal glucose-induced insulin secretion but lower islet insulin content To determine if ARRB2 was involved in beta cell secretory function, both free cytosolic Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) changes and insulin release were evaluated in vitro in response to glucose in isolated islets. An increase in glucose concentration from 1.1 to 16.7 mmol/l triggered the classic biphasic changes in $[Ca^{2+}]_c$ in both $Arrb2^{+/+}$ and $Arrb2^{-/-}$ islets (Fig. 2a). Neither the increases in $[Ca^{2+}]_c$ (Fig. 2a) nor $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Table 1) were affected in perifused $Arrb2^{-/-}$ mouse islets. Additionally, insulin secretion was not affected when expressed as pg/islet (Fig. 2b) or when the amount of secreted insulin was normalised to the islet insulin content (Fig. 2c). Similar results have been obtained from static islet incubations with various glucose concentrations (ESM Fig. 3). This indicates a preserved beta cell secretory function in response to glucose in $Arrb2^{-/-}$ islets. By contrast, the insulin content was significantly lower in

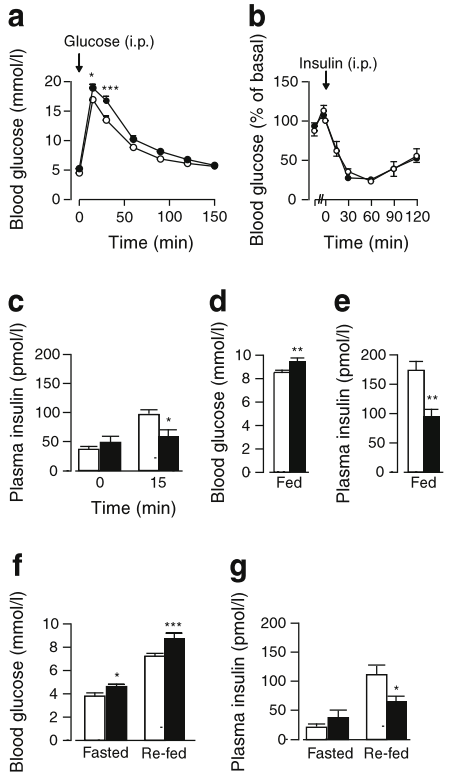


Fig. 1 *Arrb2*$^{-/-}$ mice displayed mild glucose intolerance and reduced plasma insulin levels. (**a**) Intraperitoneal glucose tolerance test: blood glucose levels were measured before and after an i.p. glucose injection (1.5 g/kg body weight) in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice. (**b**) Intraperitoneal insulin tolerance test: blood glucose levels were measured before and after the i.p. insulin injection (0.75 U/kg body weight) in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice. (**c**) During the glucose tolerance test, plasma insulin levels were measured before (0) and 15 min after the i.p. glucose injection. Blood glucose (**d**) and plasma insulin (**e**) levels in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice fed ad libitum. Blood glucose (**f**) and plasma insulin (**g**) levels were measured before (Fasted) and 3 h after re-feeding (Re-fed) in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice. Data are mean ± SEM from 12–14 mice. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ and $^{***}p<0.001$ compared with *Arrb2*$^{+/+}$ mice. White, *Arrb2*$^{+/+}$; black, *Arrb2*$^{-/-}$

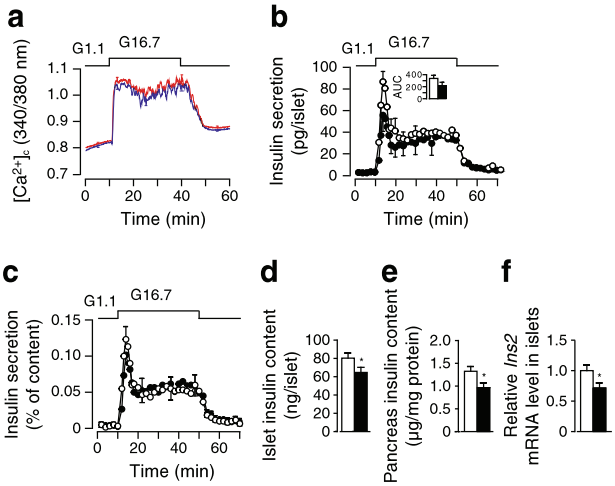


Fig. 2 *Arrb2*$^{-/-}$ islets displayed normal glucose-induced $[Ca^{2+}]_c$ and insulin secretion changes but lower insulin content. Glucose-induced $[Ca^{2+}]_c$ changes (**a**) and insulin release (**b**,**c**) in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice. After overnight culture, batches of 30–40 islets were perifused for 30 min with KRB containing 1.1 mmol/l and then 16.7 mmol/l glucose for 40 min. (**b**) Inset, AUC (pg/islet in 7 min) for the first phase of secretion (from 10 to 17 min). Insulin content of isolated islets (**d**) and whole pancreas (**e**), and *Ins2* mRNA levels in islets (**f**) in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ islets. *Ins2* mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR on total islet RNA using a mouse-specific primer (see ESM Table 2) and normalised to the geometric mean of the expression levels of four housekeeping genes (*Gusb*, *Hprt*, *Gapdh* and *Tubb2*). Data are mean ± SEM from six to eight independent experiments or animals. $^{*}p<0.05$ compared with *Arrb2*$^{+/+}$. Blue line/white symbols, *Arrb2*$^{+/+}$; red line/black symbols, *Arrb2*$^{-/-}$. G1.1, 1.1 mmol/l glucose; G16.7, 16.7 mmol/l glucose

Arrb2$^{-/-}$ compared with *Arrb2*$^{+/+}$ mice in size-matched isolated islets (20%) (Fig. 2d) and in the whole pancreas (27%) (Fig. 2e). Furthermore, *Ins2* mRNA levels were lower in *Arrb2*$^{-/-}$ islets (28%) (Fig. 2f) without a significant alteration of *Ins1* mRNA levels (1±0.10 vs 1.10±0.18 arbitrary units [AU], NS, for *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$, respectively). Taken together, these results indicate *Arrb2*$^{-/-}$ islets showed a decreased insulin expression but normal beta cell secretory function in response to glucose.

Arrb2$^{-/-}$ *islets displayed normal GLP-1- and ACh-induced insulin secretion* As ARRBs are well known for their role in GPCR signalling [14–16], isolated islets were subjected to GLP-1 or ACh stimulation. GLP-1 (20 nmol/l) increased the frequency and reduced the amplitude of glucose-induced oscillations of $[Ca^{2+}]_c$ in *Arrb2*$^{+/+}$ islets (Fig. 3a, Table 1). The amplitude decrease was mainly due to the increased nadir level of the $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Table 1). Interestingly, no significant differences could be observed under GLP-1-induced $[Ca^{2+}]_c$ changes between *Arrb2*$^{-/-}$ and *Arrb2*$^{+/+}$ islets (Fig. 3a, Table 1). Additionally, GLP-1 potentiated GSIS similarly in *Arrb2*$^{-/-}$ and *Arrb2*$^{+/+}$ islets during perifusion (Fig. 3b) and static incubations (ESM Fig. 3). Similarly, ACh (1 μmol/l) induced a comparable sustained $[Ca^{2+}]_c$ plateau which was either flat or superimposed with fast oscillations (Fig. 3c, Table 2), and potentiated insulin secretion in *Arrb2*$^{-/-}$ islets to a similar extent as in *Arrb2*$^{+/+}$ islets (Fig. 3d). Therefore, ARRB2 is not involved in the regulation of GSIS or in the response to GLP-1 or ACh.

Arrb2$^{-/-}$ *mice displayed a reduced pancreatic beta cell mass* The lower pancreatic insulin content of *Arrb2*$^{-/-}$ mice could result not only from impaired preproinsulin gene transcription (reduced *Ins2* mRNA levels) but also from a reduced beta cell mass. Morphometric histological analysis of pancreatic sections showed no differences in islet number (Fig. 4a, b), while the proportion of islet occupation per section (i.e. islet area) was decreased by ~30% in *Arrb2*$^{-/-}$ pancreases (Fig. 4a, c), due to a modified distribution of the

Table 1 Quantification of $[Ca^{2+}]_c$ oscillations under glucose and GLP-1 stimulation

Measure	G16.7		G16.7+GLP-1	
	Arrb2$^{+/+}$	*Arrb2*$^{-/-}$	*Arrb2*$^{+/+}$	*Arrb2*$^{-/-}$
Frequency (min^{-1})	0.234±0.010	0.261±0.016[a]	0.454±0.060**	0.484±0.037**,[a]
Nadir	0.917±0.003	0.919±0.003[a]	0.987±0.011**	0.969±0.010**,[a]
Peak	1.103±0.009	1.092±0.006[a]	1.109±0.009	1.096±0.005[a]
Amplitude	0.186±0.010	0.173±0.007[a]	0.122±0.010**	0.137±0.007**,[a]

* $p<0.05$ and ** $p<0.01$ compared with G16.7

[a] NS compared with *Arrb2*$^{+/+}$

G16.7, 16.7 mmol/l glucose

islet sizes (increased amount of smaller islets and reduced amount of large islets) (Fig. 4d). Immunohistochemical staining for insulin and glucagon and cell nuclei number counting did not show any abnormalities in islet architecture (Fig. 4e) but, in keeping with reduced islet size, indicated a decrease in beta cell (35%) but no change in alpha cell number (Fig. 4f), resulting in a relative significant enrichment in islet alpha cells (23.51±0.85 vs 28.90±1.38%, $p<0.001$) in *Arrb2*$^{-/-}$ pancreases. In addition, beta cell size did not differ significantly between *Arrb2*$^{-/-}$ and *Arrb2*$^{+/+}$ mice (Fig. 4g).

ARRB2 is involved in the insulin signalling pathway in pancreatic islets Numerous studies have documented the role of insulin through the IR/PI3K/Akt pathway for the expansion of the beta cell mass [5, 10, 11]. ARRB2 has been shown to be involved in the regulation of the insulin signalling pathway in liver by scaffolding c-Src and Akt to the IR, allowing full Akt activation [21], and we observed that ARRB2 plays a key role in the modulation of the beta cell mass. Therefore, we have investigated whether ARRB2 could be involved in the regulation of the insulin signalling pathway in islets. In *Arrb2*$^{+/+}$ islets, insulin (100 nmol/l) induced a clear Akt phosphorylation (~1.7-fold increase), which was strongly reduced in *Arrb2*$^{-/-}$ mouse islets ($p<0.001$) (Fig. 5). Moreover, insulin-induced phosphorylation of the transcription factor Forkhead box O (FOXO)1 and the glycogen synthase kinase 3 (GSK3)β, two major downstream targets of Akt, were also markedly reduced (Fig. 5). Taken together, our results establish for the first time that ARRB2 contributes to the insulin signalling pathway in islets.

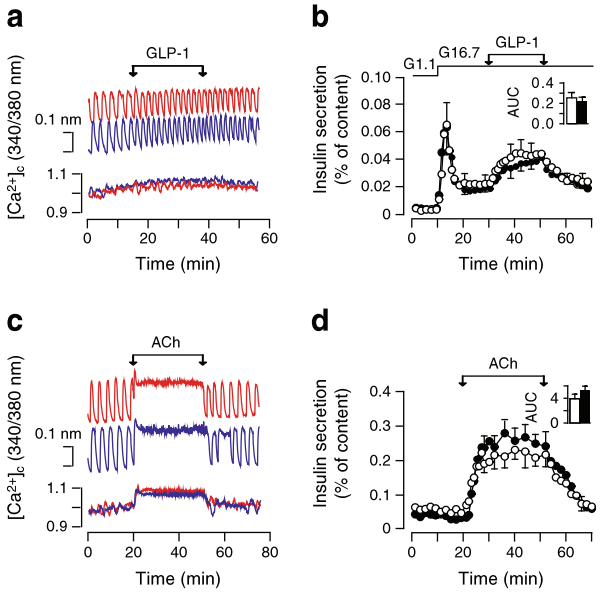


Fig. 3 *Arrb2*$^{-/-}$ islets displayed normal responses to GLP-1 and ACh. The impact of GLP-1 (20 nmol/l) on $[Ca^{2+}]_c$ changes (**a**) and insulin secretion (**b**) in the presence of 16.7 mmol/l glucose. The impact of ACh (1 μmol/l) on $[Ca^{2+}]_c$ changes (**c**) and insulin secretion (**d**) in the presence of 11 mmol/l glucose in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ islets. (**a**,**c**) The two upper traces illustrate individual experiments while the two lower traces illustrate the average. (**b**,**d**) Insets, AUC (pg/islet/min) during either GLP-1 or ACh stimulation. Data are mean ± SEM from five to six independent experiments or animals. Blue line/white symbols, *Arrb2*$^{+/+}$; red line/black symbols, *Arrb2*$^{-/-}$. G1.1, 1.1 mmol/l glucose; G16.7, 16.7 mmol/l glucose

Arrb2$^{-/-}$ *mice were unable to compensate their beta cell mass under HFD* Diet-induced obesity leads to insulin resistance and to a compensatory increase in beta cell mass [2, 30, 31]. Thus, to explore the potential role of ARRB2 in the compensatory beta cell mass expansion, we examined *Arrb2*$^{-/-}$ male mice fed with HFD. Compared with ND, feeding *Arrb2*$^{+/+}$ mice with an HFD for 19 weeks resulted in an insulin-resistant phenotype, characterised by higher weight gain (ESM Fig. 2a) for a similar food intake (ESM Fig. 2b), elevated fasted (ESM Fig. 2c) and fed (ESM Fig. 2d) blood glucose and fed plasma insulin levels (ESM Fig. 2e). *Arrb2*$^{-/-}$ mice displayed similar increases in weight gain (ESM Fig. 2a) and food intake (ESM Fig. 2b) to *Arrb2*$^{+/+}$ mice. Additionally, HFD similarly enhanced blood glucose levels in *Arrb2*$^{-/-}$ and *Arrb2*$^{+/+}$ mice (ESM Fig. 2c, d), but *Arrb2*$^{-/-}$ mice exhibited a clearly lower increase in plasma insulin levels (ESM Fig. 2e).

Table 2 Quantification of $[Ca^{2+}]_c$ changes under ACh stimulation

Measure	*Arrb2*$^{+/+}$	*Arrb2*$^{-/-}$
Cells with a sustained level of $[Ca^{2+}]_c$	17/38 (44.7%)	16/37 (43.2%)[a]
Frequency (min^{-1})	2.795±0.248	3.467±0.265[a]
Δ response	0.075±0.003	0.085±0.004[a]

[a] NS compared with *Arrb2*$^{+/+}$

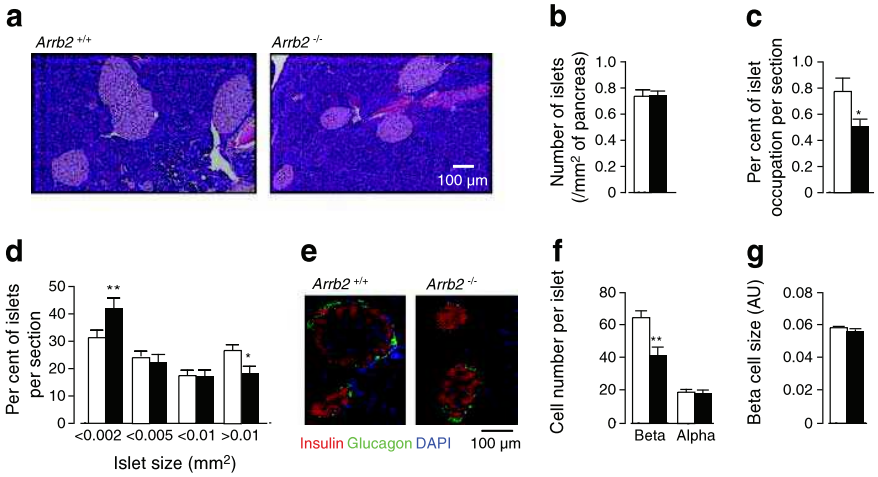


Fig. 4 *Arrb2*$^{-/-}$ mice displayed reduced beta cell mass. (**a**) Representative microphotographs of H&E-stained pancreatic sections from *Arrb2*$^{+/+}$ or *Arrb2*$^{-/-}$ mice. (**b**) Islet number and (**c**) occupation of pancreatic section in *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ pancreatic sections. (**d**) Distribution of islets according to their size (area) expressed as percentage of total islet number per pancreatic section in islets from *Arrb2*$^{+/+}$ and *Arrb2*$^{-/-}$ mice. (**e**) Representative immunofluorescence staining of insulin and glucagon from a pancreatic section. Nuclei have been labelled with DAPI. Quantification of beta and alpha cell number per islet (**f**) and beta cell size (**g**) within the islets from *Arrb2*$^{+/+}$ vs *Arrb2*$^{-/-}$ mice, using the calibrated ImageJ analysis program. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ compared with *Arrb2*$^{+/+}$ mice. White, *Arrb2*$^{+/+}$; black, *Arrb2*$^{-/-}$

Morphometric analysis of pancreatic sections showed that while *Arrb2*$^{+/+}$ littermates displayed a doubling of their islet area occupation per section (Fig. 6a) and an increase in islet number (Fig. 6b), *Arrb2*$^{-/-}$ mice were unable to compensate these variables and therefore, their islet mass under the HFD (Fig. 6a, b). As expected, beta cell mass (Fig. 6d, f) and proliferation (Ki67-positive beta cells) (Fig. 6c, g) were both increased in *Arrb2*$^{+/+}$ islets under the HFD, while both variables remained unchanged in *Arrb2*$^{-/-}$ islets (Fig. 6d–g).

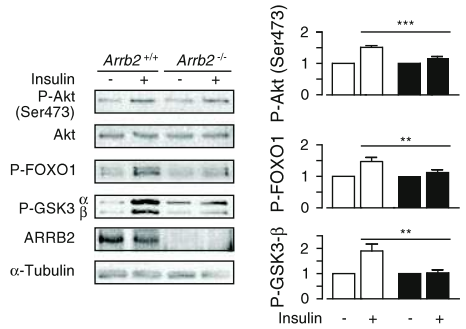


Fig. 5 ARRB2 is involved in insulin signalling in mouse pancreatic islets. Freshly isolated islets were distributed in batches of 120–150, subjected to a 2 h quiescent period in bicarbonate KRB with 1.1 mmol/l glucose and then incubated with insulin (100 nmol/l) for 10 min. Representative immunoblots show the comparative effects of insulin on phosphorylation of Akt, FOXO1 and GSK3 in islets from *Arrb2*$^{+/+}$ and *Arrb2*$^{-/-}$ mice; the graphs illustrate the quantitative analysis of increase in protein phosphorylation over basal level by densitometry using ImageJ. Data are mean ± SEM from three to four independent experiments from 15–20 mice. $^{**}p<0.01$ and $^{***}p<0.001$ compared with insulin treatment in *Arrb2*$^{+/+}$ islets. White, *Arrb2*$^{+/+}$; black, *Arrb2*$^{-/-}$

Discussion

ARRB1 and ARRB2 play key roles in various receptor functions by acting as either GPCR desensitisers or signal transducers through the coupling of activated GPCRs or RTKs to additional non-canonical signalling pathways. Beta cell function and mass are tightly controlled by glucose and are modulated by GPCRs and RTKs. The neurohormonal amplification of GSIS and beta cell mass adaptation are ensured mainly by GPCRs such as GLP-1 and M3 muscarinic receptors, but also by RTKs such as IRs. In this study, we have used *Arrb2*$^{-/-}$ mice to assess the role of ARRB2 in beta cell function and mass, with a specific interest in GLP-1 and ACh actions, and have addressed its potential implication in the insulin signalling pathway. Our study shows that *Arrb2* deletion in mice did not impact on GSIS or GLP-1 and ACh responses in vitro, but it reduced beta cell mass in normal conditions and avoided its compensatory increase under an HFD. Furthermore, the absence of ARRB2 altered the islet insulin signalling pathway.

