



Université de Lille

École Doctorale de Biologie-Santé de Lille

UMR1283/8199

« Épigénétique fonctionnelle et mécanismes du diabète de type 2 et des maladies associées »

Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de l'Université de Lille

Discipline : Science de la Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie cellulaire & moléculaire

Mention : Physiologie, Physiopathologie

Rôle du facteur de transcription E2f1 dans la fonction et l'identité de la cellule β pancréatique et identification des mécanismes moléculaires

par

Cyril BOUROUH

Soutenue publiquement le 08 Octobre 2021 devant le jury composé de :

Pr Sophie LESTAVEL

Présidente du jury

Pr Jamileh MOVASSAT

Rapporteuse

Dr Stéphane DALLE

Rapporteur

Dr Catherine POSTIC

Examinatrice

Dr Benoit POURCET

Examineur

Dr Jean Sébastien ANNICOTTE

Directeur de thèse

***A Baptiste,
A Yves et Saïd,***

Remerciements

Je tenais d'abord à remercier les membres du jury, merci au Pr Jamileh Movassat et au Dr Stéphane Dalle d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également au Dr Catherine Postic et au Dr Benoit Pourcet d'avoir accepté d'examiner cette thèse, ainsi qu'au Pr Sophie Lestavel d'avoir accepté d'être présidente de ce jury. Merci également à vous Stéphane et Benoit d'avoir accepté d'être membre de mon jury de « Comité de Suivi de Thèse » et de m'avoir suivi tout au long de la thèse.

Je souhaite également remercier le Pr Philippe Froguel de m'avoir accueilli au sein de son unité depuis mon Master 1. Merci de m'avoir permis de réaliser une thèse dans votre laboratoire et d'avoir également apporté vos corrections à ce manuscrit.

Un immense merci au Dr Jean-Sébastien Annicotte de m'avoir accueilli dans son équipe en Master 1 et de m'avoir encadré tout au long de ces 5 années. Merci de m'avoir fait découvrir la Science, de m'avoir donné toutes les clés pour réussir cette thèse, d'avoir été exigeant mais également compréhensif quand il le fallait. Merci d'avoir été un directeur de thèse qui laisse autant de libertés scientifiques à ses étudiants. Merci également pour l'ensemble de tes conseils, qu'ils étaient scientifiques ou personnels.

Un grand merci au Dr Émilie Courty pour ses nombreux conseils et son aide précieuse sur cette dernière année de thèse. Merci pour tes corrections sur l'écriture de ce manuscrit, de tes nombreuses aides sur les manip *in vivo* (tout en écoutant du Céline Dion) et un grand merci d'avoir apporté l'ensemble de tes connaissances qui ont été nécessaires pour faire avancer et évoluer ce projet de thèse. Merci également de corriger au quotidien mes petits défauts de langages (que tu as finis par adopter ...). Il ne me reste plus qu'à te souhaiter de trouver de la stabilité dans ta vie professionnelle.

Je souhaite également remercier le Dr Xavier Gromada de m'avoir encadré en Master 1 et Master 2. Merci pour la découverte du monde de la recherche, des premières manip, des discussions autour du foot et du sport en général ...

Merci au Dr Frédéric Oger, d'avoir partagé avec moi pendant 4 années ce bureau. Merci également pour ces nombreuses discussions, qu'elles soient scientifiques ou non, qui pouvaient nous occuper un petit moment dans le bureau, ce qui a contribué à faire évoluer ma culture et mes connaissances scientifiques. Merci également d'avoir partagé avec moi ta passion pour les jeux de mots anglais et pour les plus célèbres chanteurs Français : de C Jérôme à Michel Delpech, en passant par Vincent Lagaf et Sébastien Patoche et j'en oublie forcément.

Merci également à Charlène, qui m'a accompagné du début de mon master 2 jusqu'à quasiment cette fin de thèse. Merci de m'avoir tout appris sur l'expérimentation animale (et on en a passé des heures à l'animalerie ensemble), merci pour ta bonne humeur quotidienne, ton franc-parler et également ton jolie accent Dunkerquois qui m'a permis de toujours me rappeler mes racines Dunkerquoises. Je ne peux également pas oublier de te remercier pour ton travail colossal sur le génotypage des nombreuses lignées de souris, sans ce travail, cette thèse et ce projet n'auraient jamais pu voir le jour.

Je souhaite remercier infiniment l'ensemble des membres actuels ou anciens de la Team JSA : Jean-Sébastien, Frédéric, Florine, Émilie, Bryan, Clément, Charlène, Maëva, Laure, Arnaud, Yasmina, Jessica, Nawel, Leonid, Christophe, Etienne, Xavier, Nabil. Merci pour tous les bons moments passés ensemble et ces nombreuses soirées. Merci d'avoir apporté cette bonne humeur et cette bonne ambiance constante dans l'équipe, qui fait qu'on ne peut qu'être heureux de travailler avec vous, merci d'être devenu des amis. Je n'ai aucun doute qu'on continuera à se voir après mon départ. Je pense sincèrement que la réussite de cette thèse passe également par le plaisir que j'ai pu avoir à vous côtoyer au quotidien, alors un immense merci.

Merci également à l'ensemble des membres de l'UMR 8199/1283. Merci à Vincent de m'avoir fait découvrir le 421, à Julie, Marion, Nicolas, Hélène, Constance, Jérôme, Raphy, Victoria, Margot, pour ces petites pauses cafés et ces bons moments passés ensemble. Merci également au Dr Amélie Bonnefond pour l'ensemble des échanges scientifiques que nous avons pu avoir au cours de cette thèse.

Je souhaite également remercier les secrétaires du laboratoire, Hélène, Mélanie et Constance. Merci d'avoir été d'une grande aide au cours de cette thèse à travers votre efficacité et votre réactivité dans les tâches administratives.

Merci à Léna de m'avoir accompagné, soutenu, encouragé et d'avoir cru en moi au début de cette thèse. Sans toi, toute cette jolie aventure n'aurait peut-être pas vu le jour. Même si nos chemins se sont séparés, je te souhaite le meilleur pour la suite.

A Cassandra, Jean-Baptiste, Mélanie, Lucas, Anaïs, Samy, Fanny, Elliot, Agathe, Lisa-Marie, Alexandre, Pauline, merci pour tous ces jolis moments passés ensemble. Merci également à Arthur, Estelle, Mick et aux membres du club de tennis de table de Bourbourg qui m'ont permis le temps de quelques instants pendant cette thèse de me ressourcer à travers ma première passion.

Un immense merci à David pour son amitié depuis quasiment 20 ans. Merci pour toute ses soirées à regarder des films ou des matchs de foot, à parler de tout et de rien autour d'une bonne chicha. Merci

d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir soutenu lorsque j'en ai eu besoin. Maintenant, que je suis de retour sur le dunkerquois, je suis sûr qu'on se reverra beaucoup plus souvent.

Je ne pouvais écrire ces remerciements sans penser à Grégory et Mallaury, mes meilleurs amis. Je ne pourrais jamais vous remercier assez de tout ce que vous avez fait pour moi, depuis tant d'années. Merci de m'avoir encouragé, de m'avoir accueilli chez vous quand j'en avais besoin, de m'avoir réconforté dans mes moments de doutes. Merci de m'avoir choisi pour être le témoin de votre mariage et de m'avoir fait rêver. Merci Grégory de m'accompagner dans ce voyage depuis le tout premier jour de la licence 1, 9 ans après, je vois enfin le bout du tunnel. Merci pour ce joli voyage à Athènes, tous ces concerts et festivals qu'on a pu faire ensemble, toutes ces soirées, à jouer aux jeux de sociétés, à discuter, se balader. Cette thèse n'aurait pas été la même sans vous. Comme je vous l'ai déjà dit : « Il y a les amis, il y a la famille et il y a les amis qui deviennent la famille ».

Merci à Alyssan de m'avoir supporté, soutenu, encouragé et aidé depuis 8 mois pour que je puisse finir cette thèse dans les meilleures conditions. Ton amour, ta patience, ta gentillesse et ta bonne humeur quotidienne m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui, alors merci. Et comme je te le dis souvent : « It's just the beginning ».

Pour finir, je souhaite remercier l'ensemble de ma famille de m'avoir donné la possibilité de faire cette thèse. J'ai une petite pensée particulière pour mes grands-pères Yves et Saïd. Merci à mes grands-mères pour l'accueil toujours chaleureux que j'ai pu recevoir lorsque je venais vous voir, ce qui m'a toujours fait le plus grand bien. Merci à mon papa et à Michèle pour le soutien, l'aide et les conseils qu'ils ont pu m'apporter tout au long de ce parcours universitaire. Même si on se voit peu souvent et qu'on ne s'appelle que rarement, cette réussite est également grâce à toi papa. Un immense merci à ma sœur et à Florian de m'avoir toujours aidé et soutenu dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de m'avoir permis de m'évader par moment, de toujours m'avoir accueilli chez vous quand j'en avais envie. Merci également de m'avoir fait le plaisir d'être le parrain de ce merveilleux petit bonhomme, c'est clairement la plus belle chose que j'ai pu vivre au cours de cette thèse. Pour finir, je souhaiterais remercier du plus profond de mon cœur, ma maman et Michel qui ont tout donné depuis le début pour que je puisse réussir ma vie professionnelle. Merci pour tous les sacrifices que vous avez pu faire, merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir aidé, écouté, réconforté, tout au long de cette thèse.

« Les découvertes scientifiques servent entre autres à nous rendre conscient de l'étendue de notre ignorance »

Inspiré de Félicité Robert de Lamennais

Table des matières

Introduction.....	3
I. La cellule β pancréatique, cellule clé dans le maintien de l'homéostasie glucidique	2
I.1. Le pancréas : Glande amphicrine, anatomie et histologie.....	2
I.1.1. Pancréas exocrine	3
I.1.2. Pancréas endocrine	5
I.2. Le développement du pancréas endocrine	6
I.2.1 Morphologie du développement du pancréas endocrine	6
I.2.2 Implication des facteurs de transcriptions dans le développement du pancréas exocrine et endocrine	8
I.2.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans la spécification endocrine et exocrine.....	9
I.2.2.3 Ngn3, facteur clés impliqué dans la différenciation endocrinienne	11
I.3. La composition cellulaire du pancréas endocrine	16
I.3.1 La cellule α	16
I.3.2 La cellule δ	18
I.3.3 La cellule PP	19
I.3.4 La cellule ϵ	19
I.4. La cellule β pancréatique, mécanismes de sécrétion d'insuline et activation de la signalisation de l'insuline	20
I.4.1 Mécanismes de la biosynthèse et de la sécrétion d'insuline	20
I.4.2 Voie de signalisation de l'insuline et mécanisme d'action.....	22
I.4.2.1 Récepteur à l'insuline : un récepteur à tyrosine kinase.....	23
I.4.2.2 Voie de signalisation de l'insuline.....	24
II. Les diabètes, maladie de la cellule β pancréatique : Vue générale	25
II.1 Introduction	25
II.2 Le Diabète de type I	26
II.3 Le Diabète de type 2.....	29
II.3.1 Présentation du diabète de type 2	29
II.3.2 Mécanismes moléculaires et physiopathologiques du développement du DT2.	31
II.3.2.1 Présentation de l'insulino-résistance	31
II.3.2.2 Mécanismes de compensation de la cellule β face à l'insulino-résistance.....	33
II.3.2.3 Mécanismes physiologiques et moléculaires du déclin de la cellule β	36
II.3.3 Les différents traitements thérapeutiques du DT2.....	38
II.3.3.1 Modification des habitudes alimentaires et de l'activité physique	38
II.3.3.2 La metformine	39
II.3.3.3 Les sulfamides hypoglycémiantes	39
II.3.3.4 Les agonistes du récepteur au Glp-1 ou incrétinomimétiques.....	40
II.3.3.5 Les inhibiteurs de SGLT2.....	40
II.3.3.6 L'insuline.....	41
II.4 Les diabètes de type « MODY »	41
II.5 Le diabète gestationnel	42
III. Le Glucagon-Like Peptide 1, le GLP-1	43

III.1 Présentation des incrétines et du GLP-1	43
III.2 Le récepteur au GLP-1	45
III.3 Effets à court terme du Glp-1 sur la fonction de la cellule β	47
III.3.1 Rôle du Glp-1 dans la sécrétion d'insuline	47
III.3.2 Rôle du Glp-1 dans la biosynthèse de l'insuline.....	49
III.4 Effets chroniques du Glp-1 sur la cellule β pancréatique.....	50
III.4.1 Effets du Glp-1 sur la néogenèse des cellules β	50
III.4.2 Effets prolifératifs du Glp-1 sur la cellule β	50
III.4.3 Rôles anti-apoptotiques du Glp-1 sur la cellule β	51
III.5 Effets chroniques du GLP-1 sur l'homéostasie énergétique.....	51
III.5.1 Rôle du Glp-1 sur le système nerveux central	51
III.5.2 Mécanismes d'action du Glp-1 sur la physiologie hépatique	52
III.5.3 Effets du Glp-1 sur les tissus adipeux.....	53
III.5.4 Mécanismes d'action du Glp-1 sur la physiologie cardiaque.....	53
III.5.5 Effets du Glp-1 sur le muscle squelettique	53
IV.E2f1, régulateur du cycle cellulaire et du métabolisme	55
IV.1 Présentation de la famille des E2Fs	55
IV.II Rôle de E2f1 dans la prolifération, l'apoptose et la réparation de l'ADN.....	57
IV.2.1 Effets de E2f1 sur la progression du cycle cellulaire et la prolifération.....	57
IV.2.2 Contrôle des mécanismes d'apoptose par E2f1	59
IV.2.3 Rôles de E2f1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN.....	60
IV.3 E2f1, régulateur clé du métabolisme énergétique	60
IV.3.1 Régulation de la fonction du tissu adipeux blanc par la voie E2f1-pRb-Cdk4.....	60
IV.3.2 Effets de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la fonction hépatique.....	62
IV.3.3 Effets de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la cellule β pancréatique	64
V.Objectifs de la thèse	67
 Matériel et Méthodes.....	 70
 Résultats.....	 83
Partie I : Caractérisation métabolique des modèles de souris $E2f1^{\beta-/-}$ et $E2f1^{\beta over}$ et analyse des voies moléculaires contrôlées par E2f1 dans la cellule β pancréatique	82
I.1. Phénotypage métabolique des souris invalidées pour E2f1 dans la cellule β pancréatique	83
I.2 Phénotypage des souris $E2f1^{\beta-/-}$ soumises à un régime riche en graisse	90
I.3 Analyse de l'effet de la surexpression de $E2f1$ dans la cellule β	94
I.4 Caractérisation du transcriptome des îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$	97
I.5 Analyse du cistrome de E2f1 dans la cellule β pancréatique	102
Partie II : Analyse du rôle de E2f1 dans les mécanismes de sécrétion d'insuline médiés par le Glp-1 et identification des mécanismes moléculaires associés	108

II.1 E2f1 contrôle l'expression du récepteur au Glp-1 dans la cellule β pancréatique	109
II.2 E2f1 est capable de se fixer au niveau du promoteur du Glp-1r pour activer sa transcription	115
II.3 Un traitement à l'analogue au Glp-1 induit l'augmentation de la voie E2f1-pRb	117
<i>Discussion et perspectives.....</i>	128
<i>I.Effets de E2f1 dans la fonction de la cellule β.....</i>	<i>127</i>
<i>II.Effets de E2f1 dans la morphologie de l'îlot pancréatique.....</i>	<i>130</i>
<i>III.Étude de la relation entre la voie E2f1 et celle du Glp-1 dans la cellule β pancréatique</i>	<i>133</i>
<i>Références bibliographiques.....</i>	139
<i>Annexes.....</i>	162

Abréviations

AA : Acides aminés	CITED2 : Creb bindin protein P300-interacting transactivator 2
AC : Adénylate cyclase	DG : Diabète Gestational
ADN : Acide desoxyribonucléique	DHFR : Dihydrofolate reductase
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium
AGL : Acide Gras Libre	DP : Dimerization partner
AgRP : Agouti Related peptide	DPP-4 : Dipeptidyl peptidase-4
ALDH1A3 : Aldéhyde déshydrogénase 1A3	DT1 : Diabète de type 1
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	DT2 : Diabète de type 2
AMPK : Adénosine monophosphate kinase	E2F : E2 Factor
ARNm : Acide ribonucléique messenger	EPAC : Exchange protein activated by cAMPc)
ATGL : Adipose Triglyceride lipase	ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ATP : Adénosine tri-phosphate	FASN : Fatty Acid Synthase
BAD : BCL-2 associated agonist of cell death	FATP : Fatty acid transport protein
BCL-2 : B-cell lymphoma 2	FBP1: Fructose-biphosphatase 1
BIP : Binding Immunoglobulin protein	FDA : Food and drug administration
CACN1D (Canal calcique voltage-dépendant de type L, 1D)	FGF : Fibroblast Growth factor
CART : Cpaïne and emphetamine regulated transcript	FOXO : Forkhead Box O
CBP : Creb binding protein	G6PC : Glucose 6 phosphatase
CCK : Cholecystokinine	G6pc2 : Glucose-6-phosphatase catalytic subunit 2
CCVD : Canaux calcique voltage dépendant	GABA : Acide γ -aminobutyrique
CDK : Cyclins dependant kinase	GCK : Glucokinase
CDK4 : Cyclin dependant kinase 4	GCR : Glucagon Récepteur
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	GDF15 : Growth/Differentiation factor 15
CIP : CDK-interacting proteins	GH : Growth Hormone
	GHIH : Growth hormone inhibiting hormone
	GIP : Gastric inhibitory polypeptide
	GLP-1 : Glucagon Like peptide-1
	GLP-1R : Glucagon like peptide 1 receptor

GPCR : Récepteur couple aux protéines G
GRP : Gastrin-releasing peptide
GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β
GWAS : Genome wide association study
HAT : Histone Acetyl Transferase
HDAC : Histone Déacétylase
HES1 : Hairy and enhancer of split-1
hESCs : human embryonic stem cells
HNF : Hepatic nuclear factor
HO-1 : Heme oxygenase-1
IAP-2 : Inhibitor of apoptosis protein 2
IL-1 : Interleukine 1
iNKT : invariant Natural Killer T
iPSCs : induced pluripotent stem cells
IR : Insulino-résistance
IRS : Insulin receptor substrat
ISL1 : Islet 1
LZ : Leuzine Zipper :
MB : Marked Box
MODY : Maturity Onset Diabetes of the Young
MTI : masse totale de l'îlot
mTORC1 : Mammalian target of rapamycin complex I
NAFLD : Non alcoholic fatty liver disease
NES : Nuclear export signal
NF- κ B : Nuclear factor κ B
NFAT (Nuclear factor of activated T-cells)
Ngn3 : Neurogenin 3
NKX : NKX-homodomain factor
NLS : Nuclear localization signal
NPY : Neuropeptide Y
Oct4 : Octamer binding-4

OMS : Organisation mondiale de la santé
PAX4 : Paired-box containing gene 4
PC : Pyruvate carboxylase
PC2 : Pro-hormone convertase
PCK1 : Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
PDH : Pyruvate déshydrogénase
PDK : Phosphoinositide-dependant kinase
PDX1: Pancreatic and duodenal homeobox 1
PGC1 α : Peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator 1 α
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
POMC : Proopiomélanocortine
PP : Polypeptide pancréatique
pRb : protéine du rétinoblastome
PSST : Pro-somatostatine
PTF1a : Pancreatic transcription factor 1a
qPCR : Quantitative polymerase chain reaction
REr : Réticulum endoplasmique rugueux
RIN : Rna Integrity Number
SCD1 : Stearoyl-CoA Desaturase
scRNA-seq : Single cell RNA-sequencing
SGLT1 : Sodium glucose co-transporter 1
SGLT2 : Sodium/glucose co-transporter 2
SH2 : Src-homology-2
SKP2 : s-phase kinase protein-2
SNP : Single nucleotide polymorphism
Sox9 : Sex-determining region Y-box containing gene 9
SREBP1c : Sterol regulatory element-binding protein 1

SRIF : Somatotropin release-inhibiting hormone

SSTR : Somatostatine receptor

SVF : Sérum de veau foetal

TBC1D4 : RabGAP TBC1 domain family member 4

Tg : Triglycérides

TK : Tyrosine kinase

TRMP : Transient receptor potential cation channel subfamily M

TRPC3 : Transient receptor potential cation channel subfamily C Member 3

TSC2 :Tuberous Sclerosis 2

UCN-3 : Urocortine-3

UCP : Uncoupled protein

UPR : Unfolded protein response

VTP : Volume total du pancréas

Introduction

I. La cellule β pancréatique, cellule clé dans le maintien de l'homéostasie glucidique

I.1. Le pancréas : Glande amphicrine, anatomie et histologie

Le pancréas est une glande amphicrine, possédant à la fois des fonctions exocrines et endocrines, annexe au tube digestif et localisé dans la partie haute de l'abdomen, derrière l'estomac. Chez l'humain, le pancréas mesure entre 14 et 18 cm de long, 2 à 9 cm de large et épais d'environ 3 cm. Il pèse entre 50 et 100 g et peut être divisé en trois parties : la tête, le corps et la queue, sans frontière physique délimitant les différentes parties. La tête du pancréas est une partie en forme de « C » qui s'aligne avec la courbure de la partie supérieure du duodénum. Le corps est quant à lui situé sous l'estomac et s'étend de manière quasiment horizontale d'un point de vue anatomique. La queue du pancréas est en contact avec la face inférieure de la rate (1, 2) (Figure 1).

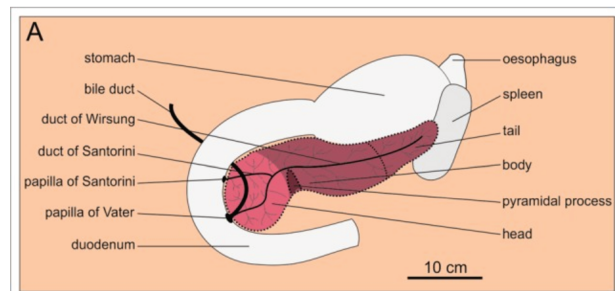


Figure 1 : Anatomie macroscopique du pancréas humain. (Adapté de Dolenšek et al., 2015)

Le pancréas humain est localisé dans la partie haute de l'abdomen, en arrière de l'estomac. Il est composé de 3 parties distinctes : la tête, le corps et la queue

Chez la souris, le pancréas n'est pas un organe aussi bien défini et délimité que chez l'humain mais possède une forme plus diffuse au niveau du mésentère de l'intestin proximal. D'un point de vue anatomique, il peut être divisé en trois lobes : le lobe splénique, le lobe gastrique et le lobe duodénale. Le plus grand lobe est le lobe splénique qui représente plus de 50% du volume total du pancréas (VTP) qui s'étend horizontalement entre le duodénum et la rate (peut être assimilé au corps et à la queue chez l'humain). Le lobe duodéal est situé dans le mésentère entourant le duodénum et est assimilé à la tête du pancréas chez l'humain. Pour finir, le lobe gastrique est la partie la plus petite du pancréas chez la souris et est parfois considéré comme une continuité du lobe splénique (2) (Figure 2).

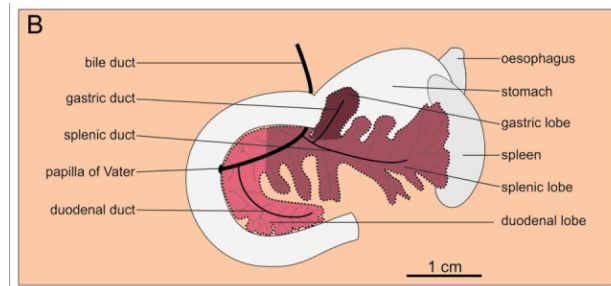


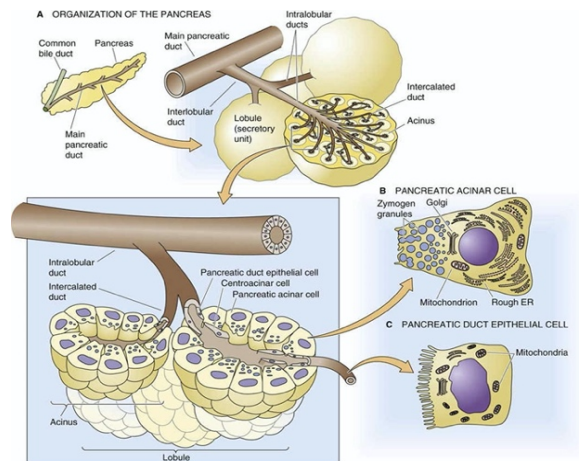
Figure 2 : Anatomie macroscopique du pancréas de souris. (Adapté de Dolenšek et al., 2015)

Le pancréas de souris présente une forme diffuse et se localise au niveau du mésentère intestinale. Il est composé de 3 lobes : le lobe splénique, le lobe gastrique et le lobe duodénale

La partie exocrine est principalement liée à des fonctions de digestion du bolus alimentaire et représente environ 95 à 98 % de la masse totale du pancréas, alors que le pancréas endocrine à une fonction majoritaire dans le maintien de l'homéostasie énergétique et représente 2 à 5% de la masse totale du pancréas (3).

I.1.1. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine, se compose de deux parties distinctes, le système acinaire et le système ductal (Figure 3). Les cellules acinaires composent la majeure partie des cellules du pancréas ($\approx 82\%$ du volume total du pancréas), ont une forme pyramidale et se regroupent en une structure appelée « Acinus », où les cellules sont reliées entre elles par des « Gap junctions » (4), leur permettant d'assurer une communication chimique et électrique intercellulaire (5). Le rôle majeur de ces cellules est de produire, stocker et sécréter différentes hormones digestives, tels que l' α -amylase, des lipases, des protéases ainsi que des nucléases qui vont dégrader au cours de la digestion, les sucres, les lipides et les protéines, respectivement.



**Figure 3 : Représentation schématique du pancréas exocrine et de sa composition cellulaire.
(Adapté de Marino & Gorelick., Pancreatic and Salivary Glands)**

Le pancréas exocrine est composé de deux types cellulaires : les cellules acinaires et les cellules ductales assurant un rôle dans la digestion du bolus alimentaire

L'architecture des cellules acinaires est bien organisée. Le noyau se situe au pôle basal et la cellule est composée de nombreuses mitochondries, d'un réticulum endoplasmique rugueux (REr) et d'un appareil de golgi développé. Cette architecture structurée permet à la cellule une production abondante de granules de sécrétion, appelées granules de zymogènes, comprenant les enzymes et pré-enzymes permettant la dégradation du bolus alimentaire, polarisées au pôle apical de la cellule. Les sécrétions des cellules acinaires se déversent au niveau du canal pancréatique pour finalement se diriger dans la lumière intestinale.

Différents stimuli vont induire la sécrétion des hormones pancréatiques. Alors que la nourriture elle-même induit le signal majoritaire de sécrétion des hormones pancréatiques, les systèmes nerveux et hormonaux sont capables d'induire cette sécrétion, notamment via l'acétylcholine et la cholecystokinine respectivement. L'activation des récepteurs de ces différentes hormones situées sur le pôle basal de la cellule acinaire entrainera l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires, tels que la voie de la Protéine Kinase A (PKA) ou de la Protéine Kinase C (PKC) par augmentation de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire permettant, la fusion des granules de zymogènes à la membrane plasmique du pôle apical des cellules acinaires et leur relargage dans le canal pancréatique (6).

Les cellules pancréatiques ductales représentent environ 5% de la masse totale du pancréas chez l'homme et vont permettre la formation de canaux pancréatiques (7). Ces canaux sont généralement classés par taille et position par rapport aux acini. Les conduits finaux (terminant au niveau des acini) sont appelés canaux intralobulaires, prolongement des canaux dit interlobulaires provenant du canal pancréatique principal qui se jette dans l'intestin (8). Les cellules ductales possèdent un double rôle

dans la digestion. Premièrement, elles sécrètent un fluide riche en bicarbonate de sodium (HCO_3^-) afin de permettre l'optimisation du pH et d'activer les enzymes digestives sécrétées par les cellules acinaires. Deuxièmement, les cellules ductales vont permettre le passage des enzymes pancréatiques jusqu'au duodénum. La cellule ductale présente un pôle apical possédant des microvillosités tandis que le pôle basal de la cellule est relié aux autres cellules ductales environnantes par des jonctions serrées ou adhérentes. Au niveau de ses organites, la cellule est composée d'une petite quantité de REr, d'appareil de Golgi et de vésicules sécrétoires. De plus, afin d'assurer sa fonction sécrétoire, elle comporte un très grand nombre de mitochondries reflétant la haute demande en énergie de la cellule (9). La sécrétion du HCO_3^- par les cellules ductales intervient après l'absorption d'un repas. Le principal stimulus de sécrétion du HCO_3^- est la sécrétine, hormone sécrétée par les cellules D endocrines de l'intestin en réponse au chyme. Néanmoins, d'autres signaux tels que la CCK (Cholecystokinine) et la stimulation par le nerf vague sont des mécanismes permettant la sécrétion du bicarbonate de sodium par les cellules ductales. La sécrétion de HCO_3^- est un mécanisme impliquant différentes voies cellulaires. Premièrement, il peut être directement sécrété via le canal chlorure CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (10). Deuxièmement, l'hormone sécrétine va induire l'augmentation du taux d'AMPc entraînant l'ouverture du canal CFTR et la sortie d'ion Cl^- . Cette modification du taux d'ion chlorure extracellulaire entraînera la sortie du HCO_3^- par l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (11).

I.1.2. Pancréas endocrine

Le pancréas endocrine représente entre 2 et 5% du volume total du pancréas et est représenté par une structure bien définie, appelée îlots de Langerhans, décrit anatomiquement pour la première fois en 1869. Le rôle principal de l'îlot de Langerhans est la régulation de l'homéostasie du glucose (12). Les îlots sont composés de 5 types cellulaires différents, chacun d'entre eux produisant et sécrétant une hormone spécifique. La conformation et le nombre de chaque type cellulaire est dépendant de l'espèce, ainsi :

- Les cellules β , produisant l'insuline, représentent environ 60% de la masse totale de l'îlot (MTI), alors que chez la souris, celui-ci représente environ 80% du MTI
- Les cellules α , produisant le glucagon, représentant environ 30% de la MTI chez l'humain et 10% chez la souris
- Les cellules δ , produisant la somatostatine, représentant à la fois chez l'humain et la souris moins de 10% du MTI
- Les cellules γ (ou PP), produisant le polypeptide pancréatique, représentant moins de 1% du MTI

- Les cellules ϵ , produisant la ghréline, principalement détectées pendant la vie fœtale et représentant moins de 1% du MTI

L'îlot de souris possède une structure différente de l'îlot humain. En effet, chez la souris, les cellules β sont distribuées au centre de l'îlots, formant le « corps », et les autres types cellulaires sont localisés en périphérie, formant ainsi le « manteau » (13). Chez l'humain, la distribution des cellules endocrines au sein de l'îlot n'est pas aussi distincte (14), où les cellules α , β et δ sont organisées de manière « aléatoire ». La distribution des îlots à travers le pancréas humain n'est pas homogène, avec deux fois plus d'îlots retrouvés dans la queue que dans le corps et la tête du pancréas (15). Chez la souris, cette distribution est également hétérogène, où le nombre d'îlots est plus élevé dans le lobe gastrique que dans le lobe duodéal et splénique (2).

Du fait de ses fonctions endocrines, les îlots de Langerhans sont des structures cellulaires hautement vascularisées. Les îlots reçoivent environ 20 % du flux sanguin pancréatique total, représentant à lui seul environ 1% du flux sanguin du corps humain (16). Le réseau capillaire des îlots est bien entendu dépendant de la taille de l'îlot. Néanmoins, il est établi qu'un îlot reçoit entre 1 et 5 artérioles en moyenne (17, 18). Cette riche vascularisation permet un relargage efficace des hormones sécrétées par l'ensemble des cellules composant l'îlot de Langerhans. En plus d'être considérablement vascularisé, les îlots de Langerhans sont des structures hautement innervées, permettant dans un premier temps la régulation de la sécrétion des hormones pancréatiques telles que l'insuline et le glucagon par le système nerveux central. Outre la régulation de la sécrétion hormonale, il a été montré que l'activation des systèmes nerveux sympathiques et parasympathiques peut entraîner sur l'îlot une augmentation de la prolifération des cellules β par exemple (19).

1.2. Le développement du pancréas endocrine

1.2.1 Morphologie du développement du pancréas endocrine

Au cours du développement, la gastrulation est une étape importante pour la formation du corps des vertébrés et est représentée par 3 feuillet distincts ayant des rôles spécifiques dans le développement : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (20). C'est à partir de l'endoderme que le tube intestinal primitif sera formé et donnera naissance aux organes de l'endoderme comme le pancréas (21). Chez la souris, pendant l'embryogenèse, l'ébauche pancréatique se met en place à environ 8,5 jours embryonnaires (E) à travers la formation des domaines pancréatiques dorsaux et ventraux. Cette mise en place est induite par différents signaux endodermique permettant la mise en place d'un programme transcriptionnel induisant la différenciation des tissus, grâce à l'expression de facteurs de transcription spécifiques tels que *Pdx-1* « Pancreatic and duodenal Homeobox-1 » (22). A ce stade l'endoderme est encore étroitement lié à la notocorde (Figure 4). Le pancréas ventral se

développe ainsi en étroite association avec l'endoderme hépatique sous l'induction de nombreux signaux tels que le FGF « Fibroblast growth factor » ou les BMPs « Bone morphogenetic proteins ». Le pancréas dorsal quant à lui bourgeonne à partir de l'endoderme dorsal, signal mis en place par l'inhibition de la voie de signalisation Hedgehog (23) et la mise en place de l'expression de *Mnx1* (Motor neuron and pancreas homeobox 1). A ce stade, l'endoderme pancréatique dorsal est lié avec l'aorte dorsale (Figure 4).

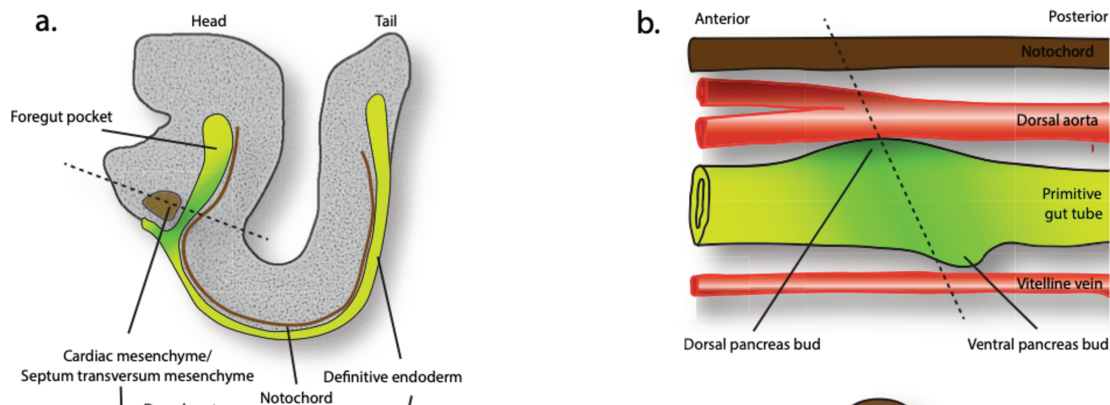


Figure 4 : Représentation schématique du développement des bourgeons pancréatique. (Adapté de Larsen et Grapin-Botton., 2017)

En A, vue latérale de l'intestin primitif à E8-E8,25 avant la rotation pour former l'ébauche pancréatique. En B, formation du bourgeon dorsal et ventral à travers l'activation de signaux provenant de la notochorde.

Suite à la formation du pancréas dorsal et l'établissement de l'ébauche pancréatique, la prolifération cellulaires et les modifications de forme des cellules vont entraîner la modification de la forme des bourgeons. En effet, vers le stade E10,5, le bourgeon pancréatique dorsal se transforme en un bourgeon arrondi avec un col étroit reliant le bourgeon pancréatique au tube intestinal primitif par une lumière centrale (24). A E11,5, le tube intestinal primitif va entamer une rotation induisant le rapprochement des bourgeons pancréatiques dorsaux et ventraux permettant la fusion des deux bourgeons en un seul organe qui sera considéré comme mature vers E17 (25).

On considère généralement que la suite du développement du pancréas est réalisée en deux étapes appelées transition primaire (E9-E12) et transition secondaire (E12-E15). La transition primaire est une étape qui est caractérisée par une prolifération importante des cellules progénitrices pancréatique et permet la spécification des différents types de cellules formant le futur pancréas. A partir de E10,75, certaines cellules vont établir une polarité apicale permettant la formation de canaux (26). A cette étape, il est également constaté l'expression de certaines hormones pancréatiques (insuline et glucagon) et de quelques enzymes digestives.

La transition secondaire se caractérise par une expansion et une ramification significative du bourgeon pancréatique. Il est constaté l'apparition de cellules formant des îlots et des canaux, ainsi qu'une

augmentation de l'expression des hormones pancréatiques et des enzymes digestives signifiant une augmentation de la différenciation cellulaire. A ce stade, quasiment l'ensemble des cellules sont différenciées formant ainsi des cellules acinaires, le réseau canalaire et le regroupement de cellules endocrine, ébauche des futurs îlots de Langerhans. Cependant, il est constaté que quelques cellules sont capables de rester multipotentes à ce stade du développement (27) (Figure 5).

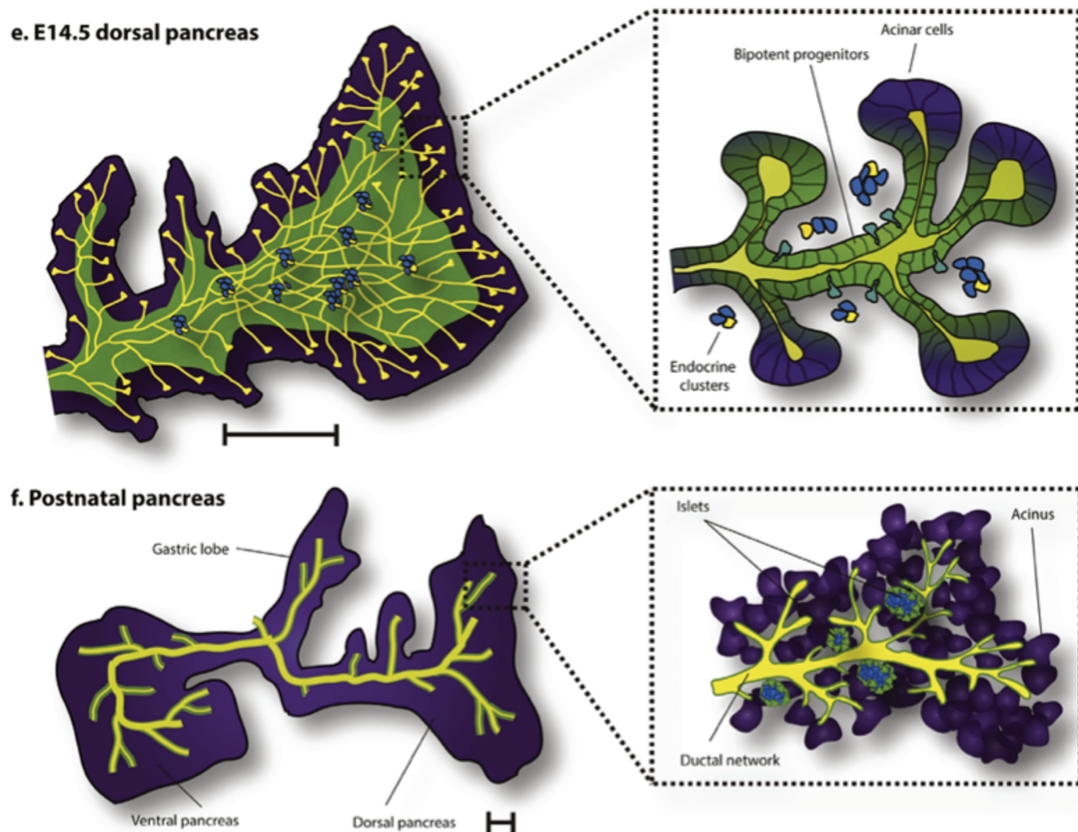


Figure 5 : Évolution de la morphogénèse pancréatique au cours du développement du pancréas. (Adapté de Larsen et Grapin-Botton., 2017)

En E, émergence de la formation de premières cellules endocrine, avec le développement de progéniteurs bipotent. En F, le pancréas post-natale est divisé en trois lobes, composés de la partie endocrine (les îlots de Langerhans) et de la partie exocrine (cellules acinaires et ductales).