Our *Arrb2*$^{-/-}$ mice were mildly glucose intolerant, with higher fasted and postprandial blood glucose levels. Nevertheless, despite their higher blood glucose levels, *Arrb2*$^{-/-}$ mice exhibited lower amount of plasma insulin in response to glucose load in the re-fed and fed ad libitum states, but displayed similar insulin sensitivities to *Arrb2*$^{+/+}$ mice. Therefore, the in vivo glucose intolerance in *Arrb2*$^{-/-}$ mice was likely to have been caused by an insufficient insulin release in response to glucose rather than insulin resistance. In spite of the lower plasma insulin, which suggests a beta cell defect, glucose-induced $[Ca^{2+}]_c$ changes and GSIS (normalised to % of content) were similar in isolated islets from *Arrb2*$^{-/-}$ and

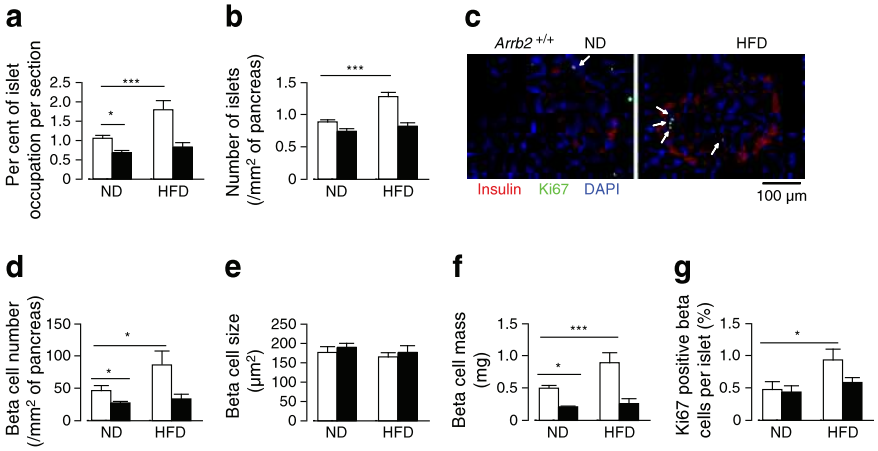


Fig. 6 *Arrb2*$^{-/-}$ mice are unable to compensate their beta cell mass under HFD conditions. Islet occupation (**a**) and number (**b**) in H&E-stained pancreatic sections from male *Arrb2*$^{+/+}$ and *Arrb2*$^{-/-}$ mice fed with ND or HFD from 8 weeks for 19 weeks. (**c**) Representative images of insulin and Ki67 immunofluorescence staining in pancreatic sections from male *Arrb2*$^{+/+}$ mice fed with either standard ND or HFD. Ki67-positive nuclei in beta cells are indicated with arrowheads. (**d**) beta cell number and (**e**) beta cell size within the islets from *Arrb2*$^{+/+}$ and *Arrb2*$^{-/-}$ mice. (**f**) The beta cell mass was measured by multiplying the total area occupied by the insulin-positive cells in three pancreatic sections with the weight of the pancreas for each mouse. (**g**) Quantification of Ki67-positive beta cells expressed as percentage of beta cells per islet from *Arrb2*$^{+/+}$ and *Arrb2*$^{-/-}$ mice. Data are mean ± SEM from four animals. $^{*}p<0.05$ and $^{***}p<0.001$. White, *Arrb2*$^{+/+}$; black, *Arrb2*$^{-/-}$

Arrb2$^{+/+}$ mice. Moreover, the ability of ACh and GLP-1 to modulate $[Ca^{2+}]_c$ changes and potentiate GSIS was unaffected in *Arrb2*$^{-/-}$ islets, indicating that ARRB2 is unlikely to play a crucial role in GSIS and the amplification mediated by GLP-1R and M3 muscarinic receptors. Conflicting results have been reported concerning the interactions of ARRB2 and GLP-1R. Indeed, it has been shown in HEK293 cells that, on GLP-1 activation, ARRB2 was not recruited to the receptor and consequently was not involved in GLP-1R endocytosis [32]. Others have reported that ARRB2 was recruited to the activated GLP-1R and that the interaction markedly reduced G protein-mediated cAMP accumulation [33, 34]. Furthermore, in HEK293T, GLP-1-mediated ARRB2 recruitment was decreased when GLP-1R were co-expressed with gastric inhibitory polypeptide receptors (GIPRs), suggesting that GLP-1/GIP receptor heteromerisation protected from receptor desensitisation [35]. As both GIPR and GLP-1R are highly co-expressed in beta cells [8], such mechanisms could explain the lack of effects of *Arrb2* deletion on GLP-1-potentiated GSIS in our study. Additionally, the lack of ARRB2 could be compensated by ARRB1, the other isoform. However, it should be noted that we did not observe any compensatory increases in *Arrb1* mRNA levels in *Arrb2*$^{-/-}$ islets (not shown), and that despite their high structural homology, ARRB1 and ARRB2 are not generally functionally redundant, but exert specific functions [16, 18]. In that sense, and in contrast to ARRB2, we and others have shown that ARRB1 is involved in GLP-1 [22, 23, 25] and M3 [26] receptor signalling pathways for the stimulation of insulin secretion [27].

By contrast, if we have observed that ARRB2 is unlikely to play a crucial role in GSIS and in the amplification mediated by GLP-1R and M3 muscarinic receptors, *Arrb2* deletion decreased total pancreas and islet insulin content, and decreased the beta cell mass. This may explain the lowered plasma insulin levels recorded in vivo in *Arrb2*$^{-/-}$ mice. The decreased insulin content was associated with a reduced expression of *Ins2* but not *Ins1* mRNA levels. This differential regulation of *Ins2* and *Ins1* genes has been reported by others [36–38]. Moreover, *Arrb2*$^{-/-}$ mice under the ND displayed a relatively lower islet size (due to an increased amount of small islets and a reduced amount of large islets), associated with a decrease in beta cell number, suggesting that ARRB2 is required for the maintenance of mouse beta cell mass in vivo. In adults, the beta cell mass is stable because of a slow turnover rate, but it displays dynamic plasticity when needed to compensate for differing insulin requirements of the organism. Thus, in most situations of insulin resistance, such as obesity, there is a compensatory increase in beta cell mass, where beta cell proliferation plays a key role [11, 39–41]. In agreement with previous reports, we observed that C57BL/6 J mice fed with a moderate increase in dietary fat (45%) displayed higher body weight gain and moderate hyperglycaemia and hyperinsulinaemia. In addition, *Arrb2*$^{+/+}$ mice under the HFD showed a compensatory increase in beta cell mass due to proliferation (i.e. increase in Ki67-positive beta cells). In our study no change in beta cell size was observed, suggesting that hyperplasia, rather than hypertrophy, was involved. By contrast, *Arrb2*$^{-/-}$ mice under the HFD did not display a compensatory increase in beta cell mass, and this inability was correlated with no increase in beta cell proliferation. Our study shows for the first time that ARRB2 is required not only for the maintenance of the beta cell mass under normal conditions but also for the compensatory beta cell mass expansion under conditions where the insulin demand is increased.

As ARRB2 is ubiquitously expressed, the defective beta cell mass expansion observed in *Arrb2*-global-knockout mice could be the indirect consequence of ARRB2 action in non-beta cells, such as insulin resistance from other tissues generating metabolic disturbances [21]. In addition, it should be mentioned that neuronal and systemic signals from liver have been reported to trigger the compensatory increase in beta cell number in insulin-resistant states [42–44], and such mechanisms could be defective in the absence of ARRB2. Future studies using beta-specific *Arrb2*$^{-/-}$ mice should determine if the defective beta cell mass expansion is due to a direct effect of ARRB2 on beta cells rather than a consequence of the absence of ARRB*2* in the whole organism.

Pancreatic beta cell proliferation and survival are regulated by signalling pathways linked to GPCRs and RTKs such as IR [4, 5]. The insulin signalling pathway in beta cells is mainly mediated through the IR/IRS/PI3K/Akt cascade [5, 11, 13]. Any deficiency of this pathway has been reported to induce beta cell failure by affecting the beta cell mass expansion [11, 13, 45]. Akt activation requires PI3K-mediated phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) synthesis, allowing its recruitment to the plasma membrane, where it is subsequently phosphorylated at Thr308 and Ser473 via the phosphoinositide-dependent kinase 1 and by the mammalian target of rapamycin complex 2, respectively [46]. In addition to this canonical PI3K/Akt pathway, ARRB2 was previously shown in hepatocytes to be required downstream of the IR for a full Akt activation [21]. Here, we found that insulin-induced Akt phosphorylation at Ser473 requires ARRB2-dependent mechanisms in mouse pancreatic islets. In beta cells, FOXO1 and GSK3 are two major targets of Akt which represses, by phosphorylation, the negative effects of FOXO1 and GSK3 on insulin production and beta cell mass. Indeed, Akt inactivates FOXO1 by phosphorylation, allowing its exclusion from the nucleus where it represses the expression of both insulin and pancreas/duodenum homeobox protein 1 (PDX1), a transcription factor involved in the maintenance of the beta cell mass [38, 47]. Similarly, GSK3β seems to negatively regulate the beta cell mass by repressing the insulin signalling pathway and by reducing PDX1 levels in islets [48, 49]. The involvement of ARRB2 in IR–Akt signalling is functionally relevant in vivo, as the phosphorylation of GSK3 and FOXO1, two Akt downstream targets, were strongly decreased on insulin stimulation in islets isolated from *Arrb2*$^{-/-}$ mice. Thus, our results suggest that ARRB2 could play a role in the control of pancreatic beta cell mass and insulin production through, at least in part, the insulin–Akt–GSK3β/FOXO1 signalling pathway. Full validation of the role of ARRB2 in the insulin signalling pathway awaits the results of further experiments testing the effects of an overexpression of the protein both in vitro and in vivo.

Besides IR, numerous GPCRs that could exhibit potential ARRB2-dependent signalling pathways are also involved in the regulation of beta cell mass [4, 40]. It is also noteworthy that there is evidence for ARRB1 roles in GLP-1 mediation of cell survival and proliferation in clonal beta cell lines [22, 24, 25]. Indeed, we showed in INS-1E cells that ARRB1 is required for GLP-1R-mediated sustained ERK1/2 activation leading to IRS-2 expression [25], and it has recently been reported that ARRB1 is involved in the proliferative action of GLP-1 via the recruitment of c-Src in beta INS832/13 cells [24]. Additionally, we have reported in MIN6 cells that ARRB1 mediates anti-apoptotic effects of GLP-1 by phosphorylating the pro-apoptotic protein BAD through ERK1/2 activation [22].

Our results are in disagreement with the phenotype of *Arrb2*$^{-/-}$ mice previously reported by Luan et al [21]. First, in contrast to our study, their colony of *Arrb2*$^{-/-}$ mice exhibited hyperinsulinaemia in the re-fed state and in response to glucose load during glucose tolerance tests, an effect associated with lower insulin sensitivity and higher hepatic glucose production during hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp studies in 8-week-old mice. The authors concluded on the one hand that glucose intolerance associated with hyperinsulinaemia resulted from impaired insulin sensitivity [21], but on the other hand, they recently reported that glucose intolerance was due to impairment of insulin secretion as they observed impaired GSIS in vivo during a hyperglycaemic clamp and in vitro in static islet incubations [28].

The reason for the discrepancies between their results and our study is unclear, but the differences cannot result from differences in ages and/or experimental conditions. Indeed, in our study the defective insulin secretion in vivo and normal insulin sensitivity were not only observed in 6–7-month-old mice but also in 8-week-old animals (not shown). In addition, we have observed that in vitro GSIS is not affected in perifused or static incubated *Arrb2*$^{-/-}$ islets, regardless of the glucose concentration used. The differences between the two colonies of *Arrb2*$^{-/-}$ mice might rather be explained by environmental/epigenetic phenomena and/or C57BL/6 mouse strain differences. Indeed, it is now clear that there are several C57BL/6 substrains with genetic differences for which different phenotypes have been reported [50].

In summary, we report that ARRB2 is not involved in GSIS or in GLP-1 or ACh potentiation of GSIS, but plays a key role in the modulation of the beta cell mass and, notably, contributes to the compensatory beta cell mass expansion in response to high-fat feeding through proliferation. In addition, we provide further new insights concerning the mechanisms of insulin action in pancreatic beta cells by showing that ARRB2 is required for full Akt activation by the hormone.

Acknowledgements The authors thank R. J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, USA) for kindly providing *Arrb2*$^{-/-}$ mice, C. Bonnans (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France) for supplying and genotyping the animals, and L. Forichon and F. Rubio

(Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France) for technical assistance with the animals. The authors thank colleagues at the Reseau Histologie Expérimentale de Montpellier (Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France) and Montpellier Rio Imaging facilities (Institut des Neurosciences de Montpellier, Montpellier, France) for technical assistance.

Funding This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Fondation pour la Recherche Médicale (grant DRM20101220453), research allocation from SFD-ALFEDIAM.

Duality of interest The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

Contribution statement MAR contributed to the design, the acquisition, analysis and interpretation of the data and to the drafting/revision of the article. ML, JR, NL, AV, NP, MMR, SD and JB contributed to the acquisition and analysis of the data and to the revision of the manuscript. GB contributed to the conception and design of the study, the acquisition, analysis and interpretation of data and to drafting/revising the manuscript. All authors approved the final version to be published.

References

1. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 52:102–110
2. Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. J Clin Invest 116:1802–1812
3. Weir GC, Bonner-Weir S (2013) Islet beta cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. Ann NY Acad Sci 1281: 92–105
4. Ahren B (2009) Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. Nat Rev Drug Discov 8:369–385
5. Goldfine AB, Kulkarni RN (2012) Modulation of beta-cell function: a translational journey from the bench to the bedside. Diabetes Obes Metab 14(Suppl 3):152–160
6. Gilon P, Henquin JC (2001) Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. Endocr Rev 22:565–604
7. Thorens B (2011) Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. Diabetes Obes Metab 13(Suppl 1): 82–88
8. Campbell JE, Drucker DJ (2013) Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action. Cell Metab 17:819–837
9. Gautam D, Han SJ, Duttaroy A et al (2007) Role of the M3 muscarinic acetylcholine receptor in beta-cell function and glucose homeostasis. Diabetes Obes Metab 9(Suppl 2):158–169
10. Leibiger IB, Leibiger B, Berggren PO (2008) Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. Annu Rev Nutr 28:233–251
11. Assmann A, Hinault C, Kulkarni RN (2009) Growth factor control of pancreatic islet regeneration and function. Pediatr Diabetes 10:14–32
12. Braun M, Ramracheya R, Rorsman P (2012) Autocrine regulation of insulin secretion. Diabetes Obes Metab 14(Suppl 3):143–151
13. Elghazi L, Bernal-Mizrachi E (2009) Akt and PTEN: beta-cell mass and pancreas plasticity. Trends Endocrinol Metab 20:243–251
14. Kovacs JJ, Hara MR, Davenport CL, Kim J, Lefkowitz RJ (2009) Arrestin development: emerging roles for beta-arrestins in developmental signaling pathways. Dev Cell 17:443–458
15. Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2005) Transduction of receptor signals by beta-arrestins. Science 308:512–517
16. Luttrell LM, Gesty-Palmer D (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. Pharmacol Rev 62:305–330
17. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. Annu Rev Physiol 69:483–510
18. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ (2011) Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists. Trends Mol Med 17:126–139
19. DeFea KA (2011) Beta-arrestins as regulators of signal termination and transduction: how do they determine what to scaffold? Cell Signal 23:621–629
20. Hupfeld CJ, Olefsky JM (2007) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. Annu Rev Physiol 69:561–577
21. Luan B, Zhao J, Wu H et al (2009) Deficiency of a beta-arrestin-2 signal complex contributes to insulin resistance. Nature 457:1146–1149
22. Quoyer J, Longuet C, Broca C et al (2010) GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 285:1989–2002
23. Sonoda N, Imamura T, Yoshizaki T, Babendure JL, Lu JC, Olefsky JM (2008) Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. Proc Natl Acad Sci U S A 105:6614–6619
24. Talbot J, Joly E, Prentki M, Buteau J (2012) beta-Arrestin1 mediated recruitment of c-Src underlies the proliferative action of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta INS832/13 cells. Mol Cell Endocrinol 354:65–70
25. Broca C, Quoyer J, Costes S et al (2009) beta-Arrestin 1 is required for PAC1 receptor-mediated potentiation of long-lasting ERK1/2 activation by glucose in pancreatic beta-cells. J Biol Chem 284:4332–4342
26. Kong KC, Butcher AJ, McWilliams P et al (2010) M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1. Proc Natl Acad Sci U S A 107:21181–21186
27. Dalle S, Ravier MA, Bertrand G (2011) Emerging roles for beta-arrestin-1 in the control of the pancreatic beta-cell function and mass: new therapeutic strategies and consequences for drug screening. Cell Signal 23:522–528
28. Zhang M, Zhu Y, Mu K et al (2013) Loss of beta-arrestin2 mediates pancreatic-islet dysfunction in mice. Biochem Biophys Res Commun 435:345–349
29. Bertrand G, Ishiyama N, Nenquin M, Ravier MA, Henquin JC (2002) The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. J Biol Chem 277:32883–32891
30. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 444:840–846
31. Sachdeva MM, Stoffers DA (2009) Minireview: meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. Mol Endocrinol 23:747–758
32. Syme CA, Zhang L, Bisello A (2006) Caveolin-1 regulates cellular trafficking and function of the glucagon-like peptide 1 receptor. Mol Endocrinol 20:3400–3411
33. Jorgensen R, Martini L, Schwartz TW, Elling CE (2005) Characterization of glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin 2 interaction: a high-affinity receptor phenotype. Mol Endocrinol 19:812–823
34. Jorgensen R, Kubale V, Vrecl M, Schwartz TW, Elling CE (2007) Oxyntomodulin differentially affects glucagon-like peptide-1 receptor beta-arrestin recruitment and signaling through Galpha(s). J Pharmacol Exp Ther 322:148–154
35. Schelshorn D, Joly F, Mutel S, Hampe C, Breton B, Mutel V, Lutjens R (2012) Lateral allosterism in the glucagon receptor family: glucagon-like peptide 1 induces G-protein-coupled receptor heteromer formation. Mol Pharmacol 81:309–318

36. Alejandro EU, Lim GE, Mehran AE et al (2011) Pancreatic beta-cell Raf-1 is required for glucose tolerance, insulin secretion, and insulin 2 transcription. FASEB J 25:3884–3895
37. Gu C, Stein GH, Pan N et al (2010) Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. Cell Metab 11:298–310
38. Meur G, Qian Q, da Silva XG et al (2011) Nucleo-cytosolic shuttling of FoxO1 directly regulates mouse Ins2 but not Ins1 gene expression in pancreatic beta cells (MIN6). J Biol Chem 286:13647–13656
39. Lee YC, Nielsen JH (2009) Regulation of beta cell replication. Mol Cell Endocrinol 297:18–27
40. Gunasekaran U, Hudgens CW, Wright BT, Maulis MF, Gannon M (2012) Differential regulation of embryonic and adult beta cell replication. Cell Cycle 11:2431–2442
41. Thorens B (2013) The required beta cell research for improving treatment of type 2 diabetes. J Intern Med 274:203–214
42. Imai J, Katagiri H, Yamada T et al (2008) Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. Science 322:1250–1254
43. El Ouaamari A, Kawamori D, Dirice E et al (2013) Liver-derived systemic factors drive beta cell hyperplasia in insulin-resistant states. Cell Rep 3:401–410
44. Yi P, Park JS, Melton DA (2013) Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. Cell 153:747–758
45. Buzzi F, Xu L, Zuellig RA et al (2010) Differential effects of protein kinase B/Akt isoforms on glucose homeostasis and islet mass. Mol Cell Biol 30:601–612
46. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science 307:1098–1101
47. Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y et al (2002) The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. J Clin Invest 110:1839–1847
48. Liu Y, Tanabe K, Baronnier D, Patel S, Woodgett J, Cras-Meneur C, Permutt MA (2010) Conditional ablation of Gsk-3beta in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. Diabetologia 53:2600–2610
49. Liu Z, Tanabe K, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA (2008) Mice with beta cell overexpression of glycogen synthase kinase-3beta have reduced beta cell mass and proliferation. Diabetologia 51:623–631
50. Zurita E, Chagoyen M, Cantero M et al (2011) Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. Transgenic Res 20:481–489

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Abderrahmani, Amar, Séverine Cheviet, Mourad Ferdaoussi, Thierry Coppola, Gérard Waeber, et Romano Regazzi. 2006. « ICER Induced by Hyperglycemia Represses the Expression of Genes Essential for Insulin Exocytosis ». *The EMBO Journal* 25 (5): 977‑86. doi:10.1038/sj.emboj.7601008.

Ahlström, Mikael, Minna Pekkinen, Minna Huttunen, et Christel Lamberg-Allardt. 2005. « Dexamethasone down-Regulates cAMP-Phosphodiesterase in Human Osteosarcoma Cells ». *Biochemical Pharmacology* 69 (2): 267 - 75. doi:10.1016/j.bcp.2004.09.012.

Ahrén, B. 2000. « Autonomic Regulation of Islet Hormone Secretion--Implications for Health and Disease ». *Diabetologia* 43 (4): 393‑410. doi:10.1007/s001250051322.

Alken, Martina, Claudia Rutz, Robert Köchl, Ute Donalies, Morad Oueslati, Jens Furkert, Doreen Wietfeld, et al. 2005. « The Signal Peptide of the Rat Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1 Promotes Receptor Expression but Is Not Essential for Establishing a Functional Receptor ». *The Biochemical Journal* 390 (Pt 2): 455‑64. doi:10.1042/BJ20050113.