1.2.2 Implication des facteurs de transcriptions dans le développement du pancréas exocrine et endocrine

La maturation et la spécification des cellules exocrines et endocrines proviennent d'un mécanisme complexe mettant en jeu de nombreux facteurs de transcription. Ces mécanismes font intervenir une cascade d'expression de facteurs de transcription et le niveau d'expression de certains facteurs clés vont permettre l'engagement des cellules dans la voie endocrine ou exocrine. La différenciation en cellules endocrine ou exocrine est contrôlée majoritairement par l'expression de deux facteurs de transcription, Neurogenin-3 (Ngn3) et « Hairy and enhancer of split-1 » (Hes1) respectivement.

I.2.2.1 Facteurs de transcription impliqués dans la spécification endocrine et exocrine

Au début des années 1990, deux facteurs clé ont été identifiés comme essentiels pour la spécification et la différenciation de l'ensemble des types de cellules dans le pancréas, à savoir *Pdx1* et *Ptf1a* (Pancreatic transcription factor 1a). Par la suite, d'autres facteurs de transcription comme *Islet 1* (*Isl1*) ou *Sox9* (Sex-determining region Y-box containing gene 9) ont été identifiés.

Pdx1

Pdx1, également nommé Insulin promoting factor 1 (IPF1), est un facteur de transcription de la famille des Homeobox. Il est exprimé précocement dans le développement du pancréas (E8,5) et son expression semble maintenue dans l'ensemble des cellules du pancréas jusque E17,5, où son expression est restreinte aux cellules endocrines (28). La délétion germinale de *Pdx1* chez la souris entraîne l'absence du développement de l'ensemble des cellules pancréatiques, accompagné d'une absence de l'expansion et de la ramification du tissu. La délétion germinale de *Pdx1* chez la souris induit une létalité néonatale 5 jours après la naissance suite au développement d'une hyperglycémie sévère. Une délétion hétérozygote de *Pdx1* (*Pdx1*^{+/-}) permet un développement normal du pancréas, cependant ces souris développent une diminution de la production d'insuline, démontrant le rôle important de *Pdx1* dans la cellule β pancréatique et la production d'insuline (29). A l'âge adulte, l'expression de *Pdx1* est retrouvée dans les cellules β et δ (30). L'utilisation de modèle de souris inductible d'inactivation de *Pdx1* par le système Tet a permis de montrer le rôle important de *Pdx1* afin de maintenir une fonction et une survie de la cellule β à travers le contrôle de l'expression de l'insuline, la glucokinase et *Glut2* par exemple (31). Chez l'humain, des mutations du gène *PDX1* sont associées au développement d'un diabète de type MODY : MODY 4 (32). L'ensemble de ces résultats mettent ainsi en évidence l'implication de *Pdx1* à la fois dans le développement mais également dans la fonction de la cellule β pancréatique.

Ptf1a

Ptf1a est un facteur de transcription appartenant à la famille des hélice-boucle-hélice. Au cours du développement pancréatique, *Ptf1a* est co-exprimé avec *Pdx1* dans les MPCs (multipotent pancreatic progenitor cells). Néanmoins, lors de la phase de transition secondaire, l'expression de *Ptf1a* est uniquement retrouvée dans les cellules acinaires (27). La délétion de *Ptf1a* chez la souris entraîne une létalité post-natale immédiate à la naissance suite à une absence totale de développement du pancréas exocrine (33), mais également aux fonctions neuronales de *Ptf1a*. Il a également été constaté que la délétion de *Ptf1a* chez la souris entraîne une absence de cellules endocrines dans le pancréas, accompagnée d'une relocalisation dans la rate, suggérant le rôle important de *Ptf1a* dans la

structuration du pancréas (33). D'autres études ont également montré que l'expression ectopique de *Ptf1a*, associée à une induction de l'expression de *Pdx1*, chez le Xénope au début du développement, induit une expansion massive du pancréas avec une différenciation importante des cellules ductales, des cellules acinaires et des cellules endocrines (34). Chez la souris adulte, l'expression de *Ptf1a* est également nécessaire, puisqu'une étude a montré que l'inactivation à l'âge adulte de *Ptf1a* dans les cellules acinaires induisait une augmentation de l'apoptose (35) démontrant le rôle important de *Ptf1a* dans la différenciation et le développement pancréas, mais également dans la survie des cellules exocrines matures.

Sox9

Sox9 est un facteur de transcription de la famille des « High Mobility Group » reliée à SRY. Entre E9 et E12,5, l'expression de *Sox9* est corrélée avec celle de *Pdx1* dans les MPCs, permettant la répression de gènes impliqués dans la différenciation intestinale (36). La diminution d'expression de *Sox9* dans les précurseurs pancréatiques entraîne la différenciation de ces cellules, cependant l'expression de *Sox9* est retrouvée dans les cellules centro-acinaires et les cellules canalaire (37). La délétion de *Sox9* dans les précurseurs pancréatiques à l'aide des souris *Pdx1-Cre* entraîne un retard de croissance, une hyperglycémie et une létalité de la souris 4 jours après la naissance. Les souris *Sox9^{+/-}* vont présenter au niveau du pancréas une réduction de la masse des cellules présentes au sein de l'îlot de Langerhans, sans modification du compartiment exocrine (38). Chez l'adulte, la perte d'expression de *Sox9* dans le pancréas conduit à une diminution des marqueurs canalaire démontrant le rôle important de *Sox9* dans le maintien de l'identité des cellules canalaire (39).

Hnf6

Hnf6 est un facteur de transcription de la superfamille des homéodomaines. Lors du processus de développement de l'endoderme, *Hnf6* régule l'expression de *Hfn1 β* , facteur de transcription essentiel pour le développement du pancréas à partir de l'endoderme. Au cours du développement pancréatique, *Hnf6* est exprimé en amont de *Pdx1* dans les MPCs (40) et devient crucial pour le développement de la cellule endocrine à travers l'expression de *Hfn1 β* et l'initiation de la prolifération et de l'expression du marqueur de cellules endocrines, Neurogenin-3 (41). L'induction de l'expression de *Ngn3* limite l'expression de *Hnf6* aux cellules ductales et à quelques cellulaires acinaires (42). La délétion de *Hnf6* induit une hypoplasie pancréatique et des modifications dans la structuration de cellules canalaire et endocrines, démontrant le rôle de *Hnf6* dans la différenciation canalaire des cellules exocrines. A l'âge adulte, l'expression de *Hnf6* est restreinte aux cellules ductales.

I.2.2.3 Ngn3, facteur clés impliqué dans la différenciation endocrinienne

La différenciation des progéniteurs pancréatiques en cellules progénitrices endocrines se fait principalement pendant la phase de transition secondaire (E12-E15), même si certaines cellules endocrines peuvent être retrouvées lors de la phase de transition primaire. Au cours de cette étape, de nombreux facteurs de transcriptions vont permettre la maturation et la différenciation de ces cellules progénitrices en 5 types de cellules endocrines (cellules α , β , δ , ε et PP). Dans cette introduction, nous nous focaliserons sur le développement des cellules α et β .

Ngn3

Le marqueur principal de cellules progénitrices endocrine est Ngn3, facteur de transcription de la famille des hélice-boucle-hélice qui agit comme un activateur de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire pour l'ensemble des cellules endocrines (43). Son expression dans les cellules endocrines adulte est controversée. De nombreuses études ont démontré une expression uniquement dans le pancréas en développement (43, 44), alors que par des approches de « lineage tracing », certaines études ont montré son expression dans les îlots de Langerhans de souris adultes (45). Il a été proposé que le faible niveau d'expression de *Ngn3* dans les îlots adultes pourrait permettre de maintenir une structure chromatinienne permettant l'expression de gènes important pour la fonction des cellules endocrines composant l'îlot (45). La délétion de Ngn3 chez la souris entraîne une absence totale de cellules endocrines dans le pancréas, entraînant la mort post-natale des souris suite à une hyperglycémie trop élevée (43). Cette étude a également mis en évidence l'absence de l'expression des marqueurs spécifiques des îlots de Langerhans tels que *Pax4*, *Pax6*, *NeuroD1* et *Isl1* au niveau de l'épithélium pancréatique, suggérant un contrôle de l'expression de Ngn3 sur ces gènes. La surexpression de *Ngn3* dans le pancréas en différenciation entraîne une différenciation prématurée des MPCs, réduisant le pool de cellules multipotentes progénitrices entraînant une réduction de la masse globale du tissu endocrinien (46). Ces données permettent ainsi d'affirmer que la régulation stricte et contrôlée de Ngn3 est importante pour entretenir une bonne composition cellulaire endocrine du pancréas. De nombreuses études se sont intéressées à la temporalité d'expression de *Ngn3*. A l'aide de modèle permettant une augmentation de l'expression de *Ngn3* inducible par le tamoxifène, les auteurs ont mis en évidence que l'activation de l'expression de *Ngn3*, uniquement pendant les 48 premières heures du développement du pancréas (E8,5-E10,5), entraîne une production quasi-exclusive des cellules productrices de glucagon (47). Dans cette étude, ils ont montré que la surexpression de *Ngn3* au niveau de la période E11,5 favorise la formation des cellules insuline et PP, alors qu'à E14,5, la surexpression de *neurogenin-3* permet principalement la production de cellules à somatostatine (47) (Figure 6). Ainsi, ces résultats montrent également le rôle important de la temporalité d'expression de *Ngn3* dans la différenciation des cellules endocrines. Récemment, une

étude a mis en évidence que la phosphorylation de Ngn3 sur certains sites de phosphorylation contrôle la différenciation endocrinienne, notamment en augmentant sa stabilité, favorisant ainsi la différenciation cellulaire (47).

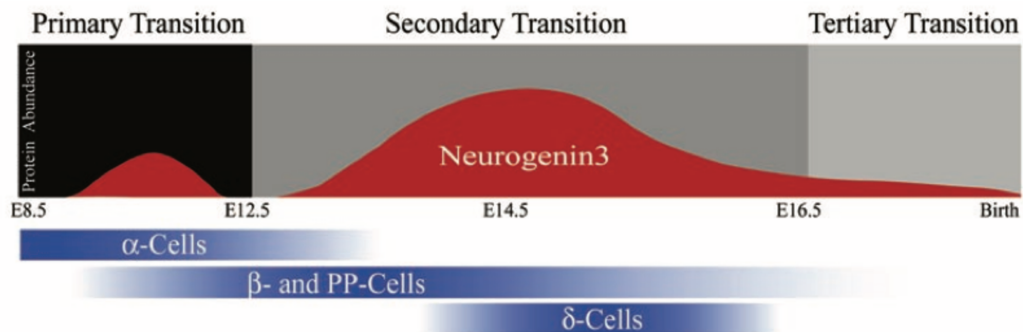


Figure 6 : Évolution de l'expression de *Ngn3* au cours du développement du pancréas endocrine. (Adapté de Ruktalis & Habener, 2009)

Au cours de la première phase de transition, la première vague d'augmentation d'expression de Ngn3 coïncide avec l'apparition de cellules α . La seconde phase de transition est marquée par une vague d'expression de Ngn3 et la différenciation des cellules progénitrices en cellules β et PP. Plus tard, au cours de cette seconde phase de transition, apparaît la différenciation des cellules δ . Après le développement des cellules endocrines, l'expression de Ngn3 diminue drastiquement.

Facteurs de transcription permettant la différenciation et le maintien d'identité des cellules endocrines en cellules β

Pax4

Le gène *Pax4* appartient à la famille des facteurs de transcription à homéodomaine partageant un motif de liaison à l'ADN supplémentaire, nommée le domaine « paired ». L'expression de *Pax4* est détectée pour la première fois à E9,5 au niveau du bourgeon dorsal et à E10,5 dans le bourgeon ventral (48). Au cours du développement, le nombre de cellules *Pax4*⁺ culmine entre E13,5 et E15,5, soit au cours de la phase de transition secondaire dans l'ensemble des cellules. Pendant cette seconde phase de transition, certaines cellules endocrines *Pax4*⁺ vont co-exprimer l'insuline et le glucagon. Cependant l'expression de *Pax4* est exclusive aux cellules β à E18,5 (49). Son expression reste activée tout au long de la vie adulte dans les cellules β matures (50). Les souris déficientes pour *Pax4* vont présenter une létalité 3 à 5 jours après l'accouchement, suite à une hyperglycémie sévère provoquée par un déficit complet en cellules productrice d'insuline. Ces animaux vont également présenter une absence de cellules produisant de la somatostatine (48). De manière intéressante, les auteurs ont constaté une augmentation massive du nombre de cellules α au sein de l'îlot. Des études supplémentaires ont montré que l'absence de *Pax4* dans les cellules progénitrices conduisait ces cellules progénitrices à devenir des cellules α , montrant une nouvelle fois le rôle important de *Pax4* pour la différenciation des cellules β et δ (51). De manière intéressante, l'équipe du Dr Patrick Collombat a montré que l'expression ectopique de *Pax4* dans une cellule α mature induisait la transformation de cellules α en

cellules β , démontrant à nouveau le rôle important de Pax4 dans les cellules endocrines (52). Ces données permettent également de suggérer que Pax4 est capable d'inhiber l'expression d'Arx (Aristaless related homeobox). Chez l'Homme, plusieurs polymorphismes du gène PAX4 sont associés à une plus grande susceptibilité de développer un diabète (53, 54) dans des populations asiatiques et également dans des populations scandinaves (55).

MafA

MafA (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A) est un facteur de transcription de la famille des musculo-aponeurotic sarcoma possédant un domaine Basic leucine zipper lui permettant sa liaison à l'ADN (56). L'expression de *MafA* est détectée au cours de la phase de transition secondaire, à E13,5, uniquement dans les cellules exprimant l'insuline (57). La délétion de *MafA* chez la souris va entraîner une intolérance au glucose et le développement d'un diabète, suite à une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β et à une modification de l'architecture de l'îlot de Langerhans (augmentation du nombre de cellules α pour une diminution de nombre de cellules β) à 12 semaines. Cette diminution de la sécrétion peut également s'expliquer par une tendance à la diminution de *Pdx1* et *Glut-2* (58). Au contraire, la surexpression de *MafA* dans des îlots de souris 2 jours après la naissance à l'aide d'un adénovirus permet une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette augmentation de la sécrétion d'insuline peut s'expliquer par une augmentation de l'expression de gènes clés impliqués dans l'identité et la sécrétion d'insuline de la cellule β tels que *NeuroD1*, *Nkx6.1* et *Gck* (59). Enfin, la délétion de *MafA* au moment de la différenciation des cellules endocrines, grâce au modèle Pdx1-Cre, a mis en évidence une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la fonction de la cellule β uniquement à partir de 3 semaines de vie (60). Ces résultats sont également associés à une diminution de la masse de cellules β , sans modification de la masse des cellules α (60). De plus, une étude a montré que MafA est impliqué dans la prolifération post-natale des cellules β à travers le contrôle de l'expression de la *Cycline D2* (*Ccnd2*) (61). Ainsi, l'ensemble de ces résultats montrent que MafA n'est pas nécessaire au développement de cellules β à partir des précurseurs endocriniens, mais qu'il est nécessaire pour maintenir une masse physiologique de cellules β mature chez l'adulte (Figure 7).

Nkx6.1

Nkx6.1 est un facteur de transcription de la famille des homeobox jouant un rôle important dans le développement de la cellule β . L'expression de *Nkx6.1* est observée à partir de E9,5 au sein de l'épithélium pancréatique jusqu'à E13, où son expression est restreinte uniquement aux cellules β pancréatique (62, 63). Son expression est également importante pour le développement de cellules endocrines puisque l'expression de *Nkx6.1* est absente dans l'ensemble des MPCs donnant naissance

aux cellules acinaires (62). La délétion de *Nkx6.1* chez la souris entraîne une diminution de la masse de cellules β de l'îlots sans altérer la formation des autres types cellulaires (64). De plus, cette étude a mis en évidence que l'expression ectopique de *Nkx6.1* dans des MPCs/Pdx1⁺ permet de restaurer le développement normal de cellules β lors d'une délétion de *Nkx6.1*. Cependant, aucune modification de la masse de cellule β est constatée à E12,5, suggérant le rôle important de *Nkx6.1* au cours de la seconde phase de transition. En plus de son rôle dans le développement, *Nkx6.1* joue un rôle crucial pour la physiologie de la cellule β . En effet, la délétion de *Nkx6.1* dans la cellule β adulte à l'aide d'un modèle inductible au tamoxifène induit le développement d'un diabète et une diminution de la production d'insuline chez la souris. L'analyse transcriptomique des îlots de ses souris a mis en évidence le rôle important de *Nkx6.1* dans le contrôle de gènes impliqués dans les mécanismes de biosynthèse et de sécrétion de l'insuline ainsi que dans la prolifération de cellules β (65). De plus, les auteurs ont montré que cette perte d'expression de *Nkx6.1* dans la cellule β adulte conduisait cette cellule à perdre son identité et à devenir une cellule δ (65). Pour finir, *Nkx6.1* permet de maintenir un phénotype de cellule β en inhibant directement à la chromatine l'expression du Glucagon (66) (Figure 7).

En plus de Pax4, MafA, *Nkx6.1*, d'autres facteurs de transcription sont également importants pour le développement ou le maintien d'une cellule β pancréatique mature. Parmi ces facteurs, nous pouvons retrouver Foxo1, pour lequel il a été montré que sa perte d'expression dans la cellule β mature induit une dédifférenciation de cette cellule (67). Nous pouvons citer également NeuroD1 et Pax6 dont le rôle dans le maintien de l'identité cellulaire β a été démontré (68-70).

Facteurs de transcriptions permettant la différenciation et le maintien d'identité des cellules α

Arx

Arx (Aristaless related homeobox) est un facteur de transcription de la famille des homeobox (facteur de transcription à homéodomaine). Il est détecté à E9,5 dans l'épithélium pancréatique et est exprimé par la suite dans les précurseurs de cellules α et β . Cependant, son expression est confinée aux cellules α et PP chez l'adulte (71). La perte d'expression d'*Arx* dans l'ensemble de l'organisme chez la souris induit une létalité deux jours après la naissance suite à une hypoglycémie sévère. Cette hypoglycémie s'explique par l'absence de cellules α dans les îlots des souris *Arx*^{-/-} associée à une augmentation concomitante de la masse de cellules β et δ (71). Au contraire, la surexpression d'*Arx* au cours du développement des cellules endocrines conduit à une diminution drastique de la masse de cellules β et δ , associé à une augmentation de la masse de cellules α et PP (72). Chez la souris adulte, l'induction d'*Arx* dans la cellule β entraîne une diminution de la masse de cellules insuline⁺ pour une augmentation

importante du nombre de cellules α et δ (72). De manière intéressante, l'inactivation d'*Arx* dans la cellule α adulte induit une augmentation du nombre de cellules β (73). Ce mécanisme induit une augmentation de la néogénèse de cellules α à travers la mobilisation des cellules ductales afin de fournir de nouvelles cellules endocrines progénitrices (73). Enfin, il a été constaté une augmentation de l'expression de *Pax4* dans les îlots de ces souris, suggérant un rôle inhibiteur d'*Arx* sur l'expression de *Pax4*, et inversement. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence que *Pax4* est capable de se fixer au promoteur d'*Arx* pour réprimer sa transcription et réciproquement, *Arx* est capable de se fixer au promoteur de *Pax4* (74). Ce mécanisme permet ainsi de renforcer l'identité mature de la cellule β ou α (Figure 7).

MafB

MafB est, comme *MafA*, un facteur de transcription possédant un domaine « Basic leucine zipper ». L'expression de *MafB* est détectée à E10,5 dans des cellules exprimant également le glucagon. Cependant, *MafB* est également retrouvé à E12,5 dans des cellules insuline⁺ (75). A l'âge adulte, l'expression de *MafB* est uniquement retrouvée dans les cellules α (76). L'utilisation d'un modèle de souris *MafB*^{-/-} a montré une diminution du nombre de cellules α et β au cours du développement, indiquant le rôle important dans la différenciation de ces deux types de cellules endocrines (77). Cependant, les effets physiologiques d'une délétion de *MafB* n'ont pu être analysés suite à une létalité des souris causées par des problèmes de développement neurologique. La délétion de *MafB* dans l'ensemble du pancréas, par l'utilisation du modèle *Pdx1-Cre*, a montré également une diminution de la masse de cellules α et β post-natale (78), démontrant à nouveau le rôle important de *MafB* dans la différenciation des cellules β et α . La délétion de *MafB* dans la cellule α à l'âge adulte, à l'aide d'un modèle inducible au tamoxifène, a mis en évidence une diminution de cellules glucagon⁺ et du contenu en glucagon intracellulaire, sans modification de la masse de cellules β . Cette étude a également montré que *MafB* est un régulateur transcriptionnel de l'expression du glucagon (79) (Figure 7).

Brn4

Brn4 (*Brain4*) ou *Pou3f4* est un facteur de transcription possédant un domaine « Pou » lui permettant sa liaison à l'ADN (80). *Brn4* est détecté à E10, au moment où les premières cellules endocrines commencent à exprimer le glucagon (81, 82). A E19, son expression est restreinte aux cellules α et à quelques cellules PP (81). Les souris *Brn4*^{-/-} ne présentent pas de modification du nombre de cellules α et de l'homéostasie glucidique (81). Cependant, l'expression ectopique de *Brn4* dans la cellule β induit une augmentation du nombre de cellules α , associée avec une apparition de ces cellules au centre de l'îlot. Ces cellules expriment également l'insuline et sont donc bi-hormonales (83). Au niveau

moléculaire, Brn4 est capable de se fixer au promoteur du gène du *proglucagon* et permet d'activer sa transcription (82) (Figure 7).

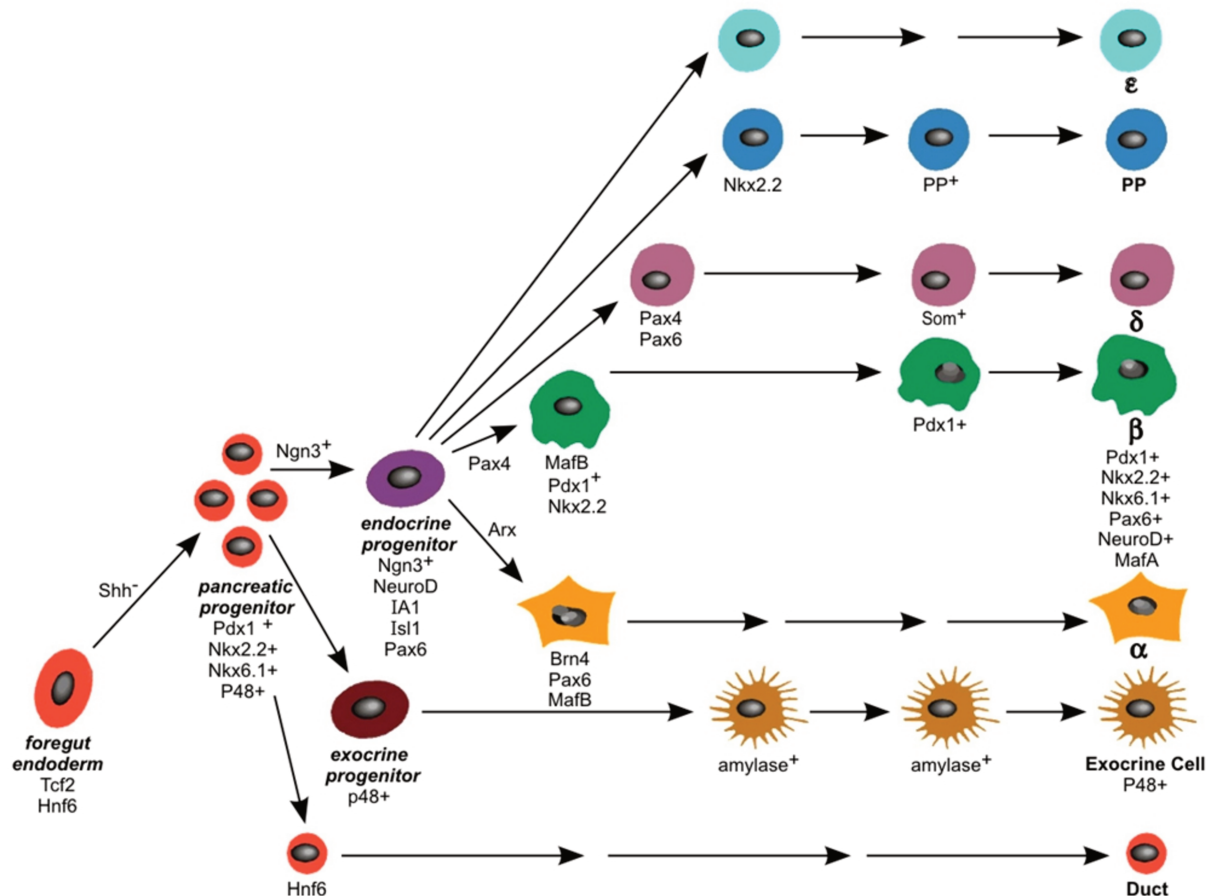


Figure 7 : Analyse de l'expression des différents facteurs de transcription au cours du développement du pancréas endocrine et exocrine. (Adapté du livre « Pancreatic Stem cells: unresolved business » de Jiang & Morahan, 2010)

Les cellules progénitrices pancréatiques vont exprimer certains facteurs de transcription et principalement *Pdx1*. L'induction de l'expression de *Ngn3* va entraîner la différenciation des progéniteurs pancréatiques en progéniteurs endocrines. Ces cellules progénitrices endocrines sous l'action de différents facteurs de transcription, et notamment *Pax4* ou *Arx*, vont donner soit des cellules β ou des cellules α , respectivement.

I.3. La composition cellulaire du pancréas endocrine

I.3.1 La cellule α

La cellule α produit et sécrète le glucagon (pour glucose agonist) en réponse à l'hypoglycémie (84) et représente environ 30% du nombre total de cellules au sein de l'îlot chez l'humain et 10% chez la souris (85). Le glucagon agit sur différents tissus de l'organisme afin d'augmenter la glycémie en permettant le relargage du glucose par le foie pendant une période de jeûne. Le glucagon se fixe à son récepteur, un récepteur à 7 domaines transmembranaire couplé aux protéines G. Le Glucagon récepteur (GCR) est fortement exprimé au niveau du foie et du rein et faiblement exprimé au niveau du cœur, de

l'adipocyte, du pancréas, du cerveau et du tractus gastro-intestinal (86). Une fois le glucagon fixé à son récepteur, cela activera l'adénylate cyclase, permettant l'augmentation des taux d'AMPc et l'activation de nombreuses voies moléculaires, telle que la voie de la PKA ou de l'AMPK. Ces voies moléculaires vont permettre de promouvoir la glycogénolyse (transformation du glycogène en glucose) et d'inhiber à la fois la synthèse de glycogène et la glycolyse, permettant la libération de glucose dans le sang. Le glucagon est codé par le gène du préproglucagon, exprimé dans les cellules α , mais également certaines cellules du système nerveux central et les cellules intestinales de type L. Un clivage post-traductionnel par l'action des différentes pro-hormones convertases va mener à la maturation de différents peptides (glucagon, Glucagon Like Peptide-1 et 2, Oxyntomoduline). Dans la cellule α , la prédominance de l'expression de la pro-hormone convertase 2 (PC2) mène à une production majeure de glucagon dans la cellule (87, 88) (Figure 8).

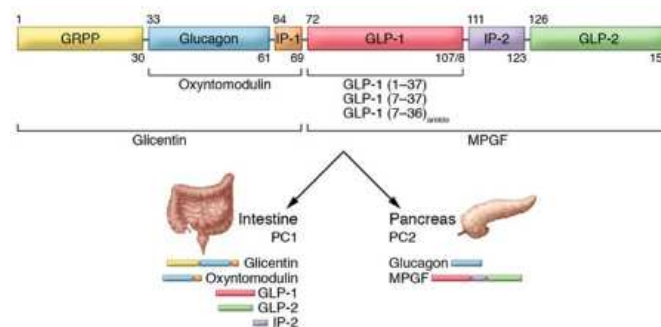


Figure 8 : Structure et mécanisme de maturation du glucagon à partir du gène humain du proglucagon (Adapté de Drucker et al., 2017)

Le gène du proglucagon va permettre la production différentes hormone à travers l'action différenciels des enzymes Pro-convertase. Au niveau de l'intestin, l'action de la PC1 va permettre la production de la Glucetine, de l'oxyntomoduline, du Glp-1, Glp-2 et de Ip-2. Tandis que dans le pancréas, la PC2 va permettre la production du Glucagon et de la MPGF.

Le glucose régule directement la sécrétion de glucagon dans la cellule α suite à un influx de calcium dans la cellule entraînant l'exocytose des granules contenant le glucagon. En effet, la cellule α exprime majoritairement le transporteur au glucose GLUT1 qui possède une forte affinité pour le glucose et permet la détection du glucose en faible concentration dans le sang (89). Une fois dans le cytoplasme de la cellule α , le glucose sera transformé en ATP suite aux mécanismes de glycolyse et du cycle de krebs. L'hypoglycémie induisant une faible concentration d'ATP intracellulaire induit la fermeture d'un canal potassique ATP dépendant (K_{ATP}) diminuant l'efflux de K^+ dans la cellule et causant une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation permet l'ouverture de canaux calcique, une entrée massive de calcium et la sécrétion des granules de glucagon (90).

De nombreux autres stimuli peuvent également avoir un effet sur la sécrétion de glucagon par la cellule α . Certains stimuli vont avoir un effet d'inhibition de la sécrétion du glucagon tel que l'insuline (91), la

somatostatine (92) ou l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (93). Au contraire, des acides aminés comme l'arginine, l'alanine et la glutamine sont des stimulateurs de la sécrétion de glucagon (94). Concernant la sécrétion de glucagon par les AGs, le mécanisme et l'effet sont controversés. En effet, des études initiales ont montré un effet inhibiteur sur la sécrétion de glucagon (95) alors que des études récentes ont montré qu'un temps court d'exposition aux AGs stimule la sécrétion de glucagon par la cellule α (96).

1.3.2 La cellule δ

En plus des cellules β produisant l'insuline (voir ci-dessous) et des cellules α produisant le glucagon, l'îlot de Langerhans est également composé à environ 5% de cellules δ sécrétant la somatostatine (97), également appelée « Growth hormone inhibiting hormone (GHIH) » ou « Somatotropin release-inhibiting hormone (SRIF) ». La somatostatine possède un rôle majoritairement paracrine sur les cellules α et β , sur lesquelles, elle va agir comme un inhibiteur rapide de la sécrétion de l'insuline et du glucagon chez la souris (98) et chez l'humain (99). Les cellules δ possèdent une morphologie unique au sein de l'îlot, ayant un aspect de type « neurone » avec des extensions cytoplasmique de type dendritique (100) leur permettant d'assurer une communication paracrine efficace avec les autres types cellulaires de l'îlot de Langerhans (101). La somatostatine est produite à partir du gène *SST1* présent sur le chromosome 3 chez l'humain et le chromosome 16 chez la souris. Le gène code une protéine précurseur, nommée pré-prosomatostatine, d'une taille de 116 acides aminés, qui sera clivée en pro-somatostatine (PSST, 92aa). La PSST sera ensuite clivée au niveau c-terminal par l'action de la pro convertase 2 (102) permettant la formation de deux formes biologiquement actives : SST-14 (14 aa), forme majoritairement sécrétée au sein de l'îlot et SST-28 (103). Une fois sécrétée, la somatostatine se fixera à son récepteur, le récepteur à la somatostatine (composé de 5 isoformes, SSTR 1-5), couplé aux protéines G permettant l'inhibition de l'AC et la réduction des taux d'AMPC intracellulaire. L'activation du SSTR permet également une hyperpolarisation membranaire par activation des canaux K^+ diminuant l'influx calcique intracellulaire et ainsi l'exocytose des hormones pancréatiques. L'expression des récepteurs à la somatostatine est principalement retrouvée dans le pancréas, certaines zones neuronales et le long du tractus gastro-intestinal.

La somatostatine est sécrétée en réponse à différents stimuli. Comme le glucagon et l'insuline, le sécrétagogue principal est le glucose via la production d'ATP, la fermeture des canaux K^+ ATP dépendant, l'entrée de calcium intracellulaire et l'exocytose des granules de somatostatine (104). Étant donné que la SST possède un rôle d'inhibition dans la sécrétion d'insuline, sa sécrétion en réponse à une élévation de la glycémie est contradictoire avec son rôle principal. Il a été proposé que la somatostatine permet de prévenir d'une hyper-sécrétion d'insuline et de glucagon. Une deuxième hypothèse émise est qu'à des concentrations élevées de glucose, la somatostatine inhibe

principalement la sécrétion de glucagon plutôt que la sécrétion d'insuline (101). Les acides gras et les acides aminés sont également des inhibiteurs de la sécrétion de la somatostatine. Concernant les AGs, ceux-ci vont se fixer au GPR120 (G-protein coupled receptor 120) couplé à une protéine G inhibitrice diminuant la production d'AMPc et l'exocytose des granules de somatostatines. Pour les AAs, l'arginine et la leucine sont les principaux sécrétagogues de la sst par augmentation de la production d'ATP.

Différentes hormones vont également jouer un rôle dans la sécrétion de somatostatine. Alors que l'insuline, la sérotonine, ainsi que la somatostatine elle-même sont des inhibiteurs de la sécrétion de somatostatine, le glucagon, le GLP-1 ainsi que le GABA sont des activateurs de cette sécrétion (97).

I.3.3 La cellule PP

Les cellules PP ou cellules F représentent moins de 5% des cellules totales de l'îlot de Langerhans et vont produire et sécréter le polypeptide pancréatique (PP) (105), peptide de 36 acides aminés impliqué majoritairement dans les mécanismes de digestion et de contrôle de la prise alimentaire majoritairement via l'axe pancréas-intestin-cerveau (101). Le PP est un peptide de la même famille que le Peptide YY (PYY) (106) et le neuropeptide Y (NPY). Ces peptides vont se fixer à une famille de 5 récepteurs (Y1 à Y6), avec une forte affinité pour le récepteur Y4 (107). La sécrétion du PP est un processus contrôlé principalement par le système nerveux central et les afférences du nerf vague en réponse à l'acétylcholine. Le PP contrôle de nombreuses fonctions gastro-intestinales tels que l'inhibition de la sécrétion des enzymes pancréatiques, la réduction de la vidange gastrique et de l'activité motrice de l'intestin (101). Contrairement aux autres hormones sécrétées par les îlots de Langerhans, la sécrétion du PP n'est pas dépendante du glucose (108). D'un point de vue paracrine, le PP semble inhiber la sécrétion de glucagon par la cellule α via le récepteur Y4 (PPYR1) (109) et la sécrétion de somatostatine (110).

I.3.4 La cellule ϵ

La cellule ϵ produit et sécrète de la ghréline et a été découverte au début des années 2000 (111, 112), et reconnue comme le 5ème type de cellules endocrines de l'îlots de Langerhans. Les cellules ϵ sont plus abondantes pendant le développement du pancréas humains (environ 10% de la masse totale des cellules endocrines), néanmoins quelques cellules sont encore détectées à l'âge adulte (<1%). Initialement, la ghréline a été détectée dans l'estomac de rat comme le ligand du « Growth hormone secretagogue receptor » (GHSR1a) (113) et a été décrite comme une hormone oréxigène capable de moduler la prise alimentaire (114) ou d'activer la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) par l'hypophyse. Chez l'humain, le gène de la Ghréline (*GHRELIN*) va coder pour la préproghréline, précurseur de 117 acides aminés qui subira de nombreuses modifications post-traductionnelles pour former de la ghréline biologiquement active. En effet, la ghréline peut être classifiée soit en ghréline

acétylée (GA) ou en ghréline non acétylée (GNA), dû à la présence ou non d'une acétylation sur la sérine 3. La forme acétylée, GA est celle capable de se fixer au récepteur GHSR1a (115).

L'expression du récepteur à la ghréline a été détecté dans des îlots humains (116) et de rongeurs (117). La ghréline va exercer sur la cellule β un effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline par activation d'une protéine G inhibitrice couplé au récepteur de la ghréline induisant la perte de signalisation de l'AMPC intracellulaire et la diminution d'influx calcique intracellulaire (118). Indirectement, la ghréline exerce un effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline par stimulation de la sécrétion de somatostatine et de PP par les cellules β et F, respectivement (119, 120). En plus de ses rôles sur le relargage des hormones de l'îlots de Langerhans, la ghréline contribue à l'activation de nombreux mécanismes moléculaires de la cellule β , tel que la prolifération et l'apoptose (121).

I.4. La cellule β pancréatique, mécanismes de sécrétion d'insuline et activation de la signalisation de l'insuline

La cellule β pancréatique est une cellule endocrine qui synthétise, stocke et sécrète de l'insuline, seule hormone hypo-glycémiant de l'organisme, dans l'objectif de maintenir une glycémie dans une plage physiologique. C'est la cellule prédominante dans l'îlot de Langerhans ($\approx 80\%$ chez la souris et 60 % chez l'homme) (122). L'insuline a été découverte en 1921 par Banting et Best à Toronto et a permis d'établir la première thérapie chez le patient diabétique.

I.4.1 Mécanismes de la biosynthèse et de la sécrétion d'insuline

Après la transcription du gène de l'insuline (*Ins*), l'ARN_m sera traduit pour former un premier peptide appelé pré-pro insuline, peptide composé d'une seule chaîne peptidique de 110 acides aminés, qui sera clivé par une enzyme nommée signal peptidase qui se fait au niveau de la lumière du RE, pour former la pro-insuline (123). La pro-insuline est un peptide composé de 3 chaînes peptidiques, A, B et C. La chaîne C sera clivée par les actions de deux pro-convertases, PC1/3 et PC2, libérant ainsi le fragment central. Cette libération entraîne la formation d'un peptide constitué de deux chaînes polypeptidiques, avec une chaîne A de 21 acides aminés et une chaîne B de 30 acides aminés reliées entre eux par deux ponts disulfures, formant l'insuline qui sera stockée dans la cellule β dans des granules et qui sera ensuite relargué dans la circulation sanguine (Figure 9).

Dans la cellule β pancréatique, l'insuline est stockée dans des granules. On considère que chaque cellule β possède environ 10 000 granules d'insuline, contenant chacune environ 200 000 molécules d'insuline. Le processus de transformation de la pro-insuline en insuline permet la maturation de ces granules. En effet, l'acidification de la lumière des granules, accompagné d'une augmentation en ion calcique permet l'activation des pro-hormones convertase, induisant la production de l'insuline mature (124).

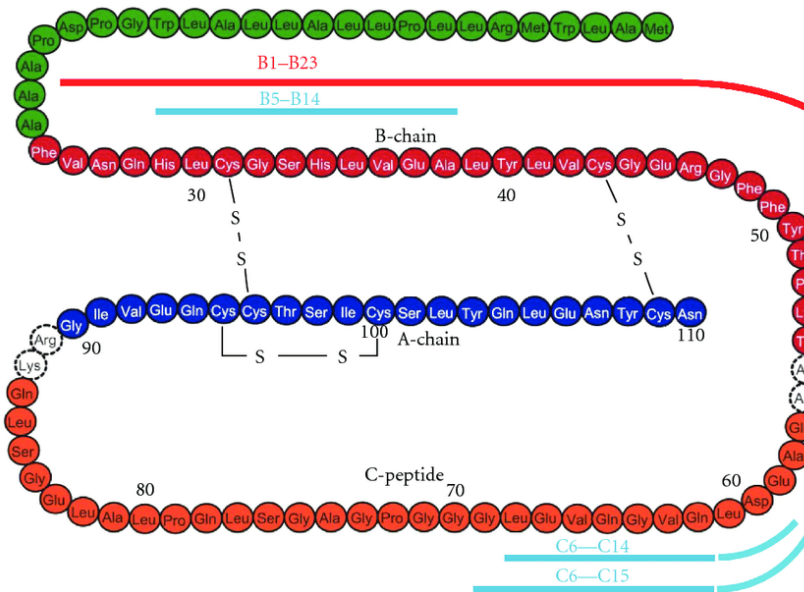


Figure 9 : Structure primaire de la préproinsuline humaine. (Adapté de Kanatsuna et al., 2012)

La préproinsuline sera clivée pour former la pro-insuline. Par la suite, l'action des pro-convertases va couper le fragment central (rouge) et former deux chaînes polypeptidiques, dont la chaîne A qui sera formée de 21 AA (en bleu) et la chaîne B (en rose) formée de 30 AA, reliées entre elles par des ponts disulfures.