Anagnostis, Panagiotis, Vasilios G. Athyros, Konstantinos Tziomalos, Asterios Karagiannis, et Dimitri P. Mikhailidis. 2009. « The Pathogenetic Role of Cortisol in the Metabolic Syndrome: A Hypothesis ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94 (8): 2692 ‑2701. doi:10.1210/jc.2009-0370.

Andrali, Sreenath S., Qingwen Qian, et Sabire Ozcan. 2007. « Glucose Mediates the Translocation of NeuroD1 by O-Linked Glycosylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15589 - 96. doi:10.1074/jbc.M701762200.

An, R., G. da Silva Xavier, H.-X. Hao, F. Semplici, J. Rutter, et G. A. Rutter. 2006. « Regulation by Per-Arnt-Sim (PAS) Kinase of Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Nuclear Import in Pancreatic Beta-Cells ». *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 5): 791‑93. doi:10.1042/BST0340791.

Arnette, Don, Tara Beers Gibson, Michael C. Lawrence, Bridgette January, Shih Khoo, Kathleen McGlynn, Colleen A. Vanderbilt, et Melanie H. Cobb. 2003. « Regulation of ERK1 and ERK2 by Glucose and Peptide Hormones in Pancreatic Beta Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32517‑25. doi:10.1074/jbc.M301174200.

Artalejo, Cristina R., Abdeladim Elhamdani, et H. Clive Palfrey. 2002. « Sustained Stimulation Shifts the Mechanism of Endocytosis from Dynamin-1-Dependent Rapid Endocytosis to Clathrin- and Dynamin-2-Mediated Slow Endocytosis in Chromaffin Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6358‑63. doi:10.1073/pnas.082658499.

Ashcroft, F. M., S. J. Ashcroft, et D. E. Harrison. 1988. « Properties of Single Potassium Channels Modulated by Glucose in Rat Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Physiology* 400 (juin): 501‑27.

Awad, J. A., R. A. Johnson, K. H. Jakobs, et G. Schultz. 1983. « Interactions of Forskolin and Adenylate Cyclase. Effects on Substrate Kinetics and Protection against Inactivation by Heat and N-Ethylmaleimide ». *The Journal of Biological Chemistry* 258 (5): 2960‑65.

B

Baggio, Laurie L., et Daniel J. Drucker. 2007. « Biology of Incretins: GLP-1 and GIP ». *Gastroenterology* 132 (6): 2131 - 57. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054.

Baldwin, J. M. 1994. « Structure and Function of Receptors Coupled to G Proteins ». *Current Opinion in Cell Biology* 6 (2): 180‑90.

Barker, Christopher J., Ingo B. Leibiger, et Per-Olof Berggren. 2013. « The pancreatic islet as a signaling hub ». *Advances in Biological Regulation* 53 (1): 156 - 63. doi:10.1016/j.jbior.2012.09.011.

Barnes, Peter J. 2011. « Glucocorticosteroids: Current and Future Directions ». *British Journal of Pharmacology* 163 (1): 29‑43. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01199.x.

Barnes, William G., Eric Reiter, Jonathan D. Violin, Xiu-Rong Ren, Graeme Milligan, et Robert

J. Lefkowitz. 2005. « Beta-Arrestin 1 and Galphaq/11 Coordinately Activate RhoA and Stress Fiber Formation Following Receptor Stimulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 8041‑50. doi:10.1074/jbc.M412924200.

Barragán, J. M., J. Eng, R. Rodríguez, et E. Blázquez. 1999. « Neural Contribution to the Effect of Glucagon-like Peptide-1-(7-36) Amide on Arterial Blood Pressure in Rats ». *The American Journal of Physiology* 277 (5 Pt 1): E784‑91.

Bennett, S. T., et J. A. Todd. 1996. « Human Type 1 Diabetes and the Insulin Gene: Principles of Mapping Polygenes ». *Annual Review of Genetics* 30: 343 ‑ 70. doi:10.1146/annurev.genet.30.1.343.

Benovic, J. L., F. Mayor, R. L. Somers, M. G. Caron, et R. J. Lefkowitz. 1986. « Light-Dependent Phosphorylation of Rhodopsin by Beta-Adrenergic Receptor Kinase ». *Nature* 321 (6073): 869 ‑ 72. doi:10.1038/321869a0.

Bensellam, Mohammed, D Ross Laybutt, et Jean-Christophe Jonas. 2012. « The molecular mechanisms of pancreatic β-cell glucotoxicity: recent findings and future research directions ». *Molecular and cellular endocrinology* 364 (1-2): 1‑27. doi:10.1016/j.mce.2012.08.003.

Bensellam, M., L. Van Lommel, L. Overbergh, F. C. Schuit, et J. C. Jonas. 2009. « Cluster Analysis of Rat Pancreatic Islet Gene mRNA Levels after Culture in Low-, Intermediate- and High-Glucose Concentrations ». *Diabetologia* 52 (3): 463‑76. doi:10.1007/s00125-008-1245-z.

Bernard, C., M. F. Berthault, C. Saulnier, et A. Ktorza. 1999. « Neogenesis vs. Apoptosis As Main Components of Pancreatic Beta Cell Ass Changes in Glucose-Infused Normal and Mildly Diabetic Adult Rats ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (10): 1195‑1205.

Bertrand, Gyslaine, Nobuyoshi Ishiyama, Myriam Nenquin, Magalie A. Ravier, et Jean-Claude Henquin. 2002. « The Elevation of Glutamate Content and the Amplification of Insulin Secretion in Glucose-Stimulated Pancreatic Islets Are Not Causally Related ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 32883 ‑ 91. doi:10.1074/jbc.M205326200.

Biering, H., G. Knappe, H. Gerl, et H. Lochs. 2000. « [Prevalence of diabetes in acromegaly and Cushing syndrome] ». *Acta Medica Austriaca* 27 (1): 27‑31.

Bledsoe, Randy K., Valerie G. Montana, Thomas B. Stanley, Chris J. Delves, Christopher J. Apolito, David D. McKee, Thomas G. Consler, et al. 2002. « Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition ». *Cell* 110 (1): 93‑105.

Bloom, William. 1931. « A New Type of Granular Cell in the Islets of Langerhans of Man ». *The Anatomical Record* 49 (4): 363‑71. doi:10.1002/ar.1090490406.

Boatright, Kelly M., et Guy S. Salvesen. 2003. « Mechanisms of Caspase Activation ». *Current Opinion in Cell Biology* 15 (6): 725‑31.

Bockaert, J., et J. P. Pin. 1999. « Molecular Tinkering of G Protein-Coupled Receptors: An Evolutionary Success ». *The EMBO Journal* 18 (7): 1723 ‑ 29. doi:10.1093/emboj/18.7.1723.

Bohn, L. M., R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov, K. Peppel, M. G. Caron, et F. T. Lin. 1999. « Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking Beta-Arrestin 2 ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5449): 2495‑98.

Borboni, P., O. Porzio, R. Magnaterra, A. Fusco, G. Sesti, R. Lauro, et L. N. Marlier. 1996. « Quantitative Analysis of Pancreatic Glucokinase Gene Expression in Cultured Beta Cells by Competitive Polymerase Chain Reaction ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 117 (2): 175‑81.

Borg, L. A., A. Andersson, C. Berne, et J. Westman. 1975. « Glucose Dependent Alterations of Mitochondrial Ultrastructure and Enzyme Content in Mouse Pancreatic Islets Maintained in Tissue Culture: A Morphometrical and Biochemical Study ». *Cell and Tissue Research* 162 (3): 313‑21.

Bosco, Domenico, Mathieu Armanet, Philippe Morel, Nadja Niclauss, Antonino Sgroi, Yannick D. Muller, Laurianne Giovannoni, Géraldine Parnaud, et Thierry Berney. 2010. « Unique Arrangement of Alpha- and Beta-Cells in Human Islets of Langerhans ». *Diabetes* 59 (5): 1202‑10. doi:10.2337/db09-1177.

Bos, Johannes L. 2006. « Epac Proteins: Multi-Purpose cAMP Targets ». *Trends in Biochemical Sciences* 31 (12): 680‑86. doi:10.1016/j.tibs.2006.10.002.

Breuner, C. W., et M. Orchinik. 2002. « Plasma Binding Proteins as Mediators of

Corticosteroid Action in Vertebrates ». *The Journal of Endocrinology* 175 (1): 99‑112.

Brissova, Marcela, Michael J. Fowler, Wendell E. Nicholson, Anita Chu, Boaz Hirshberg, David M. Harlan, et Alvin C. Powers. 2005. « Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 53 (9): 1087‑97. doi:10.1369/jhc.5C6684.2005.

Broca, Christophe, Julie Quoyer, Safia Costes, Nathalie Linck, Annie Varrault, Pierre-Marie Deffayet, Joël Bockaert, Stéphane Dalle, et Gyslaine Bertrand. 2009. « Beta-Arrestin 1 Is Required for PAC1 Receptor-Mediated Potentiation of Long-Lasting ERK1/2 Activation by Glucose in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (7): 4332‑42. doi:10.1074/jbc.M807595200.

Brown, D. A., et E. London. 1998. « Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14: 111 ‑ 36. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.111.

Brubaker, Patricia L., et Younes Anini. 2003. « Direct and Indirect Mechanisms Regulating Secretion of Glucagon-like Peptide-1 and Glucagon-like Peptide-2 ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81 (11): 1005 ‑ 12. doi:10.1139/y03-107.

Bruchas, Michael R., Tara A. Macey, Janet D. Lowe, et Charles Chavkin. 2006. « Kappa Opioid Receptor Activation of p38 MAPK Is GRK3- and Arrestin-Dependent in Neurons and Astrocytes ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 18081 ‑ 89. doi:10.1074/jbc.M513640200.

Brunstedt, J., et J. H. Nielsen. 1981. « Direct Long-Term Effect of Hydrocortisone on Insulin and Glucagon Release from Mouse Pancreatic Islets in Tissue Culture ». *Acta Endocrinologica* 96 (4): 498‑504.

Bruzzone, R., G. Tamburrano, A. Lala, M. Mauceri, B. Annibale, C. Severi, L. de Magistris, F. Leonetti, et G. Delle Fave. 1983. « Effect of Bombesin on Plasma Insulin, Pancreatic Glucagon, and Gut Glucagon in Man ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 56 (4): 643 ‑ 47. doi:10.1210/jcem-56-4-643.

Bullock, B. P., R. S. Heller, et J. F. Habener. 1996. « Tissue Distribution of Messenger Ribonucleic Acid Encoding the Rat Glucagon-like Peptide-1 Receptor ». *Endocrinology* 137 (7): 2968 ‑ 78. doi:10.1210/endo.137.7.8770921.

Burén, Jonas, Hui-Xia Liu, Jørgen Jensen, et Jan W. Eriksson. 2002. « Dexamethasone Impairs Insulin Signalling and Glucose Transport by Depletion of Insulin Receptor Substrate-1, Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B in Primary Cultured Rat Adipocytes ». *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 146 (3): 419‑29.

Buteau, Jean, Sylvain Foisy, Erik Joly, et Marc Prentki. 2003. « Glucagon-like Peptide 1 Induces Pancreatic Beta-Cell Proliferation via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor ». *Diabetes* 52 (1): 124‑32.

Butler, A. E., R. P. Robertson, R. Hernandez, A. V. Matveyenko, T. Gurlo, et P. C. Butler. 2012. « Beta Cell Nuclear Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family A (MafA) Is Deficient in Type 2 Diabetes ». *Diabetologia* 55 (11): 2985‑88. doi:10.1007/s00125-012-2666-2.

Butler, Alexandra E., Juliette Janson, Susan Bonner-Weir, Robert Ritzel, Robert A. Rizza, et Peter C. Butler. 2003. « Beta-Cell Deficit and Increased Beta-Cell Apoptosis in Humans with Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 52 (1): 102‑10.

C

Cabrera, Over, Dora M. Berman, Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Per-Olof Berggren, et Alejandro Caicedo. 2006. « The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7): 2334 ‑ 39. doi:10.1073/pnas.0510790103.

Cantin, Louis-David, Steven Magnuson, David Gunn, Nicole Barucci, Marina Breuhaus, William H. Bullock, Jennifer Burke, et al. 2007. « PDE-10A Inhibitors as Insulin Secretagogues ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17 (10): 2869 ‑ 73. doi:10.1016/j.bmcl.2007.02.061.

Caro, J. F., et J. M. Amatruda. 1982. « Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance: The Importance of

Postbinding Events in the Regulation of Insulin Binding, Action, and Degradation in Freshly Isolated and Primary Cultures of Rat Hepatocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 69 (4): 866‑75.

Cauthron, R. D., K. B. Carter, S. Liauw, et R. A. Steinberg. 1998. « Physiological Phosphorylation of Protein Kinase A at Thr-197 Is by a Protein Kinase A Kinase ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (3): 1416‑23.

Ceresa, B. P., et L. E. Limbird. 1994. « Mutation of an Aspartate Residue Highly Conserved among G-Protein-Coupled Receptors Results in Nonreciprocal Disruption of Alpha 2-Adrenergic Receptor-G-Protein Interactions. A Negative Charge at Amino Acid Residue 79 Forecasts Alpha 2A-Adrenergic Receptor Sensitivity to Allosteric Modulation by Monovalent Cations and Fully Effective receptor/G-Protein Coupling ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (47): 29557‑64.

Chan, Shing-Leng, et Victor C. Yu. 2004. « Proteins of the Bcl-2 Family in Apoptosis Signalling: From Mechanistic Insights to Therapeutic Opportunities ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 31 (3): 119‑28.

Chan, S. J., P. Keim, et D. F. Steiner. 1976. « Cell-Free Synthesis of Rat Preproinsulins: Characterization and Partial Amino Acid Sequence Determination ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (6): 1964‑68.

Charmandari, Evangelia, George P. Chrousos, George I. Lambrou, Aikaterini Pavlaki, Hisashi Koide, Sinnie Sin Man Ng, et Tomoshige Kino. 2011. « Peripheral CLOCK Regulates Target-Tissue Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activity in a Circadian Fashion in Man ». *PloS One* 6 (9): e25612. doi:10.1371/journal.pone.0025612.

Cheng, X., Y. Ma, M. Moore, B. A. Hemmings, et S. S. Taylor. 1998. « Phosphorylation and Activation of cAMP-Dependent Protein Kinase by Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (17): 9849‑54.

Chen, Quan, Laurence J. Miller, et Maoqing Dong. 2010. « Role of N-Linked Glycosylation in Biosynthesis, Trafficking, and Function of the Human Glucagon-like Peptide 1 Receptor ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 299 (1): E62 ‑ 68. doi:10.1152/ajpendo.00067.2010.

Chen, Weiwei, Thoa Dang, Raymond D. Blind, Zhen Wang, Claudio N. Cavasotto, Adam B. Hittelman, Inez Rogatsky, Susan K. Logan, et Michael J. Garabedian. 2008. « Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (8): 1754‑66. doi:10.1210/me.2007-0219.

Chini, B., et M. Parenti. 2004. « G-Protein Coupled Receptors in Lipid Rafts and Caveolae: How, When and Why Do They Go There? » *Journal of Molecular Endocrinology* 32 (2): 325‑38.

Chowdhury, Indrajit, Binu Tharakan, et Ganapathy K. Bhat. 2008. « Caspases - an Update ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 151 (1): 10 ‑ 27. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.010.

Claing, A., W. Chen, W. E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R. T. Premont, et R. J. Lefkowitz. 2001. « Beta-Arrestin-Mediated ADP-Ribosylation Factor 6 Activation and Beta 2-Adrenergic Receptor Endocytosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (45): 42509‑13. doi:10.1074/jbc.M108399200.

Clapham, D. E., et E. J. Neer. 1997. « G Protein Beta Gamma Subunits ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 37: 167‑203. doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.167.

Clark, A. R., M. E. Wilson, I. Leibiger, V. Scott, et K. Docherty. 1995. « A Silencer and an Adjacent Positive Element Interact to Modulate the Activity of the Human Insulin Promoter ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 232 (2): 627‑32.

Cole, Timothy J., Julie A. Blendy, A. Paula Monaghan, Wolfgang Schmid, Adriano Aguzzi, et Günther Schütz. 1995. « Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development ». *Steroids*, Aldosterone and Hypertension, 60 (1): 93 ‑ 96. doi:10.1016/0039-128X(94)00009-2.

Conner, D. A., M. A. Mathier, R. M. Mortensen, M. Christe, S. F. Vatner, C. E. Seidman, et J. G. Seidman. 1997. « Beta-Arrestin1 Knockout Mice Appear Normal but Demonstrate Altered Cardiac Responses to Beta-

Adrenergic Stimulation ». *Circulation Research* 81 (6): 1021‑26.

Conti, Marco, et Joseph Beavo. 2007. « Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling ». *Annual Review of Biochemistry* 76: 481 - 511. doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444.

Costes, Safia, Christophe Broca, Gyslaine Bertrand, Anne-Dominique Lajoix, Dominique Bataille, Joel Bockaert, et Stéphane Dalle. 2006. « ERK1/2 Control Phosphorylation and Protein Level of cAMP-Responsive Element-Binding Protein: A Key Role in Glucose-Mediated Pancreatic Beta-Cell Survival ». *Diabetes* 55 (8): 2220‑30. doi:10.2337/db05-1618.

Costes, Safia, Tatyana Gurlo, Jacqueline F. Rivera, et Peter C. Butler. 2014. « UCHL1 Deficiency Exacerbates Human Islet Amyloid Polypeptide Toxicity in β-Cells: Evidence of Interplay between the Ubiquitin/proteasome System and Autophagy ». *Autophagy* 10 (6): 1004‑14. doi:10.4161/auto.28478.

Couet, J., S. Li, T. Okamoto, T. Ikezu, et M. P. Lisanti. 1997. « Identification of Peptide and Protein Ligands for the Caveolin-Scaffolding Domain. Implications for the Interaction of Caveolin with Caveolae-Associated Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (10): 6525‑33.

Couvineau, Alain, Christiane Rouyer-Fessard, et Marc Laburthe. 2004. « Presence of a N-Terminal Signal Peptide in Class II G Protein-Coupled Receptors: Crucial Role for Expression of the Human VPAC1 Receptor ». *Regulatory Peptides* 123 (1-3): 181 - 85. doi:10.1016/j.regpep.2004.06.025.

Croxtall, J. D., Q. Choudhury, et R. J. Flower. 2000. « Glucocorticoids Act within Minutes to Inhibit Recruitment of Signalling Factors to Activated EGF Receptors through a Receptor-Dependent, Transcription-Independent Mechanism ». *British Journal of Pharmacology* 130 (2): 289 - 98. doi:10.1038/sj.bjp.0703272.

D

Dadon, D., S. Tornovsky-Babaey, J. Furth-Lavi, D. Ben-Zvi, O. Ziv, R. Schyr-Ben-Haroush, M. Stolovich-Rain, et al. 2012. « Glucose Metabolism: Key Endogenous Regulator of β-Cell Replication and Survival ». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 14 Suppl 3 (octobre): 101 - 8. doi:10.1111/j.1463-1326.2012.01646.x.

Daniel, P. B., W. H. Walker, et J. F. Habener. 1998. « Cyclic AMP Signaling and Gene Regulation ». *Annual Review of Nutrition* 18: 353 - 83. doi:10.1146/annurev.nutr.18.1.353.

Daniel, S., M. Noda, S. G. Straub, et G. W. Sharp. 1999. « Identification of the Docked Granule Pool Responsible for the First Phase of Glucose-Stimulated Insulin Secretion ». *Diabetes* 48 (9): 1686‑90.

Davalli, A. M., E. Biancardi, A. Pollo, C. Socci, A. E. Pontiroli, G. Pozza, F. Clementi, E. Sher, et E. Carbone. 1996. « Dihydropyridine-Sensitive and -Insensitive Voltage-Operated Calcium Channels Participate in the Control of Glucose-Induced Insulin Release from Human Pancreatic Beta Cells ». *The Journal of Endocrinology* 150 (2): 195‑203.

Davies, P. O., C. Poirier, L. Deltour, et X. Montagutelli. 1994. « Genetic Reassignment of the Insulin-1 (Ins1) Gene to Distal Mouse Chromosome 19 ». *Genomics* 21 (3): 665 - 67. doi:10.1006/geno.1994.1334.

Deacon, C. F., M. A. Nauck, M. Toft-Nielsen, L. Pridal, B. Willms, et J. J. Holst. 1995. « Both Subcutaneously and Intravenously Administered Glucagon-like Peptide I Are Rapidly Degraded from the NH2-Terminus in Type II Diabetic Patients and in Healthy Subjects ». *Diabetes* 44 (9): 1126‑31.