Par la suite, l'insuline produite sera sécrétée par la cellule β pancréatique. Cette sécrétion est un mécanisme finement contrôlé par de nombreux sécrétagogues, et principalement par le glucose sanguin (125). Le glucose sera transporté à l'intérieur de la cellule β à l'aide des transporteurs GLUT, dont notamment GLUT2 chez la souris (126, 127), et GLUT1 et 3 chez l'humain (128). Après l'internalisation du glucose au sein de la cellule β , la glycolyse sera rapidement initiée et le glucose sera transformé en glucose-6-phosphate par l'action de la glucokinase, sous-type de l'hexokinase, enzyme limitante de la glycolyse. Après l'action de différentes enzymes, la glycolyse permet la formation de molécules d'ATP et du pyruvate. Par la suite, le pyruvate sera converti en Acétyl-CoA ou en oxaloacétate, par l'action de la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la pyruvate carboxylase (PC), deux enzymes fortement exprimées dans la cellule β pancréatique (129). Ces intermédiaires vont ensuite rentrer dans le cycle de Krebs, puis par l'action de nombreuses enzymes dans la mitochondrie former du FADH_2 et de NADPH . Une fois ces molécules produites, elles permettront par la phosphorylation oxydative et l'activation de l'ATP synthase, la production de nombreuses molécules d'ATP dans la mitochondrie. L'accumulation d'ATP au niveau intracellulaire, modifie ainsi le ratio ADP/ATP et entraîne la fermeture d'un canal potassique ATP (K^+_{ATP}), composé de deux sous-unités : Kir6.2 et Sur1 (130, 131) (Figure 10). L'accumulation d'ion K^+ entraîne une dépolarisation membranaire de la cellule β et l'ouverture de canaux calcique voltage dépendant (CCVD) permettant une entrée massive de calcium au niveau intracellulaire. L'accumulation de calcium intracellulaire est le signal principal pour induire la fusion des granules d'insuline avec la membrane plasmique de la cellule β et le relargage de

l'insuline dans la circulation sanguine (132). Cette fusion se fait à l'aide des protéines SNAREs, complexe protéique composé de la syntaxin, de SNAP25 et de VAMP, présent sur la membrane des vésicules d'insuline, formant un signal de reconnaissance pour la membrane plasmique (132) qui s'activera une fois l'exocytose initiée par l'entrée de calcium (Figure 10).

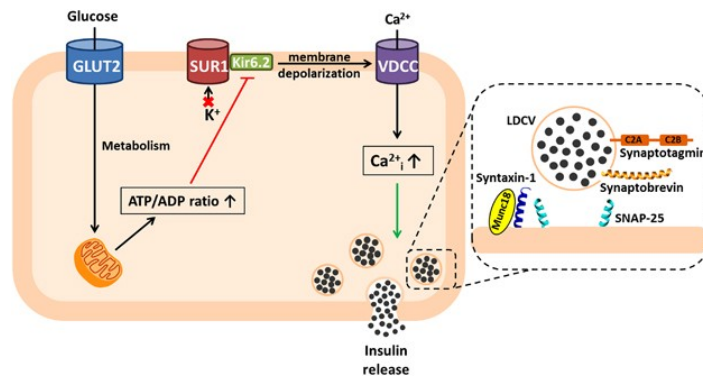


Figure 10 : Mécanisme physiologique de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. (Adapté de Röder et al., 2016, 26964835)

Le glucose qui sera capté par la cellule β sera métabolisé en ATP après l'activation de la glycolyse, du cycle de krebs et de la chaîne de phosphorylation oxydative. L'augmentation intracellulaire du ratio ATP/ADP entraîne la fermeture des canaux K^+ ATP-dépendant, induisant une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation permet l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant et l'influx massif de calcium dans la cellule permettant la fusion des granules d'insuline à la membrane et le relargage de l'insuline dans la circulation.

En plus du glucose, la cellule β est capable de sécréter de l'insuline en réponse à d'autres sécrétagogues, tels que les AGs, les AAs ou des hormones (GLP-1, mélatonine, œstrogènes, ...) (125). Concernant les AGs, ceux-ci rentrent dans la cellule par diffusion à travers la membrane plasmique (133) et différents mécanismes cellulaires tels que la β -oxydation (qui permet la formation d'ATP) (134) ou l'interaction avec des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), comme le GPR40 par exemple permettront de stimuler la sécrétion d'insuline ou de la potentialiser (135, 136). Les AAs participent également aux mécanismes de sécrétion d'insuline par la cellule β , avec des effets positifs ou négatifs. On distingue notamment 3 mécanismes cellulaires par lesquels les AA peuvent être métabolisées afin de générer de l'ATP via le cycle de krebs, la dépolarisation membranaire directe par interaction avec des transporteurs des AA ou indirecte par les co-transporteurs aux ions Na^+ (137).

1.4.2 Voie de signalisation de l'insuline et mécanisme d'action

L'insuline est une hormone anabolique qui va permettre de réguler l'homéostasie du glucose. Cette hormone agit en favorisant le transport du glucose à travers la membrane des cellules (138) et l'insuline va secondairement stimuler l'assimilation, le stockage et la transformation du glucose en glycogène. L'insuline agit via un récepteur spécifique de la membrane plasmique.

I.4.2.1 Récepteur à l'insuline : un récepteur à tyrosine kinase

La première expérience permettant de caractériser le récepteur à l'insuline a été réalisée dans les années 70, et a permis de définir la structure des sous-unités du récepteur. En 1982, une étude a montré qu'une tyrosine kinase était étroitement associée à ce récepteur (139). Par la suite, le clonage de l'ADNc du récepteur a été réalisé en 1985 et a permis de mettre en évidence que ce récepteur appartient à la famille des récepteurs à tyrosine kinase (TK) (140). Le récepteur à l'insuline est présent à la surface des tissus métaboliques clés, tels que les adipocytes, les hépatocytes et les cellules musculaires, mais également sur certains neurones (141), les macrophages (142) et les cellules β (143). Les RTK régulent de nombreuses fonctions cellulaires notamment la prolifération, la survie, la différenciation et le métabolisme de la cellule (144) et sont en général des chaînes polypeptidiques transmembranaires uniques. Le récepteur est composé de deux sous-unités α et de deux sous-unités β et on peut donc considérer le récepteur comme un hétérodimère préassocié dans la membrane. Les sous-unités α , extracellulaires, sont composées de 723 acides aminés et contiennent le site de fixation de son ligand. Elles possèdent chacune un domaine riche en cystéine et sont liées entre elles par un pont disulfure entre deux cystéines. Chaque sous-unité α est liée à une sous-unité β transmembranaire par des ponts disulfures (145). Cette sous-unité β contient un domaine à activité tyrosine kinase intracellulaire. Une seule molécule d'insuline, qui se lie avec une haute affinité sur les deux sous-unités α , va permettre d'activer le récepteur. La fixation de l'insuline va activer le récepteur en permettant le rapprochement des deux sous-unités β , induisant la liaison avec l'ATP et le dépliement de la boucle inhibitrice induisant une transphosphorylation (phosphorylation d'une sous-unité β par l'autre) sur des résidus tyrosine, activant ainsi complètement le récepteur. Ce mécanisme va permettre l'autophosphorylation du récepteur, mais aussi de protéines substrats (Insulin receptor substrat (IRS)) permettant l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire (Figure 11) (146).

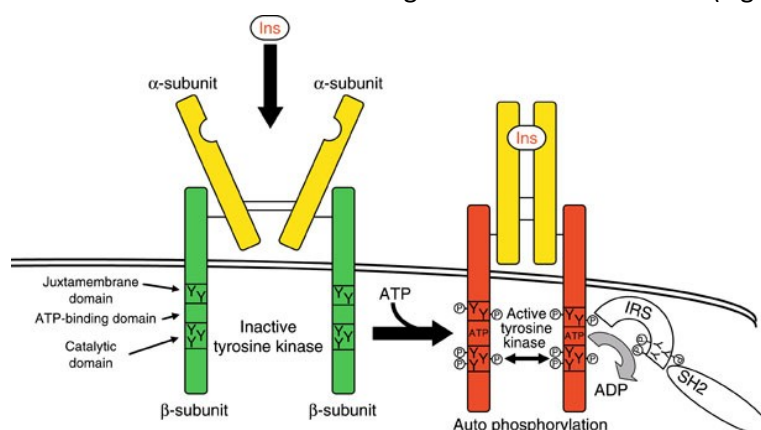


Figure 11 : Structure primaire du récepteur à l'insuline et de ses substrats (Adaptée de l'encyclopédie Molecular of pharmacology ; Insulin Receptor, de Barthel & Joost, 2008)

Le récepteur à l'insuline est un récepteur à tyrosine kinase composé de deux sous-unités α extracellulaire et de deux sous-unités β possédant des domaines extra et intra-cellulaires. La fixation de l'insuline sur son récepteur va permettre son activation à travers le rapprochement des deux sous-unités β permettant l'autophosphorylation du récepteur ainsi que la phosphorylation de ses substrats permettant l'activation des voies de signalisation intra-cellulaire.

I.4.2.2 Voie de signalisation de l'insuline

La phosphorylation des IRS, composés des 4 membres (IRS1-4) sur des tyrosines permet la fixation de protéines contenant un motif SH2 (Src-homology-2) tels que la PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), la CrkII ou encore SHP2. La fixation de ces protéines SH2 permet la régulation de l'activité ou de la localisation sub-cellulaire de ces kinases.

La principale voie de signalisation insulinique est celle de la PI3K (Figure 12) (147). L'activation de la PI3K permet la synthèse de la PIP₃ à la membrane plasmique, permettant le recrutement de la PDK (Phosphoinositide-dépendant kinase), qui, à son tour, va phosphoryler le résidu Thréonine308 de AKT (147). Cette phosphorylation d'AKT permet son activation et la phosphorylation de nombreuses protéines intra-cellulaires telles que les protéines de la famille des FOXOs (Forkhead Box O), TSC2 (tuberous sclerosis 2) GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) et TBC1D4 (RabGAP TBC1 domain family member 4). L'activation de ces différentes voies va permettre de moduler la production, l'utilisation et l'absorption de glucose, ainsi que la synthèse du glycogène, des lipides et des protéines à partir du glucose (Figure 12) (147).

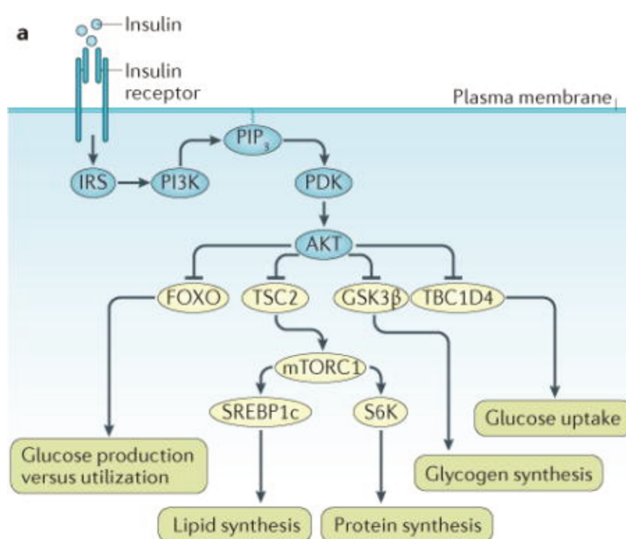


Figure 12 : Activation du récepteur à l'insuline et de sa signalisation intracellulaire (Adaptée de Haeuler et al., 2018,)

La fixation de l'insuline sur son récepteur va entraîner une cascade de phosphorylation et l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire à travers la phosphorylation de AKT par PDK. L'activation d'AKT par sa phosphorylation va entraîner la phosphorylation des protéines FoxO, Tsc2, Gsk3 β et TBC1D4. Ces effecteurs vont médiés les effets de l'insuline sur la production, l'utilisation et l'absorption de glucose par la cellule, mais également sur la synthèse de lipide, de protéine et de glycogène.

L'insuline permet la biosynthèse des vésicules transportant les transporteurs du glucose tels que GLUT4, mais également leur accrochage et leur fusion à la membrane plasmique (148). Ainsi l'inactivation de TBC1D4 par AKT permet l'activation de protéine RAB, protéine permettant la biogenèse et la fixation des vésicules transportant GLUT4 à la membrane plasmique (149) (Figure 12).

En plus de son rôle dans l'augmentation de la capacité de transport du glucose dans la cellule, l'insuline possède également de nombreux effets transcriptionnels par l'activation de nombreux facteurs de transcription, tels que FOXO1, SREBP1c (Sterol regulatory element-binding protein1) et CITED2 (CREB binding protein (CBP)/p300-interacting transactivator 2). Par exemple, en situation de jeûne, les protéines FOXOs hépatiques permettent l'expression de la glucose-6-phosphatase et inhibent la glucokinase, permettant la production de glucose hépatique. L'insuline, sécrétée en condition nourrie, va inactiver les FOXOs, permettant ainsi la diminution de la production hépatique de glucose (150). SREBP1C, dont l'activation par AKT est dépendante de la voie mTORC 1 (mammalian target of rapamycin complex I) va permettre la transcription d'enzymes impliquées dans la synthèse d'acides gras (151). Ainsi, l'insuline, à travers l'activation de sa voie de signalisation, va permettre de moduler l'homéostasie glucidique en fonction du statut nourrie/à jeûn (Figure 12).

II. Les diabètes, maladie de la cellule β pancréatique : Vue générale

II.1 Introduction

L'homéostasie glucidique permet le maintien d'une glycémie à jeun comprise entre 0,70 et 1,10 g/l et d'une glycémie inférieure à 1,40 g/l 1h30 après un repas. Un dérèglement de cette homéostasie conduit majoritairement à une pathologie nommée Diabète sucré. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le diabète est une pathologie qui touche plus de 450 millions de personnes dans le monde, ce qui représente environ 9% de la population adulte. On estime qu'environ 4 millions de personnes meurent tous les ans des complications du diabète, ce qui en fait la 7^{ème} cause de décès dans le monde (152). Les épidémiologistes estiment qu'en 2030, 578 millions de personnes seront atteintes du diabète et ce chiffre pourrait monter à plus de 700 millions de personnes en 2045. En France, on estime qu'environ 3,5 millions de personnes sont diabétiques.

Le Diabète se définit comme une hyperglycémie chronique à jeun ($>1,26$ g/l à jeun ou >7 mM) et résulte de la défaillance de l'ensemble des mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques permettant la régulation de la glycémie. Il se manifeste par une augmentation de la production d'urine (polyurie), accompagnée d'une soif importante (polydipsie). Il peut également s'accompagner d'une prise alimentaire importante (polyphagie) et d'une acido-cétose (153) (production anormale de corps cétoniques) pouvant entraîner une dyspnée de Kussmaul (153) (difficulté respiratoire profonde associée à l'acido-cétose). A long terme, l'hyperglycémie chronique entraîne une augmentation du risque de développer une pathologie cardio-vasculaire (154), des rétinopathies (155), des néphropathies (156), des neuropathies ainsi que des ulcères au pied pouvant mener à des amputations (157).

Il existe différents types de diabètes caractérisés par des mécanismes biologiques d'apparitions, des symptômes et des complications différents. Ainsi, nous retrouvons :

- Le diabète de type I, maladie auto-immune représentant moins de 10% des diabètes et survient principalement chez l'enfant
- Le diabète de type II qui représente environ 90% des cas de diabètes et survient principalement chez l'adulte de plus de 40 ans.
- Le diabète gestationnel est un diabète qui apparaît pour la première fois chez la femme enceinte et disparaît généralement après l'accouchement
- D'autres diabètes relativement rares comme les diabètes de type MODY (Maturity-onset diabetes of the young) ou les diabètes néonataux.

II.2 Le Diabète de type I

Le diabète de type 1 (DT1), également appelé diabète insulino-dépendant, est une maladie auto-immune (158) caractérisée par une concentration anormalement élevée de glucose dans le sang due à une déficience en insuline (hormone hypoglycémisante). Cette déficience est la conséquence de la destruction des cellules β pancréatiques (158), induite par la production d'auto-anticorps. Le DT1 représente environ 10% des diabètes dans le monde et se développe majoritairement chez les enfants (159). Néanmoins, il arrive parfois qu'un DT1 se déclenche à l'âge adulte. Chaque année, on estime à environ 100 000 nouveaux cas dans le monde. Le DT1 résulte de la combinaison de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux. Les patients atteints de DT1 vont commencer à présenter des autoanticorps dirigés contre différents antigènes, tels que l'insuline (160) ou GAD65 à partir d'environ 1 an, induisant l'activation de lymphocytes T cytotoxiques et entraînant la destruction progressive des cellules β . Des études de famille et de jumeaux suggèrent une hérédité des DT1 de 40 à 50% (161). Des études génétiques ont montré que des polymorphismes sont principalement liés à la région de l'antigène leucocytaire humain (HLA), cependant des études de « genome wide association studies » (GWAS) ont identifiés plus de 50 loci non HLA (162), notamment associés aux locus du gène PTPN22 (molécule impliquée dans la réactivité des cellules T et B) et du gène INS (Insuline). De plus, de nombreux facteurs environnementaux influencent l'apparition d'un DT1. Des études ont montré que les infections virales pouvaient contribuer au développement d'un DT1 (163), que la composition alimentaire donnée aux enfants pouvait être un facteur de risque pour prédisposer ou protéger au DT1 (164). Pour finir, il est maintenant bien établi que la composition du microbiote intestinal peut influencer l'apparition d'un DT1 ou au contraire en protéger l'apparition (165).

L'apparition du DT1 se fait en plusieurs étapes (Figure 13). L'étape 1 se caractérise par une perte progressive de cellules β pancréatiques due à l'auto-immunité dirigée contre ces cellules. Durant cette

étape, aucun symptôme et aucune modification de la glycémie ne sont observés. L'étape 2 se caractérise par une destruction d'environ 70 à 80% des cellules β , entraînant l'installation d'une hyperglycémie avec une absence de symptômes. L'étape 3 est la phase critique du développement de la maladie, avec une destruction de plus de 90% de la masse totale des cellules β induisant l'apparition des symptômes tels qu'une perte de poids, une polydipsie, la poliakiurie, l'augmentation de la sensation de faim, ... nécessitant la mise en place d'un traitement thérapeutique (Figure 13).

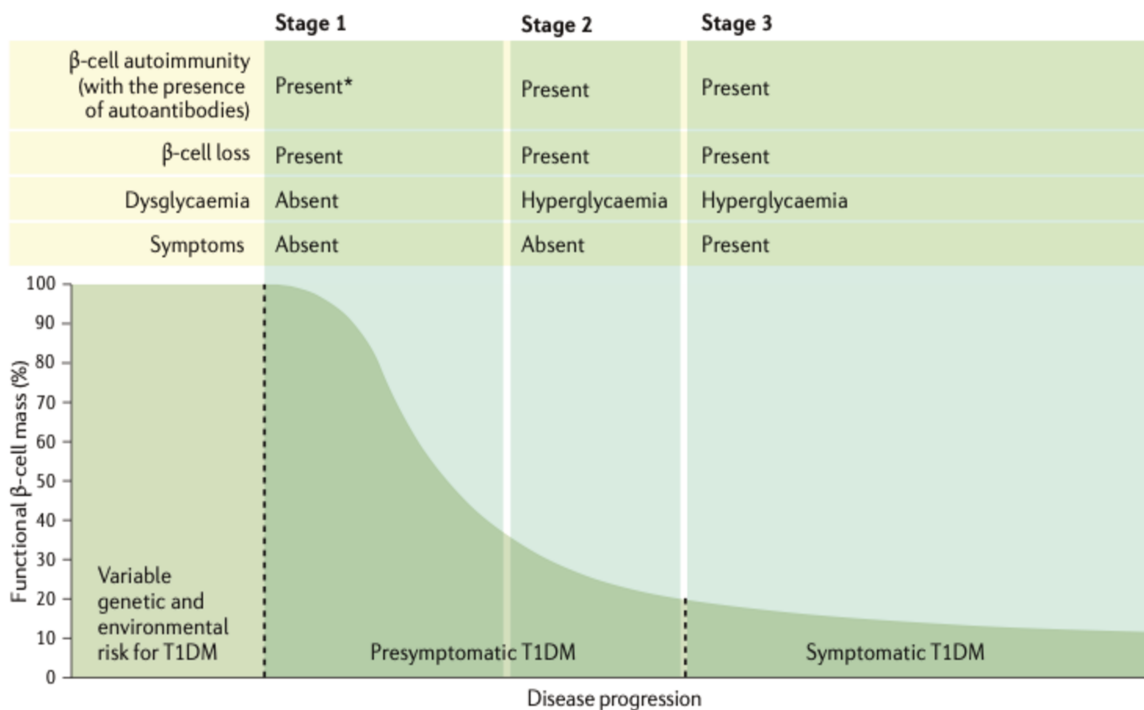


Figure 13 : Présentation des différentes étapes du développement d'un diabète de type 1 (Adaptée de Katsarou et al., 2017)

La première étape du développement du DT1 est une étape asymptomatique caractérisée par l'apparition d'auto-anticorps dirigés contre la cellule β pancréatique et le début de la diminution de la masse de cellules β . La phase 2 est toujours une phase asymptomatique caractérisée par une masse de cellules β faible et l'apparition d'une hyperglycémie chronique. Pour finir, l'étape 3 est la phase symptomatique avec la destruction de plus de 95% des cellules β , associée à une hyperglycémie chronique.

La première thérapie du DT1 a été l'injection d'insuline exogène, premièrement réalisée par Banting et Best en 1921 avec des extraits de sécrétion pancréas d'animaux, puis en 1922 la première injection d'insuline purifiée a été réalisée. Le schéma thérapeutique actuel du DT1 se concentre sur la combinaison d'une bonne hygiène de vie combiné à une administration exogène d'insuline à vie. Ce traitement reste néanmoins contraignant par la dépendance aux injections, la possibilité de développer une insulino-résistance, une obésité sévère et potentiellement l'apparition de troubles hypoglycémiques sévères suite à l'injection. Ainsi, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour rétablir la normoglycémie et une indépendance à l'insuline (166). Une des premières stratégies utilisées a été le développement de pompes à insuline et plus récemment de pancréas artificiel qui sont maintenant couplés à des systèmes de surveillance continue de la glycémie afin d'évaluer les fluctuations de la glycémie et d'ajuster en conséquence l'administration d'insuline

par la pompe (167). Quant au pancréas artificiel, il permet le suivi régulier de la glycémie et l'administration automatisée et contrôlée d'insuline et de glucagon, dans l'objectif de reproduire la physiologie pancréatique normale (168).

Le DT1 étant une maladie auto-immune, certaines immunothérapies se sont développées. La première approche a été d'utiliser la cyclosporine A, un inhibiteur des lymphocytes T (169). Suite à de nombreux effets secondaires, cet agent pharmacologique a été abandonné. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD3 et anti-CD20 et d'inhibiteurs de l'interleukine-1 (IL-1) se sont également montrés inefficace dans l'objectif de rétablir la normoglycémie (166). Actuellement, de nombreuses études visant les Lymphocytes T Régulateurs ou l'utilisation de peptides comme le GAD65 sont en cours de développement, mais ces approches continuent de présenter de nombreux effets indésirables.

La transplantation d'îlots est également apparue comme une méthode efficace pour traiter le DT1. Cette technique consiste à isoler les îlots d'un donneur décédé et de les transplanter dans le foie du receveur (170). Elle s'avère efficace pour restaurer la normoglycémie après 5 et 10 ans, mais nécessite un traitement immunosuppresseur à vie pour éviter le rejet des greffons. Néanmoins, il existe encore une possibilité de récurrence de l'auto-immunité des cellules β implantées (170). De plus, le taux de survie des greffons peut être encore assez faible en raison du stress cellulaire suite à une mauvaise vascularisation et une hypoxie, cependant de nombreuses études cliniques sont en cours d'évaluation afin d'améliorer ce problème (171).

Les cellules souches sont également une autre stratégie ciblée pour traiter le DT1 de par leur potentiel à fournir une source illimitée de cellules β , résolvant ainsi le problème de la disponibilité des îlots pour la transplantation. Deux types de cellules souches sont alors testées : les « Human embryonic stem cells » (hESCs) différenciées en cellules β à travers l'induction d'expression de facteurs de transcriptions spécifiques de la cellule β (172) ou les « induced pluripotent stem cells » (iPSCs) générées à partir de cellules somatiques selon le protocole de Yamanaka et différenciées en cellules β (173). L'utilisation d'hESCs présente néanmoins quelques limites notamment dans la génération d'une population stable de cellules et les limites éthiques de l'utilisation de ces cellules (174). Concernant les iPSC, une étape cruciale concerne l'amélioration du protocole de différenciation car de nombreuses études tendent à montrer que les cellules β formées ne sont pas complètement fonctionnelles (175).

Une des dernières stratégies utilisées pour restaurer la masse de cellules β est la transformation ou la reprogrammation de certains types cellulaires dans l'objectif de fournir des cellules β fonctionnelles. La première stratégie utilisée a été de transformer des cellules exocrines en cellules endocrines à travers la réexpression de certains marqueurs de cellules β dans ces cellules exocrines (176). D'autres études

ont montré qu'il est possible de transformer des cellules endocrines (cellules α et cellules δ) en cellules β à travers la réexpression de facteurs de transcriptions spécifiques à la cellule β (52, 73) ou l'utilisation d'agents pharmacologiques comme le GABA (177) ou l'artémisine (178). Pour finir, des études ont également montré la possibilité de former des cellules β à partir de cellules hépatiques ou intestinales toujours en induisant l'expression de marqueurs spécifiques de cellules β (56).

II.3 Le Diabète de type 2

II.3.1 Présentation du diabète de type 2

Le Diabète de type 2 (DT2), également appelé diabète non-insulino dépendant, est la forme la plus commune de diabète dans le monde ($\cong 90\%$) caractérisé par une hyperglycémie chronique causée par une insulino-résistance des tissus périphériques (muscles, foie, tissus adipeux, reins, ...) et une insulinopénie (179). De nos jours, on estime que plus de 400 millions de personnes dans le monde sont diabétiques et ce chiffre pourrait monter à 600 millions d'ici 2035 (180). Le diagnostic d'un DT2 s'effectue principalement par la mesure de la glycémie à jeun, glycémie aléatoire ou une heure après une administration orale de glucose. Plus récemment, la mesure de l'HbA1c (hémoglobine glyquée) est réalisée en clinique dans le diagnostic d'un DT2. Néanmoins, l'hémolyse ainsi que la durée de vie limitée des hématies peuvent faire de l'HbA1c une mesure invalide.

Autrefois, l'apparition d'un DT2 intervenait majoritairement autour des 40 ans. De par l'évolution sociétale et l'augmentation de l'obésité dans le monde, il est maintenant bien établi qu'un DT2 peut se développer chez l'enfant, l'adolescent et le « jeune adulte ». L'hyperglycémie chronique du DT2 est précédée d'un état prédiabétique caractérisé par un des éléments suivants : altération de la glycémie à jeun, altération de la tolérance au glucose ou une augmentation des concentrations d'hémoglobines glyquées A1C (HbA1c) (compris entre 5,7 et 6,4%). Il est estimé qu'environ 3 à 11% des patients prédiabétiques deviennent diabétiques au cours d'une année (181).

Le DT2 est une maladie multifactorielle impliquant la génétique et les facteurs environnementaux. L'identification des gènes responsable de l'apparition du DT2 a connu une percée en 2007 suite à l'apparition des GWAS. Ces études ont mis en avant que des SNPs (Single nucleotide polymorphism) au niveau du locus de *TCF7L2* (182) (également rapporté un an auparavant par des études de liaison génétique) sont associés avec l'apparition d'un DT2. Par la suite de nombreuses autres études ont mis en évidence la présence de SNPs dans le locus de nombreux gènes, tels que *KCNJ11*, *FTO*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *HHEX*, *IGF2BP* et d'autres (180). Néanmoins, il est estimé que ces mutations augmentent de seulement 10 à 20% le risque de développer un DT2 (180), le style de vie contribue à cette apparition. L'augmentation de l'indice de masse corporelle (reflet d'une augmentation de l'adiposité) est le facteur de risque principal du développement d'un DT2. La sédentarité et l'inactivité physique, la

surnutrition, le tabagisme et la consommation d'alcool sont d'autant de facteurs de risques liés au développement d'un DT2. On estime qu'environ 90% des DT2 sont potentiellement évitables en suivant un régime alimentaire sain permettant le maintien d'un BMI < 25 kg/m², en réalisant environ 30 minutes d'activité physique par jour, en évitant de fumer et en consommant de l'alcool avec modération (183).

Le développement d'un DT2 et l'hyperglycémie chronique conduisent à de nombreuses complications. En effet, les patients atteints d'un DT2 présentent de nombreux troubles micro et macro vasculaires induisant une augmentation de la probabilité d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux (184). Il est également retrouvé chez les sujets DT2 une augmentation de l'hypertension augmentant le risque de complications macrovasculaires. Les patients atteints d'un DT2 présentent également une augmentation du risque de développer une rétinopathie et on estime que le diabète représente la première cause de cécité au (185). La neuropathie diabétique est également une des complications du DT2 et entraîne une atteinte fonctionnelle et structurelle des nerfs, périphériques ou centraux provoquant de nombreux troubles de l'appareil locomoteur, digestif, urinaire et cardiaque (24286949). Pour finir, les néphropathies sont retrouvées dans plus de 50% de diabétiques et peuvent mener à l'apparition d'insuffisance rénale nécessitant la mise en place de dialyse.

La cause principale d'apparition d'un DT2 est une altération progressive de la sécrétion d'insuline par la cellule β , associée au développement d'une résistance à l'insuline des tissus périphériques tels que le foie, le muscle ou le tissu adipeux. L'augmentation des besoins en insuline suite à une insulino-résistance va être compensée par une adaptation de la cellule β , qui va augmenter sa sécrétion d'insuline et sa masse. Cette adaptation permet le maintien de la normoglycémie, néanmoins à long terme, il est observé une défaillance de cette compensation qui sera à l'origine du développement du DT2 (Figure 14) (186).

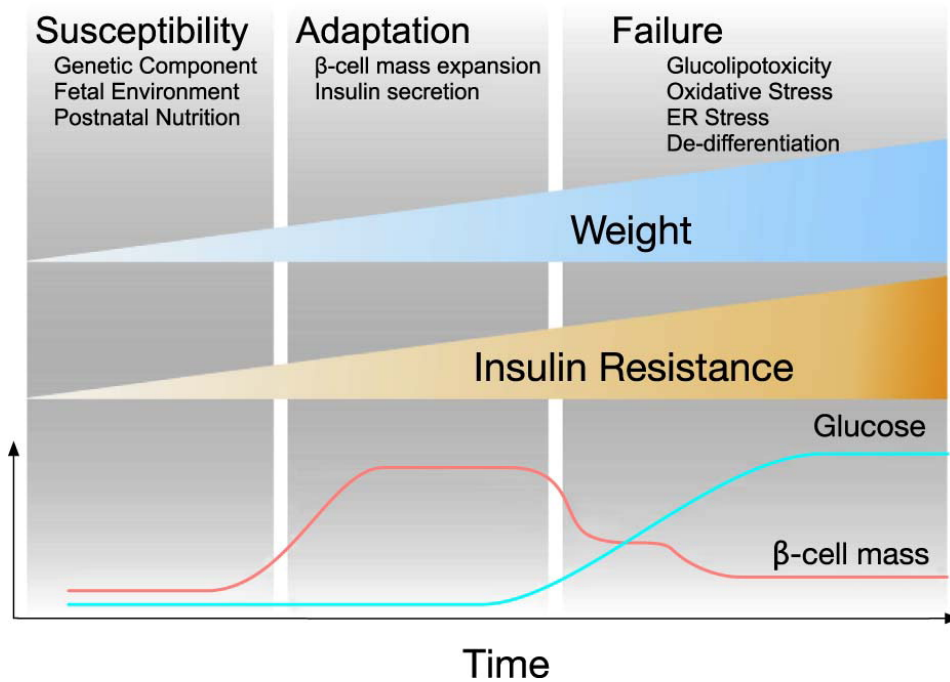


Figure 14 : Histoire naturelle du développement d'un diabète de type 2 (Adaptée de Alejandro et al., 2015)

L'évolution de la cellule β dans ce processus peut être divisée en 3 étapes : premièrement, certains individus naissent avec un haut risque de développer un DT2, notamment à travers des facteurs génétiques et environnementaux. Lors de l'augmentation de la prise de poids, la deuxième phase consistera en la phase d'adaptation de la cellule β pour compenser l'insulino-résistance suite à une prise de poids. Finalement les personnes vont développer une hyperglycémie chronique suite à l'échec de la cellule β à compenser l'insulino-résistance.

II.3.2 Mécanismes moléculaires et physiopathologiques du développement du DT2.

II.3.2.1 Présentation de l'insulino-résistance

L'insulino-résistance (IR) est un mécanisme important dans le DT2 et s'explique par une diminution de la réponse à l'insuline de ses tissus cibles (Muscles, foie, tissus adipeux, ...). L'apparition de l'insulino-résistance peut provenir de la génétique, mais également d'un environnement physiologique délétère.

Causes Génétiques du développement de l'insulino-résistance

Les premières mutations déterminées pouvant mener au développement de l'IR ont été identifiées au niveau du gène codant pour le récepteur à l'insuline. Elles correspondent à des mutations au niveau du domaine de liaison à l'insuline (domaine extracellulaire) et des mutations au niveau du domaine à tyrosine kinase intracellulaire (187).

La majorité des mutations permettant d'expliquer le développement de l'IR a été identifiée par GWAS. Cependant, la plupart des mutations identifiées par GWAS et liée aux mécanismes de sécrétion d'insuline. L'insulino-résistance étant fortement liée à l'obésité, disséquer le rôle des mutations fréquentes dans la résistance à l'insuline a longtemps été problématique (188). Le premier GWAS permettant d'identifier un variant génétique associé au développement de l'insulino-résistance a été effectué par le consortium GENESIS et a déterminé qu'un polymorphisme dans le gène *NAT2* (N-acetyltransferase 2) était associé à l'insulino-résistance (189). La relation fonctionnelle entre la

mutation de *NAT2* et le développement de l'IR a été démontrée dans la lignée cellulaire 3T3-L1 et dans un modèle de délétion génique de *Nat2* chez la souris. Ces souris présentent une diminution de la sensibilité à l'insuline (189). Par la suite, d'autres méta-analyses génétiques ont permis de mettre en évidence d'autres Loci associés au développement de l'IR, notamment sur les gènes : *PPAR γ* (peroxisome proliferator-activated receptor γ), *KLF14* (Kruppel-like factor 14) et de manière intéressante, une mutation a également été retrouvée au niveau d'IRS1 (Insulin receptor substrate 1) (188, 190).

Causes environnementales et physiopathologiques

La transduction du signal de l'insuline est complexe et implique l'action de nombreuses enzymes. Ainsi, toute modifications de l'activité de ces enzymes peut altérer la signalisation physiologique de l'insuline. En effet, l'état d'IR est globalement associé à une augmentation de la phosphorylation des sérines sur les IRS, inhibant ainsi la phosphorylation des tyrosines induisant l'IR (191) et pouvant provoquer leurs dégradation (192). Les causes de ces altérations sont multifactorielles comme l'accumulation ectopique de lipides, l'inflammation et le stress du RE.

L'une des causes principales de l'IR est ainsi l'accumulation ectopique de lipides et particulièrement des Acides gras libre (AGL), du Diacylglycérol (DAG) et des céramides dans le foie (193) et le muscle (194), mécanisme appelé Lipotoxicité.

Au niveau du muscle squelettique et du foie, les AGL entrent dans la cellule à l'aide de la « Fatty acid transport protein (FATP). L'acylCo-A à longue chaîne est ensuite capté par les mitochondries pour induire la β -oxydation et produire de l'ATP. L'accumulation d'AcylCo-A intracellulaire induit l'augmentation de la production de DAG et de céramide intracellulaire entraînant l'activation de la PKC θ et des protéines de la famille des JUNKs (Jun-Nterminal Kinase). Ces activations induisent la phosphorylation de résidus sérines sur les IRS inhibant ainsi la transduction du signal insulinique, diminuant le transport de glucose au niveau musculaire (195).

Au niveau hépatique, le mécanisme d'accumulation des acides gras induisant l'IR est similaire à celui observé au niveau musculaire. Cette accumulation entraîne l'activation de la PKC δ et de la PKC ϵ inhibant la voie de la PI3K. Ceci a pour effet de diminuer l'expression et l'activité de la Glycogen Synthase, l'entrée du glucose et de réduire les effets de l'insuline sur la production hépatique de glucose à travers l'augmentation de la phosphorylation de FOXO1. Cette phosphorylation induira sa translocation nucléaire et permettra l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse hépatique (196). L'accumulation ectopique d'acide gras est également responsable de l'activation de

la réponse UPR entraînant une diminution de la signalisation insulinique, notamment par l'activation de JNK (197, 198), induisant la perte d'activation de la PI3K en réponse à l'insuline.

L'augmentation de l'inflammation du tissu adipeux et du foie observée au cours du développement de l'obésité est également un mécanisme permettant favorisant le développement de l'IR. Au cours de l'obésité, il est observé une augmentation de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-6 ou le TNF- α , associée à une augmentation des macrophages résidents, au niveau des tissus cibles de l'insuline tels que le foie et le tissu adipeux (199-201). La production de cytokines pro-inflammatoires va induire l'activation des kinases IKK β , JNK1 et MAPK qui vont phosphoryler des résidus sérines sur IRS-1 (202, 203) et ainsi diminuer la signalisation de l'insuline intracellulaire. Ainsi, de nombreuses études ont ciblé l'activation de la voie du TNF, ce qui a pour effet d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez la souris (204). De plus, l'augmentation de l'infiltration de macrophages au niveau du tissu adipeux est un mécanisme important du développement de l'IR, caractérisé par une augmentation de macrophages de type M1 (pro-inflammatoires) suite à l'activation de lymphocytes T CD8⁺ (205), associée à une diminution de macrophages de type M2 (anti-inflammatoires) (206).

II.3.2.2 Mécanismes de compensation de la cellule β face à l'insulino-résistance

Le développement de l'insulino-résistance va entraîner une adaptation de la cellule β afin de compenser la perte des effets de l'insuline. Cette adaptation se fait par l'augmentation du nombre et de la capacité sécrétoire de la cellule β .

Chez la souris, un régime riche en graisse (mimant l'état d'obésité et d'insulino-résistance) pendant 3 à 6 mois va entraîner une augmentation de la masse des cellules β suite à leur prolifération (207). La prolifération des cellules β a été le premier mécanisme proposé comme pouvant expliquer l'adaptation de la cellule β suite au développement de l'IR. Des études ont mis en évidence que les cellules β existantes sont la source majeure de l'augmentation du nombre de cellules β (208). Récemment, il a été déterminé que les souris obèses (souris invalidées globalement pour le récepteur à la Leptine) présentent une augmentation massive de la masse de cellule β suite à une prolifération, mécanisme également retrouvé dans un modèle de souris insulino-résistantes (209). Plus récemment, nous venons de démontrer que la délétion du récepteur à la leptine, spécifiquement dans les tanocytes, entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline ((210), Annexe 4). Ces données suggèrent qu'il existe une communication inter-organe nécessaire au maintien de l'homéostasie métabolique, dérégulées dans le cadre de l'insulino-résistance. Dans ce contexte, ces mécanismes de contrôle de la prolifération et/ou de la fonction sont induits par de nombreux facteurs circulants, tels que le glucose (211), l'insuline (212), mais également le GLP-1, le GIP, l'hormone de croissance, ... (207). Ces facteurs circulants vont agir sur la cellule β en activant de nombreuses voies de signalisation cellulaires (AKT,

mTORC1, AMPK) qui, à leur tour, vont induire l'activation de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire, tels que CDK-4 (Cyclin dependant kinase 4) (213), Cycline D (214), p27 et p21 par exemple (186). L'expression et l'activation de ces facteurs permet l'induction du cycle cellulaire et la prolifération de la cellule β . Les connaissances actuelles concernant cette adaptation suggèrent donc que l'expansion des cellules β pour contrecarrer l'insulino-résistance est un processus complexe régulé par de nombreuses voies de signalisation.

Chez l'humain, les données suggérant une prolifération de la cellule β pour compenser l'IR sont plus limitées. Néanmoins, des études ont montré une augmentation d'environ 50 % de la masse des cellules β induite par l'obésité (215, 216). Contrairement à la souris, cette expansion des cellules β n'est pas liée à un phénomène de réplication, suggérant que, chez l'Homme, les nouvelles cellules β sont probablement néoformées par un mécanisme de néogenèse (217). Des études ont mis en évidence la présence de petits îlots de Langerhans, de cellules positives à l'insuline dans les canaux et des cellules positives à l'insuline seules chez des individus ayant développé une IR (218, 219). Un autre mécanisme pouvant expliquer l'augmentation de masse des cellules β pendant l'IR est la trans-différentiation de cellules endocrines (cellules α par exemple), mais également des cellules exocrines en cellules β afin de produire de l'insuline (220, 221). En cas d'IR, il a été montré que l'apparition de cellules bi-hormonales (Glucagon⁺/Insuline⁺) dans des îlots de grande taille, suggérant une tentative continue de l'organisme à répondre à une plus grande demande en insuline. Ces îlots développant des cellules bi-hormonales vont être moins fonctionnels que les plus petits îlots ne présentant pas de cellules bi-hormonales (222). Peu de choses sont encore connu dans les mécanismes de trans-différentiation au cours du développement de l'IR, mais récemment, une étude a montré l'existence de cellules β immatures présentes en périphérie de l'îlot dans une zone appelée « niche néogénique » (223). Ces cellules présentent une absence d'expression d'Urocortine-3 (Ucn-3) (représentant environ 1 à 2% de cellules β) et n'expriment pas certains marqueurs clé de la physiologie de la cellule β , tels que *G6pc2*, *Ero1b* et *Glut-2*, entraînant une absence de détection de glucose et de sécrétion d'insuline. Des études de lignage cellulaire ont montré que ces cellules représentent un état intermédiaire de la trans-différentiation de cellules α en cellules β , mais également de cellules β en cellules α (223). Récemment, des études ont montré que l'activation de la signalisation du GABA dans des îlots de souris permettaient d'induire la trans-différentiation de cellules α en cellules β (177, 178). Il a été montré le rôle important du GLP-1 produit au sein de l'îlot par les cellules α dans l'augmentation de la néogénèse de cellules β (224) et dans la trans-différentiation de cellules β en cellules α (225). Néanmoins, et malgré ces progrès, les mécanismes moléculaires et cellulaires permettant d'expliquer l'augmentation de la masse de cellules β au cours de l'IR restent, à l'heure actuelle, mal connus.

En plus d'augmenter sa masse, la cellule β est également capable d'adapter sa capacité sécrétoire lors du développement de l'IR. Cette adaptation s'explique par une meilleure sensibilité au glucose de la cellule β , s'accompagnant d'une accélération de l'oxydation du glucose et une augmentation de l'expression d'enzyme de la glycolyse au cours du développement de l'IR (226, 227). De plus, l'activité de certaines enzymes du cycle de Krebs est augmentée, permettant d'induire une plus grande production de métabolites mitochondriaux et la phosphorylation oxydative permettant une production accrue d'ATP (228) (Figure 15). En plus d'augmenter sa capacité à sécréter de l'insuline en réponse au glucose, la cellule β est capable de s'adapter en augmentant sa capacité d'oxydation des lipides, tout en évitant l'apport trop important d'AGL (Acide Gras Libre) induisant une toxicité cellulaire. L'augmentation de la synthèse de TGs dans la cellule β permet de fournir plus de substrats pour permettre la production de métabolites mitochondriaux. De plus, le catabolisme des TGs va produire des monoglycérides capables d'amplifier le mécanisme de sécrétion d'insuline (229) (Figure 15).

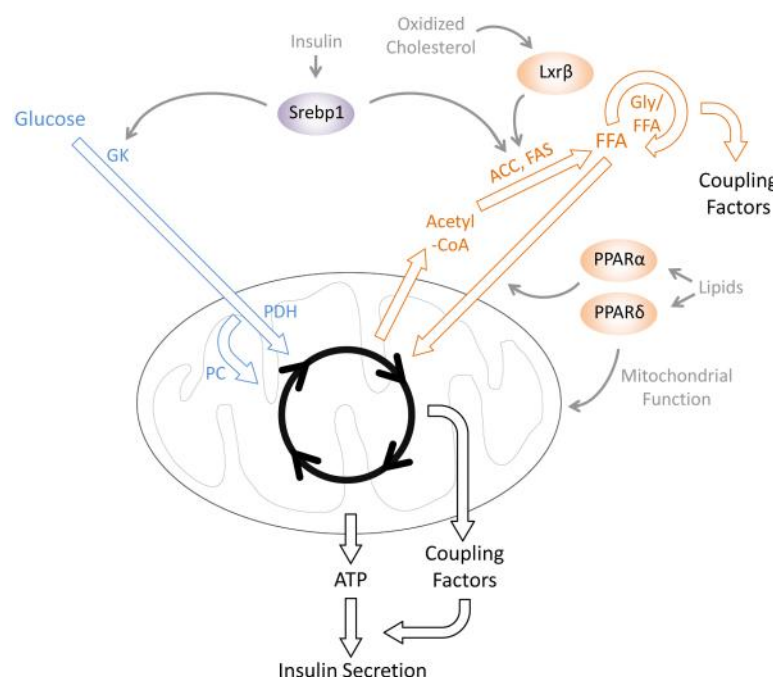


Figure 15 : Mécanisme de compensation fonctionnelle de la cellule β à contre l'insulino-résistance (Adaptée de Wortham & Sander., 2016, 27615135)

Au cours des phases de compensation, l'oxydation du glucose et des acides gras est accélérée, associée à une augmentation de la production d'ATP par la mitochondrie suite à une augmentation de son activité, induisant une augmentation de la sécrétion d'insuline.

Néanmoins, malgré la mise en place de nombreux mécanismes cellulaires permettant de compenser l'IR, il est constaté, chez les futurs diabétiques, un déclin fonctionnel et identitaire de la cellule β induisant une diminution de la sécrétion d'insuline et l'apparition d'une hyperglycémie chronique menant à un DT2.

II.3.2.3 Mécanismes physiologiques et moléculaires du déclin de la cellule β

Le déclin fonctionnel de la cellule β induisant l'apparition d'un DT2 s'expliquerait par 3 mécanismes : la diminution fonctionnelle de la cellule β , l'apoptose de la cellule β et la trans/dédifférenciation de la cellule β en un autre type cellulaire endocrine (230).

Les premières études démontrant une diminution de la sécrétion d'insuline lors d'une augmentation de la concentration en glucose des îlots de donneurs atteints de DT2 remontent aux années 1990. Cette diminution était accompagnée d'une diminution de l'oxydation du glucose (231, 232). Cette perte de sécrétion peut s'expliquer par une diminution d'expression du transporteur au glucose GLUT-1 et de la glucokinase dans des îlots de patients diabétiques (233), une augmentation de l'expression de l'Aldolase β , protéine associée négativement aux mécanismes de sécrétion d'insuline (234) (Figure 16). Il est maintenant bien établi que les mitochondries jouent un rôle majeur dans le dysfonctionnement de la cellule β au cours du DT2. Il a été observé une modification de la forme de la mitochondrie, rendant celle-ci moins efficace dans la production d'ATP (235) entraînant ainsi une hyperpolarisation mitochondriale et une diminution d'activité des enzymes mitochondriales impliqués dans la production d'ATP (236), accompagné d'une diminution de leur expression. L'expression de SUR1 et de CACN1D (canal calcique voltage-dépendant de type L, 1D), canaux permettant l'influx calcique et la sécrétion des granules d'insuline (237) est également diminuée chez les diabétiques de type 2. Enfin, il a récemment été montré que les cellules β provenant d'îlots de patients DT2 présentent un défaut d'expression de protéines du complexe SNARE, complexe protéique impliqué dans le mécanisme d'exocytose des granules d'insuline (186, 238) (Figure 16).

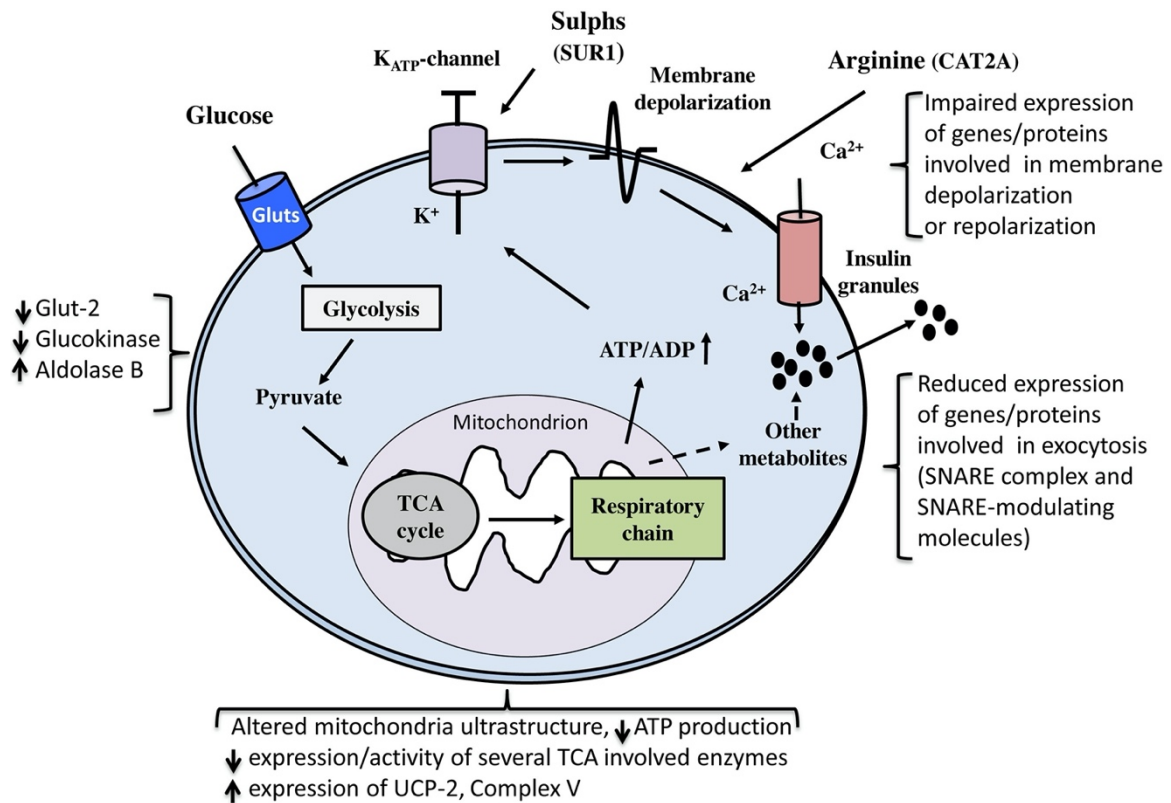


Figure 16 : Mécanismes de perte de fonction de la cellule β suite au développement de l'insulino-résistance (Adaptée de Marchetti et al., 2020)

L'apparition d'un diabète de type 2 est lié à un défaut de la cellule β à sécréter de l'insuline. Cette perte de sécrétion peut s'expliquer par une diminution de protéines impliquées dans le transport du glucose (Glut-2) et dans sa métabolisation (Glucokinase), associé à une augmentation de l'expression de l'Aldolase B. Ce défaut de sécrétion peut s'expliquer par une diminution d'expression de gènes impliqués dans la dépolarisation ou la repolarisation membranaire suite à la production d'ATP par le glucose, de gènes impliqués dans le processus d'exocytose des granules d'insuline. Pour finir, la structure de la mitochondrie, ainsi que sa capacité à produire de l'ATP est altérée dans les cellules β de patients diabétiques.

La mort des cellules β lors d'un DT2 est un autre mécanisme permettant d'expliquer l'échec de la cellule β à compenser l'IR. Il a été constaté dans de nombreuses études une augmentation de l'induction de l'apoptose dans la cellule β (217, 239), déterminée par des études de condensation complète de la chromatine nucléaire, une augmentation de l'activité des caspases 3 et 8, molécules clés dans l'induction de l'apoptose (240, 241). En plus de l'apoptose, il existe d'autres mécanismes permettant d'expliquer la mort cellulaire et notamment la macroautophagie. Ce mécanisme est caractérisé par l'apparition d'une macrovacuole à l'intérieur de la cellule. L'analyse d'îlots de Langerhans de patients diabétiques a démontré une augmentation du nombre de cellules endocrines présentant des macrovacuoles (242) entraînant la destruction de la cellule β pancréatique.

Récemment, la transdifférentiation ou la dédifférenciation de la cellule β ont été proposées comme mécanismes permettant d'expliquer la diminution de la masse de cellules β au cours du DT2. Ces hypothèses impliquent que, dans des conditions de stress, telles que la glucolipotoxicité, les cellules β pancréatiques perdent leur identité moléculaire et fonctionnelle, devenant ainsi incompétentes dans leur rôle et finissent par devenir des cellules indifférenciées ou d'autres types de cellules endocrines.

Chez la souris, les premières études *ex vivo* ont montré que les cellules α et cellules δ sont capables de se transdifférencier en cellules β (243). Chez l'humain, il a été constaté que le développement d'une insulino-résistance entraîne une augmentation du nombre de cellules bi-hormonales chez les sujets insulino-résistants (222), résultats également retrouvés dans des îlots humains à l'aide d'imagerie confocale et de cytométrie en flux (244). Les mécanismes sous-jacents à la trans/dédifférenciation des cellules β sont encore peu connus. Récemment, l'équipe de D.Accilli a démontré le rôle important de la protéine FoxO1 dans le maintien de l'identité de la cellule β (245). En conditions physiologiques, FoxO1 réside dans le cytoplasme. Lors d'un stress tels que l'hyperglycémie, FoxO1 est transloqué dans le noyau pour permettre de renforcer l'expression de gènes impliqués dans le maintien de l'identité de la cellule β . Lors d'un stress prolongé comme lors du DT2, l'expression de FoxO1 diminue, induisant la réexpression de marqueurs progéniteurs tels que *Ngn3* (Neurogenin-3), *Nanog*, *Oct4* (Octamer Binding-4) et *L-myc* diminuant ainsi la production d'insuline (67). Des études à l'aide de modèles murins permettant un lignage cellulaire a permis de mettre en évidence que ces cellules progénitrices sont capables de se transformer en d'autres types de cellules endocrines, et particulièrement en cellules α (67). Chez l'humain, il est évidemment impossible de réaliser un lignage cellulaire. Néanmoins à l'aide du marqueur de cellules progénitrices endocriniennes, ALDH1A3 (Aldéhyde déshydrogénase 1A3), une augmentation significative de cellules ALDH1A3⁺ a été détectée dans le pancréas d'humains de donneurs DT2 (246). De plus, l'expression de marqueurs de cellules β pancréatiques a été retrouvée dans des cellules exprimant le glucagon, montrant une nouvelle fois la capacité de la cellule β à changer son identité moléculaire et de devenir un autre type cellulaire, mécanisme permettant d'expliquer la diminution de la masse de cellules β observée au cours du DT2.

II.3.3 Les différents traitements thérapeutiques du DT2

Afin de contrer l'hyperglycémie chronique et restaurer la normoglycémie, de nombreux agents pharmacologiques ont été développés afin de cibler différents mécanismes permettant de diminuer la glycémie, tels que l'augmentation de la sécrétion d'insuline, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, la diminution de la production hépatique de glucose, la réabsorption intestinale et rénale de glucose ou encore l'injection d'insuline.

II.3.3.1 Modification des habitudes alimentaires et de l'activité physique

L'augmentation de la prévalence du DT2 étant associée à l'obésité, l'une des premières solutions envisagées afin de rétablir la normoglycémie est de modifier les habitudes alimentaires et diminuer l'apport calorique associée à une augmentation de l'activité physique des patients. En effet, de nombreuses études ont montré le rôle important de l'activité physique dans le contrôle de la glycémie. L'exercice permet de diminuer l'IMC (indice de masse corporelle), mais également d'augmenter la sensibilité à l'insuline, de diminuer l'HbA1c et d'augmenter le pic de consommation d'oxygène. Ces

modifications vont permettre d'améliorer les paramètres glycémiques et lipidique sanguins, la pression sanguine, diminuer les risques cardio-vasculaires (247). Concernant la modification des habitudes alimentaires, il est demandé au patient d'adopter un régime contenant des glucides à faible indice glycémique, associé à des aliments pauvres en acide gras. Ce régime s'est montré efficace pour induire à la fois une perte de poids et améliorer l'action de l'insuline et la tolérance au glucose (248). Cependant, il s'avère que la mise en place de ces modifications de prise alimentaire et de l'activité physique ne suffit pas à rétablir la normoglycémie, nécessitant ainsi la mise en place d'un traitement pharmacologique.

II.3.3.2 La metformine

La Metformine est un dérivé des biguanides et est l'antidiabétique le plus utilisé au monde. Il permet de supprimer la production hépatique de glucose réduisant ainsi la glycémie à jeun et l'HbA1c. La prise de Metformine permet de faire diminuer le poids ainsi que de diminuer le risque cardiovasculaire. Néanmoins, il possède deux effets secondaires indésirables : de nombreux troubles gastro-intestinaux ainsi qu'une augmentation de la production de lactate (180). La metformine active la voie de l'AMPK en activant, entre autres, SHP (Small heterodimer partner) et inhibe la phosphorylation de CBP (Creb Binding protein) (249). Ces deux mécanismes permettent de diminuer l'expression d'enzymes impliquées dans les mécanismes de gluconéogenèse, telles que la *G6pase* (Glucose 6 phosphatase), la *PEPCK* et la *PC* (Pyruvate carboxylase) (250). L'activation de l'AMPK induit l'inhibition de mTORC1, diminuant également la gluconéogenèse (251). D'autres études ont mis en avant que la Metformine permet également d'améliorer l'activité de GLUT1 au niveau des hépatocytes à travers l'activation d'IRS2 (Insulin receptor substrate 2) permettant la diminution de la glycémie (252). La Metformine possède également des effets sur l'absorption musculaire et intestinale du glucose et stimule la sécrétion de Glp-1 par les cellules L intestinales. Plus récemment, des études ont mis en évidence que la Metformine permettait de modifier la composition du microbiote intestinale permettant l'amélioration de la tolérance au glucose (253). Récemment, une étude a démontré que l'administration de Metformine permettait d'augmenter la production de GDF15 (Growth/differentiation factor 15), hormone diminuant la prise alimentaire et le poids de corps (254).

II.3.3.3 Les sulfamides hypoglycémiants

Les Sulfamides hypoglycémiants, tels que le Glibenclamide, permettent d'augmenter la sécrétion d'insuline, diminuant la glycémie et l'HbA1c à court et moyen terme. Les sulfamides sont également associés à une augmentation du poids de corps et peuvent induire de sévères hypoglycémies. Les sulfamides se fixent à la sous-unité SUR1 du canal potassique ATP-dépendant et induisent sa fermeture, entraînant la dépolarisation membranaire et un influx massif de calcium intracellulaire, ce qui permet l'exocytose des vésicules d'insuline (255). Les Meglitidines, composés de la Repaglinide et

la Nateglinide, ont été décrits comme des sécrétagogues de l'insuline à courte durée d'action administrés avant chaque repas et possédant le même mode d'action que les sulfamides. Même s'ils diminuent le risque d'hypoglycémie par rapport aux sulfamides, ils ne permettent pas de prévenir de la dysfonction de la cellule β et l'augmentation de l'HbA1c associée au DT2 (256).

II.3.3.4 Les agonistes du récepteur au Glp-1 ou incrétinomimétiques

De par les nombreuses fonctions métaboliques du GLP-1 (augmentation de la sécrétion d'insuline, diminution de l'appétit, diminution de la production hépatique de glucose, ...), de nombreux agents pharmacologiques ciblant la voie du GLP-1 et l'activation de son récepteur ont été développés. Le GLP-1 étant dégradé rapidement par la Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) (demi-vie <2 minutes), l'objectif a été de modifier la structure du GLP-1 pour le rendre plus résistant à la dégradation par la DPP-4 et diminuer le nombre d'injection nécessaire pour stabiliser la glycémie. Le premier agoniste approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) a été l'Exenatide en 2005, dérivé de l'exendine-4. Avec une demi-vie comprise entre 3 et 4h, l'Exenatide nécessite une double injection quotidienne (257). En 2009, la FDA a approuvé l'utilisation du Liraglutide (Victoza), dont la structure est proche de celle du GLP-1 humain mais composé d'un acide gras afin de diminuer sa dégradation, lui conférant ainsi une demi-vie de 13 h et nécessitant donc une seule injection journalière (258). Plus récemment, le Semaglutide développé par Novo Nordisk, a été accepté par la FDA. Le Semaglutide a 94% d'homologie avec le GLP-1 natif, possédant sur la Lysine26 un acide gras à 18C lui conférant une forte affinité avec l'albumine, ce qui réduit ainsi la clairance rénale. De plus, le Semaglutide présente une modification de l'AA en position 8, permettant de réduire l'action de la DPP-4. Ainsi, l'ensemble de ces modifications structurales lui confère une demi-vie de 6 jours, entraînant une seule injection hebdomadaire (259).

Les traitements aux analogues du GLP-1 augmentent l'insulinémie et font baisser la glucagonémie diminuant ainsi la production hépatique de glucose. Cependant, les agonistes du GLP-1R ont des effets secondaires bénins comme la nausée ou les vomissements. Il a été cependant déterminé que de nombreux sujets diabétiques de type 2 présentaient à terme une résistance au GLP-1, diminuant ainsi les effets bénéfiques de cette thérapie (260).

II.3.3.5 Les inhibiteurs de SGLT2

Les inhibiteurs de SGLT2 (sodium/glucose co-transporter 2) tels que le Dapagliflozine ou l'Empagliflozine, de la classe des gliflozines, vont bloquer l'absorption du glucose au niveau du tube rénal proximal (261). Ce mécanisme permet l'augmentation de l'élimination du glucose plasmatique à travers l'urine, diminuant la glucotoxicité et améliorant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Son efficacité hypoglycémiante est équivalente à celle de la Metformine et favorise également la perte de poids. Le Dapagliflozine présente une demi-vie de 13,8h et nécessite donc une

administration journalière. Ce traitement peut être associé avec d'autres médicaments antidiabétiques tels que les agonistes du GLP-1R, la Metformine et l'insuline. Néanmoins, en cas de néphropathie sévère, l'efficacité de ce traitement est réduite (180). De plus, les inhibiteurs de SGLT2 possèdent de nombreux effets indésirables tels que le risque accru d'infection des voies uro-génitales, une hypotension, une déshydratation avec pollakiurie (envie fréquente d'uriner), polyurie et nycturie. De plus, l'inhibition de SGLT2 va augmenter la production endogène de glucose (262) suite à une augmentation de la sécrétion de glucagon (263). Ce mécanisme s'explique par l'expression de SGLT2 à la membrane des cellules α (263). Cependant, une étude récente a montré que le co-traitement d'un inhibiteur de SGLT2 avec le Liraglutide (Agoniste du récepteur au Glp-1) réduit l'hyperglucagonémie induite par l'inhibition de SGLT2 par un mécanisme dépendant de la sécrétion de somatostatine par la cellule δ (264).

II.3.3.6 L'insuline

Si les antidiabétiques ne parviennent pas à normaliser l'HbA1c, les patients atteints de DT2 doivent être traités avec des injections d'insulines à forte dose (>80 à 100 unités par jour). L'insulinothérapie peut être associée aux thiazolidinediones (qui augmentent la sensibilité à l'insuline mais non autorisé en France), ou à la Metformine, ce qui permet d'améliorer le contrôle glycémique et réduit ainsi la dose d'insuline injectée. L'insulinothérapie peut également être combinée aux agonistes du GLP-1R, ce qui permet une forte réduction de l'HbA1c et favorise la perte de poids. Néanmoins, l'insulinothérapie n'est utilisée qu'en dernier recours car elle peut causer de sévères hypoglycémies.

II.4 Les diabètes de type « MODY »

Les diabètes de type MODY (Maturity-onset diabetes of the young) ont été reporté pour la première fois en 1974 comme étant un diabète familial avec une hérédité autosomique dominante, avec apparition avant l'âge de 45 ans, absence d'auto-anticorps des cellules β , absence de résistance à l'insuline et une sécrétion d'insuline normale. Ils représentent entre 1 et 5% des cas de diabètes et certaines mutations sont plus fréquemment retrouvés en fonction des populations (265).

Les premières méthodes de diagnostic des MODY sont arrivées dans les années 1990 et des mutations associées à un MODY ont été découvert dans 14 gènes différents, dont 6 codent des protéines importantes pour la fonction de la cellule β (266) : Hepatocyte nuclear factor 4 α (*HNF4 α*), Glucokinase (*GCK*), *HNF1 α* , *PDX1*, *HNF1 β* , et Neurogenic differentiation 1 (*NEUROD1*), correspondant aux MODY 1 à 6, respectivement. Les 8 autres gènes affectés par des mutations pouvant entraîner le développement d'un MODY, classés de 7 à 14 sont : Kruppel-like factor 11 (*KLF11*), Carboxyl ester lipase (CEL), Paired-Box containing gene 4 (*PAX4*), *INS*, B-lymphocyte kinase (*BLK*), Adenosine triphosphate binding cassette sub-family C member 8 (*ABCC8*), potassium channel J member 11

(*KCNJ11*), Adaptator protein phosphotyrosine interaction pH domain and leucine zipper containing 1 (*APPL1*). Ces mutations entraînent un défaut de la fonction de la cellule β , induisant le développement d'une hyperglycémie chronique et l'apparition d'autres symptômes (265). Chaque type de MODY peut être soigné à l'aide des thérapeutiques utilisées dans le traitement du DT2.

II.5 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel (DG) est défini comme une intolérance au glucose survenant au cours de la grossesse et provoquant une hyperglycémie de sévérité variable. La prévalence d'apparition du DG est différente à travers le monde mais elle oscille entre 9 et 26% (267). En France, il est recommandé de dépister le DG le plus tôt possible s'il existe des facteurs de risques (obésité, antécédents de diabètes familiaux, ...). Le dépistage se fait à l'aide d'un test de glucose par administration orale et la glycémie est mesurée à jeun, 1h et 2h après l'administration. Un DG est diagnostiqué si la glycémie est supérieure à 95, 140 et 120 mg/dl, respectivement (268). L'HbA1c peut également être un critère important pour détecter le DG, mais reste souvent dans les concentrations standard (269). Certains facteurs de risques peuvent mener au développement d'un DG, souvent identiques à ceux observés pour le développement d'un DT2, à savoir l'âge maternel, l'obésité, la provenance ethnique, l'histoire familiale liée au DT2 et le développement d'un DG lors d'une première grossesse. Le DG entraîne de nombreuses complications pour le fœtus, notamment une hypoglycémie du nouveau-né, une détresse respiratoire, une malformation fœtale et une augmentation du taux de mortalité. Au moment de l'accouchement, un DG est associé à un risque accru de pré éclampsie sévère (270).

Lors d'une grossesse normale, la sensibilité à l'insuline diminue (271) avec augmentation de la production hépatique de glucose. Suite au développement de l'insulino-résistance (272), provoquée par l'action de facteurs placentaires tels que l'hPI (Lactogène placentaire humain), la progestérone et les œstrogènes, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est augmentée en première et seconde phase d'environ 300% pendant l'ensemble de la durée de la gestation. Ainsi, la plasticité des cellules β suite au développement de l'insulino-résistance est la marque de la régulation normale de l'homéostasie glucidique au cours de la grossesse. Néanmoins, une mauvaise adaptation de ces cellules β peut mener au développement d'un DG car la sécrétion d'insuline est insuffisante (273). Malgré cela, la plupart des femmes retrouvent leur glycémie pré-gestationnelle peu après l'accouchement. Cependant, certaines femmes peuvent continuer de présenter une hyperglycémie, représentant probablement la catégorie de femmes présentant un DT2 non diagnostiqué avant le début de la grossesse (274). Après l'accouchement, l'allaitement a pour effet d'améliorer le poids et la tolérance au glucose (275).

III. Le Glucagon-Like Peptide 1, le GLP-1

III.1 Présentation des incrétines et du GLP-1

Le concept que certains facteurs produits par l'intestin après un repas sont capables de stimuler la sécrétion des hormones pancréatiques afin de contrôler la glycémie provient du début des années 1900 (276). La première incrétine détectée a été le « Gastric inhibitory polypeptide » (GIP), et a été décrit comme ayant un rôle dans les sécrétions acides de l'estomac, puis dans la stimulation de la sécrétion d'insuline chez l'animal et l'humain (277). Le GIP est sécrété par les cellules K intestinales en réponse au glucose ou aux acides gras ingérés lors d'un repas afin de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de la concentration plasmatique de glucose. Par la suite, une seconde incrétine a été découverte, le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1). Sa découverte provient du clonage et du séquençage du gène du proglucagon. En effet, ce gène en plus du glucagon, permet la production de deux autres peptides, le GLP-1 et GLP-2 possédant environ 50% d'homologie avec le glucagon (Figure 8). Le gène du proglucagon est situé sur le chromosome 2 chez l'humain (278) et la souris (276). Il est composé de 6 exons et 5 introns et le Glp-1 est codé au niveau de l'Exon 4 (Figure 8). Ce gène est exprimé dans différents types cellulaires distinct :

- Les cellules L-intestinales, situées principalement au niveau de l'iléon et du colon, même si une faible proportion de ces cellules sont présentes au niveau du duodénum et du jéjunum (279)
- Les cellules α pancréatiques (87)
- Certains types de neurones sont également capable d'exprimer le gène du proglucagon permettant l'expression du GLP-1. On retrouve ces neurones principalement dans le noyau du tractus solitaire et le bulbe olfactif (280).

L'ARNm du proglucagon est traduit en un seul précurseur pouvant donner naissance à plusieurs protéines différentes. Ainsi, la formation de ces différents peptides sera induite par un mécanisme post-traductionnel complexe. Différentes prohormone convertase (PC1/3 et PC2) sont importantes pour le clivage du proglucagon (88) en GLP-1. Il a été déterminé que différentes formes de GLP-1 pouvaient être sécrétées *in vivo*, le GLP-1 (1-37), GLP-1 (1-36)NH₂ deux isoformes inactives, tandis que le GLP-1 (7-37) et le GLP-1 (7-36)NH₂ (majoritaire dans la circulation sanguine) sont considérés comme biologiquement actifs (Figure 8).

Le Glp-1 est un peptide composé d'environ 30 à 40 peptides avec un domaine N-terminal formant une structure semblable à une bobine enroulée aléatoirement tandis que la partie centrale de ce peptide a une structure hélicoïdale. De manière intéressante, les AAs hydrophobes en position 6 et 10, ainsi que l'AA à chaîne courte en position 7 forment un motif qui facilite l'interaction du GLP-1 avec son récepteur.

Néanmoins, la demi-vie du GLP-1 actif est de moins de 2 minutes car il est dégradé par la Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). La DPP-4 est une enzyme ubiquitaire qui va cliver les peptides contenant un résidu alanine ou proline en position 2 par rapport à la partie N-terminal du peptide le rendant ainsi complètement inactif (281). La DPP-4 a été retrouvée à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins ce qui entraîne une rapide dégradation du GLP-1 suite à son relargage dans le système sanguin.

Le GLP-1 est sécrété suite à l'absorption de sucres ou de gras lors d'un repas (une injection intraveineuse de glucose n'entraînera pas de sécrétions de GLP-1). La sécrétion du GLP-1 est biphasique, une première phase de sécrétion aura lieu environ 10 à 15 minutes après le repas alors que la deuxième phase de sécrétion se déroulera environ 30 à 60 minutes après (282). Le GLP-1 étant majoritairement sécrété par les cellules L intestinales (présentes dans la partie distale de l'intestin), il est peu probable que la première phase de sécrétion du GLP-1 par les cellules L soit dépendant de l'ingestion de sucres ou de gras. Des études ont montré le rôle important de certains neurotransmetteurs tels que l'acétylcholine ou encore la gastrin-releasing peptide (GRP) dans la première phase de sécrétion chez l'humain et les rongeurs. De plus, chez le rat, l'activation du nerf vague est un des mécanismes permettant d'expliquer la première phase de sécrétion du GLP-1 (283).

Au niveau de la cellule L intestinale, la sécrétion de Glp-1 est stimulée par de nombreux signaux intracellulaires. L'entrée du glucose, via le transporteur du glucose GLUT2 et le co-transporteur sodium-glucose 1 (SGLT1), va permettre la production d'ATP par glycolyse, cycle de krebs et phosphorylation oxydative. L'accumulation intracellulaire d'ATP va entraîner la fermeture d'un canal potassique dépendant de l'ATP induisant une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation permet l'ouverture d'un canal calcique voltage dépendant induisant une entrée massive d'ions Ca^{2+} au niveau intracellulaire qui entraîne l'exocytose des granules et le relargage du GLP-1 dans la circulation sanguine (Figure 17) (284).

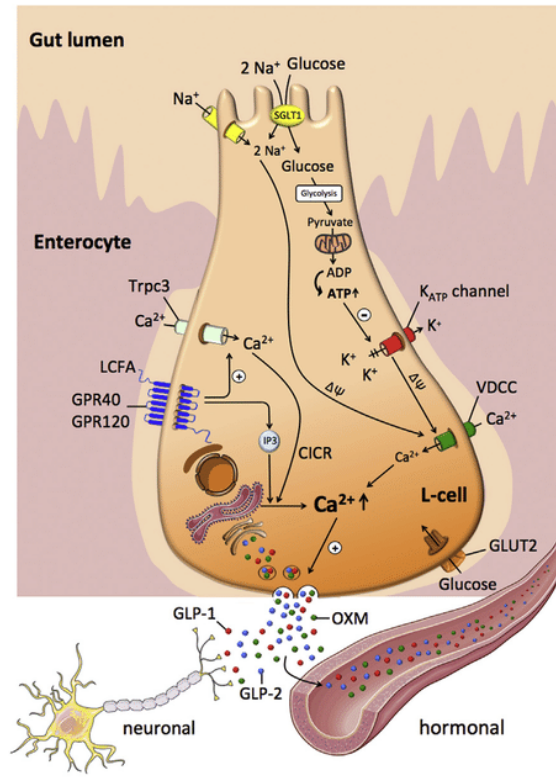


Figure 17 : Représentation schématique du mécanisme de sécrétion du Glp-1 par les cellules L intestinales (Adaptée de Müller et al., 2019)

Les cellules L intestinales vont sécréter du Glp-1 en réponse à la prise alimentaire et l'augmentation de la glycémie. Le glucose rentrera par la cellule via Glut-2 ou SGLT1 puis sera métabolisé en ATP au sein de la mitochondrie entraînant la fermeture du canal potassique ATP dépendant, l'ouverture de canaux calciques et un influx massif de calcium dans la cellule. Couplé au relargage du calcium par le RE, l'accumulation de calcium intracellulaire va permettre la fusion des vésicules de Glp-1 à la membrane et le relargage dans la circulation sanguine.

De plus, les cellules L intestinales sont capables de sécréter du GLP-1 en réponse aux acides gras. En effet, certains récepteurs tels que GPR120 et GPR40 sont activés par la fixation des acides gras à longues chaînes permettant l'ouverture des canaux TRPC3 (Transient receptor potential cation channel subfamily C Member 3) induisant une entrée de calcium intracellulaire et activant la voie IP3 permettant le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (Figure 17).

Pour finir, certains facteurs hormonaux peuvent induire la sécrétion de Glp-1 par les cellules L intestinales. Premièrement, le GIP stimule la sécrétion de GLP-1, ainsi que la cholecystikine (285). De plus, ces cellules expriment le récepteur à la leptine (hormone produite par le tissu adipeux) et la leptine induit la sécrétion du Glp-1 chez le rongeur et l'humain.

III.2 Le récepteur au GLP-1

Le GLP-1 est un peptide qui va exercer son action biologique après fixation à son récepteur au niveau de la membrane cellulaire. Le GLP-1 récepteur (**GLP-1R**) est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) (286) composé de 463 acides aminés (AA) avec une homologie de séquence de 90% entre la souris et l'humain. C'est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine G α s

augmentant les niveaux d'Adénosine monophosphate cyclique (AMPC) par activation de l'Adénylate cyclase (AC). Ce récepteur est composé de 7 hélices transmembranaires avec une partie C-terminale intracellulaire de 120 AAs et une partie N-terminale extracellulaire (287). La maturation du GLP-1R se fait au niveau du réticulum endoplasmique (RE), la partie N-terminal contient une petite séquence lui permettant sa translocation à la membrane plasmique et qui sera clivé par une peptidase (288). Lors de sa biosynthèse dans le RE, la partie N-terminal extracellulaire (ECD : Extra cellular domain) va contenir une courte séquence codant un peptide signal permettant la translocation du récepteur à travers le RE jusqu'à la membrane plasmique de la cellule (287). Après translocation, ce peptide signal sera clivé par une peptidase, le récepteur au GLP-1 sera fonctionnel et complet avec l'hélice N-terminale au début du domaine extracellulaire et quatre brins β formant deux feuilletts antiparallèles connectés par des ponts disulfures entre des résidus de Cystéines (287). Des études de cristallographies du GLP-1R ont montré que le GLP-1 se fixait à l'aide de sa région α -hélicoïdale à la partie N-terminale du GLP-1R (289) entraînant alors l'activation du GLP-1R par la liaison des résidus N-terminaux du Glp-1 avec les hélices transmembranaires et les boucles extracellulaires du récepteur (290). Néanmoins, un deuxième mécanisme de fixation du GLP-1 sur son récepteur a été proposé. Le GLP-1 activerait le GLP-1R par fixation entre les hélices V et VI, créant un site de liaison possible pour la protéine G et favorisant son activation (291). Cette activation stimule la formation de l'AMPC à travers la signalisation de la protéine G, augmentant le niveau de Ca^{2+} intracellulaire et active différentes voies de signalisation, tels que la voie des Extracellular signal-regulated kinases 1 et 2 (ERK 1 / 2) par le recrutement des β -arrestines (292), de la PKA, de la PI3K, ... Après activation du récepteur, le signal doit être interrompue et la sensibilité du récepteur à s'activer de nouveau doit être restaurée. La désensibilisation sera réalisée par un couple de sérine/thréonine kinases. Les kinases dépendant du second messenger (AMPC) et les kinases du récepteurs couplés aux protéines G (GRKs) phosphorylant le récepteur induisant le recrutement de l'arrestine, se liant au récepteur et empêchant le couplage du récepteur à une nouvelle protéine G (293).

Le GLP-1R est exprimé dans de nombreux tissus. Après avoir découvert que le GLP-1R était exprimé dans une lignée d'insulinome de rat, des études ont montré qu'il était également exprimé dans les cellules β et δ des îlots de Langerhans, les tissus adipeux, certaines zones neuronales tels que le bulbe olfactif, l'amygdale, le noyau accumbens ... Son expression est également retrouvée au niveau des artères du rein et des poumons, au niveau du cœur (uniquement dans les cellules du nœud sino-auriculaire), ainsi que dans les glandes de Brunners de l'estomac. Son expression est néanmoins controversée dans les cellules α des îlots de Langerhans (284). Des études de « single cell RNA-seq » (scRNAseq) ont montré que l'ARNm du *Glp-1r* n'est pas présent dans les cellules α (294), alors que

l'utilisation d'un agoniste du GLP-1R fluorescent (Luxendin645) montre que le GLP-1R est présent à la surface membranaire d'environ 18% des cellules α (295).

De par ses effets importants dans l'homéostasie glucidique, de nombreuses études se sont intéressées aux effets de la perte d'expression du *Glp-1r* dans l'ensemble de l'organisme. Premièrement, ces souris sont viables et présentent une hyperglycémie à jeun avec une gluco-intolérance lors de tests au glucose par administration orale associée à une diminution de la sécrétion d'insuline (296). De manière paradoxale, les souris *Glp-1r*^{-/-} soumises à un régime riche en graisse sont plus maigres mais présentent une intolérance au glucose plus marquée (296).

De par ses nombreux effets métaboliques bénéfiques sur l'ensemble de l'organisme, le Glp-1 et le développement de nombreux agonistes ont vu le jour en thérapeutique. Outre les effets de l'activation du Glp-1r qui potentialise la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de la glycémie, le Glp-1 va posséder également de nombreux autres effets bénéfiques sur la cellule β et sur d'autres tissus de l'organisme ayant un rôle métabolique important tels que le foie, le muscle ou les tissus adipeux par exemple (297).