Debons, A. F., L. D. Zurek, C. S. Tse, et S. Abrahamsen. 1986. « Central Nervous System Control of Hyperphagia in Hypothalamic Obesity: Dependence on Adrenal Glucocorticoids ». *Endocrinology* 118 (4): 1678‑81. doi:10.1210/endo-118-4-1678.

De Camilli, P., K. Takei, et P. S. McPherson. 1995. « The Function of Dynamin in Endocytosis ». *Current Opinion in Neurobiology* 5 (5): 559‑65.

DeFea, K. A., Z. D. Vaughn, E. M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Déry, et N. W. Bunnett. 2000. « The Proliferative and

Antiapoptotic Effects of Substance P Are Facilitated by Formation of a Beta - Arrestin-Dependent Scaffolding Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20): 11086 - 91. doi:10.1073/pnas.190276697.

Degerman, Eva, Faiyaz Ahmad, Youn Wook Chung, Emilia Guirguis, Bilal Omar, Lena Stenson, et Vincent Manganiello. 2011. « From PDE3B to the Regulation of Energy Homeostasis ». *Current Opinion in Pharmacology* 11 (6): 676 - 82. doi:10.1016/j.coph.2011.09.015.

Del Guerra, Silvia, Roberto Lupi, Lorella Marselli, Matilde Masini, Marco Bugliani, Simone Sbrana, Scilla Torri, et al. 2005. « Functional and Molecular Defects of Pancreatic Islets in Human Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 54 (3): 727‑35.

Delmeire, D., D. Flamez, S. A. Hinke, J. J. Cali, D. Pipeleers, et F. Schuit. 2003. « Type VIII Adenylyl Cyclase in Rat Beta Cells: Coincidence Signal Detector/generator for Glucose and GLP-1 ». *Diabetologia* 46 (10): 1383‑93. doi:10.1007/s00125-003-1203-8.

Dendukuri, Nandini, Lucie Blais, et Jacques LeLorier. 2002. « Inhaled Corticosteroids and the Risk of Diabetes among the Elderly ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 54 (1): 59‑64.

Deroo, Bonnie J., Claudia Rentsch, Sowmini Sampath, Janel Young, Donald B. DeFranco, et Trevor K. Archer. 2002. « Proteasomal Inhibition Enhances Glucocorticoid Receptor Transactivation and Alters Its Subnuclear Trafficking ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (12): 4113‑23.

De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers, et F. Schuit. 1995. « Human and Rat Beta Cells Differ in Glucose Transporter but Not in Glucokinase Gene Expression ». *The Journal of Clinical Investigation* 96 (5): 2489‑95. doi:10.1172/JCI118308.

DeWire, Scott M, Seungkirl Ahn, Robert J Lefkowitz, et Sudha K Shenoy. 2007. « Beta-Arrestins and Cell Signaling ». *Annual Review of Physiology* 69: 483‑510. doi:10.1146/annurev.ph.69.013107.100021.

« dic.212283.pdf ». 2015. Consulté le août 17. http://www.drugsincontext.com/wp-content/uploads/2015/07/dic.212283.pdf.

Di Dalmazi, Guido, Valentina Vicennati, Eleonora Rinaldi, Antonio Maria Morselli-Labate, Emanuela Giampalma, Cristina Mosconi, Uberto Pagotto, et Renato Pasquali. 2012. « Progressively Increased Patterns of Subclinical Cortisol Hypersecretion in Adrenal Incidentalomas Differently Predict Major Metabolic and Cardiovascular Outcomes: A Large Cross-Sectional Study ». *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 166 (4): 669 - 77. doi:10.1530/EJE-11-1039.

Dolenšek, Jurij, Marjan Slak Rupnik, et Andraž Stožer. 2015. « Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas ». *Islets* 7 (1): e1024405. doi:10.1080/19382014.2015.1024405.

Doliba, Nicolai M., Wei Qin, Habiba Najafi, Chengyang Liu, Carol W. Buettger, Johanna Sotiris, Heather W. Collins, et al. 2012. « Glucokinase Activation Repairs Defective Bioenergetics of Islets of Langerhans Isolated from Type 2 Diabetics ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (1): E87 - 102. doi:10.1152/ajpendo.00218.2011.

Donath, Marc Y., et Steven E. Shoelson. 2011. « Type 2 Diabetes as an Inflammatory Disease ». *Nature Reviews Immunology* 11 (2): 98‑107. doi:10.1038/nri2925.

Dov, Avital, Eva Abramovitch, Nasim Warwar, et Rafael Nesher. 2008. « Diminished Phosphodiesterase-8B Potentiates Biphasic Insulin Response to Glucose ». *Endocrinology* 149 (2): 741 - 48. doi:10.1210/en.2007-0968.

Drucker, D. J., et S. Asa. 1988. « Glucagon Gene Expression in Vertebrate Brain ». *The Journal of Biological Chemistry* 263 (27): 13475‑78.

Druker, Jimena, Ana C. Liberman, María Antunica-Noguerol, Juan Gerez, Marcelo Paez-Pereda, Theo Rein, Jorge A. Iñiguez-Lluhí, Florian Holsboer, et Eduardo Arzt. 2013. « RSUME Enhances Glucocorticoid Receptor SUMOylation and Transcriptional Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (11): 2116 - 27. doi:10.1128/MCB.01470-12.

Dumortier, Olivier, Nicolas Theys, Marie-Thérèse Ahn, Claude Remacle, et Brigitte Reusens. 2011. « Impairment of Rat Fetal Beta-Cell Development by Maternal Exposure to Dexamethasone during Different Time-

Windows ». *PloS One* 6 (10): e25576. doi:10.1371/journal.pone.0025576.

Duvillié, B., D. Bucchini, T. Tang, J. Jami, et A. Pàldi. 1998. « Imprinting at the Mouse Ins2 Locus: Evidence for Cis- and Trans-Allelic Interactions ». *Genomics* 47 (1): 52‑57. doi:10.1006/geno.1997.5070.

E

Ellingsgaard, Helga, Irina Hauselmann, Beat Schuler, Abdella M. Habib, Laurie L. Baggio, Daniel T. Meier, Elisabeth Eppler, et al. 2011. « Interleukin-6 Enhances Insulin Secretion by Increasing Glucagon-like Peptide-1 Secretion from L Cells and Alpha Cells ». *Nature Medicine* 17 (11): 1481‑89. doi:10.1038/nm.2513.

Elouil, H., M. Bensellam, Y. Guiot, D. Vander Mierde, S. M. A. Pascal, F. C. Schuit, et J. C. Jonas. 2007. « Acute Nutrient Regulation of the Unfolded Protein Response and Integrated Stress Response in Cultured Rat Pancreatic Islets ». *Diabetologia* 50 (7): 1442 ‑ 52. doi:10.1007/s00125-007-0674-4.

Eng, J. 1992. « Exendin Peptides ». *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York* 59 (2): 147 ‑49.

Eriksen, Marie, David H. Jensen, Siri Tribler, Jens J. Holst, Sten Madsbad, et Thure Krarup. 2015. « Reduction of Insulinotropic Properties of GLP-1 and GIP after Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance ». *Diabetologia* 58 (5): 920‑28. doi:10.1007/s00125-015-3522-y.

Evans, R M. 1988. « The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily ». *Science (New York, N.Y.)* 240 (4854): 889‑95.

F

Faelber, Katja, Song Gao, Martin Held, York Posor, Volker Haucke, Frank Noé, et Oliver Daumke. 2013. « Chapter Fifteen - Oligomerization of Dynamin Superfamily Proteins in Health and Disease ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, édité par Jesús Giraldo and Francisco Ciruela, 117:411‑43. Oligomerization in Health and Disease. Academic Press. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123869319000155.

Fan, Fan, Chen Ji, Yumei Wu, Shawn M. Ferguson, Natalia Tamarina, Louis H. Philipson, et Xuelin Lou. 2015. « Dynamin 2 Regulates Biphasic Insulin Secretion and Plasma Glucose Homeostasis ». *Journal of Clinical Investigation*, septembre. doi:10.1172/JCI80652.

Ferguson, Shawn M., et Pietro De Camilli. 2012. « Dynamin, a Membrane-Remodelling GTPase ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2): 75 ‑ 88. doi:10.1038/nrm3266.

Ferguson, S. S. 2001. « Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling ». *Pharmacological Reviews* 53 (1): 1‑24.

Foulkes, N. S., E. Borrelli, et P. Sassone-Corsi. 1991. « CREM Gene: Use of Alternative DNA-Binding Domains Generates Multiple Antagonists of cAMP-Induced Transcription ». *Cell* 64 (4): 739‑49.

Fransson, Liselotte, Victoria Rosengren, Titu Kumar Saha, Nina Grankvist, Tohidul Islam, Richard E. Honkanen, Åke Sjöholm, et Henrik Ortsäter. 2014. « Mitogen-Activated Protein Kinases and Protein Phosphatase 5 Mediate Glucocorticoid-Induced Cytotoxicity in Pancreatic Islets and β-Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 383 (1-2): 126 ‑ 36. doi:10.1016/j.mce.2013.12.010.

Fredriksson, Robert, Malin C. Lagerström, Lars-Gustav Lundin, et Helgi B. Schiöth. 2003. « The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints ». *Molecular Pharmacology* 63 (6): 1256 ‑ 72. doi:10.1124/mol.63.6.1256.

Froguel, P. 1998. « Nuclear Factors and Type 2 Diabetes ». *Schweizerische Medizinische Wochenschrift* 128 (49): 1936‑39.

Fujitani, Y., Y. Kajimoto, T. Yasuda, T. A. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Umayahara, N. Fujita, et al. 1999. « Identification of a Portable Repression Domain and an E1A-Responsive Activation Domain in Pax4: A Possible Role of Pax4 as a Transcriptional Repressor in the Pancreas ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8281‑91.

Furukawa, N., T. Shirotani, E. Araki, K. Kaneko, M. Todaka, K. Matsumoto, K. Tsuruzoe, et al. 1999. « Possible Involvement of Atypical Protein Kinase C (PKC) in Glucose-Sensitive Expression of the Human Insulin Gene: DNA-Binding Activity and Transcriptional Activity of Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene-1 (PDX-1) Are Enhanced via Calphostin C-Sensitive but

Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) and Gö 6976-Insensitive Pathway ». *Endocrine Journal* 46 (1): 43‑58.

G

Galés, Céline, et Michel Bouvier. 2007. « [New talk between receptor and trimeric G proteins: “an intertwined body dance”] ». *Médecine Sciences: M/S* 23 (11): 1031 ‑ 34. doi:10.1051/medsci/200723111031.

Galés, Céline, Joost J. J. Van Durm, Stéphane Schaak, Stéphanie Pontier, Yann Percherancier, Martin Audet, Hervé Paris, et Michel Bouvier. 2006. « Probing the Activation-Promoted Structural Rearrangements in Preassembled Receptor-G Protein Complexes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (9): 778 ‑86. doi:10.1038/nsmb1134.

Galliher-Beckley, Amy Jo, Jason Grant Williams, Jennifer Brady Collins, et John Anthony Cidlowski. 2008. « Glycogen Synthase Kinase 3beta-Mediated Serine Phosphorylation of the Human Glucocorticoid Receptor Redirects Gene Expression Profiles ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (24): 7309 ‑ 22. doi:10.1128/MCB.00808-08.

Galon, Jerome, Denis Franchimont, Naoki Hiroi, Gregory Frey, Antje Boettner, Monika Ehrhart-Bornstein, John J. O’Shea, George P. Chrousos, et Stefan R. Bornstein. 2002. « Gene Profiling Reveals Unknown Enhancing and Suppressive Actions of Glucocorticoids on Immune Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (1): 61 ‑ 71. doi:10.1096/fj.01-0245com.

Gao, Hua, Yue Sun, Yalan Wu, Bing Luan, Yaya Wang, Bin Qu, et Gang Pei. 2004. « Identification of Beta-arrestin2 as a G Protein-Coupled Receptor-Stimulated Regulator of NF-kappaB Pathways ». *Molecular Cell* 14 (3): 303‑17.

Gembal, M., P. Detimary, P. Gilon, Z. Y. Gao, et J. C. Henquin. 1993. « Mechanisms by Which Glucose Can Control Insulin Release Independently from Its Action on Adenosine Triphosphate-Sensitive K+ Channels in Mouse B Cells ». *The Journal of Clinical Investigation* 91 (3): 871‑80. doi:10.1172/JCI116308.

German, M., S. Ashcroft, K. Docherty, H. Edlund, T. Edlund, S. Goodison, H. Imura, G. Kennedy, O. Madsen, et D. Melloul. 1995. « The Insulin Gene Promoter. A Simplified Nomenclature ». *Diabetes* 44 (8): 1002‑4.

Gilmore, R., G. Blobel, et P. Walter. 1982. « Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum. I. Detection in the Microsomal Membrane of a Receptor for the Signal Recognition Particle ». *The Journal of Cell Biology* 95 (2 Pt 1): 463‑69.

Gilmore, R., P. Walter, et G. Blobel. 1982. « Protein Translocation across the Endoplasmic Reticulum. II. Isolation and Characterization of the Signal Recognition Particle Receptor ». *The Journal of Cell Biology* 95 (2 Pt 1): 470‑77.

Gilon, Patrick, Hee-Young Chae, Guy A. Rutter, et Magalie A. Ravier. 2014. « Calcium Signaling in Pancreatic β-Cells in Health and in Type 2 Diabetes ». *Cell Calcium* 56 (5): 340 ‑ 61. doi:10.1016/j.ceca.2014.09.001.

Gloerich, Martijn, et Johannes L. Bos. 2010. « Epac: Defining a New Mechanism for cAMP Action ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 50: 355 ‑ 75. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105714.

Göke, R., H. C. Fehmann, T. Linn, H. Schmidt, M. Krause, J. Eng, et B. Göke. 1993. « Exendin-4 Is a High Potency Agonist and Truncated Exendin-(9-39)-Amide an Antagonist at the Glucagon-like Peptide 1-(7-36)-Amide Receptor of Insulin-Secreting Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (26): 19650‑55.

Goodman, O. B., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen, et J. L. Benovic. 1996. « Beta-Arrestin Acts as a Clathrin Adaptor in Endocytosis of the beta2-Adrenergic Receptor ». *Nature* 383 (6599): 447‑50. doi:10.1038/383447a0.

Goodman, P. A., O. Medina-Martinez, et C. Fernandez-Mejia. 1996. « Identification of the Human Insulin Negative Regulatory Element as a Negative Glucocorticoid Response Element ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 120 (2): 139‑46.

Gould, G. W., et G. D. Holman. 1993. « The Glucose Transporter Family: Structure, Function and Tissue-Specific Expression ». *The Biochemical Journal* 295 (Pt 2) (octobre): 329‑41.

Grad, Iwona, et Didier Picard. 2007. « The Glucocorticoid Responses Are Shaped by Molecular Chaperones ». *Molecular and*

Cellular Endocrinology 275 (1-2): 2‑12. doi:10.1016/j.mce.2007.05.018.

Gremlich, S, R Roduit, et B Thorens. 1997. « Dexamethasone Induces Posttranslational Degradation of GLUT2 and Inhibition of Insulin Secretion in Isolated Pancreatic Beta Cells. Comparison with the Effects of Fatty Acids ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3216‑22.

H

Haataja, Leena, Tatyana Gurlo, Chang J. Huang, et Peter C. Butler. 2008. « Islet Amyloid in Type 2 Diabetes, and the Toxic Oligomer Hypothesis ». *Endocrine Reviews* 29 (3): 303‑16. doi:10.1210/er.2007-0037.

Halban, Philippe A., Kenneth S. Polonsky, Donald W. Bowden, Meredith A. Hawkins, Charlotte Ling, Kieren J. Mather, Alvin C. Powers, Christopher J. Rhodes, Lori Sussel, et Gordon C. Weir. 2014. « β-Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment ». *Diabetes Care* 37 (6): 1751‑58. doi:10.2337/dc14-0396.

Hamamdzic, D., E. Duzic, J. D. Sherlock, et S. M. Lanier. 1995. « Regulation of Alpha 2-Adrenergic Receptor Expression and Signaling in Pancreatic Beta-Cells ». *The American Journal of Physiology* 269 (1 Pt 1): E162‑71.

Han, P., J. Werber, M. Surana, N. Fleischer, et T. Michaeli. 1999. « The Calcium/calmodulin-Dependent Phosphodiesterase PDE1C down-Regulates Glucose-Induced Insulin Secretion ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (32): 22337‑44.

Hansen, L., C. F. Deacon, C. Orskov, et J. J. Holst. 1999. « Glucagon-like Peptide-1-(7-36)amide Is Transformed to Glucagon-like Peptide-1-(9-36)amide by Dipeptidyl Peptidase IV in the Capillaries Supplying the L Cells of the Porcine Intestine ». *Endocrinology* 140 (11): 5356 ‑ 63. doi:10.1210/endo.140.11.7143.

Härndahl, Linda, Xing-Jun Jing, Rosita Ivarsson, Eva Degerman, Bo Ahrén, Vincent C. Manganiello, Erik Renström, et Lena Stenson Holst. 2002. « Important Role of Phosphodiesterase 3B for the Stimulatory Action of cAMP on Pancreatic Beta-Cell Exocytosis and Release of Insulin ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37446‑55. doi:10.1074/jbc.M205401200.

Harper, M. E., A. Ullrich, et G. F. Saunders. 1981. « Localization of the Human Insulin Gene to the Distal End of the Short Arm of Chromosome 11 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (7): 4458‑60.

Hedeskov, C. J. 1980. « Mechanism of Glucose-Induced Insulin Secretion ». *Physiological Reviews* 60 (2): 442‑509.

Heller, R. S., T. J. Kieffer, et J. F. Habener. 1997. « Insulinotropic Glucagon-like Peptide I Receptor Expression in Glucagon-Producing Alpha-Cells of the Rat Endocrine Pancreas ». *Diabetes* 46 (5): 785‑91.

Henderson, J. R., et M. C. Moss. 1985. « A Morphometric Study of the Endocrine and Exocrine Capillaries of the Pancreas ». *Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England)* 70 (3): 347‑56.

Henley, J. R., E. W. Krueger, B. J. Oswald, et M. A. McNiven. 1998. « Dynamin-Mediated Internalization of Caveolae ». *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 85‑99.

Henquin, J. C. 2000. « Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose ». *Diabetes* 49 (11): 1751‑60.

Henquin, J. C., M. Nenquin, M. A. Ravier, et A. Szollosi. 2009. « Shortcomings of Current Models of Glucose-Induced Insulin Secretion ». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 11 Suppl 4 (novembre): 168‑79. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01109.x.

Henquin, Jean-Claude, Denis Dufrane, et Myriam Nenquin. 2006. « Nutrient Control of Insulin Secretion in Isolated Normal Human Islets ». *Diabetes* 55 (12): 3470‑77. doi:10.2337/db06-0868.

Henquin, Jean-Claude, Myriam Nenquin, Patrick Stiernet, et Bo Ahren. 2006. « In Vivo and in Vitro Glucose-Induced Biphasic Insulin Secretion in the Mouse: Pattern and Role of Cytoplasmic Ca2+ and Amplification Signals in Beta-Cells ». *Diabetes* 55 (2): 441‑51.

Holmstrom, Sam R., Sergey Chupreta, Alex Yick-Lun So, et Jorge A. Iñiguez-Lluhí. 2008. « SUMO-Mediated Inhibition of Glucocorticoid Receptor Synergistic Activity Depends on Stable Assembly at the Promoter but Not on DAXX ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*

22 (9): 2061‑75. doi:10.1210/me.2007-0581.

Holmstrom, Sam, Mary E. Van Antwerp, et Jorge A. Iñiguez-Lluhi. 2003. « Direct and Distinguishable Inhibitory Roles for SUMO Isoforms in the Control of Transcriptional Synergy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15758 ‑ 63. doi:10.1073/pnas.2136933100.

Huang, Y., G. F. Wilkinson, et Gary B. Willars. 2010. « Role of the Signal Peptide in the Synthesis and Processing of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor ». *British Journal of Pharmacology* 159 (1): 237 ‑ 51. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00517.x.

I

Inada, A., Y. Someya, Y. Yamada, Y. Ihara, A. Kubota, N. Ban, R. Watanabe, K. Tsuda, et Y. Seino. 1999. « The Cyclic AMP Response Element Modulator Family Regulates the Insulin Gene Transcription by Interacting with Transcription Factor IID ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (30): 21095‑103.

Inglese, J., N. J. Freedman, W. J. Koch, et R. J. Lefkowitz. 1993. « Structure and Mechanism of the G Protein-Coupled Receptor Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 23735‑38.

International Human Genome Sequencing Consortium, E. Adekoya, M. Ait-Zahra, N. Allen, M. Anderson, S. Anderson, F. Anufriev, et al. 2001. « Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome ». *Nature* 409 (6822): 860 ‑ 921. doi:10.1038/35057062.