III.3 Effets à court terme du Glp-1 sur la fonction de la cellule β

III.3.1 Rôle du Glp-1 dans la sécrétion d'insuline

Comme indiqué auparavant, la fixation du Glp-1 sur son récepteur va permettre l'activation de l'adénylate cyclase induisant une augmentation des taux d'AMPc intracellulaire. Dans un premier temps, l'AMPc va stimuler l'activité de la protéine kinase A (PKA) (298) entraînant la phosphorylation de la sous-unité β_2 des canaux voltages dépendant de type L. La diminution d'activité de la PKA entraîne une perte de la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au Glp-1 (299). De plus, la PKA induit la phosphorylation des sous-unité KIR6.2 et SUR1 des canaux potassiques ATP-dépendant augmentant leur sensibilité à l'ATP, induisant une fermeture de ses canaux, dépolarisant ainsi la membrane plasmique de la cellule β pancréatique et permettant l'ouverture des canaux calciques voltages dépendant (CCVD) (Figure 18). Cet influx intracellulaire de calcium permet l'exocytose des granules d'insuline. De plus, la PKA inhibe les canaux potassiques voltages dépendants empêchant la repolarisation membranaire, stimulant l'influx calcique intracellulaire. De plus, des études ont montré que la PKA permet d'augmenter la mobilisation des granules d'insuline par une augmentation de l'absorption du glutamate dans les granules, potentialisant leur exocytose (300). De manière intéressante, une autre protéine kinase, la PKC (Protéine kinase C) joue un rôle dans l'effet insulino-trope du GLP-1. En effet, après activation du Glp-1r, la PKC sera activée entraînant l'activation des canaux Trpm4 (Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4) et Trpm5. Cette activation permet la dépolarisation membranaire entraînant une entrée massive de calcium

intracellulaire (301). L'effet insulinothrompique du Glp-1 n'est pas uniquement dépendant de l'activation de la voie de signalisation des protéines kinases A et C. Il est considéré qu'environ 50% de l'insuline sécrétée en réponse au Glp-1 est médiée par la voie de signalisation des protéines Epac (Exchange protein activated by cAMP). Ces protéines sont composées d'un domaine de liaison à l'AMPc permettant leur activation (302). Cette activation de Epac 1 et 2 dans la cellule β stimule la libération du calcium contenu dans le RE via l'activation du canal Ryr1 (Ryanodine receptor 1), augmentant la concentration intracellulaire de Ca^{2+} et favorisant la sécrétion d'insuline. Epac2 est capable également de se fixer à la sous-unité SUR1 du canal potassique ATP dépendant. Lors de l'augmentation des taux d'AMPc intracellulaire, cette fixation est rompue, entraînant le relargage d'Epac2 qui pourra se fixer à d'autres protéines impliquées dans le transport des vésicules d'insuline tels que Rim2 et le senseur de calcium Piccolo. Le complexe Epac2/Rim2/Piccolo interagit avec la protéine Rab3, présente à la membrane des granules d'insulines, faisant diminuer le pH des granules d'insulines par entrée d'ions Cl^- (Figure 16).

De plus, le Glp-1 va pouvoir exercer ses effets insulinothrompes par l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique. Dans une lignée d'insulinome de rat (RIN1046-38), il a été montré que le Glp-1 est également capable d'augmenter l'expression du transporteur au glucose, Glut1, ainsi que de l'Hexokinase-1, deux protéines clés impliquées dans le mécanisme de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (303). De plus, le Glp-1 est capable d'augmenter l'expression de *Kir6.2*, sous-unité du canal potassique impliquée dans la sécrétion d'insuline (304) démontrant une nouvelle fois le rôle important du Glp-1 dans les mécanismes de sécrétion d'insuline.

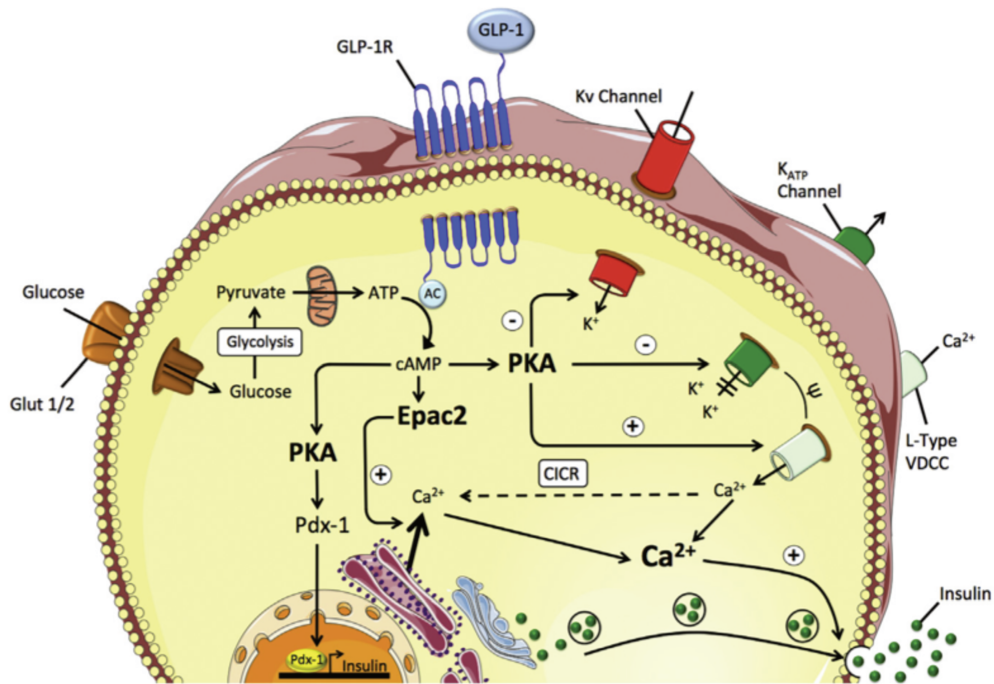


Figure 18 : Représentation schématique des effets du Glp-1 sur la production et la sécrétion d'insuline par la cellule β (Adaptée de Müller et al., 2019)

L'activation du Glp-1r sur la cellule β va induire l'augmentation de la production d'AMPC qui peut avoir plusieurs rôles. Premièrement, l'AMPC peut activer la Pka qui va induire la translocation de Pdx-1 dans le noyau et ainsi permettre la transcription du gène de l'insuline et l'augmentation de sa biosynthèse. L'activation de la Pka peut également conduire à la fermeture du canal potassique ATP dépendant et l'ouverture de canaux calciques voltage dépendant permettant l'augmentation de l'entrée de calcium intracellulaire et la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Pour finir, l'AMPC va stimuler l'activité de la protéine Epac2 permettant le relargage de calcium du réticulum endoplasmique et ainsi augmenter la concentration en calcium intra-cellulaire et la fusion des vésicules d'insuline à la membrane.

III.3.2 Rôle du Glp-1 dans la biosynthèse de l'insuline

En plus d'avoir un rôle dans la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique, le Glp-1 joue un rôle important dans la synthèse d'insuline. Premièrement, le Glp-1 est capable d'augmenter le niveau de transcrits du gène de l'insuline dans une lignée cellulaire d'insulinome de rat (305). Cette augmentation d'expression est induite par Pdx1, facteur de transcription clé, impliqué dans le développement du pancréas et dans le contrôle de l'expression du gène de l'insuline. L'activation de la Pka par un traitement au Glp-1 entraîne une augmentation de l'expression de Pdx1, accompagnée d'une augmentation de sa translocation nucléaire et de sa fixation au promoteur du gène de l'insuline ((306), Figure 18). De plus, le GLP-1 va stimuler l'activité du facteur de transcription Nfat (Nuclear factor of activated T-cells) qui est capable de se fixer sur le promoteur du gène de l'insuline et d'induire son expression (307).

Les effets à court terme du Glp-1 sont plutôt en lien avec les mécanismes de sécrétion d'insuline par la cellule β . Néanmoins, les effets chroniques du Glp-1 (comme lors d'un traitement aux agonistes du GLP-1R lors d'un DT2) peuvent avoir de nombreux rôles bénéfiques sur la cellule β , notamment en stimulant la prolifération et en inhibant l'apoptose.

III.4 Effets chroniques du Glp-1 sur la cellule β pancréatique.

III.4.1 Effets du Glp-1 sur la néogenèse des cellules β

La masse des cellules β au sein de l'îlot de Langerhans est maintenue par une balance entre la prolifération et l'apoptose. L'augmentation du nombre de cellules β se fait par la prolifération des cellules β déjà existante ou à travers la différenciation des cellules progénitrices provenant des canaux, mécanisme appelé néogenèse. L'amélioration du contrôle de la glycémie par le Glp-1 passe également par des effets chroniques afin de préserver la masse de cellules β . Premièrement, le Glp-1 est capable d'induire la différenciation de cellules ductales en cellules productrices d'insuline (308) par diminution d'expression du marqueur de cellule ductale, Ck-20 (*Krt20*) et par augmentation de l'expression de marqueurs protéiques clés de la cellule β tels que Glut-2 ou Gck. De plus, le traitement de cellules Capan-1 (cellules ductales humaines) avec un agoniste du Glp-1r entraîne une augmentation de l'expression de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des cellules progénitrices en cellules β tels que Pdx1, NeuroD, Hnf3 β (Hepatic nuclear factor 3 β), résultant en une augmentation du nombre de cellules marquées positivement pour l'insuline (309). *In vivo*, le traitement de souris avec de l'Exendin-4 stimule l'expression de Pdx1 au niveau des cellules ductales, permettant ainsi l'augmentation de la masse des cellules β (310).

La transdifférenciation des cellules α en cellules β induite par le Glp-1 est un mécanisme récemment démontré comme permettant d'expliquer l'amélioration de la glycémie par un traitement aux analogues du Glp-1. Cette transdifférenciation est induite par la production de Fgf-21 permettant l'expression de Pdx1 et la transdifférenciation de cellules α en cellules β (225).

III.4.2 Effets prolifératifs du Glp-1 sur la cellule β

L'activation chronique du Glp-1r par ses agonistes joue un rôle important dans les mécanismes de prolifération de la cellule β pancréatique (284). De nombreuses voies de signalisation cellulaire ont été mises en évidence dans le contrôle de la prolifération de la cellule β induite par le Glp-1. Il a d'abord été déterminé que certains des effets prolifératifs du Glp-1 étaient médiés par Pdx1. En effet, des souris déficientes pour *Pdx1* dans la cellule β présentent une incapacité à augmenter la prolifération de la cellule β en réponse au GLP-1 (311). À l'aide de la lignée cellulaire INS-1A, différentes voies de signalisation intracellulaire tels que la voie des PkA, B et C (312-314), ou la voie Ampk/mTor (315) ont été démontrées comme ayant un rôle dans la prolifération de la cellule β . L'effet mitogénique de l'exposition chronique aux analogues du Glp-1 peut également passer par

la voie de la calcineurin/Nfat. Les agonistes du Glp-1r peuvent également induire la prolifération de la cellule β pancréatique par la stimulation de Irs2 (insulin receptor substrate 2) (316) par des mécanismes liés à la phosphorylation de Creb et à l'induction de gènes important de la prolifération cellulaire.

III.4.3 Rôles anti-apoptotiques du Glp-1 sur la cellule β

Outre le rôle important dans la prolifération de la cellule β , le Glp-1 peut exercer ses effets bénéfiques à travers l'inhibition de l'apoptose de la cellule β (317). L'activation du Glp-1r par ses agonistes va entraîner la production d'AMPc et l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaires telles que l'activation de la PKB, qui permet la liaison du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor κ B) à l'ADN et l'induction de l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ou encore Iap-2 (Inhibitor of apoptosis protein 2) (318). L'effet anti-apoptotique du Glp-1 est également médié par l'activation de la voie PI3K-AKT permettant l'inactivation de la protéine pro-apoptotique Bad (BCL-2 associated agonist of cell death), diminuant ainsi l'activation de la caspase-3 (319). A l'aide de la lignée INS-1, il a également établi que la production d'AMPc par le GLP-1 entraîne l'inhibition de l'Ampk permettant l'activation de la protéine mTor et l'augmentation des capacités anti-apoptotiques de la cellule β (315, 320).

L'un des mécanismes cellulaires induisant l'apoptose pendant le développement du diabète est le stress du réticulum endoplasmique (321), conséquence d'une réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) prolongée. Plusieurs équipes se sont alors intéressées à déterminer l'effet du Glp-1 sur la réponse UPR et le stress du RE. Premièrement, à travers l'utilisation de la lignée INS1, il a été montré qu'un traitement avec un agoniste du Glp-1r entraîne l'augmentation de la traduction d'Atf-4 à travers l'activation de la Pka, ayant pour conséquence d'augmenter la réponse UPR et de diminuer le stress du RE à long terme (322). Dans une autre étude, les auteurs ont également montré qu'un traitement à l'exendine-4 permet l'induction de la protéine chaperonne BiP (Binding immunoglobulin protein) permettant une meilleure réponse UPR, ainsi que l'expression de JunB, protéine anti-apoptotique et protégeant du stress du RE (323, 324). *In vivo*, il a également été démontré le rôle protecteur d'un traitement chronique au Glp-1 sur le stress du RE lors du développement d'un diabète, notamment à travers le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la réponse UPR (*Xbp1*, *Chop*, *eIF2 α*) (322).

III.5 Effets chroniques du GLP-1 sur l'homéostasie énergétique

III.5.1 Rôle du Glp-1 sur le système nerveux central

Au-delà des effets pancréatiques, les effets du Glp-1 sur le cerveau et principalement sur la prise alimentaire et la perte de poids sont largement étudiés. Ses effets ont été démontrés dans de nombreuses espèces, tels que la souris, le cochon et l'Homme (284). D'un point de vue anatomique, le

GLP-1 active les neurones à Proopiomélanocortine (POMC) et à « Cocaïne and amphetamine-regulated transcript (CART) », neurones dits anorexigènes, présents au sein du noyau arqué (ARC) et inhibe l'action des neurones oréxigéniques, nommées NPY et AgRP (Neuropeptide Y et Agouti-related peptide), situés dans l'hypothalamus. La stimulation des neurones anoréxigéniques et l'inhibition des neurones oréxigéniques se fait via la signalisation GABAergique, qui stimule les neurones à POMC et inhibe les neurones à NPY. En plus des effets dans les neurones de l'hypothalamus, certaines autres cellules neuronales jouent également un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire par le Glp-1. Par exemple, l'activation du Glp-1r dans les neurones du noyau du tractus solitaire (NTS) a pour conséquence d'augmenter la phosphorylation de la PkA et de la MapK, induisant une diminution d'activité de l'AMPK et diminuant la prise alimentaire (325).

Nous allons maintenant aborder l'impact de la signalisation du Glp-1 dans les tissus métaboliques périphériques que sont le foie, le tissu adipeux, le cœur et le muscle (Figure 17).

III.5.2 Mécanismes d'action du Glp-1 sur la physiologie hépatique

Dans le foie, l'activation du récepteur au Glp-1 permet l'augmentation de l'expression de la *Glycogen synthase α* induisant l'augmentation de la production de glycogène hépatique (326). Il a été montré que dans un modèle *Ob/Ob*, un traitement à l'exendine-4 contrôle la production de glucose hépatique, par diminution de l'expression d'enzymes clés de la gluconéogenèse hépatique et l'amélioration de la signalisation de l'insuline dans l'hépatocyte (327).

Le traitement par le Liraglutide (analogue du Glp-1) a montré une amélioration de l'hyperlipidémie, du contenu en acides gras dans les hépatocytes, de la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD) ainsi que de la fibrose hépatique (328, 329). Les effets bénéfiques du Glp-1 sur les hépatocytes peuvent s'expliquer premièrement par une diminution de l'apoptose hépatocytaire suite à une augmentation de l'autophagie réduisant le stress du RE, par activation de la voie AMPK/mTOR. Dans un second temps, les effets bénéfiques peuvent être expliqués par l'augmentation de la survie cellulaire suite à une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) hépatocytaires, une inhibition de l'activité de p38 (MAPK) et une diminution d'expression de gènes pro-apoptotiques tels que Bak et Bax. Ces effets peuvent être également expliqués par une augmentation d'expression de Ucp-2 (uncoupling protein 2), régulateur majeur de la biogénèse mitochondriale, ainsi qu'une augmentation d'expression de Pgc1 α (peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator 1 α) (Figure 19).

III.5.3 Effets du Glp-1 sur les tissus adipeux

Bien que les thérapies à base de Glp-1 augmentent la perte de poids via les effets du Glp-1 sur la satiété, certaines études ont montré un rôle important des agonistes du Glp-1r dans l'adipogénèse et la fonction de l'adipocyte blanc et brun. Dans le tissu adipeux blanc, le Liraglutide permet à travers la production d'AMPc de diminuer l'expression de la Fatty Acid Synthase (*Fasn*) diminuant ainsi la lipogénèse adipocytaire (330), d'améliorer la sensibilité à l'insuline (331) et de réguler la formation de nouveaux adipocytes (332). Il permet également d'activer les cellules « Adipose-resident invariant natural killer T » (iNKT), cellules immunitaires sécrétant le Fgf-21, hormone ayant un rôle important dans les mécanismes de perte de poids (Figure 19 (333)).

Au niveau du tissu adipeux brun, ayant un rôle important dans les mécanismes de thermogénèse, l'administration de Glp-1 permet l'augmentation de l'expression de *Ucp-1* (Uncoupling protein 1, protéine découplante mitochondriale), de *Cox411* (protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale) et de *Pgc1 α* entraînant une augmentation de l'activité thermogénique du tissu adipeux brun (334). De plus, le traitement au Glp-1 de cellules adipeuses permet de diminuer l'expression de gènes impliqués dans la lipogénèse *de novo*. Le traitement avec l'Exenatide de souris C57Bl6/J ou de la lignée cellulaire 3T3-L1 différenciée en adipocyte permet de remodeler les adipocytes blancs en adipocytes bruns via la voie de la Sirtuin1 (*Sirt1*) (335).

III.5.4 Mécanismes d'action du Glp-1 sur la physiologie cardiaque

Le DT2 et l'obésité représentent des facteurs de risque pour le développement de maladies cardiovasculaires. L'intérêt d'étudier l'impact de la stimulation du récepteur au Glp-1 sur le système cardio-vasculaire est donc émergent. L'expression du récepteur au Glp-1 a été observé dans différentes parties du cœur : l'endothélium cardiaque, les cellules musculaires lisses et au niveau des artères coronaires (336). L'activation du Glp-1r dans les cardiomyocytes augmente la survie cellulaire suite à une insuffisance cardiaque par inhibition de l'apoptose notamment par contrôle de l'expression de protéines cardioprotectives tels que Nrf2 (Nuclear factor 2), Ppar β (peroxisome proliferator-activated receptor β) et Ho-1 (Heme oxygenase-1) ou encore la phosphorylation d'AKT ou de GSK3 β (337). Le Glp-1 permet de réduire la pression sanguine en cas d'hypertension à travers la sécrétion du facteur natriurétique auriculaire (ANP), permettant la vasodilatation et la réduction de la pression sanguine (338). Le Glp-1 possède également des effets sur le rythme cardiaque, notamment à travers la signalisation sympathique et parasympathique du système nerveux (284).

III.5.5 Effets du Glp-1 sur le muscle squelettique

Les études s'intéressant aux effets du Glp-1 sur le muscle squelettique ont mis en évidence qu'une exposition aux agonistes du Glp-1 permet d'améliorer la synthèse de glycogène par augmentation de

l'activité de la glycogène synthase α permettant d'augmenter les capacités intrinsèques du muscle squelettique (339). D'autres études ont mis en évidence que l'administration d'agonistes au Glp-1r augmente le transport du glucose dans le muscle, indépendamment de l'insuline, à travers l'activation de la voie de signalisation de l'AMPK conduisant à la translocation membranaire de Glut-4 (340).

Le muscle étant un organe sensible aux actions de l'insuline, l'effet du Glp-1 sur l'insulino-résistance du muscle squelettique a été analysée. En conditions physiopathologiques, le Glp-1 permet de diminuer l'insulino-résistance induite par le palmitate dans la lignée cellulaire HSMM à travers une augmentation de la phosphorylation de Irs-1 et de AKT dans la cellule musculaire. L'activation de la voie Insuline-IRS1 permet d'augmenter l'expression et la translocation de Glut-4 dans la lignée HSMM et permet donc l'augmentation de la captation du glucose sanguin (341) (Figure 19).

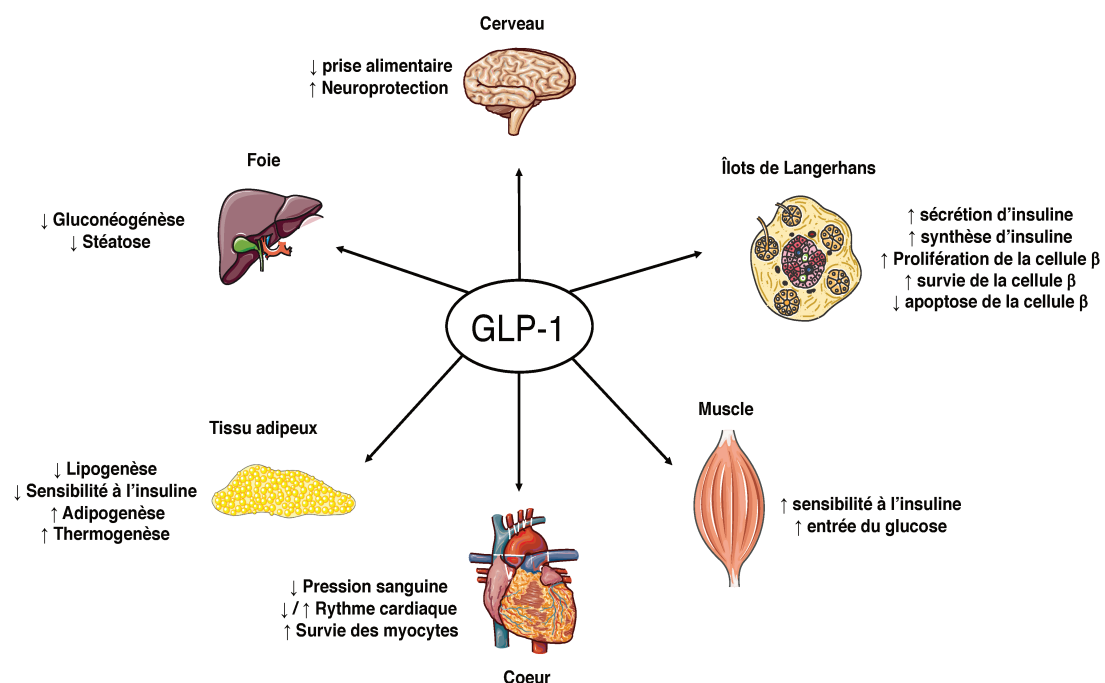


Figure 19 : Effets du Glp-1 sur les différents tissus métaboliques (Adaptée de Müller et al., 2019)

Le Glp-1 va posséder de nombreux effets bénéfiques sur de nombreux tissus participant à la régulation du métabolisme. Sur le cerveau, le Glp-1 va posséder un rôle neuroprotecteur et diminuer la prise alimentaire. Au niveau des îlots de Langerhans, le Glp-1 augmente la sécrétion et la synthèse d'insuline, ainsi que la prolifération et la survie et diminue l'apoptose des cellules β . Sur le muscle, le Glp-1 augmente l'entrée du glucose et améliore la sensibilité au glucose. Il diminue également la pression sanguine, améliore la survie des cardiomyocytes et module le rythme cardiaque. Au niveau du tissu adipeux blanc, le Glp-1 diminue la lipogenèse, augmente la sensibilité à l'insuline, l'adipogenèse et la thermogenèse. Pour finir, le Glp-1 diminue la néoglucogenèse hépatique et la stéatose.

IV.E2f1, régulateur du cycle cellulaire et du métabolisme

IV.1 Présentation de la famille des E2Fs

En 1986, *Kovesdi et al.* ont démontré l'existence d'un facteur nucléaire capable de reconnaître et de se fixer au promoteur du gène E2 chez l'Adénovirus. Ce facteur a été nommé E2F pour « E2 factor » (342) suggérant un rôle important de cette protéine pour la progression du cycle cellulaire. Par la suite, de nombreuses études ont démontré une interaction protéique directe avec le suppresseur de tumeur du rétinoblastome (Rb) (343-345) et qu'une mutation de la séquence de Rb entraînait une incapacité de Rb à se fixer à E2F (346). Le premier clone de la famille des E2Fs (E2F1) a été isolé par trois équipes en 1993 (347-349). Par la suite, deux autres clones humains (E2F2 et E2F3 respectivement) ont été isolés (350, 351).

A ce jour, chez les mammifères, 8 gènes de la famille des E2Fs ont été identifiés (de E2F1 à E2F8) (352). Plusieurs isoformes d'E2F ont également été découvertes, résultant soit d'un épissage alternatif ou de sites de débuts de transcriptions différents. Par exemple, le locus du gène *E2F3* code pour deux isoformes distincts ; E2F3a et E2F3b (353). De par la complexité de leur nombre, les différents E2Fs peuvent être classés en trois sous-catégories basées sur leur activité transcriptionnelle (activateurs ou répresseurs) et leurs homologies de séquence (354-356) (Figure 18).

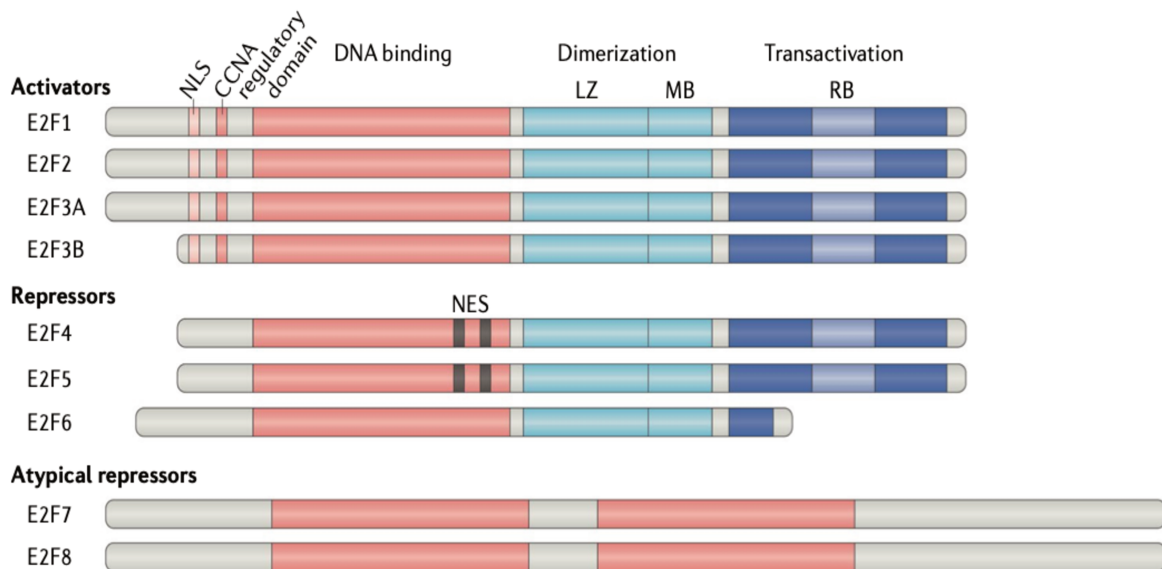


Figure 20 : Vue d'ensemble de la structure de l'ensemble des protéines de la famille des E2fs (Adaptée de Kent & Leone., 2019, 31053804)

L'ensemble des E2fs vont posséder un domaine de liaison à l'ADN. Les E2F1 à E2F6 requièrent une dimérisation avec un membre des facteurs de transcription de la famille des partenaires de dimérisation (DP) pour se fixer à l'ADN. Cette interaction peut être facilitée avec un domaine de dimérisation composé d'un domaine leucine zipper (LZ) et d'un domaine Marked Box (MB). Les E2F1 à E2F5 sont liés aux protéines de la famille des protéines poches (pRB, p107 et p130) au niveau du domaine de transactivation. Les E2F1 à E2F3 vont posséder un domaine NLS (Nuclear localisation signal) alors que les E2F4 et E2F5 vont posséder un domaine NES (Nuclear exportation signal). Les E2F7 et E2F8 ne possèdent pas de domaine de dimérisation et de transactivation et ne sont pas capable de se lier à des protéines de dimérisation et aux protéines poches.

Les E2F1 à E2F6 forment le groupe des E2Fs dit « Canoniques » et sont composés d'un site de fixation à l'ADN (Figure 1) (352). Néanmoins, cette fixation à l'ADN n'est possible qu'en cas de dimérisation des E2Fs avec une protéine membre de la famille des « Transcription factor dimerization partner ; TFDP1-TFDP3 » (357). Cette dimérisation est facilitée par la présence dans la structure de ces E2Fs d'un domaine de dimérisation, lui-même subdivisé en un domaine « Leucine Zipper » (LZ) et un domaine « Marked box » (MB). Les E2Fs canoniques possèdent un domaine de transactivation à l'exception de E2F6. Ce domaine est composé d'un site de fixation aux protéines de la famille des « protéines poches » comme la protéine du Rétinoblastome (RB), mais également p107 (RBL-1) et p130 (RBL-2). Les E2F1-3 sont majoritairement liés avec RB (358), alors que E2F4 interagit principalement avec p107 (359), mais peut également interagir avec RB (360). E2F5 va interagir préférentiellement avec p130 (361). De plus, E2F1-E2F3 possèdent un domaine NLS « Nuclear localization signal », ainsi qu'un site de fixation à la CyclinA, adjacent au NLS (362). Au contraire, E2F4 et E2F5 sont composés de deux domaines NES « Nuclear export signal » (Figure 20).

Concernant E2F7 et E2F8, formant le groupe des E2Fs atypiques, ils sont composés uniquement de deux domaines de fixations à l'ADN (355, 356, 363), sans domaine de transactivation et de dimérisation (Figure 20).

Comme indiqué précédemment, les E2Fs peuvent également être classés selon leurs activités transcriptionnelles. En effet, E2F1, E2F2 et E2F3a sont classés comme des activateurs de la transcription par fixation aux promoteurs de leurs gènes cibles tandis que E2F3b à E2F6 sont considérés comme des répresseurs de la transcription, notamment par fixation des protéines « poches » (pRB, p107, p130), mais également le recrutement d'histones déacétylases (HDAC) permettant la compaction des histones et réprimant la transcription des gènes cible (364). E2F6 ne possédant pas de domaines de transactivation, son activité répressive est induite par le recrutement du « Polycomb Group Proteins » (PcG) modifiant la structure des histones par ajout de groupement acétyl ou méthyl modulant l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène cible (365) (Figure 20). Les histones sont des protéines qui permettent la compaction de l'ADN dans le nucléosome. Les queues N-terminales des histones sont sujettes à diverses modifications post-traductionnelles, tels que l'acétylation ou la méthylation affectant l'accessibilité de la chromatine et l'expression des gènes. Il a été montré que l'acétylation des lysines présentes sur les histones est un mécanisme très dynamique régulée par l'action opposée de deux familles d'enzymes : les Histone acétyl transferase (HAT), associées à une activation de la transcription, et les Histones Deacetylases (HDAC), associées à une répression de la transcription (366). L'acétylation de la queue des histones par les HAT permet la décompaction de la chromatine et l'exposition des sites de liaisons pour l'ARN polymérase II et pour les facteurs de transcription. Au contraire, la déacétylation des histones à travers l'augmentation de l'activité des

enzymes HDAC va entraîner une compaction de la chromatine empêchant la fixation des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II, réprimant ainsi la transcription des gènes (367). En plus de l'acétylation, les histones peuvent être mono, di, ou tri-méthylés. Le recrutement de groupement méthyl sur les histones peut avoir un rôle activateur ou répresseur de la transcription en fonction des acides aminés des histones qui sont méthylés et du nombre de groupement méthyls attachés. Ainsi, la présence ou l'absence de différentes marques d'histone au niveau de la chromatine d'un promoteur induit soit l'activation ou la répression de la transcription du gène.

Initialement, les E2Fs ont été décrits comme des facteurs de transcription ayant un rôle dans la progression du cycle cellulaire à travers la réplication de l'ADN en phase G1 (368). De nombreuses autres études ont cependant montré d'autres rôles importants des E2Fs. En effet, par des études d'analyse d'expression génique par la technique « micro-array à ADN », il a été déterminé que les protéines de la famille des E2Fs sont impliquées dans la réparation de l'ADN suite à la réplication (369, 370), dans l'apoptose des cellules, notamment par des mécanismes dépendant de p53 (371) et des mécanismes de contrôle transcriptionnelle de gènes anti-apoptotiques (Mcl-1) (372) et pro-apoptotiques (373, 374). En plus de leurs rôles dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou l'apoptose, les protéines de la famille des E2fs jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire et le développement. En effet, à partir de modèles de souris déficients pour les différents membres de la famille des E2fs, leur rôle dans le développement et la différenciation a pu être démontré (375).

IV.II Rôle de E2f1 dans la prolifération, l'apoptose et la réparation de l'ADN

IV.2.1 Effets de E2f1 sur la progression du cycle cellulaire et la prolifération

La prolifération cellulaire est un des mécanismes biologiques fondamentaux du développement, de l'homéostasie et de la régénération. La séquence d'étapes au cours de ce processus est appelée cycle cellulaire et est divisé en une phase de synthèse de l'ADN (Phase S) et une phase de division cellulaire, appelé mitose (Phase M). Ces phases sont précédées de deux phases intermédiaires, les phases G1 et G2 respectivement (376).

En phase de quiescence (G0), l'activité des « cyclins dépendant kinase » (CDK) est faible ou nulle, entraînant un état hypophosphorylé de la protéine du rétinoblastome (pRb) permettant sa liaison aux facteurs de transcription de la famille des E2fs, et plus particulièrement E2f1. Grâce à l'activation de signaux mitogéniques, les cellules quiescentes initient une cascade de signalisation par l'activation la voie Erk permettant la transcription de facteurs de transcription tels que c-Myc et Ets-1 (377). Ce mécanisme permet d'augmenter l'expression de la cycline D, qui va se lier à CDK4 et CDK6, permettant leur activation. Cette fixation s'accompagne de la fixation de la cycline E à CDK2, initiant la

phosphorylation de pRb sur différents résidus de sérines et de thréonines, permettant sa dissociation au facteur de transcription E2f1 (378). Cette dissociation permet l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la transition de la phase G1/S, dont la cycline E, la cycline D1, CDC2, DHFR (Dihydrofolate reductase), la DNA polymérase A par exemple (379). Ces événements mènent au passage du point de restriction (Point R), défini comme le moment où la cellule n'a plus besoin de stimuli mitogéniques pour terminer le cycle cellulaire (380) (Figure 21). Dans l'objectif d'éviter une suractivation de E2f1 et une prolifération cellulaire trop importante, de nombreux mécanismes sont mis en place pour inhiber son activité. Par exemple, le complexe CyclineA-CDK2, actif pendant la phase S permet la phosphorylation du partenaire de dimérisation de E2F1 (DP1) entraînant la dissociation du complexe E2F1-DP1 à la chromatine, et permettant la fixation des E2fs répresseurs E2F7 ou E2F8, sur le promoteur des gènes cibles de E2f1 (381). La dissociation de E2F1 à la chromatine permet également son ubiquitylation par la protéine SKP2 (s-phase kinase protein-2) (382) permettant la dégradation de E2F1 par le protéasome (383) et limitant ainsi la prolifération cellulaire (Figure 21).

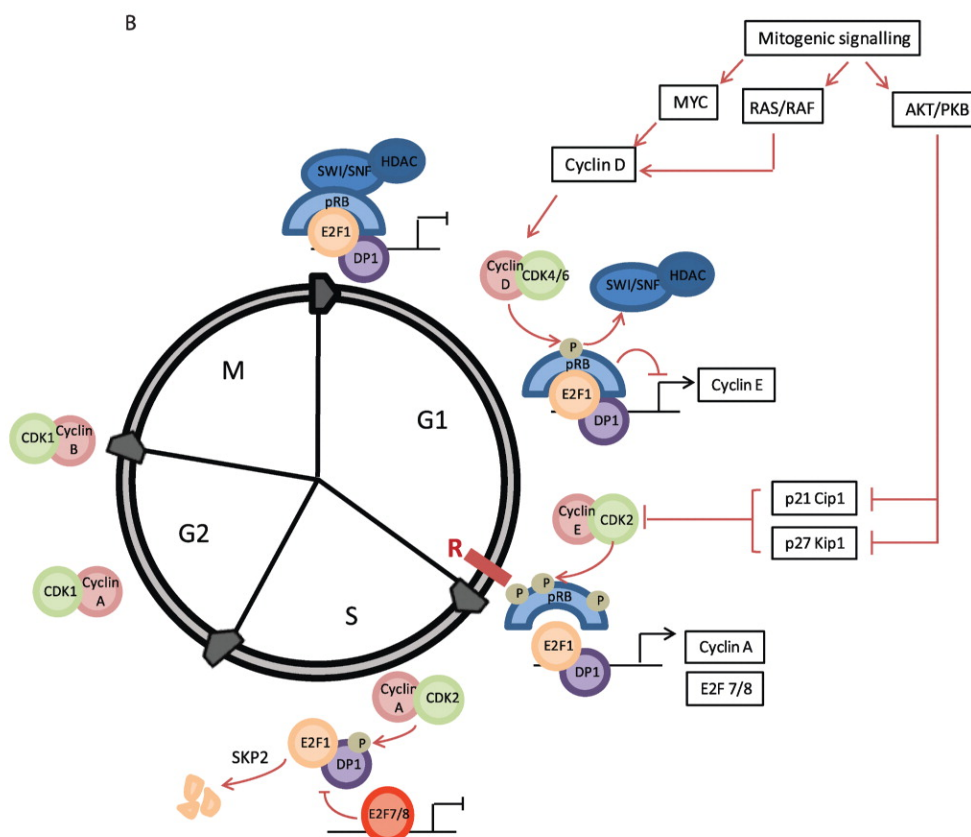


Figure 21 : Mécanisme moléculaire du contrôle du cycle cellulaire par la voie E2f1-pRb-Cdk4 (Adaptée de Roworth et al., 2015, 27308406)

Au cours de la phase G1, l'activité transcriptionnelle de E2f1 est réprimée par l'interaction du complexe E2f1-Dp1 avec la protéine Rb. Sous la stimulation de signaux mitogéniques, la cycline D va former un complexe avec Cdk4 permettant la phosphorylation de pRb et son détachement au complexe E2f1-Dp1. Ce mécanisme permet ainsi d'activer la transcription des gènes cibles de E2f1 tels que la cycline E, la cycline A. Au cours de la transition de la phase S à la phase G2, l'activité transcriptionnelle de E2f1 est réprimée suite à un retour à la forme hypophosphorylée de pRb et à une augmentation de la dégradation de E2f1 par le protéasome suite à une ubiquitylation par Skp2.

D'autres mécanismes permettent d'inhiber l'activité de E2F1, notamment par une régulation négative de la phosphorylation de pRB. En effet, il existe au sein de la cellule des inhibiteurs des CDK, appelés CDKi, protéines de la famille des INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INKB}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}) et des CIP (CDK-interacting proteins) tels que (p21^{CIP1}, p27^{KIP} et p57^{KIP2}) (384). Par exemple, le locus *CDKN2a*, qui code deux protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF} régule l'activité transcriptionnelle de E2F1. En effet, p16 est capable de se fixer à CDK4 et inhibe ainsi la formation du complexe CyclineD/CDK4, diminuant le niveau de phosphorylation de pRB (385) lors de la phase G2/M.

L'ensemble de ces mécanismes font de la voie E2F1-pRb-CDK4 un système homéostatique finement régulé. Sa dérégulation entraîne des perturbations du cycle cellulaire, faisant de E2F1 un oncogène potentiel, dont la dérégulation de son activité pourrait contribuer à une progression sans restriction du cycle cellulaire et la formation de tumeurs. Cependant, contrairement à pRB et p53 dont on a identifié 1143 et 7716 mutations, respectivement, seulement 43 mutations pour E2F1 ont été observés selon la base de données COSMIC comme prédisposant à la formation de certains cancers. En conséquence, chez la souris, une surexpression de *E2f1* prédispose à l'apparition de certains cancers, tels que le cancer de la peau, du vagin ou de l'épithélium de l'estomac (386, 387). A l'inverse, la délétion de *E2f1* chez la souris augmente de manière inattendue le développement de certaines tumeurs (hépatocarcinomes, tumeurs pulmonaires, hémangiosarcomes). De plus, les souris *E2f1*^{-/-} présentent une atrophie testiculaire et des modifications histologiques au niveaux de certaines glandes exocrines tel que le pancréas ou la glande salivaire (388). Ces résultats mettent en évidence que E2F1 pourrait posséder un rôle potentiellement oncogénique, mais également certaines propriétés de suppresseur de tumeur, notamment *via* son rôle pro-apoptotique.