Ishizuka, T., T. Nagashima, K. Kajita, A. Miura, M. Yamamoto, S. Itaya, Y. Kanoh, M. Ishizawa, H. Murase, et K. Yasuda. 1997. « Effect of Glucocorticoid Receptor Antagonist RU 38486 on Acute Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance in Rat Adipocytes ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 46 (9): 997‑1002.

Itani, Omar A., Kang Z. Liu, Kristyn L. Cornish, Jason R. Campbell, et Christie P. Thomas. 2002. « Glucocorticoids Stimulate Human sgk1 Gene Expression by Activation of a GRE in Its 5'-Flanking Region ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283 (5): E971 ‑ 79. doi:10.1152/ajpendo.00021.2002.

Iwashima, Y., A. Kondoh-Abiko, S. Seino, J. Takeda, M. Eto, K. S. Polonsky, et I. Makino. 1994. « Reduced Levels of Messenger Ribonucleic Acid for Calcium Channel, Glucose Transporter-2, and Glucokinase Are Associated with Alterations in Insulin Secretion in Fasted Rats ». *Endocrinology* 135 (3): 1010 ‑ 17. doi:10.1210/endo.135.3.8070343.

J

Jansson, L., et P.-O. Carlsson. 2002. « Graft Vascular Function after Transplantation of Pancreatic Islets ». *Diabetologia* 45 (6): 749‑63. doi:10.1007/s00125-002-0827-4.

Jhala, Ulupi S., Gianluca Canettieri, Robert A. Screaton, Rohit N. Kulkarni, Stan Krajewski, John Reed, John Walker, Xueying Lin, Morris White, et Marc Montminy. 2003. « cAMP Promotes Pancreatic Beta-Cell Survival via CREB-Mediated Induction of IRS2 ». *Genes & Development* 17 (13): 1575 ‑ 80. doi:10.1101/gad.1097103.

Jonas, J. C., M. Bensellam, J. Duprez, H. Elouil, Y. Guiot, et S. M. A. Pascal. 2009. « Glucose Regulation of Islet Stress Responses and Beta-Cell Failure in Type 2 Diabetes ». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 11 Suppl 4 (novembre): 65‑81. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01112.x.

Jonas, J. C., A. Sharma, W. Hasenkamp, H. Ilkova, G. Patanè, R. Laybutt, S. Bonner-Weir, et G. C. Weir. 1999. « Chronic Hyperglycemia Triggers Loss of Pancreatic Beta Cell Differentiation in an Animal Model of Diabetes ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (20): 14112‑21.

Jorgensen, Rasmus, Valentina Kubale, Milka Vrecl, Thue W Schwartz, et Christian E Elling. 2007. « Oxyntomodulin Differentially Affects Glucagon-like Peptide-1 Receptor Beta-Arrestin Recruitment and Signaling through Galpha(s) ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322 (1): 148 ‑ 54. doi:10.1124/jpet.107.120006.

Jorgensen, Rasmus, Lene Martini, Thue W. Schwartz, et Christian E. Elling. 2005. « Characterization of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Beta-Arrestin 2 Interaction: A High-Affinity Receptor Phenotype ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (3): 812 ‑ 23. doi:10.1210/me.2004-0312.

Jörns, Anne, Christoph Sennholz, Ortwin Naujok, et Sigurd Lenzen. 2010. « Beta Cell Mass Regulation in the Rat Pancreas through

Glucocorticoids and Thyroid Hormones ». *Pancreas* 39 (8): 1167 - 72. doi:10.1097/MPA.0b013e3181dfce4f.

K

Kaiser, G., F. Gerst, D. Michael, S. Berchtold, B. Friedrich, N. Strutz-Seebohm, F. Lang, H.-U. Häring, et S. Ullrich. s. d. « Regulation of Forkhead Box O1 (FOXO1) by Protein Kinase B and Glucocorticoids: Different Mechanisms of Induction of Beta Cell Death in Vitro ». *Diabetologia*, 1 - 9. doi:10.1007/s00125-013-2863-7.

Kalhan, S. C., et P. A. Adam. 1975. « Inhibitory Effect of Prednisone on Insulin Secretion in Man: Model for Duplication of Blood Glucose Concentration ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 41 (3): 600‑610. doi:10.1210/jcem-41-3-600.

Kaneto, H., J. Fujii, T. Myint, N. Miyazawa, K. N. Islam, Y. Kawasaki, K. Suzuki, et al. 1996. « Reducing Sugars Trigger Oxidative Modification and Apoptosis in Pancreatic Beta-Cells by Provoking Oxidative Stress through the Glycation Reaction ». *The Biochemical Journal* 320 (Pt 3) (décembre): 855‑63.

Kang, Guoxin, Oleg G. Chepurny, Brian Malester, Michael J. Rindler, Holger Rehmann, Johannes L. Bos, Frank Schwede, William A. Coetzee, et George G. Holz. 2006. « cAMP Sensor Epac as a Determinant of ATP-Sensitive Potassium Channel Activity in Human Pancreatic Beta Cells and Rat INS-1 Cells ». *The Journal of Physiology* 573 (Pt 3): 595 - 609. doi:10.1113/jphysiol.2006.107391.

Kang, Jiuhong, Yufeng Shi, Bin Xiang, Bin Qu, Wenjuan Su, Min Zhu, Min Zhang, et al. 2005. « A Nuclear Function of β-Arrestin1 in GPCR Signaling: Regulation of Histone Acetylation and Gene Transcription ». *Cell* 123 (5): 833 - 47. doi:10.1016/j.cell.2005.09.011.

Kappe, Camilla, Liselotte Fransson, Petra Wolbert, et Henrik Ortsäter. 2015. « Glucocorticoids Suppress GLP-1 Secretion: Possible Contribution to Their Diabetogenic Effects ». *Clinical Science (London, England: 1979)*, avril. doi:10.1042/CS20140719.

Karin, Michael, et Florian R. Greten. 2005. « NF-kappaB: Linking Inflammation and Immunity to Cancer Development and Progression ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (10): 749 - 59. doi:10.1038/nri1703.

Kataoka, Kohsuke, Song-iee Han, Setsuko Shioda, Momoki Hirai, Makoto Nishizawa, et Hiroshi Handa. 2002. « MafA Is a Glucose-Regulated and Pancreatic Beta-Cell-Specific Transcriptional Activator for the Insulin Gene ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49903 - 10. doi:10.1074/jbc.M206796200.

Kataoka, K., S. Shioda, K. Ando, K. Sakagami, H. Handa, et K. Yasuda. 2004. « Differentially Expressed Maf Family Transcription Factors, c-Maf and MafA, Activate Glucagon and Insulin Gene Expression in Pancreatic Islet Alpha- and Beta-Cells ». *Journal of Molecular Endocrinology* 32 (1): 9‑20.

Katritch, Vsevolod, Vadim Cherezov, et Raymond C. Stevens. 2013. « Structure-Function of the G Protein-Coupled Receptor Superfamily ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53: 531‑56. doi:10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.

Kendall, Ryan T., et Louis M. Luttrell. 2009. « Diversity in Arrestin Function ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (18): 2953 - 73. doi:10.1007/s00018-009-0088-1.

Khoo, Shih, Steven C. Griffen, Ying Xia, Richard J. Baer, Michael S. German, et Melanie H. Cobb. 2003. « Regulation of Insulin Gene Transcription by ERK1 and ERK2 in Pancreatic Beta Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 32969‑77. doi:10.1074/jbc.M301198200.

Kim, Jihee, Seungkirl Ahn, Xiu-Rong Ren, Erin J. Whalen, Eric Reiter, Huijun Wei, et Robert J. Lefkowitz. 2005. « Functional Antagonism of Different G Protein-Coupled Receptor Kinases for Beta-Arrestin-Mediated Angiotensin II Receptor Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (5): 1442 - 47. doi:10.1073/pnas.0409532102.

Kim, M.-J., J.-H. Kang, Y. G. Park, G. R. Ryu, S. H. Ko, I.-K. Jeong, K.-H. Koh, et al. 2006. « Exendin-4 Induction of Cyclin D1 Expression in INS-1 Beta-Cells: Involvement of cAMP-Responsive Element ». *The Journal of Endocrinology* 188 (3): 623‑33. doi:10.1677/joe.1.06480.

Kim, Wook, et Josephine M. Egan. 2008. « The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and

Diabetes Treatment ». *Pharmacological Reviews* 60 (4): 470 - 512. doi:10.1124/pr.108.000604.

Kino, Tomoshige, Yan A. Su, et George P. Chrousos. 2009. « Human Glucocorticoid Receptor Isoform Beta: Recent Understanding of Its Potential Implications in Physiology and Pathophysiology ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 66 (21): 3435‑48. doi:10.1007/s00018-009-0098-z.

Klinger, Sonia, Carine Poussin, Marie-Bernard Debril, Wanda Dolci, Philippe A. Halban, et Bernard Thorens. 2008. « Increasing GLP-1-Induced Beta-Cell Proliferation by Silencing the Negative Regulators of Signaling cAMP Response Element Modulator-Alpha and DUSP14 ». *Diabetes* 57 (3): 584‑93. doi:10.2337/db07-1414.

Knudsen, L. B., P. F. Nielsen, P. O. Huusfeldt, N. L. Johansen, K. Madsen, F. Z. Pedersen, H. Thøgersen, M. Wilken, et H. Agersø. 2000. « Potent Derivatives of Glucagon-like Peptide-1 with Pharmacokinetic Properties Suitable for Once Daily Administration ». *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (9): 1664‑69.

Kohout, T. A., F. S. Lin, S. J. Perry, D. A. Conner, et R. J. Lefkowitz. 2001. « Beta-Arrestin 1 and 2 Differentially Regulate Heptahelical Receptor Signaling and Trafficking ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4): 1601 - 6. doi:10.1073/pnas.041608198.

Kolakowski, L. F. 1994. « GCRDb: A G-Protein-Coupled Receptor Database ». *Receptors & Channels* 2 (1): 1‑7.

Kreil, G. 1981. « Transfer of Proteins across Membranes ». *Annual Review of Biochemistry* 50: 317 - 48. doi:10.1146/annurev.bi.50.070181.001533.

Kühn, H. 1978. « Light-Regulated Binding of Rhodopsin Kinase and Other Proteins to Cattle Photoreceptor Membranes ». *Biochemistry* 17 (21): 4389‑95.

Kumari, Tannu, Bhaskar Pant, et Kamalraj Raj Pardasani. 2009. « A Model for the Evaluation of Domain Based Classification of GPCR ». *Bioinformation* 4 (4): 138‑42.

Kumar, Raj, et E. Brad Thompson. 2005. « Gene Regulation by the Glucocorticoid Receptor: Structure:function Relationship ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 94 (5): 383 - 94. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.046.

Kuna, Ramya S., Shravan Babu Girada, Suman Asalla, Joyprashant Vallentyne, Subbareddy Maddika, James T. Patterson, David L. Smiley, Richard D. DiMarchi, et Prasenjit Mitra. 2013. « Glucagon-like Peptide-1 Receptor-Mediated Endosomal cAMP Generation Promotes Glucose-Stimulated Insulin Secretion in Pancreatic β-Cells ». *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 305 (2): E161 - 70. doi:10.1152/ajpendo.00551.2012.

L

Lagerström, Malin C., et Helgi B. Schiöth. 2008. « Structural Diversity of G Protein-Coupled Receptors and Significance for Drug Discovery ». *Nature Reviews. Drug Discovery* 7 (4): 339 - 57. doi:10.1038/nrd2518.

Lalaoui, Najoua, Lisa M. Lindqvist, Jarrod J. Sandow, et Paul G. Ekert. 2015. « The Molecular Relationships between Apoptosis, Autophagy and Necroptosis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 39 (mars): 63 - 69. doi:10.1016/j.semcdb.2015.02.003.

Lambillotte, C., P. Gilon, et J. C. Henquin. 1997. « Direct Glucocorticoid Inhibition of Insulin Secretion. An in Vitro Study of Dexamethasone Effects in Mouse Islets ». *The Journal of Clinical Investigation* 99 (3): 414‑23. doi:10.1172/JCI119175.

Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron, et L. S. Barak. 1999. « The beta2-Adrenergic Receptor/betaarrestin Complex Recruits the Clathrin Adaptor AP-2 during Endocytosis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3712‑17.

Larsson, Dr L.-I., F. Sundler, et R. Håkanson. 1975. « Immunohistochemical Localization of Human Pancreatic Polypeptide (HPP) to a Population of Islet Cells ». *Cell and Tissue Research* 156 (2): 167 - 71. doi:10.1007/BF00221800.

Larsson, H., et B. Ahrén. 1999. « Insulin Resistant Subjects Lack Islet Adaptation to Short-Term Dexamethasone-Induced Reduction in Insulin Sensitivity ». *Diabetologia* 42 (8): 936‑43. doi:10.1007/s001250051251.

Laybutt, D. Ross, Arun Sharma, Dennis C. Sgroi, Justin Gaudet, Susan Bonner-Weir, et

Gordon C. Weir. 2002. « Genetic Regulation of Metabolic Pathways in Beta-Cells Disrupted by Hyperglycemia ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (13): 10912‑21. doi:10.1074/jbc.M111751200.

Leiser, M., et N. Fleischer. 1996. « cAMP-Dependent Phosphorylation of the Cardiac-Type Alpha 1 Subunit of the Voltage-Dependent Ca2+ Channel in a Murine Pancreatic Beta-Cell Line ». *Diabetes* 45 (10): 1412‑18.

Lester, L. B., M. C. Faux, J. B. Nauert, et J. D. Scott. 2001. « Targeted Protein Kinase A and PP-2B Regulate Insulin Secretion through Reversible Phosphorylation ». *Endocrinology* 142 (3): 1218 ‑ 27. doi:10.1210/endo.142.3.8023.

Lester, L. B., L. K. Langeberg, et J. D. Scott. 1997. « Anchoring of Protein Kinase A Facilitates Hormone-Mediated Insulin Secretion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14942‑47.

Lewis-Tuffin, Laura J., Christine M. Jewell, Rachelle J. Bienstock, Jennifer B. Collins, et John A. Cidlowski. 2007. « Human Glucocorticoid Receptor Beta Binds RU-486 and Is Transcriptionally Active ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2266 ‑ 82. doi:10.1128/MCB.01439-06.

Light, Peter E., Jocelyn E. Manning Fox, Michael J. Riedel, et Michael B. Wheeler. 2002. « Glucagon-like Peptide-1 Inhibits Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channels via a Protein Kinase A- and ADP-Dependent Mechanism ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 16 (9): 2135‑44. doi:10.1210/me.2002-0084.

Lin, Fang-Tsyr, Wei Chen, Sudha Shenoy, Mei Cong, Sabrina T. Exum, et Robert J. Lefkowitz. 2002. « Phosphorylation of Beta-arrestin2 Regulates Its Function in Internalization of beta(2)-Adrenergic Receptors ». *Biochemistry* 41 (34): 10692‑99.

Lin, F. T., K. M. Krueger, H. E. Kendall, Y. Daaka, Z. L. Fredericks, J. A. Pitcher, et R. J. Lefkowitz. 1997. « Clathrin-Mediated Endocytosis of the Beta-Adrenergic Receptor Is Regulated by Phosphorylation/dephosphorylation of Beta-arrestin1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (49): 31051‑57.

Lin, F. T., W. E. Miller, L. M. Luttrell, et R. J. Lefkowitz. 1999. « Feedback Regulation of Beta-arrestin1 Function by Extracellular Signal-Regulated Kinases ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (23): 15971‑74.

Lingohr, Melissa K., Isabelle Briaud, Lorna M. Dickson, Jill F. McCuaig, Cristina Alárcon, Barton L. Wicksteed, et Christopher J. Rhodes. 2006. « Specific Regulation of IRS-2 Expression by Glucose in Rat Primary Pancreatic Islet Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (23): 15884‑92. doi:10.1074/jbc.M600356200.

Ling, Z., J. C. Hannaert, et D. Pipeleers. 1994. « Effect of Nutrients, Hormones and Serum on Survival of Rat Islet Beta Cells in Culture ». *Diabetologia* 37 (1): 15‑21.

Liu, Jieyu, Yu Liu, Li Chen, Yuehui Wang, et Junqi Li. 2013. « Glucagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide Protects against Diabetic Cardiomyopathy by the Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway ». *Journal of Diabetes Research* 2013: 630537. doi:10.1155/2013/630537.

Loder, Merewyn K., Gabriela da Silva Xavier, Angela McDonald, et Guy A. Rutter. 2008. « TCF7L2 Controls Insulin Gene Expression and Insulin Secretion in Mature Pancreatic Beta-Cells ». *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 3): 357 ‑ 59. doi:10.1042/BST0360357.

Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, et R. J. Lefkowitz. 1990. « Beta-Arrestin: A Protein That Regulates Beta-Adrenergic Receptor Function ». *Science (New York, N.Y.)* 248 (4962): 1547‑50.

Lonart, György, Susanne Schoch, Pascal S. Kaeser, C. Jenny Larkin, Thomas C. Südhof, et David J. Linden. 2003. « Phosphorylation of RIM1alpha by PKA Triggers Presynaptic Long-Term Potentiation at Cerebellar Parallel Fiber Synapses ». *Cell* 115 (1): 49‑60.

Lu, Jingze, Zixuan He, Junmei Fan, Pingyong Xu, et Liangyi Chen. 2008. « Overlapping Functions of Different Dynamin Isoforms in Clathrin-Dependent and -Independent Endocytosis in Pancreatic Beta Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (2): 315 ‑ 19. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.077.

Lu, Nick Z., Jennifer B. Collins, Sherry F. Grissom, et John A. Cidlowski. 2007. « Selective Regulation of Bone Cell Apoptosis by Translational Isoforms of the Glucocorticoid Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (20): 7143 ‑ 60. doi:10.1128/MCB.00253-07.

Luttrell, L. M., G. J. Della Rocca, T. van Biesen, D. K. Luttrell, et R. J. Lefkowitz. 1997. « Gbetagamma Subunits Mediate Src-Dependent Phosphorylation of the Epidermal Growth Factor Receptor. A Scaffold for G Protein-Coupled Receptor-Mediated Ras Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (7): 4637‑44.

Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, et al. 1999. « Beta-Arrestin-Dependent Formation of beta2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes ». *Science (New York, N.Y.)* 283 (5402): 655‑61.

Luttrell, L. M., F. L. Roudabush, E. W. Choy, W. E. Miller, M. E. Field, K. L. Pierce, et R. J. Lefkowitz. 2001. « Activation and Targeting of Extracellular Signal-Regulated Kinases by Beta-Arrestin Scaffolds ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5): 2449 - 54. doi:10.1073/pnas.041604898.

Luttrell, Louis M., et Robert J. Lefkowitz. 2002. « The Role of Beta-Arrestins in the Termination and Transduction of G-Protein-Coupled Receptor Signals ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 3): 455‑65.

M

Macfarlane, W. M., C. M. McKinnon, Z. A. Felton-Edkins, H. Cragg, R. F. James, et K. Docherty. 1999. « Glucose Stimulates Translocation of the Homeodomain Transcription Factor PDX1 from the Cytoplasm to the Nucleus in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 1011‑16.

Macfarlane, W. M., S. B. Smith, R. F. James, A. D. Clifton, Y. N. Doza, P. Cohen, et K. Docherty. 1997. « The p38/reactivating Kinase Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Mediates the Activation of the Transcription Factor Insulin Upstream Factor 1 and Insulin Gene Transcription by High Glucose in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20936‑44.

Maechler, P., et C. B. Wollheim. 1999. « Mitochondrial Glutamate Acts as a Messenger in Glucose-Induced Insulin Exocytosis ». *Nature* 402 (6762): 685‑89. doi:10.1038/45280.

Maedler, Kathrin. 2006. « Aging correlates with decreased beta-cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: a potential role for Fas and pancreatic duo... - PubMed - NCBI ». http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/pubmed/?term=Maedler+K+2006+55+2455-2462.

Magnan, C., et A. Ktorza. 2005. « Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique ». *EMC - Endocrinologie* 2 (4): 241 - 64. doi:10.1016/j.emcend.2005.07.001.

Mak, Judith C. W., Takeshi Hisada, Michael Salmon, Peter J. Barnes, et K. Fan Chung. 2002. « Glucocorticoids Reverse IL-1beta-Induced Impairment of Beta-Adrenoceptor-Mediated Relaxation and up-Regulation of G-Protein-Coupled Receptor Kinases ». *British Journal of Pharmacology* 135 (4): 987 - 96. doi:10.1038/sj.bjp.0704545.

Ma, Lan, et Gang Pei. 2007. « Beta-Arrestin Signaling and Regulation of Transcription ». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 2): 213‑18. doi:10.1242/jcs.03338.

Malecki, M. T., U. S. Jhala, A. Antonellis, L. Fields, A. Doria, T. Orban, M. Saad, J. H. Warram, M. Montminy, et A. S. Krolewski. 1999. « Mutations in NEUROD1 Are Associated with the Development of Type 2 Diabetes Mellitus ». *Nature Genetics* 23 (3): 323‑28. doi:10.1038/15500.

Ma, Philip, et Rodney Zemmel. 2002. « Value of Novelty? » *Nature Reviews. Drug Discovery* 1 (8): 571 - 72. doi:10.1038/nrd884.

Marchese, Adriano, Catherine Chen, You-Me Kim, et Jeffrey L. Benovic. 2003. « The Ins and Outs of G Protein-Coupled Receptor Trafficking ». *Trends in Biochemical Sciences* 28 (7): 369 - 76. doi:10.1016/S0968-0004(03)00134-8.

Marchetti, P., R. Lupi, M. Bugliani, C. L. Kirkpatrick, G. Sebastiani, F. A. Grieco, S. Del Guerra, et al. 2012. « A Local Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) System in Human Pancreatic Islets ». *Diabetologia* 55 (12): 3262‑72. doi:10.1007/s00125-012-2716-9.

Marco, J., C. Calle, D. Román, M. Díaz-Fierros, M. L. Villanueva, et I. Valverde. 1973. « Hyperglucagonism Induced by Glucocorticoid Treatment in Man ». *The New England Journal of Medicine* 288 (3): 128 - 31. doi:10.1056/NEJM197301182880305.

Marcus, E. A., C. Kintner, et W. Harris. 1998. « The Role of GSK3beta in Regulating Neuronal

Differentiation in Xenopus Laevis ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 12 (4-5): 269 - 80. doi:10.1006/mcne.1998.0713.

Matsuoka, Taka-aki, Isabella Artner, Eva Henderson, Anna Means, Maike Sander, et Roland Stein. 2004. « The MafA Transcription Factor Appears to Be Responsible for Tissue-Specific Expression of Insulin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9): 2930 - 33. doi:10.1073/pnas.0306233101.

Mayo, Kelly E., Laurence J. Miller, Dominique Bataille, Stéphane Dalle, Burkhard Göke, Bernard Thorens, et Daniel J. Drucker. 2003a. « International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family ». *Pharmacological Reviews* 55 (1): 167 - 94. doi:10.1124/pr.55.1.6.

Mayo, Kelly E, Laurence J Miller, Dominique Bataille, Stéphane Dalle, Burkhard Göke, Bernard Thorens, et Daniel J Drucker. 2003b. « International Union of Pharmacology. XXXV. The Glucagon Receptor Family ». *Pharmacological Reviews* 55 (1): 167 - 94. doi:10.1124/pr.55.1.6.

McCulloch, Laura J., Martijn van de Bunt, Matthias Braun, Keith N. Frayn, Anne Clark, et Anna L. Gloyn. 2011. « GLUT2 (SLC2A2) Is Not the Principal Glucose Transporter in Human Pancreatic Beta Cells: Implications for Understanding Genetic Association Signals at This Locus ». *Molecular Genetics and Metabolism* 104 (4): 648 - 53. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.026.

McDonald, P. H., C. W. Chow, W. E. Miller, S. A. Laporte, M. E. Field, F. T. Lin, R. J. Davis, et R. J. Lefkowitz. 2000. « Beta-Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3 ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5496): 1574‑77.

McDonald, P. H., N. L. Cote, F. T. Lin, R. T. Premont, J. A. Pitcher, et R. J. Lefkowitz. 1999. « Identification of NSF as a Beta-arrestin1-Binding Protein. Implications for beta2-Adrenergic Receptor Regulation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (16): 10677‑80.

Mcintyre, N., C. D. Holdsworth, et D. S. Turner. 1964. « NEW INTERPRETATION OF ORAL GLUCOSE TOLERANCE ». *Lancet (London, England)* 2 (7349): 20‑21.

McKay, Lorraine I., et John A. Cidlowski. 2003. « Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids ». http://www.ncbi.nlm.nih.gov.gate2.inist.fr/books/NBK13780/.

McMahon, M., J. Gerich, et R. Rizza. 1988. « Effects of Glucocorticoids on Carbohydrate Metabolism ». *Diabetes/Metabolism Reviews* 4 (1): 17‑30.

Meier, Juris J., Michael A. Nauck, Wolfgang E. Schmidt, et Baptist Gallwitz. 2002. « Gastric Inhibitory Polypeptide: The Neglected Incretin Revisited ». *Regulatory Peptides* 107 (1-3): 1‑13.

Melloul, D., S. Marshak, et E. Cerasi. 2002a. « Regulation of Insulin Gene Transcription ». *Diabetologia* 45 (3): 309‑26. doi:10.1007/s00125-001-0728-y.

———. 2002b. « Regulation of Insulin Gene Transcription ». *Diabetologia* 45 (3): 309‑26. doi:10.1007/s00125-001-0728-y.

Menge, Bjoern A., Andrea Tannapfel, Orlin Belyaev, Robert Drescher, Christophe Müller, Waldemar Uhl, Wolfgang E. Schmidt, et Juris J. Meier. 2008. « Partial Pancreatectomy in Adult Humans Does Not Provoke Beta-Cell Regeneration ». *Diabetes* 57 (1): 142 - 49. doi:10.2337/db07-1294.

Mentlein, R. 1999. « Dipeptidyl-Peptidase IV (CD26)--Role in the Inactivation of Regulatory Peptides ». *Regulatory Peptides* 85 (1): 9‑24.

Miller, L. J., M. Dong, K. G. Harikumar, et F. Gao. 2007. « Structural Basis of Natural Ligand Binding and Activation of the Class II G-Protein-Coupled Secretin Receptor ». *Biochemical Society Transactions* 35 (Pt 4): 709‑12. doi:10.1042/BST0350709.

Miller, William E., Daniel A. Houtz, Christopher D. Nelson, P. E. Kolattukudy, et Robert J. Lefkowitz. 2003. « G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Kinase Phosphorylation and Beta-Arrestin Recruitment Regulate the Constitutive Signaling Activity of the Human Cytomegalovirus US28 GPCR ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (24): 21663 - 71. doi:10.1074/jbc.M303219200.

Milligan, Graeme, et Evi Kostenis. 2006. « Heterotrimeric G-Proteins: A Short History ». *British Journal of Pharmacology* 147 Suppl 1 (janvier): S46 - 55. doi:10.1038/sj.bjp.0706405.

Mojsov, S., G. Heinrich, I. B. Wilson, M. Ravazzola, L. Orci, et J. F. Habener. 1986.

« Preproglucagon Gene Expression in Pancreas and Intestine Diversifies at the Level of Post-Translational Processing ». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (25): 11880‑89.

Mosley, Amber L., John A. Corbett, et Sabire Ozcan. 2004. « Glucose Regulation of Insulin Gene Expression Requires the Recruitment of p300 by the Beta-Cell-Specific Transcription Factor Pdx-1 ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (9): 2279‑90. doi:10.1210/me.2003-0463.

Mosley, Amber L., et Sabire Ozcan. 2004. « The Pancreatic Duodenal Homeobox-1 Protein (Pdx-1) Interacts with Histone Deacetylases Hdac-1 and Hdac-2 on Low Levels of Glucose ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (52): 54241‑47. doi:10.1074/jbc.M410379200.

Murre, C., P. S. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Y. Jan, Y. N. Jan, C. V. Cabrera, J. N. Buskin, S. D. Hauschka, et A. B. Lassar. 1989. « Interactions between Heterologous Helix-Loop-Helix Proteins Generate Complexes That Bind Specifically to a Common DNA Sequence ». *Cell* 58 (3): 537‑44.

N

Naga Prasad, Sathyamangla V., Arundathi Jayatilleke, Aasakiran Madamanchi, et Howard A. Rockman. 2005. « Protein Kinase Activity of Phosphoinositide 3-Kinase Regulates Beta-Adrenergic Receptor Endocytosis ». *Nature Cell Biology* 7 (8): 785‑96.

Naga Prasad, Sathyamangla V., Stéphane A. Laporte, Dean Chamberlain, Marc G. Caron, Larry Barak, et Howard A. Rockman. 2002. « Phosphoinositide 3-Kinase Regulates beta2-Adrenergic Receptor Endocytosis by AP-2 Recruitment to the Receptor/beta-Arrestin Complex ». *The Journal of Cell Biology* 158 (3): 563 - 75. doi:10.1083/jcb.200202113.

Nauck, M. A., E. Homberger, E. G. Siegel, R. C. Allen, R. P. Eaton, R. Ebert, et W. Creutzfeldt. 1986. « Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated from Venous Insulin and C-Peptide Responses ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 63 (2): 492‑98. doi:10.1210/jcem-63-2-492.

Naya, F. J., H. P. Huang, Y. Qiu, H. Mutoh, F. J. DeMayo, A. B. Leiter, et M. J. Tsai. 1997. « Diabetes, Defective Pancreatic Morphogenesis, and Abnormal Enteroendocrine Differentiation in BETA2/neuroD-Deficient Mice ». *Genes & Development* 11 (18): 2323‑34.

Naya, F. J., C. M. Stellrecht, et M. J. Tsai. 1995. « Tissue-Specific Regulation of the Insulin Gene by a Novel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor ». *Genes & Development* 9 (8): 1009‑19.

Nie, Y., M. Nakashima, P. L. Brubaker, Q. L. Li, R. Perfetti, E. Jansen, Y. Zambre, D. Pipeleers, et T. C. Friedman. 2000. « Regulation of Pancreatic PC1 and PC2 Associated with Increased Glucagon-like Peptide 1 in Diabetic Rats ». *The Journal of Clinical Investigation* 105 (7): 955‑65. doi:10.1172/JCI7456.

Niimura, Manabu, Takashi Miki, Tadao Shibasaki, Wakako Fujimoto, Toshihiko Iwanaga, et Susumu Seino. 2009. « Critical Role of the N-Terminal Cyclic AMP-Binding Domain of Epac2 in Its Subcellular Localization and Function ». *Journal of Cellular Physiology* 219 (3): 652‑58. doi:10.1002/jcp.21709.

Ni, Qiang, Ambhighainath Ganesan, Nwe-Nwe Aye-Han, Xinxin Gao, Michael D. Allen, Andre Levchenko, et Jin Zhang. 2011. « Signaling Diversity of PKA Achieved Via a Ca2+-cAMP-PKA Oscillatory Circuit ». *Nature chemical biology* 7 (1): 34 - 40. doi:10.1038/nchembio.478.

Novak, U., A. Wilks, G. Buell, et S. McEwen. 1987. « Identical mRNA for Preproglucagon in Pancreas and Gut ». *European Journal of Biochemistry / FEBS* 164 (3): 553‑58.

O

Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, L. S. Barak, et M. G. Caron. 2001. « Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-Coupled Receptor-Beta-Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis* ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19452‑60. doi:10.1074/jbc.M101450200.

Oakley, R. H., S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, et L. S. Barak. 2000. « Differential Affinities of Visual Arrestin, Beta arrestin1, and Beta arrestin2 for G Protein-Coupled Receptors Delineate Two Major Classes of Receptors ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 17201 - 10. doi:10.1074/jbc.M910348199.

Oakley, Robert H., et John A. Cidlowski. 2011. « Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (5): 3177‑84. doi:10.1074/jbc.R110.179325.

———. 2013. « The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (5): 1033‑44. doi:10.1016/j.jaci.2013.09.007.

Oakley, Robert H., Javier Revollo, et John A. Cidlowski. 2012. « Glucocorticoids Regulate Arrestin Gene Expression and Redirect the Signaling Profile of G Protein-Coupled Receptors ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (43): 17591‑96. doi:10.1073/pnas.1209411109.

O'Byrne, P. M., S. Rennard, H. Gerstein, F. Radner, S. Peterson, B. Lindberg, L.-G. Carlsson, et D. D. Sin. 2012. « Risk of New Onset Diabetes Mellitus in Patients with Asthma or COPD Taking Inhaled Corticosteroids ». *Respiratory Medicine* 106 (11): 1487‑93. doi:10.1016/j.rmed.2012.07.011.

Ogawa, A, J H Johnson, M Ohneda, C T McAllister, L Inman, T Alam, et R H Unger. 1992. « Roles of Insulin Resistance and Beta-Cell Dysfunction in Dexamethasone-Induced Diabetes. » *Journal of Clinical Investigation* 90 (2): 497 ‑ 504. doi:10.1172/JCI115886.

Ohara-Imaizumi, Mica, Tomonori Fujiwara, Yoko Nakamichi, Tadashi Okamura, Yoshihiro Akimoto, Junko Kawai, Satsuki Matsushima, et al. 2007. « Imaging Analysis Reveals Mechanistic Differences between First- and Second-Phase Insulin Exocytosis ». *The Journal of Cell Biology* 177 (4): 695 ‑ 705. doi:10.1083/jcb.200608132.

Ohlsson, H., K. Karlsson, et T. Edlund. 1993. « IPF1, a Homeodomain-Containing Transactivator of the Insulin Gene ». *The EMBO Journal* 12 (11): 4251‑59.

Oh, P., D. P. McIntosh, et J. E. Schnitzer. 1998. « Dynamin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-Driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium ». *The Journal of Cell Biology* 141 (1): 101‑14.

Ohta, M., J. Nelson, D. Nelson, M. D. Meglasson, et M. Erecińska. 1993. « Effect of Ca++ Channel Blockers on Energy Level and Stimulated Insulin Secretion in Isolated Rat Islets of Langerhans ». *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 264 (1): 35‑40.

Okamoto, T., A. Schlegel, P. E. Scherer, et M. P. Lisanti. 1998. « Caveolins, a Family of Scaffolding Proteins for Organizing "Preassembled Signaling Complexes" at the Plasma Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5419‑22.

Olbrot, Martin, Jonathan Rud, Larry G. Moss, et Arun Sharma. 2002. « Identification of Beta-Cell-Specific Insulin Gene Transcription Factor RIPE3b1 as Mammalian MafA ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 6737‑42. doi:10.1073/pnas.102168499.

Olefsky, J. M., J. Johnson, F. Liu, P. Jen, et G. M. Reaven. 1975. « The Effects of Acute and Chronic Dexamethasone Administration on Insulin Binding to Isolated Rat Hepatocytes and Adipocytes ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 24 (4): 517‑27.

Ong, K. K., D. I. Phillips, C. Fall, J. Poulton, S. T. Bennett, J. Golding, J. A. Todd, et D. B. Dunger. 1999. « The Insulin Gene VNTR, Type 2 Diabetes and Birth Weight ». *Nature Genetics* 21 (3): 262 ‑ 63. doi:10.1038/6775.

Origuchi, Tomoki, Satomi Yamaguchi, Akiyo Inoue, Yoshie Kazaura, Naomi Matsuo, Norio Abiru, Atsushi Kawakami, et Katsumi Eguchi. 2011. « Increased Incidence of Pre-Diabetes Mellitus at a Department of Rheumatology: A Retrospective Study ». *Modern Rheumatology / the Japan Rheumatism Association* 21 (5): 495‑99. doi:10.1007/s10165-011-0433-8.

Orskov, C., L. Rabenhøj, A. Wettergren, H. Kofod, et J. J. Holst. 1994. « Tissue and Plasma Concentrations of Amidated and Glycine-Extended Glucagon-like Peptide I in Humans ». *Diabetes* 43 (4): 535‑39.

Ortsater, Henrik, Ake Sjoholm, et Alex Rafacho. 2012. « Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess ». In *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*, édité par Sameh Magdeldin. InTech. http://www.intechopen.com/books/state-of-the-art-of-therapeutic-endocrinology/regulation-of-glucocorticoid-receptor-signaling-and-the-

diabetogenic-effects-of-glucocorticoid-exces.

Overington, John P., Bissan Al-Lazikani, et Andrew L. Hopkins. 2006. « How Many Drug Targets Are There? » *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (12): 993 - 96. doi:10.1038/nrd2199.

Ozaki, N., T. Shibasaki, Y. Kashima, T. Miki, K. Takahashi, H. Ueno, Y. Sunaga, et al. 2000. « cAMP-GEFII Is a Direct Target of cAMP in Regulated Exocytosis ». *Nature Cell Biology* 2 (11): 805 - 11. doi:10.1038/35041046.

P

Palade, G. E., et R. R. Bruns. 1968. « Structural Modulations of Plasmalemmal Vesicles ». *The Journal of Cell Biology* 37 (3): 633‑49.

Panjwani, Naim, Erin E. Mulvihill, Christine Longuet, Bernardo Yusta, Jonathan E. Campbell, Theodore J. Brown, Catherine Streutker, et al. 2013. « GLP-1 Receptor Activation Indirectly Reduces Hepatic Lipid Accumulation but Does Not Attenuate Development of Atherosclerosis in Diabetic Male ApoE(-/-) Mice ». *Endocrinology* 154 (1): 127 - 39. doi:10.1210/en.2012-1937.

Papachristou, D. N., J. L. Liu, et Y. C. Patel. 1994. « Glucocorticoids Regulate Somatostatin Peptide and Steady State Messenger Ribonucleic Acid Levels in Normal Rat Tissues and in a Somatostatin-Producing Islet Tumor Cell Line (1027B2) ». *Endocrinology* 134 (5): 2259 - 66. doi:10.1210/endo.134.5.7908873.

Paradis, Justine S., Stevenson Ly, Élodie Blondel-Tepaz, Jacob A. Galan, Alexandre Beautrait, Mark G. H. Scott, Hervé Enslen, Stefano Marullo, Philippe P. Roux, et Michel Bouvier. 2015. « Receptor Sequestration in Response to β-Arrestin-2 Phosphorylation by ERK1/2 Governs Steady-State Levels of GPCR Cell-Surface Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (37): E5160 - 68. doi:10.1073/pnas.1508836112.

Parker, J. C., M. A. VanVolkenburg, R. J. Ketchum, K. L. Brayman, et K. M. Andrews. 1995. « Cyclic AMP Phosphodiesterases of Human and Rat Islets of Langerhans: Contributions of Types III and IV to the Modulation of Insulin Secretion ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217 (3): 916 - 23. doi:10.1006/bbrc.1995.2858.

Perroy, Julie, Stephanie Pontier, Pascale G. Charest, Muriel Aubry, et Michel Bouvier. 2004. « Real-Time Monitoring of Ubiquitination in Living Cells by BRET ». *Nature Methods* 1 (3): 203 - 8. doi:10.1038/nmeth722.

Perry, Stephen J., George S. Baillie, Trudy A. Kohout, Ian McPhee, Maria M. Magiera, Kok Long Ang, William E. Miller, et al. 2002. « Targeting of Cyclic AMP Degradation to Beta 2-Adrenergic Receptors by Beta-Arrestins ». *Science (New York, N.Y.)* 298 (5594): 834‑36. doi:10.1126/science.1074683.

Perry, TracyAnn, et Nigel H. Greig. 2003. « The Glucagon-like Peptides: A Double-Edged Therapeutic Sword? » *Trends in Pharmacological Sciences* 24 (7): 377‑83. doi:10.1016/S0165-6147(03)00160-3.

Petersen, H. V., P. Serup, J. Leonard, B. K. Michelsen, et O. D. Madsen. 1994. « Transcriptional Regulation of the Human Insulin Gene Is Dependent on the Homeodomain Protein STF1/IPF1 Acting through the CT Boxes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10465‑69.

Pitcher, J. A., N. J. Freedman, et R. J. Lefkowitz. 1998. « G Protein-Coupled Receptor Kinases ». *Annual Review of Biochemistry* 67: 653 - 92. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.653.

Pitcher, J., M. J. Lohse, J. Codina, M. G. Caron, et R. J. Lefkowitz. 1992. « Desensitization of the Isolated Beta 2-Adrenergic Receptor by Beta-Adrenergic Receptor Kinase, cAMP-Dependent Protein Kinase, and Protein Kinase C Occurs via Distinct Molecular Mechanisms ». *Biochemistry* 31 (12): 3193 ‑97.

Poitout, Vincent, et R. Paul Robertson. 2008. « Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β-Cell Dysfunction ». *Endocrine Reviews* 29 (3): 351‑66. doi:10.1210/er.2007-0023.

Povsic, Thomas J., Trudy A. Kohout, et Robert J. Lefkowitz. 2003. « Beta-arrestin1 Mediates Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Anti-Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (51): 51334‑39. doi:10.1074/jbc.M309968200.

Pratt, W. B., et D. O. Toft. 1997. « Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and

Immunophilin Chaperones ». *Endocrine Reviews* 18 (3): 306 - 60. doi:10.1210/edrv.18.3.0303.