IV.2.2 Contrôle des mécanismes d'apoptose par E2f1

Des études ont ainsi montré que E2F1 est capable d'induire l'apoptose à travers l'activation de nombreuses voies cellulaires. Le premier mécanisme connu de contrôle de l'apoptose par E2F1 correspond au contrôle de la voie E2F1 sur la voie p53. En effet, E2F1 est capable, à travers l'induction de la protéine p14^{ARF}, de stabiliser p53, induisant une apoptose par activation de la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que *BAX*, *IGF-BP3* ou encore *PIG3* (389). De plus, E2F1 est un régulateur de l'expression de p73, protéine liée à p53, et favorise la transcription de certains gènes de l'apoptose, notamment par activation de la transcription de p14^{ARF} activant l'apoptose dépendant de la protéine p53. Mais p73 est également capable d'activer la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que *BAX* ou *GRAMD4*, protéine inhibitrice de BCL-2, facteur anti-apoptotique (390). E2F1 est également capable de contrôler directement l'expression de protéines impliqués dans la voie intrinsèque de l'apoptose et notamment les protéines BIM, NOXA, APAF1, caspase 3... (391). Enfin, E2F1 est capable d'induire

l'apoptose à travers l'inhibition des signaux de survie cellulaire anti-apoptotiques tels que la voie NF- κ B ou la voie BCL-2 (392) (Figure 22).

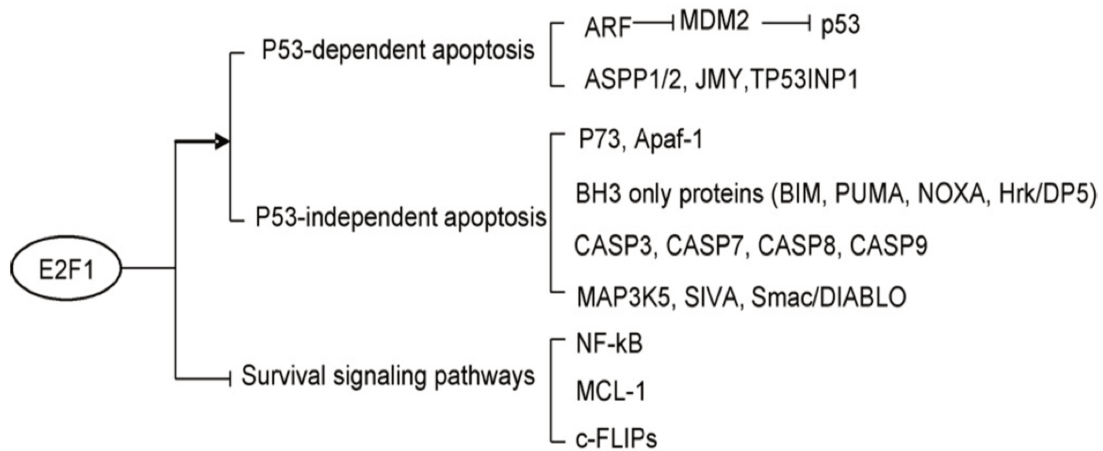


Figure 22 : Rôle de E2f1 dans l'activation de l'apoptose ou de la survie cellulaire (Adaptée de Wu et al., 2009, 19539777)

E2f1 est capable d'activer l'apoptose par des mécanismes dépendant de la voie p53 et notamment à travers le contrôle de la voie Arf ou indépendant de p53 à travers l'induction de l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que les Caspases 3 et 7, Bim ... De plus, à travers le contrôle de la voie Nf- κ B ou la voie Mcl-1, E2f1 est capable d'inhiber la survie cellulaire.

IV.2.3 Rôles de E2f1 dans les mécanismes de réparation de l'ADN

En plus d'induire l'apoptose suite à des dommages de l'ADN, E2F1 est également capable de bloquer cette signalisation pour permettre la réparation cellulaire. Il a été constaté une relocalisation cellulaire de E2F1 suite à des dommages à l'ADN inhibant l'expression de gènes pro-apoptotiques (391). De plus, E2F1 est capable de réguler directement l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN tels que DDB2/XPE, XPC, RAD51, BARD1 et PRKCD (393-395). E2F1 est également capable d'augmenter l'expression de p19^{INK4D} stimulant la réparation de l'ADN indépendamment de p53 (396). Ainsi, l'ensemble de ses données permettent de mettre en évidence le double rôle de E2F1 dans la cellule, à savoir un rôle oncogénique (lié aux mécanismes de prolifération) et un rôle suppresseur de tumeur (lié aux mécanismes d'apoptose et de réparation de l'ADN) (Figure 22).

IV.3 E2f1, régulateur clé du métabolisme énergétique

Depuis plus de 15 ans maintenant de nombreuses équipes se sont intéressées au rôle des régulateurs du cycle cellulaires dans le maintien de l'homéostasie énergétique tels que le tissu adipeux, le foie ou encore les îlots de Langerhans (397).

IV.3.1 Régulation de la fonction du tissu adipeux blanc par la voie E2f1-pRb-Cdk4

Les différents tissus adipeux blancs (viscéral et sous-cutané principalement) ont pour fonction de stocker l'énergie dans l'organisme, sous forme de lipides, pour ensuite les redistribuer en cas de forte

demande énergétique du corps (385). Cette fonction est assurée par un mécanisme appelé lipolyse qui consiste, par l'action de trois enzymes (ATGL, HSL, MGL), en une hydrolyse séquentielle des triglycérides stockés dans la vacuole lipidique qui compose environ 90% de l'adipocyte mature (398). Cette lipolyse va permettre, à partir d'une molécule de triglycérides, la production de trois molécules d'acides gras libres qui serviront de substrat énergétique aux tissus alors que le glycérol servira majoritairement de substrat pour la gluconéogenèse hépatique (398). En plus de son rôle de stockage, le tissu adipeux possède également une fonction endocrine permettant la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, le tissu adipeux est capable de sécréter de nombreuses hormones (leptine, adiponectine, cytokines inflammatoires), nommées adipokines (399), ainsi que des métabolites lipidiques possédant de nombreux effets sur les tissus métaboliques.

L'obésité est une condition définie par une augmentation du poids du corps caractérisée par une accumulation excessive de gras dans les tissus adipeux, dû au mauvais équilibre entre l'énergie absorbée (nutrition) et l'énergie utilisée. Afin d'augmenter sa capacité de stockage induite par l'obésité, le tissu adipeux est capable de s'adapter par hypertrophie (augmentation de la taille des adipocytes) et/ou hyperplasie (augmentation du nombre d'adipocytes) (399). Cette hyperplasie résulte de la prolifération des précurseurs adipocytaires puis leur différenciation en adipocytes matures, ce qui en fait un modèle intéressant pour étudier le rôle des régulateurs du cycle cellulaire et plus principalement de la voie E2f1-pRb-Cdk4, voie régulatrice de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Il est maintenant bien établi que le facteur de transcription E2f1 participe à la différenciation adipocytaire par l'activation de ICAT, inhibiteur de la β -caténine et de TCF4 dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (400). De plus, E2f1 est capable de se fixer au promoteur de Ppar λ (facteur de transcription clé de l'adipocyte) et d'induire son expression pendant l'adipogénèse (401). Chez la souris, la délétion de *E2f1* dans l'ensemble de l'organisme protège d'une obésité suite à un régime riche en graisse (401). Chez l'humain, E2F1 contrôle l'expression de TRAIL (TNFSF10), qui sera sécrété par l'adipocyte entraînant une augmentation de production et de sécrétion de TL1A (Tumor Necrosis Factor-like cytokine 1A) induisant une insulino-résistance du tissu adipeux ainsi qu'une augmentation de l'expression de E2F1 (402). De plus, cette augmentation de TL1A induit une accumulation d'acide gras dans les macrophages adipocytaires, entraînant un rôle pro-inflammatoire du macrophage (402).

La protéine du rétinoblastome (Rb) contrôle directement l'activité transcriptionnelle de E2F1. De nombreuses équipes ont donc émis l'hypothèse d'un rôle possible de Rb dans la fonction adipocytaire. De nombreuses études ont montré un rôle important de Rb dans le mécanisme final de différenciation. En effet, une perte d'expression de Rb entraîne une incapacité des cellules adipocytaires à terminer leur

différenciation (403). De plus, Rb est capable d'interagir avec CEBP/ α pour contrôler la différenciation cellulaire. L'activité répressive de Rb étant dépendante de son état de phosphorylation, des études ont montré que des voies de signalisation cellulaires, tels que la voie de la Phospho-inositol 3 kinase (PI-3K) ou la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) induisent une augmentation de la phosphorylation de Rb, permettant l'expansion clonale (404), un mécanisme nécessaire à la différenciation terminale des adipocytes. La perte d'expression de Rb dans des fibroblastes d'embryons de souris ou des adipocytes blancs matures résulte en la formation d'un adipocyte mature brun via l'induction de l'expression de UCP-1, protéine clé impliquée dans la thermogénèse du tissu adipeux brun (405). Chez l'Homme, des études ont montré que l'expression protéique ou de l'ARNm de RB est inversement corrélée à l'indice de masse corporel et l'insulino-résistance tandis qu'elle est positivement corrélée avec l'expression de gènes adipogéniques (406), montrant le rôle important de Rb dans la différenciation adipocytaire, chez la souris et chez l'humain.

L'état de phosphorylation de Rb ayant un rôle important dans ses effets répresseurs de l'activité transcriptionnelle de E2F1, des études se sont intéressées aux rôles des CDK, et notamment CDK4 (protéines permettant la phosphorylation de Rb) dans l'adipocyte. Une première étude a montré qu'une perte d'expression de CDK4 dans la lignée cellulaire 3T3-L1 entraîne un défaut d'adipogénèse, accompagnée d'une perte de fonction de l'adipocyte par une diminution de la lipogénèse et du transport du glucose au sein de l'adipocyte. Au contraire, une surexpression de CDK4 favorise l'adipogénèse (407). De plus, cette étude a déterminé que CDK4 est capable de réguler l'activité de PPAR λ par phosphorylation afin de contrôler son activité transcriptionnelle (407). *In vivo*, la perte d'expression de CDK4 entraîne un défaut de lipogénèse et une augmentation de l'activité lipolytique de l'adipocyte. A l'inverse, la lipogénèse est diminuée et la lipolyse augmentée lorsque l'activité de CDK4 est augmentée (408). De plus, les auteurs ont montré le rôle important de CDK4 dans la signalisation de la voie de l'insuline au sein de l'adipocyte (408).

L'ensemble de ces études tendent à montrer un rôle important de la voie E2F1-pRB-CDK4 dans la fonction et le développement du tissu adipeux.

IV.3.2 Effets de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la fonction hépatique

Le foie joue un rôle métabolique, immunitaire, digestif et également détoxifiant important. Il est divisé en plusieurs lobes composés chacun de différents types cellulaires, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules de Kupffer (macrophages) ... Le foie possède de nombreuses fonctions permettant le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme. En effet, le glucose sanguin est capable de pénétrer dans l'hépatocyte par le transporteur au glucose (Glut2) après la prise alimentaire où il sera transformé en glycogène ou converti en acide gras, transformé à leur tour Triglycérides (TAG), stocké sous forme de

goulette lipidique ou secrété sous forme de VLDL (Very low density lipoprotein). De plus, le foie est également capable de stocker les acides aminés. Ces différents mécanismes permettent de faire diminuer la glycémie. En condition de jeûne ou durant un exercice physique, le glycogène stocké sera transformé en glucose par un mécanisme appelé glycogénolyse, alors que les acides gras et les acides aminés seront transformés en glucose par divers mécanismes biologiques nommés néoglucogenèse.

Les premières études s'intéressant au rôle de E2f1 dans les hépatocytes ont été réalisées dans des modèles de cancers et de régénération et ont montré qu'une surexpression de E2f1 dans le foie avait un rôle à la fois oncogénique, par une augmentation de la prolifération hépatocytaire, mais également un rôle de suppresseur de tumeur, par une augmentation de l'apoptose (409). Une autre étude a montré le rôle important de E2f1 dans le développement de la fibrose hépatique (410). Néanmoins, le rôle de E2f1 dans les fonctions métaboliques du foie est encore peu connu. Récemment, l'équipe du Pr Lluís Fajas, en collaboration avec notre équipe, a mis en évidence le rôle important de E2f1 dans le métabolisme du glucose et des acides gras hépatiques à l'aide du modèle *E2f1*^{-/-}. Dans un premier temps, les auteurs ont mis en évidence le contrôle de la glycolyse et de la lipogenèse dans les hépatocytes, notamment par une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse tels que *SLC2A2*, *GCK* ou *PKLR*, induisant une diminution de la glycolyse ou de gènes de la lipogenèse tels que *ACACA*, *FASN* ou encore *SCD1*, avec pour conséquence une diminution des triglycérides hépatiques et plasmatiques protégeant ainsi le développement d'une stéatose hépatique dans un modèle *Db/Db* (411). Les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de *E2F1* dans des foies de donneurs humains obèses (411). Dans une autre étude, la même équipe a démontré, à l'aide d'un modèle déficient pour *E2f1* dans l'hépatocyte par l'utilisation d'une souris exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur à l'Albumine (Alb-Cre), le rôle majeur de E2f1 dans le contrôle de la gluconéogenèse hépatique. En effet, les auteurs ont démontré que la perte d'expression de *E2f1* entraîne une diminution de la production hépatique de glucose accompagnée d'une diminution d'expression d'enzymes limitante de la gluconéogenèse, telles que *Pck1* (Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) et *G6pc* (Glucose-6-phosphatase). Au contraire, les auteurs ont déterminé qu'une augmentation de l'expression de *E2f1*, dans des modèles de surexpression adénoviraux (*in vitro*) et génétiques (*in vivo*), entraîne une augmentation de l'expression de ces deux gènes accompagnée d'une augmentation de la gluconéogenèse (412). De plus, ils ont montré une augmentation de l'expression de E2F1, corrélée à celle de PCK1 dans le foie de patients diabétiques dans lequel la néoglucogenèse est souvent altérée (412).

Les rôles directs de pRb dans les mécanismes d'hépatocarcinome sont connus, néanmoins son rôle dans le métabolisme hépatique reste encore très peu élucidé. L'étude de l'équipe du Pr Lluís Fajas a également démontré que les foies de souris *Db/Db* présentaient une hyperphosphorylation de pRb,

induisant une augmentation de l'activité de E2f1 corrélant avec les modifications de phénotypes observés précédemment dans cette étude (411).

CDK4 phosphorylant pRb afin de lever sa répression sur l'activité transcriptionnelle de E2f1-Dp1, certaines études ont démontré le rôle important de CDK4 dans le métabolisme hépatique. Dans le foie, une diminution d'activité ou d'expression de *CDK4* induit l'augmentation des gènes de la gluconéogenèse, entraînant une exacerbation de la production de glucose (413). De plus, cette étude met en évidence que l'insuline est capable d'activer la voie de CDK4 dans l'hépatocyte et de diminuer ainsi la gluconéogenèse à travers la régulation de l'expression de *PGC1 α* (413), jouant un rôle majeur dans la néoglucogenèse (414) par une interaction avec le facteur de transcription FoxO1. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de CDK4 dans un modèle murin soumis à un régime riche en graisse entraîne une augmentation du développement de la NAFLD (415). Ces résultats s'accompagnent également de la démonstration d'une augmentation du niveau protéique de CDK4 dans des foies de patients atteints de NAFLD (415). De plus, l'inhibiteur endogène de CDK4, p16, codé par le locus *Cdkn2a*, possède un rôle important dans la gluconéogenèse hépatique. Dans un modèle de délétion de p16, il en résulte le développement d'une hyperglycémie à jeun et une augmentation de la néoglucogenèse suite à l'augmentation de l'expression de *G6pc*, *Fbp1* (Fructose-biphosphatase 1), *Pepck* (Phosphoénolpyruvate carboxykinase) notamment (416).

IV.3.3 Effets de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la cellule β pancréatique

Le rôle important de E2F1 dans la prolifération de la cellule β est bien établi. En effet, les souris *E2f1*^{-/-} présentent une diminution de la taille du pancréas et des îlots de Langerhans suite à un défaut de prolifération post natal (417). De plus, l'expression ectopique de E2F1 induit une prolifération de la cellule β , aussi bien *in vitro* que *in vivo*. De plus, la surexpression de E2F1 augmente le contenu intracellulaire en insuline de la cellule associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (418).

E2f1 a un rôle important dans les mécanismes de sécrétion d'insuline. En effet, la perte d'expression de *E2f1* conduit à une diminution d'expression du facteur de transcription Pdx1, entraînant une diminution de la sécrétion d'insuline et induisant une intolérance au glucose marquée des souris (417). De plus, E2f1 possède un rôle direct dans le mécanisme de sécrétion d'insuline par la cellule β . En effet, E2f1 est capable de se fixer au promoteur et active la transcription du gène *Kir6.2/Kcnj11*, sous-unité du canal potassique directement impliquée dans le mécanisme physiologique de sécrétion d'insuline (419). En effet, la perte d'expression de *E2f1* entraîne une diminution d'expression de *Kir6.2*, tandis que la réexpression de *Kir6.2* dans les îlots isolés de souris *E2f1*^{-/-} restaure la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (419). Néanmoins, l'intolérance au glucose des souris E2F1 n'induit pas l'apparition

d'un phénotype de diabète, ceci pouvant s'expliquer par une hypersensibilité des souris à l'insuline, suite à une diminution de la masse du tissu adipeux blanc (417) et une augmentation du métabolisme oxydatif du muscle et du tissu adipeux brun (420). En outre, le glucose module l'activité transcriptionnelle de E2f1 par un mécanisme dépendant de l'insuline sécrétée en réponse au glucose, de CDK4 et de Rb, permettant d'augmenter l'expression de Kir6.2 (419). Ces données démontrent à nouveau le rôle important des régulateurs du cycle cellulaire dans la réponse physiologique.

A l'aide de modèles déficientes pour CDK4 ou d'un modèle permettant la suractivation de CDK4 (CDK4^{R24C}), il a été mis en évidence que l'induction de CDK4 permet d'activer l'activité transcriptionnelle de E2f1 sur le promoteur de *Ngn-3* induisant sa transcription et permettant l'augmentation du pool de cellules endocrines. De plus, CDK4 contrôle l'expression de *Nkx2.2* et *Nkx6.1*, deux facteurs de transcription de la cellule β pancréatique, ce qui montre une fois encore le rôle important de la voie E2F1-CDK4 dans le contrôle de la prolifération et du développement de la cellule β (421).

Les effets transcriptionnels et prolifératifs de E2f1 étant contrôlés en grande partie par la fixation de pRb sur E2f1, de nombreuses équipes se sont intéressées à déterminer le rôle de pRb dans la cellule β pancréatique. Une première étude, à l'aide d'un modèle de délétion spécifique de pRb dans la cellule β , a mis en évidence qu'une diminution de l'expression de pRb à l'âge embryonnaire n'entraîne pas de modifications ni de la masse de cellules β , ni de l'insulinémie et ni de la glycémie (422). Néanmoins, à l'aide du modèle PDX-1Cre::pRb^{loxp/loxp}, permettant la délétion de pRb dans les progéniteurs pancréatiques, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de cellules Ngn-3 positives, entraînant une augmentation de la différenciation en cellules β et une augmentation de la néogenèse de cellules β . Au contraire, cette perte d'expression entraîne une diminution d'expression d'ARX, diminuant la masse de cellules α et une conversion de ces cellules en cellules β (423). De plus, cette déplétion de pRb entraînait une induction de E2f1, induisant une meilleure homéostasie glucidique de la souris et la protection du développement d'un DT2 (423).

CDK4 étant un régulateur important de la prolifération et du développement cellulaire, son rôle dans la cellule β pancréatique a également été étudié. A l'aide d'une délétion globale de CDK4 dans l'organisme, Rane et al ont montré qu'une perte d'expression de CDK4 entraîne une diminution du nombre de cellules β intra-ilots. Au contraire, une suractivation de CDK4 entraîne une hyperplasie de l'îlot suite à une augmentation de la prolifération cellulaire (424). Une autre étude a mis évidence que cette augmentation de taille de l'îlot est accompagnée d'une augmentation du contenu-intracellulaire en insuline, également accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, l'induction de l'expression de CDK4^{R24C} dans l'îlot humain entraîne une augmentation

de la prolifération de la cellule β , démontrant un potentiel rôle thérapeutique de CDK4 (425). De plus, l'utilisation d'agents pharmacologiques inhibant l'activité de CDK4 a mis en évidence une absence d'effet de cette inhibition sur des rats adultes comparé aux rats jeunes qui présentaient une diminution de masse de cellules β ainsi qu'une perturbation de l'homéostasie glucidique (426), démontrant une nouvelle fois le rôle important de CDK4 dans le développement et la prolifération de la cellule β pendant le développement.

Ainsi, l'ensemble de ces études des rôles de la voie E2f1-pRb-CDK4 sur la cellule β pancréatique ont mis en évidence l'importance des régulateurs du cycle cellulaire dans le développement, l'identité et la fonction de la cellule β pancréatique. Cependant, E2f1 va posséder en plus de ses fonctions dans le foie, le tissu adipeux et la cellule β , de nombreux autres effets dans les tissus métaboliques, comme le muscle, le cœur ou encore le cerveau (Figure 23).

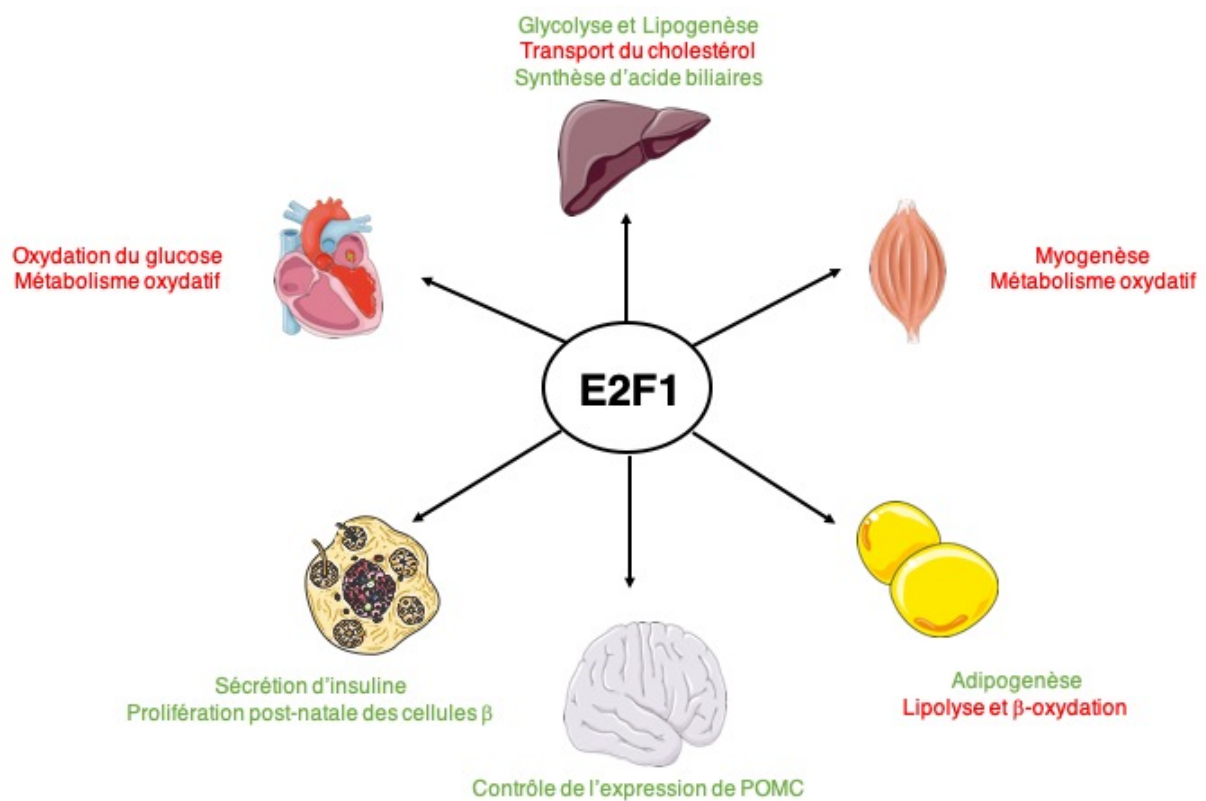


Figure 23 : Effets principaux de E2f1 dans les tissus métaboliques (Adaptée de Denechaud et al., 2017)
 En plus de son rôle dans la progression du cycle cellulaire, E2f1 active de nombreuses voies cellulaires jouant un rôle important dans le maintien de l'homéostasie. Les voies activées par E2f1 sont représentées en vert et les voies réprimées par E2f1 en rouge.

V. Objectifs de la thèse

Le diabète de type 2 se caractérise à la fois par une insulino-résistance des tissus métaboliques et par une perte progressive de la fonction, associée à une perte d'identité de la cellule β pancréatique. Restaurer la fonction et la masse de cellules β est devenu un enjeu thérapeutique majeur pour soigner cette maladie. Cependant, l'ensemble des mécanismes moléculaires permettant d'expliquer la perte de sécrétion d'insuline et d'identité de la cellule β sont encore peu connus. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires induisant le développement de la perte de sécrétion d'insuline et de masse de la cellule β dans l'objectif de restaurer la normoglycémie chez les patients atteints d'un diabète de type 2.

Notre laboratoire, ainsi que d'autres équipes de renommée internationale, ont récemment mis en évidence le rôle important du facteur de transcription E2F1, régulateur clé du cycle cellulaire, dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. À l'aide de modèles de souris déficientes dans l'ensemble de l'organisme pour E2f1, nous avons déterminé le rôle important de E2f1 dans les mécanismes de sécrétion d'insuline et de prolifération post-natale de la cellule β pancréatique. Néanmoins, le rôle direct de E2f1 dans le contrôle de la fonction et de l'identité de la cellule β restait à découvrir.

Le but de ce travail de thèse était donc de comprendre la fonction cellulaire spécifique de E2f1 dans la sécrétion d'insuline et le maintien de l'identité de la cellule β par le développement et l'utilisation de modèles animaux uniques, originaux et d'une lignée cellulaire de cellules β pancréatiques de souris, la lignée Min6. Pour répondre à ces questions, nous avons développé au laboratoire à l'aide de la technologie Cre/LoxP, un modèle de souris déficientes pour *E2f1* dans la cellule β (souris *E2f1 ^{β -/-}*) et un modèle de souris permettant la surexpression de la forme humaine de E2F1 dans la cellule β (souris *E2f1 ^{β over}*). L'expression de E2f1 dans la lignée Min6 a également été modulée à l'aide de siRNA ou de traitement pharmacologique visant à inhiber l'activité transcriptionnelle de E2F1.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse étaient de :

1. Générer puis déterminer le phénotype métabolique des souris *E2f1 ^{β -/-}* et *E2f1 ^{β over}* sous régime standard et régime riche en graisse et étudier le rôle de E2f1 dans la fonction et l'identité de la cellule β .
2. Disséquer et comprendre les mécanismes moléculaires contrôlés par E2f1 dans la cellule β en lien avec le phénotype métabolique observé dans nos différents modèles de souris.

Étant donné que l'analyse des mécanismes moléculaires contrôlés par E2f1 par des techniques « Omics » (RNA-Seq, CHIP-Seq) ont mis en évidence une diminution de l'expression du récepteur au Glp-1 dans les îlots de souris *E2f1^{β/-}*, nous avons développé de nouveaux objectifs au cours de ma thèse qui étaient de :

3. Démontrer le rôle important de E2f1 dans les mécanismes de sécrétion d'insuline médiée par le Glp-1 dans la cellule β pancréatique.
4. Analyser le rôle d'un traitement à l'agoniste du Glp-1r dans l'activation de la voie E2f1-pRb-Cdk4 et le contrôle de l'expression de gènes directement régulés par E2f1 dans l'îlot pancréatique.

L'ensemble de ces travaux, présentés en annexe sous format de manuscrits déposés dans BioRxiv, ont fait l'objet de deux articles soumis dans le journal « Diabetes » et « Cell Report » et sont actuellement en révision.

Matériel et Méthodes

I. Produits chimiques, anticorps et plasmides

I.1 Produits chimiques

L'ensemble des produits chimiques utilisés lors des expériences ont été achetés chez Sigma-Aldrich, tels que l'exendine-4 (E7144), le D-glucose (Sigma, G8769) et l'insuline humaine (I-034). Le HLM006474 (427) a été synthétisé comme précédemment décrit (428).

I.2 Traitement pharmacologique

Pour les expériences nécessitant la diminution de l'expression/et ou de l'activité de E2f1 par agent pharmacologique, les cellules Min6 et les îlots humains ont été traités avec le HLM006474 à une concentration 10 μ M ou du DMSO 0,1%, pendant 48 heures (427, 428). Pour les expériences utilisant l'exendine-4, les cellules ont été traitées avec 50 nM d'exendine-4 ou 0,1% de DMSO à différent temps.

I.3 Anticorps

Les anticorps anti-insuline (A0564) et anti-insuline ready to use (IR002) proviennent de DAKO. Les anticorps anti-phospho-pRb^{S807/811} (CS#9308) et anti-pRb 4H1 (CS#9309) ont été achetés chez Cell Signaling. Les anticorps anti-tubuline (T5168), anti-glucagon (G2654), anti-Flag BioM2 (F9291) et anti-HA ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'anticorps anti-E2F1 C-20 (sc-193) provient de chez Santa-cruz. Les anticorps anti-Hdac1 (ab7028) et anti-E2f1 (Ab179445) ont été achetés chez Abcam.

I.4 Plasmides

Les plasmides pCMV (empty vector), pCMV-E2f1, pCMV-Dp1, pCMV-pRb, pCMV- β gal et pCMV E2FRE-Tk-luc ont été précédemment développés et décrits (411, 419). La séquence d'ADN du promoteur au Glp-1 récepteur de souris (Glp1r-Luc, 1000 paires de base en amont du TSS) a été cloné en amont du gène de la luciférase par e-Zyvec.

II. Procédures animales

II.1 Génération des différentes lignées de souris génétiquement modifiées

Les souris ont été maintenues conformément aux directives de l'Union Européenne pour l'utilisation d'animaux de laboratoire. L'ensemble des expérimentations a été réalisé dans le respect du référentiel éthique (accord animalerie n°59-350294, Autorisation d'expérimentation animale, approbation du projet par notre comité d'éthique local n°APAFIS#2915-201511300923025v4). L'ensemble de ces expérimentations a été réalisé sur des souris mâles. Les animaux sont hébergés dans des cages en plexiglass transparentes à une température régulière de 23°C avec un cycle de lumière/obscurité de 12 heures. Les souris ont été sevrées 21 jours après leur naissance et ont un accès *ad libitum* à la

nourriture (régime RM1, Special Diets Services) et à l'eau. Pour les expériences de régime riche en graisse (HFD), des souris de 6 semaines ont été placées sous HFD (60% d'acides gras, 30% de glucides et 10 % de protéines, Research Diet, D12492i) pendant 16 à 20 semaines. Afin d'évaluer la prise de poids, les souris sont pesées chaque semaine et les expériences de tests métaboliques ont été réalisées toutes les 4 semaines. Les souris $E2f1^{+/+}$ et $E2f1^{-/-}$ proviennent de Jax Lab et sont disponibles au laboratoire (fond génétique SV129xC57Bl6J). Les souris $E2f1^{\beta^{-/-}}$ (fond génétique C57Bl6J) ont été générées par le laboratoire après croisements entre les souris Rip-Cre (souris exprimant la cre-recombinase sous l'action du Rat Insulin promoter) (429) et des souris dont les exons 2 et 3 du gène $E2f1$ est flanqué de sites $LoxP$ ($E2f1^{fl/fl}$). Les souris $E2f1^{fl/fl}$ ont été générées pour le laboratoire par Taconic (26619117). Les souris possédant la cassette Rosa26-loxP-LacZ-LoxP-h2E2F1 (souris RFC) ont été obtenues auprès du Pr Ulrike Ziebold (430). Des souris hétérozygotes RFC/+ ont été croisées avec des souris RipCre pour obtenir des souris RipCre-RFC ($E2F1^{\beta over}$) et des souris RFC/+ ($E2F1^{\beta ctrl}$).

II.2 Génotypage des lignées de souris

Le génotypage des souris s'effectue à l'aide d'une biopsie de queue digérée dans 100 μ l de Direct PCR Tail (Viagen, #102-T) + 1 μ l de Protéinase K à 55°C, pendant 16 heures, puis à 85°C pendant 45 minutes toujours sous agitation. La PCR est réalisée à l'aide d'un mix composé de 10 μ l de Hot Start Phire Green 2X (Thermo scientific, F126) + 2 μ l d'oligonucléotides + 1 μ l d'ADN + H₂O qsp 20 μ l. La liste des oligonucléotides utilisées dans la thèse est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des oligonucléotides utilisées pour le génotypage des différentes lignées de souris

Gène	Oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide
POMC Cre	Cre1	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	Cre2	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
	Cre3	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	Cre4	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
Tomato	Tomato1	AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA
	Tomato2	CCGAAAATCTGTGGGAAGTC
	Tomato3	GGCATTAAAGCAGCGTATCC
	Tomato4	CTGTTCCCTGTACGGCATGG
E2f1 Flox	6441_32	AATGGGCCTAAGGTTGTGG
	6441_33	TCCCCTTAAACGTAAGCTGG
RFC	E2f1_Fo5	TATGACACCTCACTGAATCTGACC
	E2f1_Re6	GATCTGAAAGTTCTCCGAAGAGTC
E2f1	E2f1_Wt1	GGATATGATTGTTGGACTTCTTGG
	E2f1_Wt2	CTAAATCTGACCACCAAACGC
	E2f1_PGK	CAAGTGCCAGCGGGGCTGCTAAAG

II.3 Présentation des différents tests métaboliques

II.3.1 Test de tolérance à l'insuline

Pour le test de tolérance à l'insuline (ITT), les souris sont mises à jeun pendant 5h. Une solution d'insuline (Sigma, I9278) diluée à 0,75 U/Kg de souris est injectée en intra péritonéale. L'évolution de la glycémie est mesurée avant l'injection, puis 15, 30, 45, 60 et 90 minutes après l'injection à l'aide d'un glucomètre Accucheck Performa (Roche).

II.3.2 Tests de tolérance au glucose

Les tests de tolérance au glucose oral ou en intra-péritonéal (oGTT et ipGTT respectivement) ont été réalisés après un jeûne de 16h. Les animaux ont été gavés ou injectés en ip avec une solution de D-glucose (Sigma, G8769) concentrée à 2g/Kg ou de 1,5g/Kg en fonction du régime alimentaire des souris. La mesure de la glycémie s'effectue à l'aide d'un glucomètre Accucheck Performa à 0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes après l'administration de glucose.

II.3.3 Dosage de l'insulinémie

Au cours des oGTT et ipGTT, un prélèvement de sang de la veine caudale est réalisé à T0, T15 et T30, puis centrifugés pendant 20 minutes, à 4500 RPM à 4°C afin de récupérer le sérum qui sera congelé à -80°C, puis l'insulinémie sera dosée par ELISA.

II.3.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

La concentration plasmatique en insuline est mesurée par ELISA à l'aide du kit « Ultrasensitive mouse Insulin » (Merckodia, 10-1249-01) pour le sérum des souris sous régime Standard et du kit « Mouse Insulin » (Merckodia, 10-1247-01) pour le sérum de souris sous régime riche en graisse. Les dosages d'insuline sur îlots isolés des souris et cellules Min6 ont été réalisés avec le kit « Mouse Insulin » (Merckodia, 10-1247-01). Le dosage d'insuline à partir d'îlots humain a été effectué à l'aide du kit « human insulin » (Merckodia, 10-1113-01). Le dosage s'effectue sur 10µl de sérum selon le protocole du fabricant. La densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Promega) et les calculs de concentration d'insuline ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel sur la base d'une gamme étalon, comme indiqué par le fabricant.

II.4 Isolement d'îlots de Langerhans de souris

Après sacrifice des souris par dislocation cervicale, le pancréas est digéré par une solution de collagénase à 1,5mg/ml pendant 8 minutes à 37°C sous agitation après injection de la collagénase par le canal cholédoque. Par la suite, les îlots sont purifiés par centrifugation dans des gradients d'Histopaque décroissants (Sigma, 11191) à 2000 RPM pendant 45 minutes, puis repiqués et comptés à la main sous une loupe (Leica). Les îlots sont ensuite cultivés O/N dans un milieu contenant du RPM1640 + Glutamax (Gibco, 61870044) + 10% de SVF + 10 000 u/mL de Pénicilline/Streptomycine.

III. Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose

Pour mesurer de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, 30 îlots pancréatiques de taille similaire ont été isolés de souris ou de donneurs humains puis sontensemencés dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Pour les cellules Min6, 10 000 cellules sont platées dans une plaque 96 puits. Après lavage dans du PBS1X, les îlots et les Min6 sont cultivés dans une solution de Krebs Ringer Buffer (KRB) (NaCl 115 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 130 mM, NaHCO₃ 20 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, HEPES 16 mM) et contenant 0,5% de Bovine Serum Albumin (BSA). Après 1h, le milieu est enlevé et remplacé par 200 µL d'une solution de KRB/BSA + 2,8 mM de glucose déposé pendant 1h. Le milieu est ensuite récupéré puis stocké à -80°C. Par la suite, 200 µL de KRB/BSA + 16,7 mM de glucose sont déposés pendant 1 h, puis le milieu est à nouveau récupéré pour être stocké à -80°C. Enfin, une solution de KRB/BSA contenant 16,7 mM glucose + 50 nM d'exendine-4 est déposée pendant 1H. Après récupération du surnageant, les cellules ou les îlots sont lysés à l'aide d'une solution d'acide alcool (1,5% de HCl 0,18 M, 75% Ethanol, qsp H₂O), puis stockés à -80°C avant d'être dosés afin de mesurer le contenu intracellulaire en insuline.

IV. Culture cellulaire

IV.1 Présentation de la lignée cellulaire Min6

Les cellules Min6, issues de lignées de cellules β pancréatiques de souris (Addex Bio) sont cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) contenant du Glutamax (Gibco, 31965-039) et supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal (SVF), 55 µM de β-mercaptoéthanol et de la pénicilline/streptomycine (P/S) à raison de 10000 U/ml, dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO₂. Ces cellules sont décollées de la flasque de culture à l'aide de 2ml de trypsine (Gibco, 25300-054) à 37°C, puis comptées à l'aide du Luna II Automated Cell counter (Logos). Après le comptage, les cellules seront platées dans une plaque de culture adéquate à l'expérience choisie.

IV.2 siRNA (Small interfering RNA)

Pour les expériences de siRNA, les cellules sont platées et cultivées dans du milieu de Min6 sans P/S. Les cellules sont ensuite transfectées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre *E2f1* (Dharmacon, Smartpool) à une concentration de 5 nM à l'aide du DharmaFECT1 transfection reagent (Dharmacon) en suivant les instructions du fabricant. Schématiquement, le siRNA est dilué à 5nM puis mis en contact pendant 20 minutes avec le DharmaFECT1. Après 20 minutes d'incubation, la solution composée des siRNA et du tampon de transfection est mise en contact avec les cellules. Les expériences sur les Min6 sont par la suite réalisées 48H après la transfection.

IV.3 Transfection transitoire de plasmide

Pour les expériences de transfection de plasmide, les Min6 sont cultivées dans du milieu de Min6 sans P/S. Les cellules sont ensuite transfectées avec différents plasmides à l'aide de la lipofectamine 2000 (Life technologies). Les cellules sont transfectées à environ 70% de confluence. L'ADN plasmidique et la Lipofectamine2000 sont dilués dans de l'Opti-MEM facilitant la transfection. Après incubation pendant 20 minutes, le mix est déposé sur les cellules et les échantillons sont récupérés 24 à 48 heures après la transfection.

IV.4 Analyse de l'activité luciférase

48 heures après la transfection, la mesure de l'activité luciférase est réalisée à l'aide du kit « Luciferase Assay system » (Promega, E1500). Après lavage au PBS1X, les cellules sont lysées à l'aide de 100 µL de tampon de lyse « Cell culture Lysis 5X reagent », et le lysat cellulaire sera congelé à -80°C. Le lendemain, 50 µL de lysat cellulaire est déposé dans une plaque 96 puits, puis 100 µL de « Luciferase assay reagent » est ajouté. La lecture de la luminescence est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (Promega) à 450 nm. La normalisation est réalisée à l'aide de la lecture de l'activité de la β-galactosidase, mesurée à une longueur d'onde de 450 nm.

IV.5 Mesure de l'activité cellulaire par la technologie Seahorse

Le seahorse Xfe-24 (Agilent) est une technologie qui permet d'analyser l'activité cellulaire par mesure de la glycolyse (mesure du taux d'acidification du milieu extracellulaire (ECAR)) ou par la mesure de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, analysée par la mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR). Les mises au point ont révélé que la meilleure densité cellulaire était de 40 000 cellules. Après ensemencement de ces cellules dans une plaque 24 puits Seahorse, celles-ci sont ensuite traitées pendant 48 h avec, soit 0,1% de DMSO, soit 10 µM de HLM006474. 48h après le début du traitement, les cellules Min6 sont incubées pendant une heure dans un milieu comprenant 2,8 mM de glucose ou soit 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4. Pour l'analyse de l'activité mitochondriale, une solution de 20 mM de glucose, puis une autre solution 2 µM d'Oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) sont utilisées à différents temps. Après avoir effectué les mesures de l'activité mitochondriale, les cellules sont lysées dans 100 µL de tampon de lyse (NaCl137 mM, Glycérol 10%, Tris 50 mM pH8, NP40 1% et H₂O). L'analyse de la quantité protéique par l'utilisation du kit « Pierce BCA protein assay kit » permet de normaliser l'activité mitochondriale au nombre de cellules.

V. Analyse de l'expression génique

V.1 Extraction d'ARN

Les ARN des cellules Min6, d'îlots de souris et d'îlots humains sont extraits à l'aide d'un tampon de lyse composé de 350 μ L de RLT (provenant du kit Rneasy Micro Kit) et de 1% de β -mercaptoéthanol, après plusieurs lavages à l'aide de PBS 1X (Phosphate-buffered saline). L'ARN est ensuite extrait à l'aide du kit Rneasy micro kit (Qiagen, 74004) en suivant les recommandations du fabricant.

V.2 Synthèse de l'ADNc par rétro-transcription

Après extraction, la quantité d'ARN est mesurée par Nanodrop®. La rétro-transcription (rt) est effectuée à partir de 100 ng pour les îlots de souris et humains et de 500 ng pour les cellules Min6 à l'aide de la Superscript III (InVitrogen). Dans un premier temps, un mix composé de 1 μ L de Random Hexamer et 1 μ L de dNTP à 10 mM est déposé sur 11 μ L d'ARN et incubé pendant 5' à 4°C, puis 5' à 65°C. Dans un second temps, un mix composé de 7 μ L de DTT 0,1M, 0,6 μ L de Superscript III, 1,4 μ L de Tampon5X et d'H₂O qsp 20 μ L est déposé sur l'ARN puis incubé 5' à 25°C, puis 60' à 50°C et enfin 15' à 70°C.

V.3 PCR quantitative (qPCR)

Pour la réaction de qPCR, un mix composé de 0,6 μ L d'amorces sens et antisens à 10 μ M (Tableau 2) de nos gènes d'intérêt, 7,5 μ L de SYBrmix 2x (Roche), 1,9 μ L d'H₂O, et 5 μ L d'ADNc dilué au 1/20^{ème} est préparé. La mesure d'expression génique est réalisée à l'aide du LightCycler 480 (Roche). La quantité d'ARNm est calculée par la méthode du $\Delta\Delta$ CT (« cycle threshold) en comparant le cycle seuil du gène d'intérêt à celui du gène de ménage, la *Cyclophiline A*.

Tableau 2 : Liste des oligonucléotides utilisées pour les qPCR.

Gène	Oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide
<i>Cyclophiline A</i>	Sens	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC
	Anti-sens	TTGCCATTCTGGACCCAAA
<i>E2f1 Exon3</i>	Sens	CAAACGCTTCTTGGAGCTGCTGAG
	Anti-sens	GGCTGCCTAGCCACTGGATATGAT
<i>Pdx1</i>	Sens	CCCCAGTTTACAAGCTCGCT
	Anti-sens	CTCGGTTCCATTCCGGGAAAGG
<i>Ucn3</i>	Sens	TGATGCCACCTACTTCCTG
	Anti-sens	CTGTGTTGAGGCAGCTGAAG
<i>Kcnj11</i>	Sens	CACAAGCTGGGTTGGGGGCTC
	Anti-sens	TGCCCTCAGCTGGGTTCTGC
<i>MafA</i>	Sens	CCTGTAGAGGAAGCCGAGGAA
	Anti-sens	CCTCCCCAGTCGAGTATAGC
<i>Slc2a2</i>	Sens	AACCGGGATGATTGGCATGT
	Anti-sens	GGCGAATTTATCCAGCAGCA
<i>Gck</i>	Sens	GCTCAGTGAACCCCGTCAGC
	Anti-sens	TGTGCGCAGCTGCTCTGAGG
<i>P2y1</i>	Sens	TGGAGACACGAGTTTGTGAAGGCACG
	Anti-sens	CAAGTTCAGGTGGCCAGTTTCTTGG
<i>Ngn3</i>	Sens	AATTTACTCCAGGCGAGGGC
	Anti-sens	GCCATCCTAGTTCTCCCGAC
<i>Arx</i>	Sens	GCGGGCTTTCCAGAAGACGC
	Anti-sens	CTGGAACCACACCTGGACTCGG
<i>Glp1r</i>	Sens	GTTTCCTCACGGAAGCGCCA
	Anti-sens	AAGGAACCTGGGGGCCATC
<i>hGLP1R</i>	Sens	AGTCCAAGCGAGGGGAAAGA
	Anti-sens	GAGGCGATAACCAGAGCAGAG
<i>hE2f1</i>	Sens	CCGCCATCCAGGAAAAGGTG
	Anti-sens	GTCAGTGGCCCTGTTCTCCTC

VI. Expériences d'immunoprécipitation de la chromatine

VI.1 Analyse *in silico* de la région promotrice du récepteur au Glp-1 murin.

La séquence ADN du promoteur du *Glp1* a été obtenue en utilisant le site Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). La recherche de motif a été réalisée à l'aide de LASAGNA-Search tool (431).

VI.2 Immunoprécipitation de la chromatine et qPCR

Les cellules Min6 ont été transfectées avec un vecteur vide pCMV10 ou un vecteur pCMV10-hE2F1-Flag. 48 heures après la transfection, les complexes ADN-protéines ont été fixés à l'aide d'un traitement à 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes, puis la réaction a été stoppée par l'ajout d'une solution de Glycine à une concentration de 0,125M pendant 5 minutes. Par la suite, les cellules ont été lysées à l'aide d'un tampon de lyse (1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH8,0), puis soniquées à l'aide d'un Bioruptor (Diagenode, ref B01060010) pendant 15 minutes sur des cycles de 30 secondes ON/ 30 secondes OFF. Après sonication, les protéines ont été immunoprécipitées à l'aide d'anticorps anti-IgG ou anti-Flag (Flag BioM2, Sigma, F9291). Après plusieurs lavages à l'aide d'un tampon composé

(RIPA Buffer + 1/7000 tRNA), les liaisons covalentes générées par le traitement au formaldéhyde entre protéines et ADN sont cassées en chauffant pendant 16 heures à 65°C, permettant de récupérer l'ADN immunoprécipité. Par la suite, l'ADN est purifié à l'aide du Kit Min Elute PCR purification kit (Qiagen) et la qPCR a été réalisée à l'aide d'amorce spécifique au promoteur du Glp-1 (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des oligonucléotides utilisées pour les qPCR après immunoprécipitation de la chromatine

Gène	Oligonucléotide	Séquence de l'oligonucléotide
<i>Prom_Glp-1r</i>	Sens	CTGCGGCTCTTAAACCTGAG
	Anti-sens	CTGTCCTCTTCCGCCTGG
<i>Chromosome 7</i>	Sens	ACTCTGCCTGTCACCCTTTT
	Anti-sens	GGTGTCAAGAGAGTGTGGGA

VII. Séquençage à haut débit de l'ARNm et de l'immunoprécipitation de la chromatine

VII.1 Séquençage de l'ARNm d'îlots des souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-}

Pour le séquençage de l'ARN, l'ARN totale a été extraite des îlots de souris à l'aide du Rneasy Plus Microkit (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. La qualité de l'ARN a ensuite été vérifiée à l'aide de la « RNA 6000 nanochips » sur le Bioanalyseur 2100 (Agilent). 50 ng d'ARN purifié avec un « RNA Integrity number » (RIN) supérieur ou égal à 8 ont été utilisés pour la préparation des bibliothèques (TruSeq stranded mRNA Library Preparation Kit, Illumina) et séquencés sur un « HiSeq2500 » (Illumina). Une moyenne de 54 millions de « Reads » de 75 paires de bases a été générée pour chaque échantillon. Après validation de la qualité des séquences, les « reads » ont été alignés sur le génome de référence de la souris (mm10) à l'aide de TopHat2. La quantification et l'annotation des « reads » ont été réalisées à l'aide de « Bioconductor Rsubread ». Les analyses d'expression génique différentielle ont été réalisées à l'aide du logiciel Bioconductor DESeq2. En utilisant une valeur p ajustée aux comparaisons multiples inférieure à 0,05 comme seuil de significativité, une analyse des voies de signalisation modulées a été réalisée sur la liste de gènes significativement modulés en utilisant les logiciels « IPA » et « Metascape » (432).

VII.2 Séquençage de l'ADN après immunoprécipitation de la chromatine

Après transfection, une immunoprécipitation de la chromatine et une purification de l'ADN, 1 ng d'ADN ont été utilisés pour préparer les bibliothèques avec le kit Nextflex rapid DNA seq 2.0 (Perkin Elmer, NOVA-5188-01) sur le séquenceur « NextSeq » de 100 paires de bases. Le démultiplexage des données de séquence a été effectué à l'aide du logiciel de conversion bcl2fastq (Illumina, version 2,20). Le rognage des adaptateurs et des « reads » de faible qualité a été effectué à l'aide de TrimGalore (Version 0.4.5). Par la suite, les séquences obtenues à partir de fichiers FASTQ ont été alignées sur le

génomique de la souris (mm10) à l'aide de Bowtie2Aligner (Version 2.3.5.1). Enfin, afin d'identifier les gènes, un « peak-calling » a été réalisé avec le logiciel MACS2 (version 2.2.7.1). Les études bio-informatiques ont finalement été réalisées à l'aide de la plateforme Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu>). La recherche de motif a été réalisée à l'aide de LASAGNA-Search tool (431).

VII.3 Analyse ChromHMM

Le logiciel ChromHMM est un logiciel qui permet de caractériser et « clusteriser » les états de la chromatine après des expériences de séquençage de l'immunoprécipitation de la chromatine. Pour cette étude, les marques chromatiniennes suivantes ont été utilisées : H3K4me3, H3K27ac, H3K9ac ou H3K4me1 pour les marques d'histones activatrices et H3K27me3 pour la marque d'histone inhibitrice. Le logiciel permet de modéliser explicitement la présence ou l'absence de chaque marque d'histone et de segmenter le génome de multiples états chromatiniens (dans cette étude, 16 états seront définis).

VIII. Western-Blot

VIII.1 Extraction protéique et dosage

Après 48h de transfection, les cellules Min6 sont lavées deux à trois fois à l'aide de PBS1X et lysées avec un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycérol, 1% NP-40) supplémenté avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Roche) et d'inhibiteurs de phosphatases (ThermoFischer). Les cellules sont ensuite incubées pendant 20' à 4°C, puis le lysat cellulaire est centrifugé pendant 20 minutes, à une vitesse 15000 RPM et à une température de 4°C afin de récupérer les protéines présentes dans le surnageant. Le dosage protéique est ensuite réalisé à l'aide du Kit « Pierce BCA protein assay » (Thermofischer, A53225) selon les recommandations du fabricant

VIII.2 Fractionnement cellulaire

Afin de déterminer la localisation cellulaire de E2f1 dans la cellule Min6, les protéines cytoplasmiques puis nucléaires ont été extraites séparément à l'aide du kit « Nuclear extract kit » (Active motif). Après 48h de transfection, les cellules sont lavées, puis grattées à l'aide de PBS1X et enfin centrifugées pendant 100 minutes à 4°C à 200g. Les cellules sont resuspendues dans 500 µL de Tampon hypotonique 1X pendant 15 minutes. 25 µL de détergent est ensuite ajouté et les cellules sont ensuite mélangées pendant 10 secondes puis centrifugées à 14000g, 4°C pendant 30 secondes. Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est ensuite transféré dans un nouveau tube. Les cellules sont par la suite resuspendues avec 50 µL de tampon de lyse pendant 30 minutes à 4°C dans l'objectif de lyser le noyau et récupérer les protéines nucléaires. Par la suite, le lysat cellulaire est centrifugé 10 minutes à 4°C à 14000 g et le surnageant contenant les protéines nucléaires est transféré dans un nouveau tube. Les

protéines cytoplasmiques et nucléaires sont ensuite dosées à l'aide du kit « Pierce BCA protein assay » (Thermofischer, A53225).

VIII.3 Western Blot

Pour le Western blot, 40 µg de protéines totales sont déposés sur un Gel de SDS (Dodecylsulfate de sodium) (Biorad) et migrent à un voltage constant de 110V. Après migration, le transfert sur membrane de nitrocellulose s'effectue pendant 1h à 110V. Le blocage des sites non-spécifiques s'effectue à l'aide d'une solution de Tris-buffered saline (TBS)-Tween 0,05% supplémenté avec 5% de lait pendant 1h. Les membranes sont ensuite incubées O/N pendant 4°C avec les anticorps primaires dans du TBS-Tween 0,05% supplémenté avec 3% de BSA (Bovine serum albumin) ou de lait. Après 16 heures, les membranes sont lavées 3 fois 7 minutes dans une solution de TBS-Tween 0,05%, puis incubées pendant 1H avec les anticorps secondaires couplés à la Horseradish peroxidase (HRP) dilués dans une solution de TBS-Tween 0,05% supplémenté avec 3% de lait. Après 1h, les membranes sont à nouveau lavées 3 fois 7 minutes avec une solution de TBS-Tween 0,05%. La révélation des bandes luminescentes est réalisée à l'aide du kit « Pierce ECL Western blotting substrate » ou « Supersignal West DURA extended duration substrate » (Thermofischer) à l'aide du Chemidox Xrs+ (Biorad). L'intensité du signal des bandes observées est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

IX. Profilage du Kinome

IX.1 Extraction protéique pour expérience de Pamgene

Après leur mise en culture, les îlots de souris et humains sont lavés 3 fois dans du PBS 1X, puis lysés à l'aide du tampon M-PER (Mammalian Protein extraction reagen) (ThermoFischer) supplémenté avec un inhibiteur de phosphatase (ThermoFischer). Après incubation pendant 20 minutes à 4°C, le lysat cellulaire est centrifugé à 4500 RPM pendant 20 minutes à 4°C, puis aliquoté dans différents tubes afin d'éviter les cycles de congélation et décongélation pouvant modifier l'activité des kinases et placés à -80°C. Le dosage protéique s'effectue comme précédemment indiqué.

IX.2 Pamgene

Le Pamgene est une technologie qui permet de déterminer l'activité de sérine thréonine kinases (STK) ou des phosphotyrosines kinase (PTK) par mesure de la phosphorylation de peptides sur une puce. Une puce STK (puce utilisée pour nos expériences) contient sur une membrane poreuse, 144 séquences peptidiques de 13 AA hébergeant des sites de phosphorylation dérivés de la littérature et corrélés à l'action de nombreuses kinases. L'échantillon composé des protéines est déposé sur la puce qui sera placée dans la Pamstation afin d'incuber les échantillons à une température de 37°C. Pendant l'incubation, l'échantillon est pompé dans les deux sens de la membrane afin de maximiser la cinétique de liaison de phosphorylation aux AAs. La phosphorylation est détectée par l'ajout d'anticorps primaire

capable de reconnaître une phosphorylation sur les sérines-thrénine et d'anticorps secondaire dirigés contre l'anticorps primaire couplés à un fluorophore. L'analyse cinétique de la fluorescence est par la suite réalisée à l'aide d'une caméra CCD présente au sein de la Pamstation permettant de définir le niveau de phosphorylation du peptide (Figure 24, (433)).

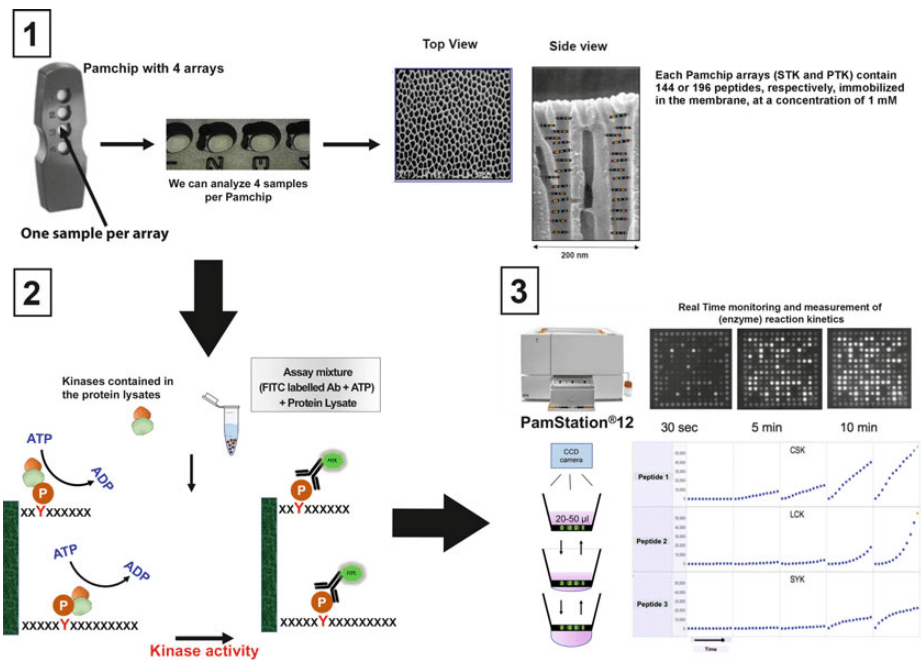


Figure 24 : Principes techniques de la technologie PamGene (Adaptée de Chirumamilla et al., 2019)

En 1, les puces STK ou PTK vont présenter sur chaque puits 144 ou 196 séquences peptidiques phosphorylables, respectivement. Par la suite, les peptides sont incubés avec le lysat protéique comprenant les kinases. Au cours de l'incubation, le lysat est pompé à travers la membrane permettant les réactions de phosphorylation. La phosphorylation sera reconnue par un anticorps couplé au FITC utilisé pour détecter le signal de phosphorylation à l'aide d'une caméra CCD.

IX.3 Ingenuity Pathway Analysis

Les différences de phosphorylation des peptides (Log2FC) ainsi que leur p-value associée vont permettre, à l'aide du logiciel IPA « Ingenuity pathway analysis » (Qiagen), de déterminer les voies moléculaires modulées en fonction des traitements.

X. Immunohistochimie et Immunofluorescence

X.1 Préparation des tissus et inclusion en paraffine

Les pancréas prélevés sur les souris sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PAF) à 4%. Une déshydratation des tissus par bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (70%, 90% et 100%) puis les tissus sont envoyés au service d'histologie de la Faculté de médecine de Lille pour être inclus en bloc de paraffine. Les blocs sont ensuite coupés en section de 5 μm qui sont déposées sur des lames adhésives, TOMO (VWR, 631-1239) ou des lames adhésives superfrost + (Thermoscientific, J1800ADN2)

X.2 Immunofluorescence

Les lames sont déparaffinées par 3 bains de cleraene, réhydratées par 3 bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (100%, 90% et 70%), puis rincées à l'eau. Afin de permettre le démasquage des sites antigéniques, les lames sont placées dans 200 mL de tampon Citrate 1X (Thermo scientific) et chauffées au micro-onde à 520 W pendant 2 minutes, puis à 160 W pendant 10 minutes. Après deux rinçages dans du TBS1X Triton 0,025% pendant 7 minutes, les coupes sont délimitées à l'aide d'un crayon projetant une encre hydrophobe (DAKOPEN) afin d'y déposer les futures solutions d'anticorps primaires. 150 μL d'une solution de Blocking Buffer (Thermo scientific, 37520) composée de TBS-BSA 1%, 5% de sérum de chèvre et 5% de sérum d'âne sont déposés pendant une heure sur chaque coupe dans l'objectif de bloquer les sites antigéniques non-spécifiques. Par la suite, 150 μL de solution composée de TBS-BSA 1% et des anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêts sur chaque coupe sont laissés en incubation toute la nuit à 4°C. Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans du TBS1X contenant 0,025% de Triton. 150 μL d'une solution de TBS 1X BSA 0,025% et d'anticorps secondaires diluée au 1/100^{ème} et de Hoeschst dilué au 1/1000^{ème} sont ensuite ajoutés pendant 1h. Pour finir, les lames sont montées à l'aide de Fluorescent Mounting Medium (NE Biotech, NB-2300158-2), puis une lamelle est posée sur la lame. Les lames sont observées au Microscope à fluorescence confocale Zeiss LSM 710 Airyscan et Zeiss Spining Disk.

X.3 Immunohistochimie pour mesurer la masse de cellules β

Afin de mesurer la masse de cellules, l'ensemble du pancréas des souris a été coupé et déposé sur lame. 6 lames à intervalle régulier pour chaque souris sont sélectionnées. Par exemple, si 120 lames ont été coupées pour un pancréas, les lames 20, 40, 60, 80, 100 et 120 vont être analysées. Les lames sont déparaffinées selon le même protocole que pour l'immunohistochimie. Les cellules β sont colorées à l'aide d'un anticorps-primaire anti-insuline (DAKO) et d'un anticorps secondaire couplé à la HRP (Ozyme). Le DAB+ (DAKO) est utilisé comme substrat pour activer la HRP et une contre coloration du pancréas est réalisée à l'aide de l'hématoxyline (Biosite, BS-CQEGON-1000). Une photo de chaque

coupe est prise par un microscope optique automatisé (Zeiss Axio scan. Z1). Chaque section est entièrement analysée et la mesure de la surface des cellules β , de la surface du tissu et le nombre d'îlots par coupe sont réalisés par une macrocommande sur le logiciel ImageJ créé par la plateforme d'imagerie de la faculté de médecine de l'université de Lille (BICeL).

XI. Analyse statistique

Les résultats sont présentés en moyennes \pm s.e.m. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test du *t* de student, une analyse de variance à une voie (One-way ANOVA) suivi par un test de Dunnett's, une analyse de variance à deux voies (Two-Way ANOVA). Ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9.0. Les différences sont considérées comme statistiques à $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ et **** $p < 0.0001$)

Partie 1 :

**Caractérisation métabolique des modèles
de souris $E2f1^{\beta-/-}$ et $E2f1^{\beta over}$ et analyse
des voies moléculaires contrôlées par
 $E2f1$ dans la cellule β pancréatique**

Résultats

L'ensemble des données de la littérature étudiant le rôle de E2f1 dans la cellule β a été obtenu à l'aide de lignées cellulaires ou de modèles de souris déficientes pour E2f1 dans l'ensemble de l'organisme ($E2f1^{-/-}$) (434). Les résultats obtenus au cours de ces études ont montré le rôle important de E2f1 dans la cellule β . En effet, les souris $E2f1^{-/-}$ présentent un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose par diminution d'expression de *Kir6.2* (419), une diminution de la taille du pancréas accompagnée d'une diminution de la masse des cellules β (417). C'est pourquoi, dans le but d'étudier spécifiquement le rôle de E2f1 dans la cellule β , un modèle de délétion de *E2f1* dans la cellule β pancréatique a été développé au laboratoire à l'aide de la technologie Cre/LoxP (435). Pour cela, des souris exprimant la cre-recombinase sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline (Rip Cre⁺) (429) ont été croisées avec des souris dont les exons 2 et 3 du gène *E2f1* sont flanqués de deux sites LoxP (Taconic biosciences, NY, USA) ($E2f1^{LoxP/LoxP}$) (412) pour générer le modèle de souris invalidé spécifiquement dans la cellule β , dénommé par la suite $E2f1^{\beta-/-}$. La première étape de notre étude avait pour objectif de valider la délétion de *E2f1* dans la cellule β pancréatique et d'étudier le phénotype métabolique de notre modèle de souris.

I.1. Phénotypage métabolique des souris invalidées pour E2f1 dans la cellule β pancréatique

Dans l'objectif de valider le modèle $E2f1^{\beta-/-}$, l'analyse de l'expression génique par qPCR (quantitative polymerase chain reaction) de *E2f1* dans l'îlot de Langerhans, l'hypothalamus, le cœur, le foie, le tissu adipeux blanc epididymal, le tissu adipeux brun et le muscle a été réalisée dans l'ensemble des modèles transgéniques développés (Rip Cre⁺, $E2f1^{LoxP/LoxP}$ et $E2f1^{\beta-/-}$) âgés de 3 mois. A l'aide d'oligonucléotides spécifiques aux exons 2 et 3 de *E2f1* (Tableau 2), une diminution d'expression d'environ 85% de *E2f1* a été observée dans les îlots des souris $E2f1^{\beta-/-}$ comparé aux deux modèles contrôles Rip Cre⁺ et $E2f1^{LoxP/LoxP}$ (Figure 25, A). Aucune modification d'expression de *E2f1* n'est observée dans les autres tissus analysés (Figure 25, A) permettant de valider la diminution d'expression génique de *E2f1* spécifiquement dans l'îlot de Langerhans. Un test de tolérance au glucose par injection en intra-péritonéale (ipGTT) réalisé sur des souris âgées de 4 mois a permis de mettre en évidence que les souris $E2f1^{-/-}$ développaient une intolérance au glucose (Figure 25, B, C) associée à un défaut de sécrétion d'insuline *in vivo* 30 minutes après l'injection de glucose (Figure 25, D). Dans l'objectif de déterminer si cette gluco-intolérance n'est pas la conséquence d'une diminution de la sensibilité à l'insuline des souris $E2f1^{\beta-/-}$, un test de sensibilité à l'insuline a été réalisé. Les résultats obtenus montrent que la sensibilité à l'insuline des souris $E2f1^{\beta-/-}$ est identique à celle des souris Rip Cre⁺ et

E2f1^{LoxP/LoxP} (Figure 25, E). L'ensemble de ses résultats mettent donc en évidence que la diminution d'expression de *E2f1* dans la cellule β entraîne une gluco-intolérance chez la souris, probablement liée à un défaut de la sécrétion d'insuline en réponse à une élévation de la glycémie.

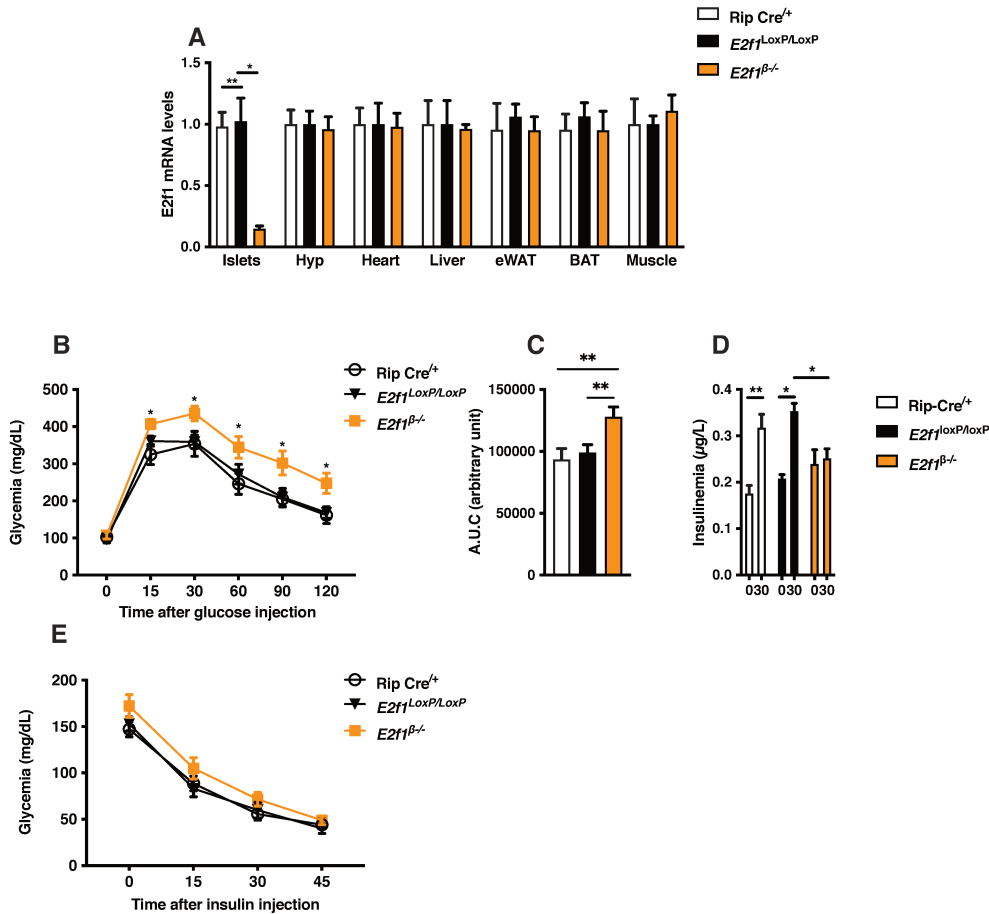


Figure 25 : La perte d'expression de *E2f1* dans la cellule β entraîne une gluco-intolérance associée à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (A) Analyse de l'expression en ARNm de *E2f1* par qPCR dans les îlots de Langerhans, l'hypothalamus, le cœur, le foie, le tissu adipeux blanc epididymal, le tissu adipeux brun et le muscle de souris Rip Cre⁺, *E2f1^{LoxP/LoxP}* et *E2f1^{β-/-}*. (B) Mesure de la glycémie des souris Rip Cre⁺ (n=8), *E2f1^{LoxP/LoxP}* (n=7) et *E2f1^{β-/-}* (n=12) à différents temps après injection d'une dose (2g/kg) de glucose en *i.p.* (T0, T15, T30, T45, T60, T90 et T120) exprimé en mg/dL. (C) Aire sous la courbe (AUC) du test de tolérance au glucose. (D) Insulinémie (μg/L) des souris Rip Cre⁺ (n=8), *E2f1^{LoxP/LoxP}* (n=7) et *E2f1^{β-/-}* (n=12) avant injection de glucose (T0) et 30 minutes après injection de glucose (T30). (E) Mesure de la glycémie des souris Rip Cre⁺ (n=8), *E2f1^{LoxP/LoxP}* (n=8) et *E2f1^{β-/-}* (n=8) à différents temps après injection d'insuline (0,75U d'insuline/kg) en *i.p.* (T0, T15, T30 et T45). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par One-way ANOVA et Two-way ANOVA. *p < 0.05; **p < 0.01.

Considérant que les niveaux d'expression génique de *E2f1* dans les îlots de Langerhans des souris contrôles Rip Cre⁺ et *E2f1^{LoxP/LoxP}* sont identiques et qu'aucune différence de phénotype métabolique n'a été observé, il a été considéré d'utiliser uniquement les souris *E2f1^{LoxP/LoxP}* comme souris contrôles pour la suite de cette étude. L'utilisation du modèle Rip Cre⁺ permet l'expression de la Cre-recombinase et la délétion du gène « floxé » au moment de l'activation de l'expression de l'insuline, soit au stade E9.5 (24). *E2f1* possédant un rôle clé dans la prolifération et le développement de la cellule β pancréatique (417, 421), il était nécessaire de déterminer à partir de quelle période de sa vie

la souris développe une gluco-intolérance comme observée précédemment (Figure 25). Pour cela, des souris âgées de 6, 8 et 12 semaines ont été soumises à un test de tolérance au glucose (Figure 26). Les résultats montrent que les souris $E2f1^{\beta-/-}$ âgées de 6 semaines ne possèdent pas de modifications du poids de corps (Figure 36, A) et de la glycémie après injection de glucose (Figure 26, B, C) associées à une sécrétion normale d'insuline en réponse au glucose (Figure 26 D). A 8 semaines d'âge, les souris $E2f1^{\beta-/-}$ ne présentent pas de différence de poids (Figure 26, E), de tolérance au glucose (Figure 26, F, G), ainsi que de sécrétion d'insuline (Figure 26, H). A 12 semaines, aucune différence de poids n'est constatée entre les souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ (Figure 26, I). Néanmoins, les souris $E2f1^{\beta-/-}$ présentent une gluco-intolérance marquée (Figure 26, J K), associée à une diminution de la sécrétion d'insuline 15 minutes après injection de glucose (Figure 26, L).

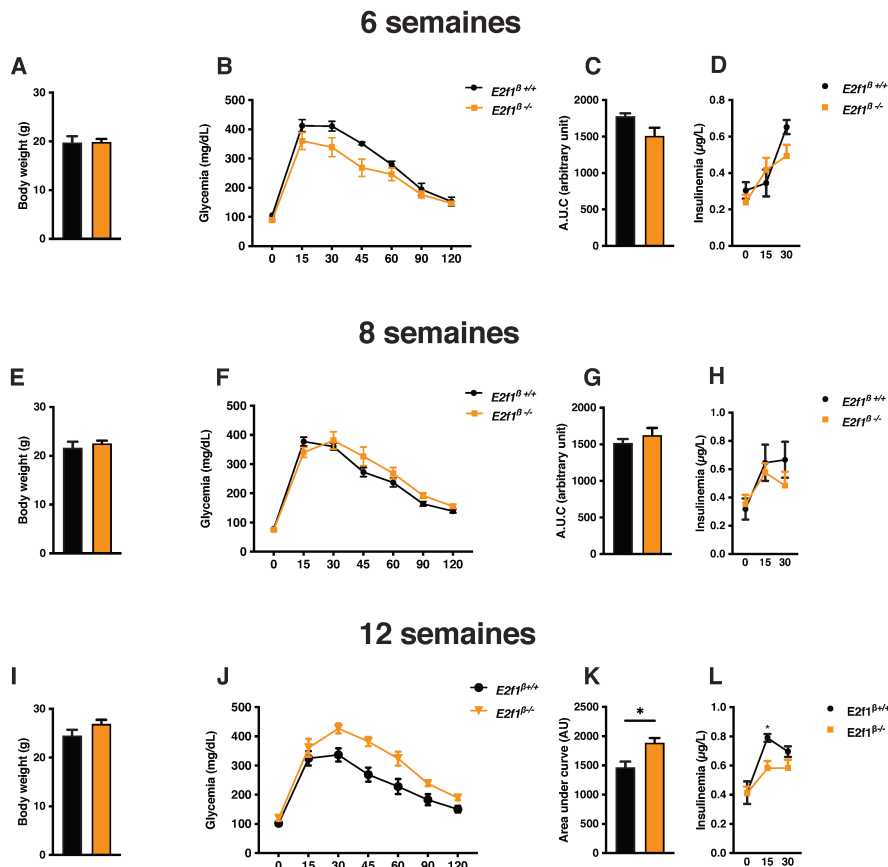


Figure 26 : L'intolérance au glucose chez les souris $E2f1^{\beta-/-}$ apparaît à 12 semaines. (A, B, C, D) (A) Poids en gramme, (B) Test de tolérance au glucose, (C) Aire sous la courbe calculée à partir de (B), (D) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 6 semaines (n=5-7). (E, F, G, H) (E) Poids en gramme, (F) Test de tolérance au glucose, (G) Aire sous la courbe calculée à partir de (B), (H) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 8 semaines (n=5-7). (I, J, K, L) (I) Poids en gramme, (J) Test de tolérance au glucose, (K) Aire sous la courbe calculée à partir de (B), (L) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 12 semaines (n=5-7). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du t de student (A, C, E, G, I, K) et Two-way ANOVA (B, D, F, G, J, L). *p < 0.05.

Les résultats obtenus précédemment *in vivo* démontrent un rôle important de *E2f1* dans les mécanismes de sécrétion d'insuline en réponse au glucose par la cellule β pancréatique. Par la suite, nous avons voulu déterminer si *ex vivo*, cet effet était également retrouvé (Figure 27). Pour cela, des îlots de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} âgés de 14 semaines ont été isolés. Un test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose a permis de mettre en évidence que, malgré un contenu en insuline identique (Figure 27, B), les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} présentaient un défaut de sécrétion en réponse à de fortes concentrations de glucose (16.7mM) par rapport aux îlots de souris *E2f1* ^{β +/+} alors qu'aucune différence significative n'est observée en réponse à de faibles concentrations de glucose (2,8 mM) (Figure 27, A). De plus, la normalisation de la sécrétion d'insuline par le contenu en insuline par îlot permet de mettre en évidence un résultat similaire qu'*ex vivo*, démontrant que la perte d'expression de *E2f1* induit une diminution de la capacité de la cellule β à sécréter de l'insuline, sans modification de la production d'insuline (Figure 27, C).

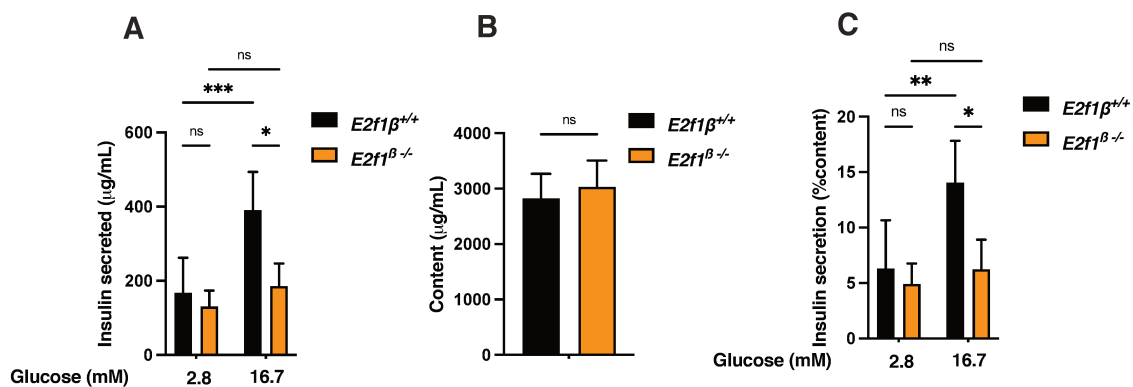


Figure 27 : Ex vivo, les îlots des souris *E2f1* ^{β -/-} présentent une modification de la sécrétion d'insuline sans modification de la concentration totale d'insuline. (A) Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose aux concentrations indiquées de glucose sur 50 îlots isolés de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} âgés de 14 semaines (n=3-9). **(B)** Mesure du contenu intracellulaire d'insuline de 50 îlots isolés de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} âgés de 14 semaines après test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (n=3-9). **(C)** Mesure de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose rapporté au niveau de contenu intracellulaire d'insuline de 50 îlots isolés de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} âgés de 14 semaines (n=3-9). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du *t* de student (B) ou un Two-way ANOVA (A, C) . **p* < 0.05.

D'autre part, l'analyse de coupes histologiques de pancréas de ces souris par immunofluorescence a permis de mettre en évidence que les îlots des souris déficientes pour *E2f1* dans l'ensemble de l'organisme (souris *E2f1*^{-/-}) présentaient une architecture de l'îlot altérée avec une diminution de la proportion de cellules positives en insuline accompagné d'une augmentation concomitante de la proportion de cellules positives en glucagon (Figure 28, A, B).

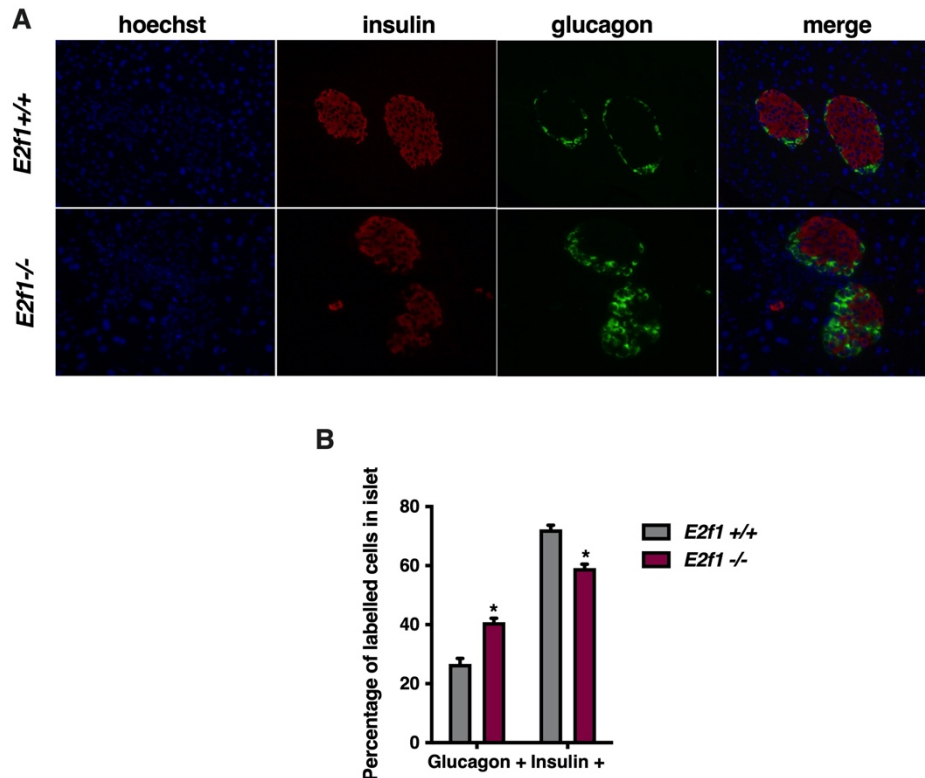


Figure 28 : Les souris *E2f1*^{-/-} présentent une diminution de la taille des îlots associé à une diminution de la masse de cellules β et une augmentation de la masse des cellules α (A) Marquage immunofluorescent de l'insuline et du glucagon sur des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{+/+} et *E2f1*^{-/-} âgés de 16 semaines. (B) Quantification des cellules marquées au glucagon (glucagon⁺) et à l'insuline (insuline⁺) sur des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{+/+} et *E2f1*^{-/-} âgés de 16 semaines. (n=3). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un Two-tailed unpaired t-test (B). *p < 0,05.