Prelovsek, Oja, Tomaz Mars, Marko Jevsek, Matej Podbregar, et Zoran Grubic. 2006. « High Dexamethasone Concentration Prevents Stimulatory Effects of TNF-Alpha and LPS on IL-6 Secretion from the Precursors of Human Muscle Regeneration ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291 (6): R1651 - 56. doi:10.1152/ajpregu.00020.2006.

Prentki, Marc, et Christopher J. Nolan. 2006. « Islet Beta Cell Failure in Type 2 Diabetes ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (7): 1802‑12. doi:10.1172/JCI29103.

Q

Qiu, Yi, Min Guo, Suming Huang, et Roland Stein. 2004. « Acetylation of the BETA2 Transcription Factor by p300-Associated Factor Is Important in Insulin Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9796 - 9802. doi:10.1074/jbc.M307577200.

Quoyer, Julie, Christine Longuet, Christophe Broca, Nathalie Linck, Safia Costes, Elodie Varin, Joël Bockaert, Gyslaine Bertrand, et Stéphane Dalle. 2010. « GLP-1 Mediates Antiapoptotic Effect by Phosphorylating Bad through a Beta-Arrestin 1-Mediated ERK1/2 Activation in Pancreatic Beta-Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1989 - 2002. doi:10.1074/jbc.M109.067207.

R

Raalte, Daniël H. van, Valentina Nofrate, Mathijs C. Bunck, Thijs van Iersel, Jeroen Elassaiss Schaap, Ulla K. Nässander, Robert J. Heine, Andrea Mari, Wim H. A. Dokter, et Michaela Diamant. 2010. « Acute and 2-Week Exposure to Prednisolone Impair Different Aspects of β-Cell Function in Healthy Men ». *European Journal of Endocrinology* 162 (4): 729 - 35. doi:10.1530/EJE-09-1034.

Rafacho, Alex, Luiz M. Gonçalves-Neto, Junia C. Santos-Silva, Paloma Alonso-Magdalena, Beatriz Merino, Sebastião R. Taboga, Everardo M. Carneiro, Antonio C. Boschero, Angel Nadal, et Ivan Quesada. 2014. « Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats ». *PloS One* 9 (4): e93531. doi:10.1371/journal.pone.0093531.

Rafacho, Alex, Henrik Ortsäter, Angel Nadal, et Ivan Quesada. 2014a. « Glucocorticoid Treatment and Endocrine Pancreas Function ». *Journal of Endocrinology*, septembre, JOE - 14 - 0373. doi:10.1530/JOE-14-0373.

———. 2014b. « Glucocorticoid Treatment and Endocrine Pancreas Function: Implications for Glucose Homeostasis, Insulin Resistance and Diabetes ». *The Journal of Endocrinology* 223 (3): R49 - 62. doi:10.1530/JOE-14-0373.

Rahier, J., Y. Guiot, R. M. Goebbels, C. Sempoux, et J. C. Henquin. 2008. « Pancreatic Beta-Cell Mass in European Subjects with Type 2 Diabetes ». *Diabetes, Obesity & Metabolism* 10 Suppl 4 (novembre): 32‑42. doi:10.1111/j.1463-1326.2008.00969.x.

Ramos, Lavoisier S., Jonathan Hale Zippin, Margarita Kamenetsky, Jochen Buck, et Lonny R. Levin. 2008. « Glucose and GLP-1 Stimulate cAMP Production via Distinct Adenylyl Cyclases in INS-1E Insulinoma Cells ». *The Journal of General Physiology* 132 (3): 329 - 38. doi:10.1085/jgp.200810044.

Ranta, Felicia, Diana Avram, Susanne Berchtold, Martina Düfer, Gisela Drews, Florian Lang, et Susanne Ullrich. 2006. « Dexamethasone Induces Cell Death in Insulin-Secreting Cells, an Effect Reversed by Exendin-4 ». *Diabetes* 55 (5): 1380‑90. doi:10.2337/db05-1220.

Raoux, Matthieu, Pierre Vacher, Julien Papin, Alexandre Picard, Elzbieta Kostrzewa, Anne Devin, Julien Gaitan, et al. 2015. « Multilevel Control of Glucose Homeostasis by Adenylyl Cyclase 8 ». *Diabetologia* 58 (4): 749 - 57. doi:10.1007/s00125-014-3445-z.

Ravier, Magalie A., Michele Leduc, Joy Richard, Nathalie Linck, Annie Varrault, Nelly Pirot, Morgane M. Roussel, Joël Bockaert, Stéphane Dalle, et Gyslaine Bertrand. 2014. « β-Arrestin2 Plays a Key Role in the Modulation of the Pancreatic Beta Cell Mass in Mice ». *Diabetologia* 57 (3): 532‑41. doi:10.1007/s00125-013-3130-7.

Ravier, Magalie A., Takashi Tsuboi, et Guy A. Rutter. 2008. « Imaging a Target of Ca2+ Signalling: Dense Core Granule Exocytosis Viewed by Total Internal Reflection

Fluorescence Microscopy ». *Methods (San Diego, Calif.)* 46 (3): 233‑38. doi:10.1016/j.ymeth.2008.09.016.

Read, M. L., A. R. Clark, et K. Docherty. 1993. « The Helix-Loop-Helix Transcription Factor USF (upstream Stimulating Factor) Binds to a Regulatory Sequence of the Human Insulin Gene Enhancer ». *The Biochemical Journal* 295 (Pt 1) (octobre): 233‑37.

Read, M. L., M. R. Masson, et K. Docherty. 1997. « A RIPE3b1-like Factor Binds to a Novel Site in the Human Insulin Promoter in a Redox-Dependent Manner ». *FEBS Letters* 418 (1-2): 68‑72.

Rehmann, Holger, Joost Das, Puck Knipscheer, Alfred Wittinghofer, et Johannes L. Bos. 2006. « Structure of the Cyclic-AMP-Responsive Exchange Factor Epac2 in Its Auto-Inhibited State ». *Nature* 439 (7076): 625‑28. doi:10.1038/nature04468.

Rehmann, Holger, Balaji Prakash, Eva Wolf, Alma Rueppel, Johan de Rooij, Johannes L. Bos, et Alfred Wittinghofer. 2003. « Structure and Regulation of the cAMP-Binding Domains of Epac2 ». *Nature Structural Biology* 10 (1): 26 ‑ 32. doi:10.1038/nsb878.

Reiter, Eric, et Robert J. Lefkowitz. 2006. « GRKs and Beta-Arrestins: Roles in Receptor Silencing, Trafficking and Signaling ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 17 (4): 159 ‑ 65. doi:10.1016/j.tem.2006.03.008.

Renström, E., L. Eliasson, et P. Rorsman. 1997. « Protein Kinase A-Dependent and ‑Independent Stimulation of Exocytosis by cAMP in Mouse Pancreatic B-Cells ». *The Journal of Physiology* 502 (Pt 1) (juillet): 105‑18.

Rhodes, Christopher J. 2005. « Type 2 Diabetes-a Matter of Beta-Cell Life and Death? » *Science (New York, N.Y.)* 307 (5708): 380‑84. doi:10.1126/science.1104345.

Ricordi, C., D. W. Gray, B. J. Hering, D. B. Kaufman, G. L. Warnock, N. M. Kneteman, S. P. Lake, N. J. London, C. Socci, et R. Alejandro. 1990. « Islet Isolation Assessment in Man and Large Animals ». *Acta Diabetologica Latina* 27 (3): 185‑95.

Ritzel, R. A., N. Kleine, J. J. Holst, B. Willms, W. Schmiegel, et M. A. Nauck. 2007. « Preserved GLP-1 Effects in a Diabetic Patient with Cushing's Disease ». *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 115 (2): 146 ‑ 50. doi:10.1055/s-2007-955096.

Roberge, J. N., et P. L. Brubaker. 1991. « Secretion of Proglucagon-Derived Peptides in Response to Intestinal Luminal Nutrients ». *Endocrinology* 128 (6): 3169‑74. doi:10.1210/endo-128-6-3169.

Robertson, R. Paul. 2004. « Chronic Oxidative Stress as a Central Mechanism for Glucose Toxicity in Pancreatic Islet Beta Cells in Diabetes ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42351 ‑ 54. doi:10.1074/jbc.R400019200.

Rocca, A. S., et P. L. Brubaker. 1999. « Role of the Vagus Nerve in Mediating Proximal Nutrient-Induced Glucagon-like Peptide-1 Secretion ». *Endocrinology* 140 (4): 1687‑94. doi:10.1210/endo.140.4.6643.

Rockall, A. G., S. A. Sohaib, D. Evans, G. Kaltsas, A. M. Isidori, J. P. Monson, G. M. Besser, A. B. Grossman, et R. H. Reznek. 2003. « Computed Tomography Assessment of Fat Distribution in Male and Female Patients with Cushing's Syndrome ». *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 149 (6): 561‑67.

Rodriguez-Diaz, Rayner, Midhat H. Abdulreda, Alexander L. Formoso, Itai Gans, Camillo Ricordi, Per-Olof Berggren, et Alejandro Caicedo. 2011. « Innervation Patterns of Autonomic Axons in the Human Endocrine Pancreas ». *Cell Metabolism* 14 (1): 45‑54. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.008.

Roed, Sarah Noerklit, Anne Cathrine Nøhr, Pernille Wismann, Helle Iversen, Hans Bräuner-Osborne, Sanne Moeller Knudsen, et Maria Waldhoer. 2015. « Functional Consequences of Glucagon-like Peptide-1 Receptor Cross-Talk and Trafficking ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (2): 1233‑43. doi:10.1074/jbc.M114.592436.

Roger, B., J. Papin, P. Vacher, M. Raoux, A. Mulot, M. Dubois, J. Kerr-Conte, et al. 2011. « Adenylyl Cyclase 8 Is Central to Glucagon-like Peptide 1 Signalling and Effects of Chronically Elevated Glucose in Rat and Human Pancreatic Beta Cells ». *Diabetologia* 54 (2): 390 ‑ 402. doi:10.1007/s00125-010-1955-x.

Rojas, Joselyn, Mervin Chávez-Castillo, Mervin Chávez-Castillo, Mayela Cabrera, Mayela Cabrera, Valmore Bermúdez, et Valmore Bermúdez. 2015. « Glucococorticoid-Induced Death of Pancreatic Beta Cells: An

Organized Chaos ». *JOP. Journal of the Pancreas* 16 (1): 11‑19.

Rolland, Jean-François, Jean-Claude Henquin, et Patrick Gilon. 2002. « Feedback Control of the ATP-Sensitive K(+) Current by Cytosolic Ca(2+) Contributes to Oscillations of the Membrane Potential in Pancreatic Beta-Cells ». *Diabetes* 51 (2): 376‑84.

Roma, Letícia P, Kleber L A Souza, Everardo M Carneiro, Antonio C Boschero, et José R Bosqueiro. 2012. « Pancreatic Islets from Dexamethasone-Treated Rats Show Alterations in Global Gene Expression and Mitochondrial Pathways ». *General Physiology and Biophysics* 31 (1): 65‑76. doi:10.4149/gpb_2012_011.

Rorsman, Patrik, et Matthias Braun. 2013. « Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets ». *Annual Review of Physiology* 75: 155 - 79. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183754.

Rorsman, P., et E. Renström. 2003. « Insulin Granule Dynamics in Pancreatic Beta Cells ». *Diabetologia* 46 (8): 1029 - 45. doi:10.1007/s00125-003-1153-1.

Rosengren, Anders H., Matthias Braun, Taman Mahdi, Sofia A. Andersson, Mary E. Travers, Makoto Shigeto, Enming Zhang, et al. 2012. « Reduced Insulin Exocytosis in Human Pancreatic β-Cells with Gene Variants Linked to Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 61 (7): 1726 - 33. doi:10.2337/db11-1516.

Rouillé, Y., S. Martin, et D. F. Steiner. 1995. « Differential Processing of Proglucagon by the Subtilisin-like Prohormone Convertases PC2 and PC3 to Generate Either Glucagon or Glucagon-like Peptide ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (44): 26488‑96.

Rovati, G. Enrico, Valérie Capra, et Richard R. Neubig. 2007. « The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State ». *Molecular Pharmacology* 71 (4): 959‑64. doi:10.1124/mol.106.029470.

S

Saad, M. J., F. Folli, J. A. Kahn, et C. R. Kahn. 1993. « Modulation of Insulin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Liver and Muscle of Dexamethasone-Treated Rats ». *The Journal of Clinical Investigation* 92 (4): 2065‑72. doi:10.1172/JCI116803.

Sakai, Koji, Kazuya Matsumoto, Takeshi Nishikawa, Mihoshi Suefuji, Kazuhiko Nakamaru, Yoshiaki Hirashima, Junji Kawashima, et al. 2003. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species Reduce Insulin Secretion by Pancreatic Beta-Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (1): 216‑22.

Sakoda, H., T. Ogihara, M. Anai, M. Funaki, K. Inukai, H. Katagiri, Y. Fukushima, et al. 2000. « Dexamethasone-Induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is due to Inhibition of Glucose Transport rather than Insulin Signal Transduction ». *Diabetes* 49 (10): 1700‑1708.

Salvi, Roberto, et Amar Abderrahmani. 2014. « Decompensation of β-Cells in Diabetes: When Pancreatic β-Cells Are on ICE(R) ». *Journal of Diabetes Research* 2014: 768024. doi:10.1155/2014/768024.

Sander, M., A. Neubüser, J. Kalamaras, H. C. Ee, G. R. Martin, et M. S. German. 1997. « Genetic Analysis Reveals That PAX6 Is Required for Normal Transcription of Pancreatic Hormone Genes and Islet Development ». *Genes & Development* 11 (13): 1662‑73.

Sandhu, H., S. R. Wiesenthal, P. E. MacDonald, R. H. McCall, V. Tchipashvili, S. Rashid, M. Satkunarajah, et al. 1999. « Glucagon-like Peptide 1 Increases Insulin Sensitivity in Depancreatized Dogs ». *Diabetes* 48 (5): 1045‑53.

Sato, Taiki, Hiroto Hayashi, Masahiro Hiratsuka, et Noriyasu Hirasawa. 2015a. « Glucocorticoids Decrease the Production of Glucagon-like Peptide-1 at the Transcriptional Level in Intestinal L-Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, février. doi:10.1016/j.mce.2015.02.014.

———. 2015b. « Glucocorticoids Decrease the Production of Glucagon-like Peptide-1 at the Transcriptional Level in Intestinal L-Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 406 (mai): 60 - 67. doi:10.1016/j.mce.2015.02.014.

Schnitzer, J. E., J. Liu, et P. Oh. 1995. « Endothelial Caveolae Have the Molecular Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including VAMP, NSF, SNAP, Annexins, and GTPases ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (24): 14399‑404.

Scott, Mark G. H., Erwann Le Rouzic, Axel Périanin, Vincenzo Pierotti, Hervé Enslen, Serge

Benichou, Stefano Marullo, et Alexandre Benmerah. 2002. « Differential Nucleocytoplasmic Shuttling of Beta-Arrestins. Characterization of a Leucine-Rich Nuclear Export Signal in Beta-arrestin2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (40): 37693 - 701. doi:10.1074/jbc.M207552200.

Scrocchi, L. A., T. J. Brown, N. MaClusky, P. L. Brubaker, A. B. Auerbach, A. L. Joyner, et D. J. Drucker. 1996. « Glucose Intolerance but Normal Satiety in Mice with a Null Mutation in the Glucagon-like Peptide 1 Receptor Gene ». *Nature Medicine* 2 (11): 1254‑58.

Shao, Yimin, Geheng Yuan, Yan Feng, Junqing Zhang, et Xiaohui Guo. 2014. « Early liraglutide treatment is better in glucose control, β-cell function improvement and mass preservation in db/db mice ». *Peptides*. Consulté le janvier 13. doi:10.1016/j.peptides.2013.11.011.

Shapiro, M. J., et S. R. Coughlin. 1998. « Separate Signals for Agonist-Independent and Agonist-Triggered Trafficking of Protease-Activated Receptor 1 ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (44): 29009‑14.

Sharma, A, et R Stein. 1994. « Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. » *Molecular and Cellular Biology* 14 (2): 871‑79.

Shenoy, S. K., P. H. McDonald, T. A. Kohout, et R. J. Lefkowitz. 2001. « Regulation of Receptor Fate by Ubiquitination of Activated Beta 2-Adrenergic Receptor and Beta-Arrestin ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5545): 1307 - 13. doi:10.1126/science.1063866.

Shenoy, Sudha K., et Robert J. Lefkowitz. 2003. « Trafficking Patterns of Beta-Arrestin and G Protein-Coupled Receptors Determined by the Kinetics of Beta-Arrestin Deubiquitination ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 14498‑506. doi:10.1074/jbc.M209626200.

Shibasaki, Tadao, Harumi Takahashi, Takashi Miki, Yasuhiro Sunaga, Kimio Matsumura, Mami Yamanaka, Changliang Zhang, et al. 2007. « Essential Role of Epac2/Rap1 Signaling in Regulation of Insulin Granule Dynamics by cAMP ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (49): 19333 - 38. doi:10.1073/pnas.0707054104.

Shimada, Masako, Xin Chen, Tomas Cvrk, Helene Hilfiker, Maria Parfenova, et Gino V. Segre. 2002. « Purification and Characterization of a Receptor for Human Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31774‑80. doi:10.1074/jbc.M204166200.

Shukla, Arun K., Garima Singh, et Eshan Ghosh. 2014. « Emerging Structural Insights into Biased GPCR Signaling ». *Trends in Biochemical Sciences* 39 (12): 594‑602. doi:10.1016/j.tibs.2014.10.001.

Singhal, Parag, Andrea Caumo, Peter E. Carey, Claudio Cobelli, et Roy Taylor. 2002. « Regulation of Endogenous Glucose Production after a Mixed Meal in Type 2 Diabetes ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283 (2): E275 - 83. doi:10.1152/ajpendo.00424.2001.

Smith, S. B., H. C. Ee, J. R. Conners, et M. S. German. 1999. « Paired-Homeodomain Transcription Factor PAX4 Acts as a Transcriptional Repressor in Early Pancreatic Development ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8272‑80.

Soares, M. B., E. Schon, A. Henderson, S. K. Karathanasis, R. Cate, S. Zeitlin, J. Chirgwin, et A. Efstratiadis. 1985. « RNA-Mediated Gene Duplication: The Rat Preproinsulin I Gene Is a Functional Retroposon ». *Molecular and Cellular Biology* 5 (8): 2090‑2103.

Solito, Egle, Abeda Mulla, John F. Morris, Helen C. Christian, Roderick J. Flower, et Julia C. Buckingham. 2003. « Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase ». *Endocrinology* 144 (4): 1164 - 74. doi:10.1210/en.2002-220592.

Sonoda, Noriyuki, Takeshi Imamura, Takeshi Yoshizaki, Jennie L Babendure, Juu-Chin Lu, et Jerrold M Olefsky. 2008. « Beta-Arrestin-1 Mediates Glucagon-like Peptide-1 Signaling to Insulin Secretion in Cultured Pancreatic Beta Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (18): 6614 - 19. doi:10.1073/pnas.0710402105.

Srinivasan, Shanthi, Ernesto Bernal-Mizrachi, Mitsuru Ohsugi, et Marshall Alan Permutt. 2002. « Glucose Promotes Pancreatic Islet Beta-Cell Survival through a PI 3-kinase/Akt-Signaling Pathway ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 283 (4): E784‑93. doi:10.1152/ajpendo.00177.2002.

Steiner, D. F., P. S. Quinn, S. J. Chan, J. Marsh, et H. S. Tager. 1980. « Processing Mechanisms in the Biosynthesis of Proteins ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 343: 1‑16.

Strasser, Andreas. 2005. « The Role of BH3-Only Proteins in the Immune System ». *Nature Reviews. Immunology* 5 (3): 189‑200. doi:10.1038/nri1568.

Suissa, Samy, Abbas Kezouh, et Pierre Ernst. 2010. « Inhaled Corticosteroids and the Risks of Diabetes Onset and Progression ». *The American Journal of Medicine* 123 (11): 1001‑6. doi:10.1016/j.amjmed.2010.06.019.

Sun, Yue, Zhijie Cheng, Lan Ma, et Gang Pei. 2002. « Beta-arrestin2 Is Critically Involved in CXCR4-Mediated Chemotaxis, and This Is Mediated by Its Enhancement of p38 MAPK Activation ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49212‑19. doi:10.1074/jbc.M207294200.

Syme, Colin A., Lei Zhang, et Alessandro Bisello. 2006. « Caveolin-1 Regulates Cellular Trafficking and Function of the Glucagon-like Peptide 1 Receptor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 20 (12): 3400‑3411. doi:10.1210/me.2006-0178.

T

Takei, K., P. S. McPherson, S. L. Schmid, et P. De Camilli. 1995. « Tubular Membrane Invaginations Coated by Dynamin Rings Are Induced by GTP-Gamma S in Nerve Terminals ». *Nature* 374 (6518): 186‑90. doi:10.1038/374186a0.

Talbot, Jason, Erik Joly, Marc Prentki, et Jean Buteau. 2012. « β-Arrestin1-Mediated Recruitment of c-Src Underlies the Proliferative Action of Glucagon-like Peptide-1 in Pancreatic β INS832/13 Cells ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 364 (1-2): 65‑70. doi:10.1016/j.mce.2012.08.010.

Tanaka, Y., C. E. Gleason, P. O. Tran, J. S. Harmon, et R. P. Robertson. 1999. « Prevention of Glucose Toxicity in HIT-T15 Cells and Zucker Diabetic Fatty Rats by Antioxidants ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (19): 10857‑62.

Tanaka, Yoshito, Phuong Oanh T. Tran, Jamie Harmon, et R. Paul Robertson. 2002. « A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic β cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12363‑68. doi:10.1073/pnas.192445199.

Taskinen, M. R., E. A. Nikkilä, R. Pelkonen, et T. Sane. 1983. « Plasma Lipoproteins, Lipolytic Enzymes, and Very Low Density Lipoprotein Triglyceride Turnover in Cushing's Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 57 (3): 619‑26. doi:10.1210/jcem-57-3-619.

Thompson, Aiysha, et Venkateswarlu Kanamarlapudi. 2014. « The Regions within the N-Terminus Critical for Human Glucagon like Peptide-1 Receptor (hGLP-1R) Cell Surface Expression ». *Scientific Reports* 4: 7410. doi:10.1038/srep07410.

———. 2015a. « Agonist-Induced Internalisation of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor Is Mediated by the Gαq Pathway ». *Biochemical Pharmacology* 93 (1): 72‑84. doi:10.1016/j.bcp.2014.10.015.

———. 2015b. « Distinct Regions in the C-Terminus Required for GLP-1R Cell Surface Expression, Activity and Internalisation ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, juin. doi:10.1016/j.mce.2015.06.012.

Tian, Geng, Jenny Sågetorp, Yunjian Xu, Hongyan Shuai, Eva Degerman, et Anders Tengholm. 2012. « Role of Phosphodiesterases in the Shaping of Sub-Plasma-Membrane cAMP Oscillations and Pulsatile Insulin Secretion ». *Journal of Cell Science* 125 (Pt 21): 5084‑95. doi:10.1242/jcs.107201.

Tolkovsky, A. M., et A. Levitzki. 1978. « Mode of Coupling between the Beta-Adrenergic Receptor and Adenylate Cyclase in Turkey Erythrocytes ». *Biochemistry* 17 (18): 3795.

Topp, B. G., M. D. McArthur, et D. T. Finegood. 2004. « Metabolic Adaptations to Chronic Glucose Infusion in Rats ». *Diabetologia* 47 (9): 1602‑10. doi:10.1007/s00125-004-1493-5.

Toso, Christian, Michael McCall, Juliet Emamaullee, Shaheed Merani, Joy Davis, Ryan Edgar,

Rena Pawlick, Tatsuya Kin, Lotte B. Knudsen, et AM James Shapiro. 2010. « Liraglutide, a Long-Acting Human Glucagon-like Peptide 1 Analogue, Improves Human Islet Survival in Culture ». *Transplant International* 23 (3): 259 - 65. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00984.x.

Tseng, C. C., et X. Y. Zhang. 2000. « Role of G Protein-Coupled Receptor Kinases in Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor Signaling ». *Endocrinology* 141 (3): 947 - 52. doi:10.1210/endo.141.3.7365.

Tsuboi, Takashi, Gabriela da Silva Xavier, George G. Holz, Laurence S. Jouaville, Andrew P. Thomas, et Guy A. Rutter. 2003. « Glucagon-like Peptide-1 Mobilizes Intracellular Ca2+ and Stimulates Mitochondrial ATP Synthesis in Pancreatic MIN6 Beta-Cells ». *The Biochemical Journal* 369 (Pt 2): 287 - 99. doi:10.1042/BJ20021288.

U/V

Ullrich, Susanne, Susanne Berchtold, Felicia Ranta, Guiscard Seebohm, Guido Henke, Adrian Lupescu, Andreas F. Mack, et al. 2005. « Serum- and Glucocorticoid-Inducible Kinase 1 (SGK1) Mediates Glucocorticoid-Induced Inhibition of Insulin Secretion ». *Diabetes* 54 (4): 1090‑99.

Valtat, B., C. Dupuis, D. Zenaty, A. Singh-Estivalet, F. Tronche, B. Bréant, et B. Blondeau. 2011. « Genetic Evidence of the Programming of Beta Cell Mass and Function by Glucocorticoids in Mice ». *Diabetologia* 54 (2): 350 - 59. doi:10.1007/s00125-010-1898-2.

Valtat, Bérengère, Jean-Pierre Riveline, Ping Zhang, Amrit Singh-Estivalet, Mathieu Armanet, Nicolas Venteclef, Adrien Besseiche, et al. 2013. « Fetal PGC-1α Overexpression Programs Adult Pancreatic β-Cell Dysfunction ». *Diabetes* 62 (4): 1206‑16. doi:10.2337/db12-0314.

Vanderford, Nathan L., Sreenath S. Andrali, et Sabire Ozcan. 2007. « Glucose Induces MafA Expression in Pancreatic Beta Cell Lines via the Hexosamine Biosynthetic Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (3): 1577 - 84. doi:10.1074/jbc.M605064200.

van Raalte, Daniël H., Kelly A. A. Kwa, Renate E. van Genugten, Maarten E. Tushuizen, Jens J. Holst, Carolyn F. Deacon, John M. Karemaker, Robert J. Heine, Andrea Mari, et Michaela Diamant. 2013. « Islet-Cell Dysfunction Induced by Glucocorticoid Treatment: Potential Role for Altered Sympathovagal Balance? » *Metabolism: Clinical and Experimental* 62 (4): 568‑77. doi:10.1016/j.metabol.2012.10.007.

Van Raalte, D. H., D. M. Ouwens, et M. Diamant. 2009. « Novel Insights into Glucocorticoid-Mediated Diabetogenic Effects: Towards Expansion of Therapeutic Options? » *European Journal of Clinical Investigation* 39 (2): 81 - 93. doi:10.1111/j.1365-2362.2008.02067.x.

Vázquez, Patricia, Isabel Roncero, Enrique Blázquez, et Elvira Alvarez. 2005. « The Cytoplasmic Domain close to the Transmembrane Region of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor Contains Sequence Elements That Regulate Agonist-Dependent Internalisation ». *The Journal of Endocrinology* 186 (1): 221‑31. doi:10.1677/joe.1.06179.

Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, et al. 2001. « The Sequence of the Human Genome ». *Science (New York, N.Y.)* 291 (5507): 1304 - 51. doi:10.1126/science.1058040.

Violin, Jonathan D., David G. Soergel, Guido Boerrigter, John C. Burnett, et Michael W. Lark. 2013. « GPCR Biased Ligands as Novel Heart Failure Therapeutics ». *Trends in Cardiovascular Medicine* 23 (7): 242‑49. doi:10.1016/j.tcm.2013.01.002.

Voight, Benjamin F., Laura J. Scott, Valgerdur Steinthorsdottir, Andrew P. Morris, Christian Dina, Ryan P. Welch, Eleftheria Zeggini, et al. 2010. « Twelve Type 2 Diabetes Susceptibility Loci Identified through Large-Scale Association Analysis ». *Nature Genetics* 42 (7): 579‑89. doi:10.1038/ng.609.

W

Waddleton, Deena, Weizhen Wu, Yue Feng, Chris Thompson, Michael Wu, Yun-Ping Zhou, Andrew Howard, Nancy Thornberry, Jing Li, et Joseph A. Mancini. 2008. « Phosphodiesterase 3 and 4 Comprise the Major cAMP Metabolizing Enzymes Responsible for Insulin Secretion in INS-1 (832/13) Cells and Rat Islets ». *Biochemical Pharmacology* 76 (7): 884‑93. doi:10.1016/j.bcp.2008.07.025.

Waeber, G., N. Thompson, P. Nicod, et C. Bonny. 1996. « Transcriptional Activation of the GLUT2 Gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 Homeobox Factor ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 10 (11): 1327 - 34. doi:10.1210/mend.10.11.8923459.

Wang, Jen-Chywan, Mika Kakefuda Derynck, Daisuke F. Nonaka, Daniel B. Khodabakhsh, Chris Haqq, et Keith R. Yamamoto. 2004. « Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Scanning Identifies Primary Glucocorticoid Receptor Target Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (44): 15603‑8. doi:10.1073/pnas.0407008101.

Wang, Ping, Hua Gao, Yanxiang Ni, Beibei Wang, Yalan Wu, Lili Ji, Linhua Qin, Lan Ma, et Gang Pei. 2003. « Beta-Arrestin 2 Functions as a G-Protein-Coupled Receptor-Activated Regulator of Oncoprotein Mdm2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (8): 6363‑70. doi:10.1074/jbc.M210350200.

Watada, H., Y. Kajimoto, Y. Umayahara, T. Matsuoka, H. Kaneto, Y. Fujitani, T. Kamada, R. Kawamori, et Y. Yamasaki. 1996. « The Human Glucokinase Gene Beta-Cell-Type Promoter: An Essential Role of Insulin Promoter Factor 1/PDX-1 in Its Activation in HIT-T15 Cells ». *Diabetes* 45 (11): 1478‑88.

Webster, J. C., C. M. Jewell, J. E. Bodwell, A. Munck, M. Sar, et J. A. Cidlowski. 1997. « Mouse Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Status Influences Multiple Functions of the Receptor Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9287‑93.

Weir, G. C., D. R. Laybutt, H. Kaneto, S. Bonner-Weir, et A. Sharma. 2001. « Beta-Cell Adaptation and Decompensation during the Progression of Diabetes ». *Diabetes* 50 Suppl 1 (février): S154‑59.

Wei, Y., et S. Mojsov. 1995. « Tissue-Specific Expression of the Human Receptor for Glucagon-like Peptide-I: Brain, Heart and Pancreatic Forms Have the Same Deduced Amino Acid Sequences ». *FEBS Letters* 358 (3): 219‑24.

Welsh, M., N. Scherberg, R. Gilmore, et D. F. Steiner. 1986. « Translational Control of Insulin Biosynthesis. Evidence for Regulation of Elongation, Initiation and Signal-Recognition-Particle-Mediated Translational Arrest by Glucose ». *The Biochemical Journal* 235 (2): 459‑67.

Westermark, Per, et Gunilla T. Westermark. 2008. « Review. Reflections on Amyloidosis in Papua New Guinea ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 363 (1510): 3701 - 5. doi:10.1098/rstb.2008.0073.

Whalley, N. M., L. E. Pritchard, D. M. Smith, et A. White. 2011. « Processing of Proglucagon to GLP-1 in Pancreatic α-Cells: Is This a Paracrine Mechanism Enabling GLP-1 to Act on β-Cells? » *The Journal of Endocrinology* 211 (1): 99 - 106. doi:10.1530/JOE-11-0094.

Whitaker, Gina M., Francis C. Lynn, Christopher H. S. McIntosh, et Eric A. Accili. 2012. « Regulation of GIP and GLP1 Receptor Cell Surface Expression by N-Glycosylation and Receptor Heteromerization ». *PloS One* 7 (3): e32675. doi:10.1371/journal.pone.0032675.

Widmann, C., W. Dolci, et B. Thorens. 1996. « Heterologous Desensitization of the Glucagon-like Peptide-1 Receptor by Phorbol Esters Requires Phosphorylation of the Cytoplasmic Tail at Four Different Sites ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (33): 19957‑63.

———. 1997a. « Internalization and Homologous Desensitization of the GLP-1 Receptor Depend on Phosphorylation of the Receptor Carboxyl Tail at the Same Three Sites ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (8): 1094 - 1102. doi:10.1210/mend.11.8.9959.

———. 1997b. « Internalization and Homologous Desensitization of the GLP-1 Receptor Depend on Phosphorylation of the Receptor Carboxyl Tail at the Same Three Sites ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (8): 1094 - 1102. doi:10.1210/mend.11.8.9959.

Wierup, Nils, Frank Sundler, et R. Scott Heller. 2014. « The Islet Ghrelin Cell ». *Journal of Molecular Endocrinology* 52 (1): R35‑49. doi:10.1530/JME-13-0122.

Wierup, N., H. Svensson, H. Mulder, et F. Sundler. 2002. « The Ghrelin Cell: A Novel Developmentally Regulated Islet Cell in the Human Pancreas ». *Regulatory Peptides* 107 (1-3): 63‑69.

Willms, B., J. Werner, J. J. Holst, C. Orskov, W. Creutzfeldt, et M. A. Nauck. 1996. « Gastric Emptying, Glucose Responses,

and Insulin Secretion after a Liquid Test Meal: Effects of Exogenous Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1)-(7-36) Amide in Type 2 (noninsulin-Dependent) Diabetic Patients ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (1): 327‑32. doi:10.1210/jcem.81.1.8550773.

Willoughby, Debbie, et Dermot M. F. Cooper. 2007. « Organization and Ca2+ Regulation of Adenylyl Cyclases in cAMP Microdomains ». *Physiological Reviews* 87 (3): 965 - 1010. doi:10.1152/physrev.00049.2006.

Wise, J. K., R. Hendler, et P. Felig. 1973. « Influence of Glucocorticoids on Glucagon Secretion and Plasma Amino Acid Concentrations in Man ». *The Journal of Clinical Investigation* 52 (11): 2774 - 82. doi:10.1172/JCI107473.

Wu, H., W. M. MacFarlane, M. Tadayyon, J. R. Arch, R. F. James, et K. Docherty. 1999. « Insulin Stimulates Pancreatic-Duodenal Homoeobox Factor-1 (PDX1) DNA-Binding Activity and Insulin Promoter Activity in Pancreatic Beta Cells ». *The Biochemical Journal* 344 Pt 3 (décembre): 813‑18.

X/Y/Z

Xiao, Kunhong, Daniel B. McClatchy, Arun K. Shukla, Yang Zhao, Minyong Chen, Sudha K. Shenoy, John R. Yates, et Robert J. Lefkowitz. 2007. « Functional Specialization of Beta-Arrestin Interactions Revealed by Proteomic Analysis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12011 - 16. doi:10.1073/pnas.0704849104.

Yamada, E. 1955. « The Fine Structure of the Gall Bladder Epithelium of the Mouse ». *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1 (5): 445‑58.

Young, A. A., B. R. Gedulin, S. Bhavsar, N. Bodkin, C. Jodka, B. Hansen, et M. Denaro. 1999. « Glucose-Lowering and Insulin-Sensitizing Actions of Exendin-4: Studies in Obese Diabetic (ob/ob, Db/db) Mice, Diabetic Fatty Zucker Rats, and Diabetic Rhesus Monkeys (Macaca Mulatta) ». *Diabetes* 48 (5): 1026‑34.

Yves, COMBARNOUS. 2013. *Communications et signalisations cellulaires (4e ed)*. Lavoisier.

Zawalich, Walter S., Gregory J. Tesz, Hanae Yamazaki, Kathleen C. Zawalich, et William Philbrick. 2006. « Dexamethasone Suppresses Phospholipase C Activation and Insulin Secretion from Isolated Rat Islets ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 55 (1): 35 - 42. doi:10.1016/j.metabol.2005.06.023.

Zhang, Chuan, Takashi Moriguchi, Miwako Kajihara, Ritsuko Esaki, Ayako Harada, Homare Shimohata, Hisashi Oishi, et al. 2005. « MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (12): 4969 - 76. doi:10.1128/MCB.25.12.4969-4976.2005.

Zraika, S., K. Aston-Mourney, D. R. Laybutt, M. Kebede, M. E. Dunlop, J. Proietto, et S. Andrikopoulos. 2006. « The Influence of Genetic Background on the Induction of Oxidative Stress and Impaired Insulin Secretion in Mouse Islets ». *Diabetologia* 49 (6): 1254‑63. doi:10.1007/s00125-006-0212-9.

LISTE DES ABBREVIATIONS

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoyribonucléique

AMPc: Adénosine monophosphorique cyclique

ARF6: ADP-ribosylation factor6

ARNO: ARF Nucleotide binding site opener

ATP: Adénoside triphosphate

β-ARK: β-adrenergic receptor kinase

BCL-2: B cell lymphoma

CBP: CREB binding protein

CEM: CRE modulators

CNB: Cyclic nucleotide-binding

CRE: cAMP response element

CREB: cAMP response element binding protein

DAG: Diacylglycérol

DISC: Death inducing signaling complex

Domaine TM: Domaine Trans-membranaire

DPP-4: Dipeptidyl peptidase-4

EPAC: cAMP Guanine-nucleotide exchange factor

ERK1/2: Extracellular signal regulated kinase 1/2.

FADD: Fas associated death domain

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

GABA: Acide γ-aminobutyrique

GBPs: Guanylate binding proteins

GDP: Guanosine diphosphate

GHRH: Growth hormone releasing hormone

GIP: Glucose-dependent insulinotropic peptide

GK: glucokinase

GLP-1: Glucagon-Like Peptide-1

GLUT2: Glucose Transporter 2

GRK: G-protein-coupled receptor kinase

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

GTP: Guanosine triphosphate

HEK: Human embryonic kidney

HLH: Helix-Loop-Helix

HVR: Hypervariable region

IAPP: Islet Amyloid Polypeptide

ICER: Inducible cAMP early repressor

IEF-1: Insulin enhancer factor-1

ILPR: Insulin-linked polymorphic region

IP3: Inositol 1, 4, 5 triphosphate

IP_3R : Inositol 1, 4, 5 triphosphate receptors

IRS2: Insuline receptor substrat 2

JNK: Jun N-terminal kinase

K_{ATP}: Canaux potassiques dépendant de l'ATP

Kir6.2: inward-rectifier potassium ion channels

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MxA: Myxovirus resistance proteins

NRE: Negative regulatory element

NSF: N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein

OGT: O-linked GlcNAc transferase

P90RSK: (90kDa Ribosomal s6 kinase)

PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

PARP (Poly-ADP ribose polymerase)

PAS: Per-arnt-sim.

PAX4: Paired-box 4

PAX6: Paired-box 6

PC 1/3: Prohormone convertase 1/3

PDE: Phosphodiesterase

PDX-1: Pancreatic duodenal Homeobox-1

PGC-1α: (proliferator-activated receptor-γ coactivator-1 α)

Pi3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKA: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PP: Polypeptide pancréatique

RAIG: Retinoic acid-inducible orphan GPCR

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

RRP: Readily Releasable Pool

RSK: Ribosomal s6 kinase

RyR: Ryanodine-sensitive-channels

sAC: soluble Adenylate cyclase

SAPK: Stress-activated protein kinase

SERCA: Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase

SGK1: Serum and Glucocorticoid inducible kinase 1

SUR1: Sulfanylurea receptors

USF: Upstream stimulatory factor

VIP: Vasoactive intestinal polypeptide

VNTR: Variable number of tandem repeats

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : La régulation de l'homéostasie glucidique. 8
Figure 2 : Le pancréas. 14
Figure 3 : Architecture de l'îlot de Langerhans. 14
Figure 4 : La sécrétion d'insuline induite par le glucose. 18
Figure 5 : Organisation des régions promotrices et activatrices du gène de l'insuline de rat I et II et humaine. 21
Figure 6 : Traduction de l'ARN messager de l'insuline. 26
Figure 7 : Effets du glucose sur la cellule β pancréatique. 29
Figure 8 : Structure schématique générale des récepteurs cuplés aux protéines G. 31
Figure 9 : Les 3 classes principales de RCPGs. 33
Figure 10 : Les différentes familles des protéines G 35
Figure 11 : Représentations schématiques des β-arrestines 1 et 2. 41
Figure 12 : Rôles des β-arrestines 1 et 2 dans la désensibilisation des RCPGs. 42
Figure 13 : Structure et mode d'action des dynamines. 45
Figure 14 : Structures linéaires du GLP-1, Exenatide et Liraglutide. 53
Figure 15 : Structure du récepteur GLP-1. 55
Figure 16 : Action du GLP-1 sur la fonction des cellules β ; la voie dépendante de la protéines G 62
Figure 17 : Rôle de la β-arrestine 1 dans la signalisation du récepteur GLP-1. 64
Figure 18 : Pathogénèse du diabète de type 2. 68
Figure 19 : Schéma des voies intrinsèques et extrinsèques conduisant à l'activation de l'apoptose cellulaire. 71
Figure 20 : Synthèse et sécrétion des glucocorticoïdes 72
Figure 21 : Structure générale du récepteur aux glucocorticoïdes et modifications post-traductionnelles. 75
Figure 22 : Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. 78
Figure 23 : Rôles des GCs dans la fonction des cellules β pancréatiques 84