Afin d'étudier l'effet de la délétion de *E2f1* dans la cellule β pancréatique sur la morphologie de l'îlot, une analyse morphométrique a été réalisée grâce à des immunomarquages des cellules β sur des coupes de pancréas de souris âgées de 3 mois. Dans un premier temps la densité des îlots, la taille des îlots ainsi que la fraction et la masse des cellules β ont été analysées (Figure 29, E, F). Les résultats ont permis de mettre en évidence que la perte d'expression de *E2f1* dans la cellule β ne modifie pas la densité des îlots (nombre d'îlots sur la surface totale du tissu) (Figure 29, A), la taille moyenne des îlots (Figure 29, B), ainsi que la fraction de cellules β (surface de cellules β sur la surface totale du tissu) (Figure 29, C), et pour finir la masse des cellules β (fraction de cellules β sur le poids total du pancréas) (Figure 29, D).

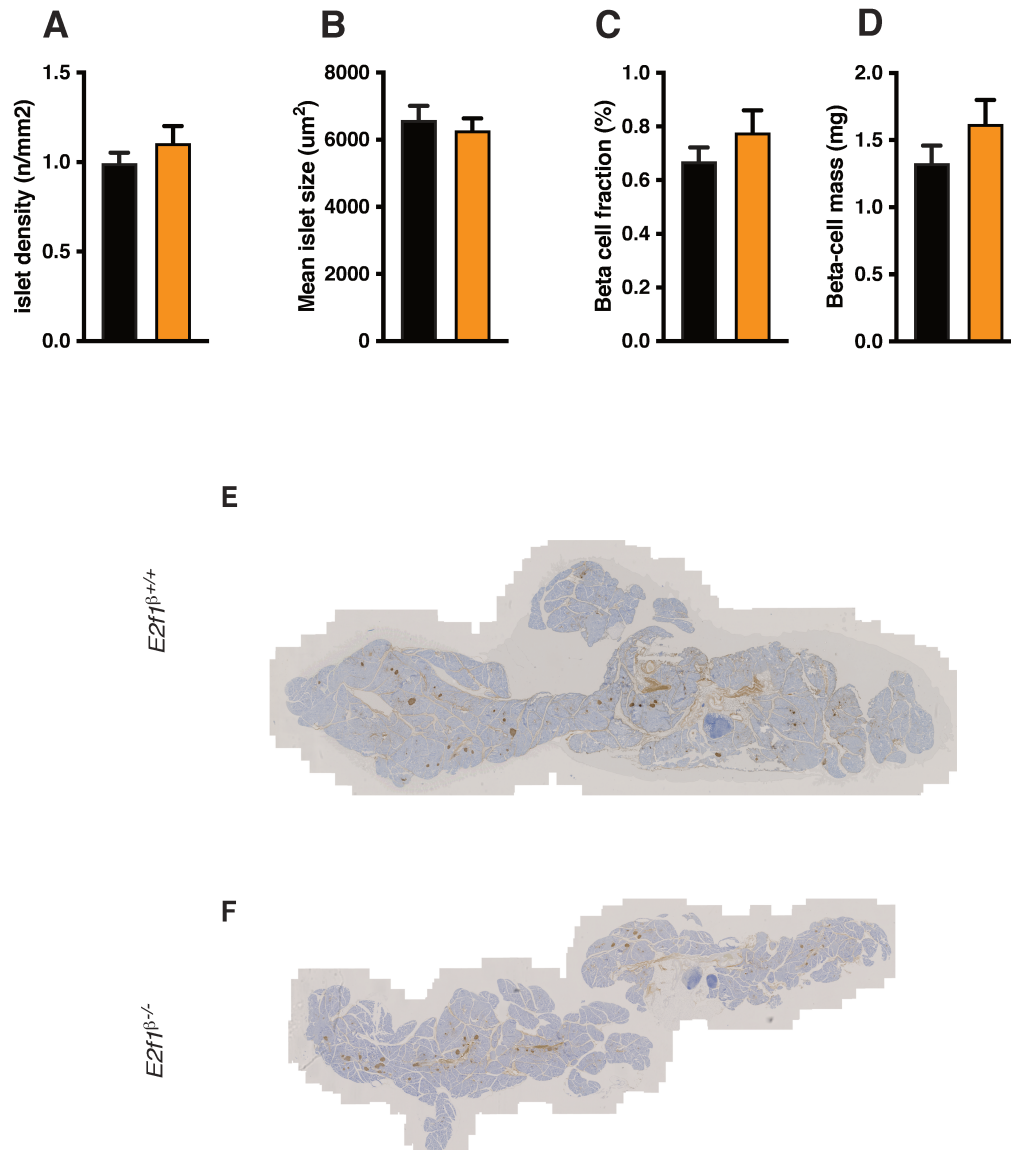


Figure 29 : La diminution d'expression de *E2f1* ne modifie pas le nombre et la taille des îlots ainsi que la masse des cellules β . (A) Analyse du nombre d'îlot sur la surface totale de la coupe de pancréas (densité) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines après marquage des cellules β par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps primaire anti-insuline, d'un anticorps secondaire HRP et un contre-marquage à l'hématoxyline (n=5). (B) Analyse de la surface moyenne des îlots de Langerhans de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines après marquage des cellules β par immunohistochimie (n=5). (C) Analyse de la fraction de cellules β (mesure de taille moyenne des îlots par rapport à la surface total du pancréas) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines après marquage des cellules β par immunohistochimie (n=5). (D) Moyenne de la masse des cellules β (fraction de cellules β multiplié par la masse totale du pancréas) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines après marquage des cellules β par immunohistochimie (n=5). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du t de student (A, B, C, D).

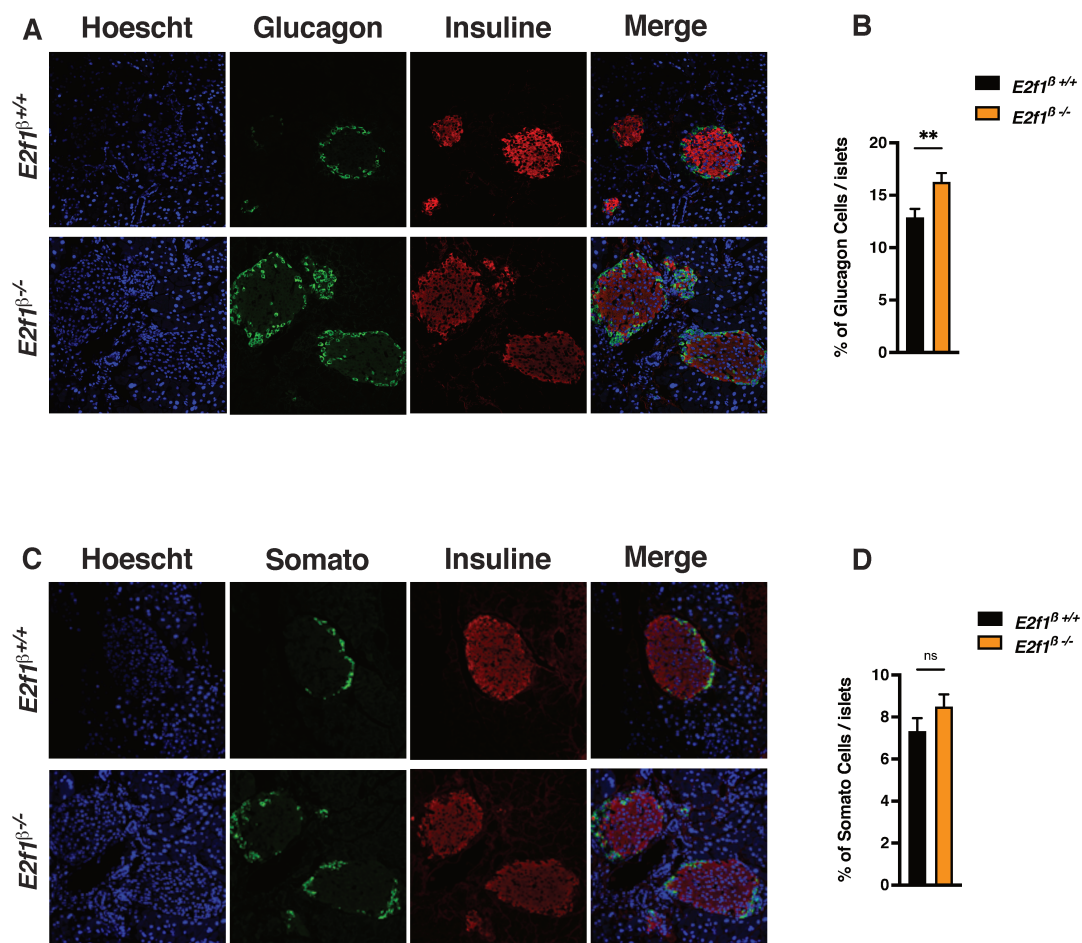


Figure 30 : Les îlots des souris *E2f1*^{β-/-} présentent une augmentation du nombre de cellules α , sans modification de la masse de cellules δ . (A) Marquage immunofluorescent de l'insuline et du glucagon dans des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines (n=5). (B) Ratio du nombre de cellules glucagon⁺ sur le nombre total de cellules dans l'îlots (insuline⁺ et glucagon⁺) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines (n=5). (C) Marquage immunofluorescent de l'insuline et de la somatostatine dans des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines (n=5). (D) Ratio du nombre de cellules glucagon⁺ sur le nombre total de cellules dans l'îlots (insuline⁺ et somatostatine⁺) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} âgés de 12 semaines (n=5). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du t de student (B, D). **p < 0,005.

Par la suite, une analyse morphométrique a été réalisée afin de déterminer la fraction de cellules α (cellules positives au glucagon) et cellules δ (cellules positives à la somatostatine). Pour cela, les cellules β , α et δ ont été immunomarquées à l'aide d'anticorps anti-insuline, glucagon et somatostatine, respectivement. La fraction de cellules α et δ a été calculée en rapportant la surface du glucagon et somatostatine par rapport à la surface de l'îlot total. Les résultats obtenus mettent en évidence que la diminution d'expression de *E2f1* dans la cellule β induit une augmentation significative du pourcentage de cellules α par îlot (Figure 30 A, B) ($p=0,0074$, N= 5) avec l'apparition de cellules α au centre de l'îlot. De plus, la fraction de cellules δ n'est, quant à elle, pas modifiée en absence de l'expression de *E2f1* (Figure 30, C, D) ($p=0,2180$, N=5). Ces résultats suggèrent ainsi qu'une perte d'expression de *E2f1* dans

la cellule β entraîne une augmentation du nombre de cellules α sans modification de la masse de cellules β .

I.2 Phénotypage des souris $E2f1^{\beta-/-}$ soumises à un régime riche en graisse

Des données de la littérature ont mis en évidence que les îlots de sujets diabétiques de type 2 présentent une diminution d'expression de $E2F1$ (436). Afin d'induire un stress métabolique et de mimer une obésité, des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ ont été soumises à un régime riche en graisse (HFD, Research Diet, Fat 60%) pendant 20 semaines. L'analyse de l'évolution du poids des souris pendant 20 semaines a montré que les souris $E2f1^{\beta-/-}$ présentent une légère diminution de la prise de masse corporelle au cours du temps comparée aux souris $E2f1^{\beta+/+}$ (Figure 31, A, B).

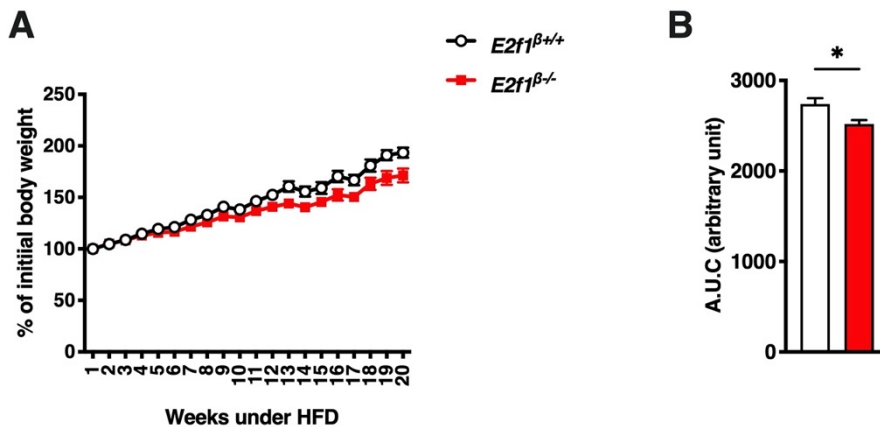
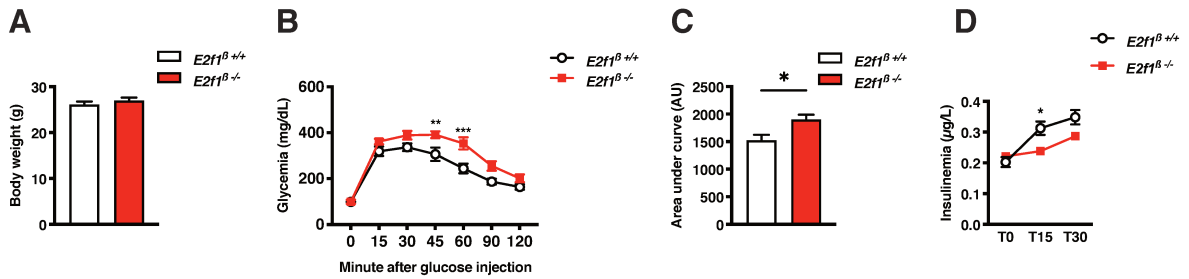


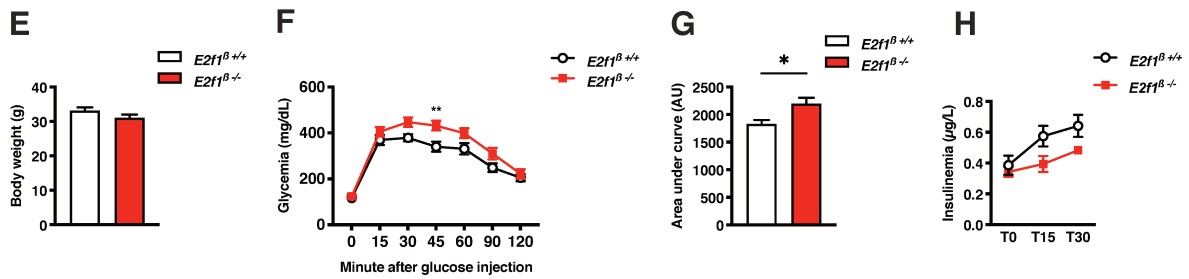
Figure 31 : Suivi du poids des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ pendant 20 semaines de régime riche en graisse (A) Evolution du poids de corps des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ nourries pendant 20 semaines avec un régime riche en graisses (n=7). **(B)** Aire sous la courbe (AUC) du suivi de poids des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ (A). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un two-way Anova (A) et un test du t de student (B). *p < 0,05.

Afin d'étudier l'impact d'un régime riche en graisse sur l'homéostasie glucidique des souris invalidées pour $E2f1$, des tests de tolérance au glucose ont été réalisés après 4, 8 et 12 semaines de régime (Figure 32). Un test de tolérance au glucose en injection intra-péritonéale après 4 semaines de régime a permis de mettre en évidence une intolérance au glucose (Figure 32, B, C) associée à un défaut de sécrétion d'insuline 30 minutes après l'injection de glucose (Figure 32, D) comme observé lors des ipGTT réalisés sur des souris sous régime standard. Ce phénotype est également observé après 8 semaines de régime HFD (Figure 38, F, G, H). Néanmoins, après 12 semaines, aucune intolérance au glucose n'est observée pour les souris $E2f1^{-/-}$ sans défaut de sécrétion d'insuline 30 minutes après injection de glucose (Figure 38, J, K, L). Après un test de tolérance à l'insuline, aucune modification de la sensibilité à l'insuline n'est observée entre les souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ 13 semaines après HFD. (Figure 38, M)

4 weeks under HFD



8 weeks under HFD



12 weeks under HFD

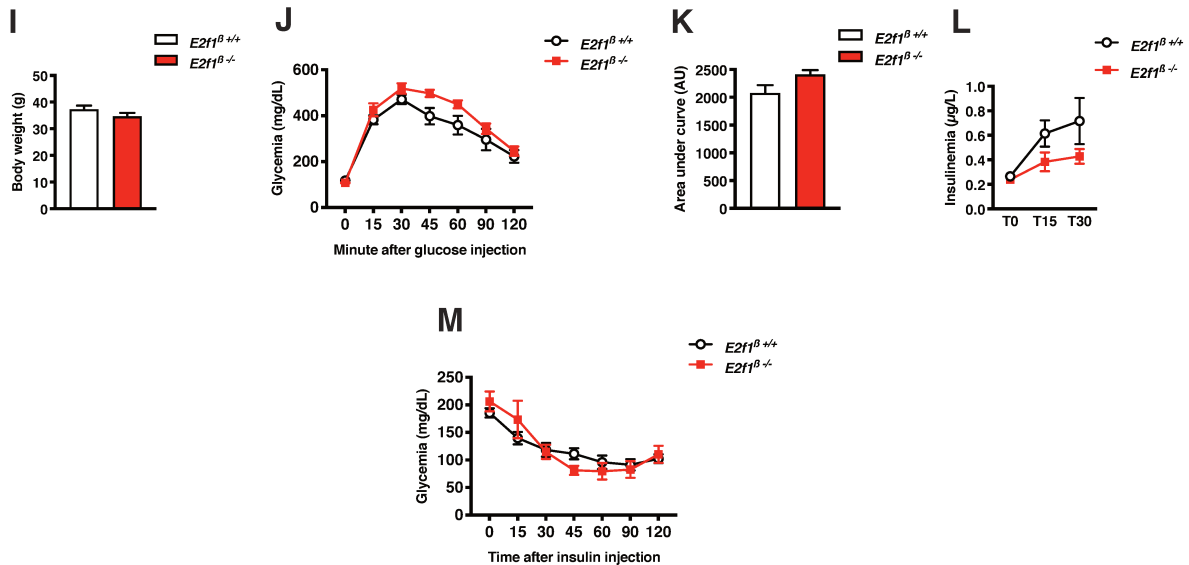


Figure 32 : Les souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ ne présentent plus de phénotype de gluco-intolérance 12 semaines après la mise en place d'un régime riche en graisse. (A, B, C, D) (A) Poids en gramme, (B) Test de tolérance au glucose, (C) Aire sous la courbe calculée à partir de (B), (D) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime riche en graisse depuis 4 semaines (n=7). (E, F, G, H) (E) Poids en gramme, (F) Test de tolérance au glucose, (G) Aire sous la courbe calculée à partir de (F), (H) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime riche en graisse depuis 8 semaines (n=7). (I, J, K, L) (I) Poids en gramme, (J) Test de tolérance au glucose, (K) Aire sous la courbe calculée à partir de (J), (L) et insulinémie à 0, 15 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime riche en graisse depuis 12 semaines (n=7). (M) Mesure de la glycémie des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime riche en graisse depuis 4 semaines à différents temps après injection d'insuline

(0,75U d'insuline/kg) en *i.p.* (T0, T15, T30, T45, T60, T90 et T120) (n=7). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un two-way Anova (B, D, F, H, J, L, M) et un test du *t* de student (A, C, E, G, I, K). **p* < 0,05.

L'analyse morphométrique des îlots de Langerhans des souris $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime standard a permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de cellules α et une tendance à l'augmentation du nombre de cellules δ , sans modification de la masse de cellules β (Figure 30). Nous avons ensuite déterminé la morphométrie des îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ suite à un régime riche en graisse (Figure 33) à l'aide d'expériences d'immunofluorescence. Nos résultats démontrent qu'après 30 semaines de régime riche en graisse, le nombre d'îlots, la densité d'îlots ainsi que le pourcentage de cellules endocrines ne sont pas modifiés (Figure 33, A, B, C). De manière intéressante, une diminution de la fraction de cellules β a été observée pour les souris $E2f1^{\beta-/-}$ (Figure 33, D). De plus, cette diminution s'accompagne d'une augmentation significative du pourcentage de cellules α ($p=0,0014$) (Figure 33, E, F) et de cellules δ ($p=0,0173$) (Figure 33, G, H).

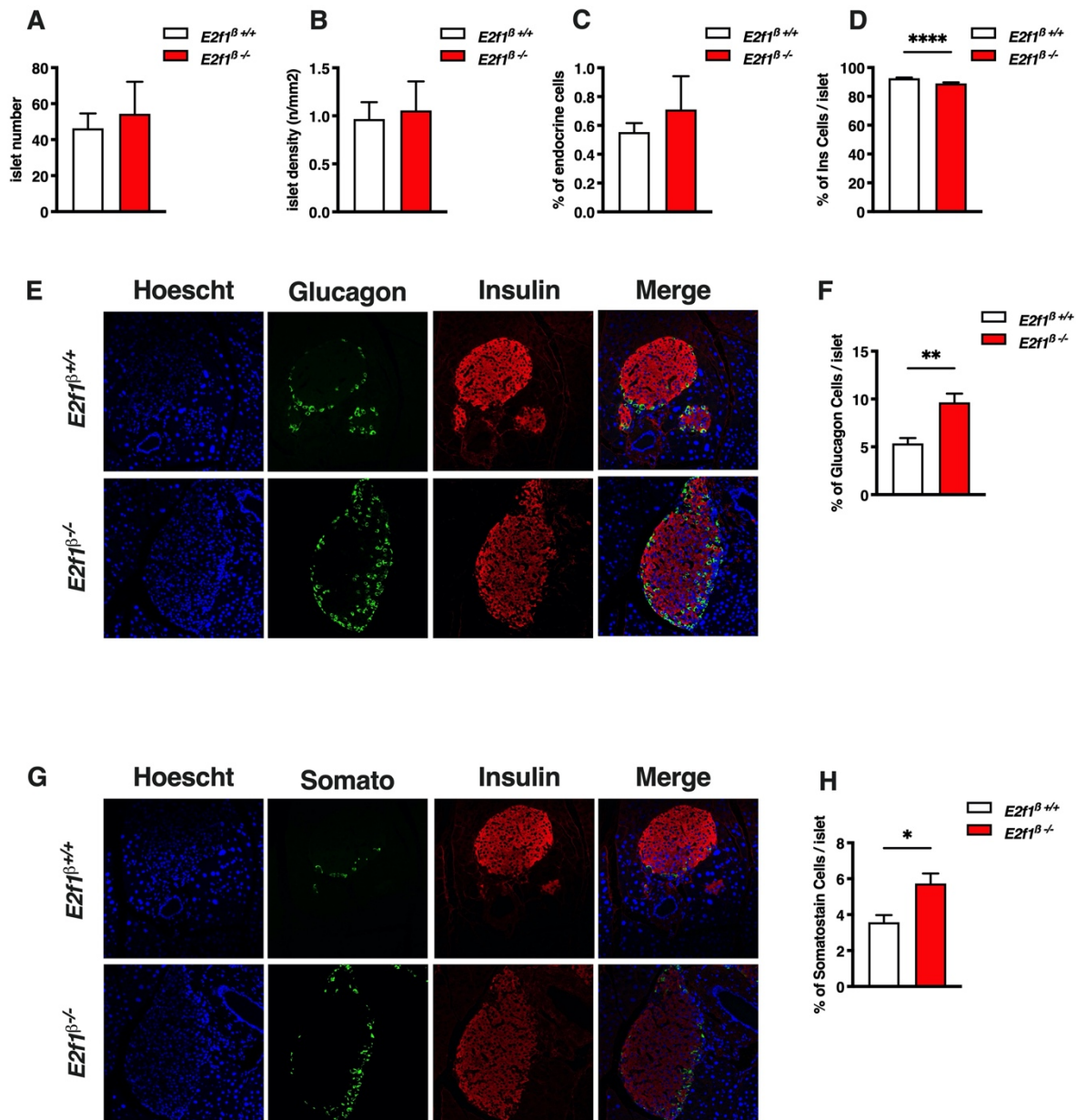


Figure 33 : Les îlots des souris *E2f1*^{β-/-} présentent une augmentation du nombre de cellules α et de cellules δ, associé à une diminution de la masse des cellules β. (A) Analyse du nombre d'îlot sur la surface totale de la coupe de pancréas (densité) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(B)** Analyse de la surface moyenne des îlots de Langerhans de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(C)** Analyse de la fraction de cellules endocrines (mesure de taille moyenne des îlots par rapport à la surface total du pancréas) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(D)** Pourcentage de la surface de cellules positives à l'insuline sur l'ensemble de la surface de cellules endocrines (cellules β et α) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(E)** Marquage immunofluorescent de l'insuline et du glucagon dans des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3)). **(F)** Ratio du nombre de cellules glucagon⁺ sur le nombre total de cellules dans l'îlots (insuline⁺ et glucagon⁺) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(G)** Marquage immunofluorescent de l'insuline et de la somatostatine dans des coupes de pancréas de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1* sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). **(H)** Ratio du nombre de cellules glucagon⁺ sur le nombre total de cellules dans l'îlots (insuline⁺ et somatostatine⁺) de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} sous régime riche en graisse depuis 30 semaines (n=3). Les données sont présentées en moyenne ± s.e.m et sont analysées par un test du t de student (A, B, C, D, F, H). *p < 0,05. **p < 0,005. ****p < 0,0005.

Ainsi, les résultats obtenus sur des souris déficientes pour *E2f1* dans la cellule β soumises à un régime riche en graisse, dans l'objectif de mimer une obésité et un stress métabolique, permettent de démontrer que le phénotype d'intolérance au glucose, comme observé sur les souris sous régime standard, s'estompe avec le développement de l'obésité. L'atténuation du phénotype métabolique s'accompagne d'une diminution de la prise de poids. Néanmoins, une diminution de la masse des cellules β pancréatiques ainsi qu'une augmentation de la fraction de cellules α et δ est observée.

I.3 Analyse de l'effet de la surexpression de *E2f1* dans la cellule β

Les résultats obtenus précédemment ont mis en évidence que les souris *E2f1* ^{β -/-} présentent un phénotype d'intolérance au glucose, accompagné d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et d'une augmentation de la fraction de cellules α au sein de l'îlot de Langerhans. Dans la suite de cette étude, l'effet d'une surexpression de E2F1 humain dans la cellule β a été analysé afin de déterminer si cette surexpression pouvait reverser le phénotype observé pour les souris *E2f1* ^{β -/-}, voire améliorer l'homéostasie glucidique. Pour cela, des souris Rip-Cre (429) ont été croisées avec des souris exprimant la cassette Rosa-26-LoxP-LacZ-LoxP-hE2f1 (souris RFC) obtenus en collaboration avec le Dr Ulrike Ziebold (Berlin, Allemagne) (430)). Ces souris expriment la forme humaine de E2F1, couplé à un tag HA, et sous le contrôle du promoteur endogène du locus ROSA. Des souris Hétérozygotes (RFC/+) ont été croisées avec des souris RipCre/+ afin d'obtenir des souris contrôles RFC/+ (*E2f1* ^{β ctrl}) et des souris RFC/Rip (*E2f1* ^{β over}), permettant la surexpression de *E2f1* dans la cellule β . Premièrement, la surexpression de *E2f1* a été confirmée par qPCR (Figure 34, A). Par la fusion de la forme humaine de E2F1 avec le tag HA, l'expression protéique spécifique de hE2F1 dans la cellule β a été déterminée à l'aide d'un anticorps anti-HA. Le signal retrouvé à l'aide de l'anticorps HA dans les souris *E2f1* ^{β over} et la colocalisation observée uniquement entre les cellules marquées positivement pour l'insuline et le HA valident notre modèle d'étude (Figure 34, B). Après validation du modèle, l'analyse du poids des souris *E2f1* ^{β ctrl} et *E2f1* ^{β over} âgées de 3 mois ne révèle aucune modification entre les deux modèles (Figure 34, C). Un test de tolérance au glucose par injection intrapéritonéale ne montre aucune modification de la sensibilité au glucose chez les souris surexprimant E2f1 dans la cellule β pancréatique (Figure 34, D, E). De manière intéressante, l'insulinémie des souris *E2f1* ^{β over} est significativement supérieure à celle des souris *E2f1* ^{β ctrl}, indiquant une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, néanmoins sans modification de la sensibilité au glucose (Figure 35, F). Ces résultats suggèrent une possible modification de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques. Un test de tolérance à l'insuline a donc été réalisé et ne révèle aucune modification de la sensibilité à l'insuline au cours du temps (Figure 35, F). Enfin, la fraction de cellules β et α au sein de

l'îlot a été analysée. Nos résultats ne mettent pas en évidence de différence dans le nombre de cellules α et β entre les souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ (Figure 35, G).

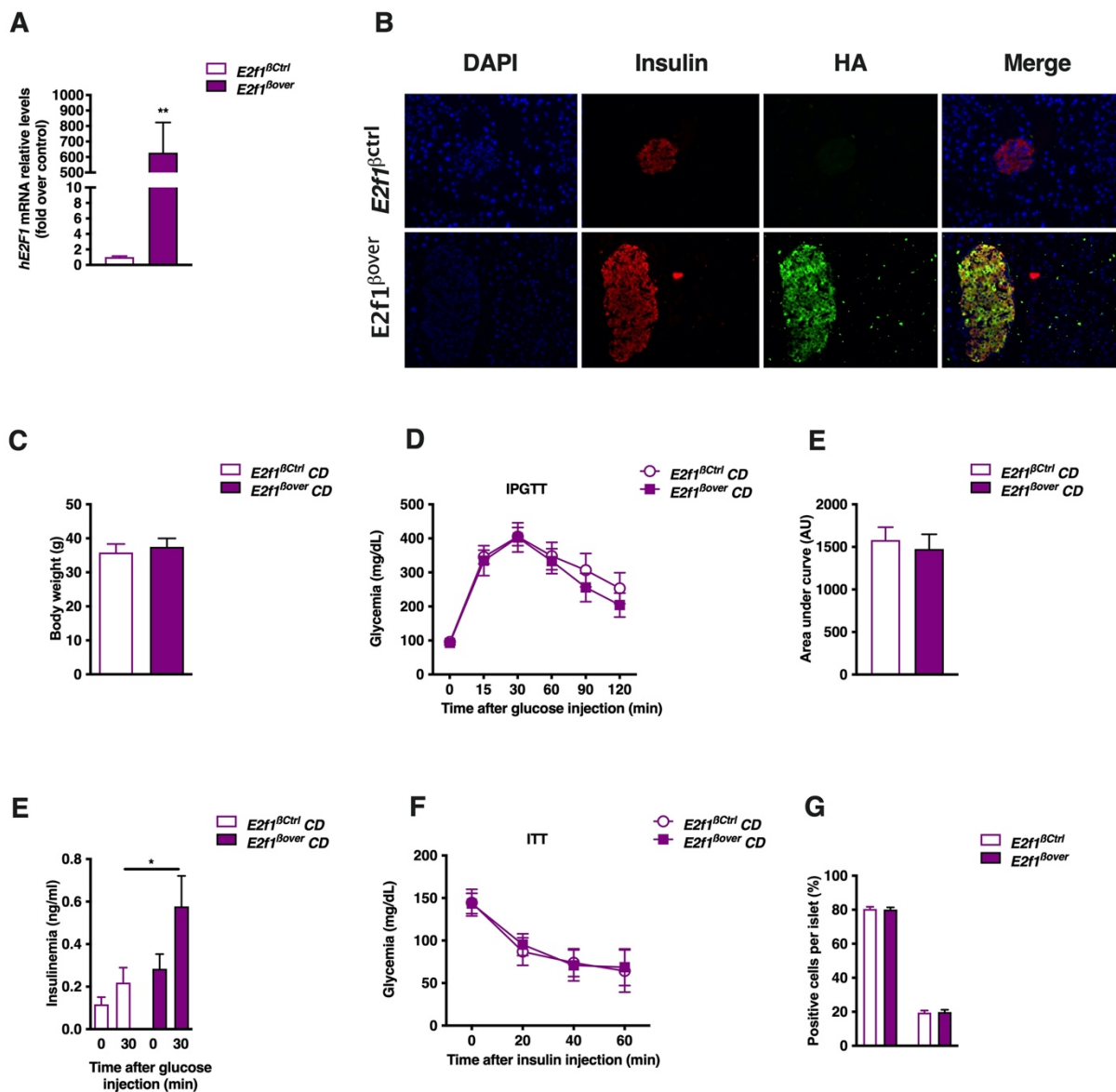


Figure 34 : La surexpression de $E2F1$ dans la cellule β ne modifie pas la gluco-intolérance, mais s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. (A) Expression de l'ARNm de la forme humaine de $E2F1$ dans des îlots de Langerhans isolés de souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ (n=6). **(B)** Analyse de l'immunofluorescence de coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ marquées avec l'insuline (rouge), le HA (vert) et le noyau (Bleu, DAPI). **(C)** Poids en gramme des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ sous régime standard (n=10). **(D, E, F,)** **(D)** Test de tolérance au glucose, **(E)** Aire sous la courbe calculée à partir de **(D)**, **(F)** et insulinémie à 0 et 30 minutes après injection de glucose sur des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ âgés de 12 semaines (n=5). **(G)** Mesure de la glycémie des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ à différents temps après injection d'insuline (0,75U d'insuline/kg) en *i.p.* (T0, T20, T40 et T60) (n=5). **(H)** Quantification des cellules marquées au glucagon (glucagon⁺) et à l'insuline (insuline⁺) sur des coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ (n=3). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du t de student (A, C, E, G) et par Two-Way ANOVA (D, E, F). *p < 0,05. **p < 0,005.

Suite à la faible amélioration de la gluco-intolérance, néanmoins accompagnée d'une augmentation importante de l'insuline chez les souris $E2f1^{\beta over}$, nous avons soumis ces souris à un régime riche en graisse afin de mimer une obésité et un diabète de type 2 (Figure 35). Premièrement, l'analyse de la prise du poids de corps pendant 16 semaines ne révèle aucune modification 16 semaines après la mise sous régime (Figure 35, A B). Aucune modification de la tolérance au glucose n'est observée entre les souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ 16 semaines après la mise sous régime riche en graisse (Figure 35, C D). Pour finir, un test de tolérance à l'insuline en injection intra-péritonéale révèle que le régime riche en graisse induit une insulino-résistance des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$, sans aucune différence entre les deux modèles (Figure 35, E).

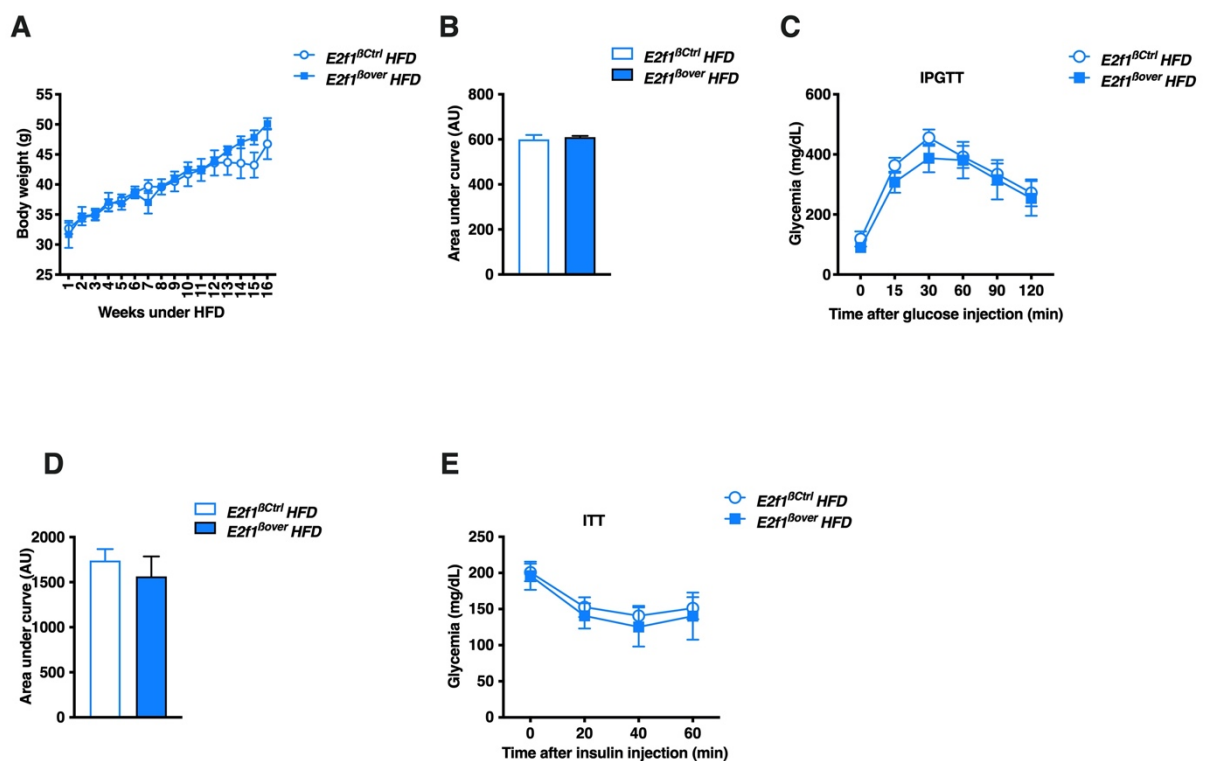


Figure 35 : Sous régime riche en graisse, les souris $E2f1^{\beta over}$ ne présentent pas d'amélioration de la gluco-tolérance. (A) Évolution du poids de corps des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ nourries pendant 16 semaines avec un régime riche en graisse (n=5) **(B)** Aire sous la courbe (AUC) du suivi de poids des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ (A). **(C, D)** **(C)** Test de tolérance au glucose, **(D)** et aire sous la courbe de (C) de souris $E2f1^{\beta +/-}$ et $E2f1^{\beta -/-}$ $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ nourries pendant 16 semaines avec un régime riche en graisse (n=5). **(E)** Mesure de la glycémie des souris $E2f1^{\beta ctrl}$ et $E2f1^{\beta over}$ à différents temps après injection d'insuline (0,75U d'insuline/kg) en *i.p.* (T0, T20, T40 et T60) après 15 semaines sous régime riche en graisses (n=5). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test de t de student (B, D) et par Two-Way ANOVA (A, C, E).

I.4 Caractérisation du transcriptome des îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$

Dans l'objectif de déterminer quels sont les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer cette diminution de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ainsi que l'augmentation de la fraction de cellules α , le transcriptome des îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgées de 12 semaines a été analysé par séquençage de l'ARNm (RNA-Seq) (Figure 36). Les résultats obtenus montrent que les îlots de Langerhans des souris $E2f1^{\beta-/-}$ présentent une diminution significative ($P_{adj} < 0,05$) de l'expression de 199 gènes pour une augmentation de l'expression de 493 gènes ($P_{adj} < 0,05$) comparé aux souris $E2f1^{\beta+/+}$ (Figure 36, A). Afin de comprendre quels mécanismes moléculaires étaient contrôlés par les gènes dont l'expression est modulée lors de la délétion de $E2f1$, une analyse de « Gene ontology » à l'aide du logiciel Metascape a été réalisée (432) et les 10 voies moléculaires les plus modulées ont été représentées (Figure 36, B, C). L'analyse des voies moléculaires des gènes « Downrégulés » montre une diminution des mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes de sécrétion d'insuline, tels que la régulation de l'exocytose ($-\text{Log}_{10}(p) = 5,81$), l'homéostasie du calcium ($-\text{Log}_{10}(p) = 3,45$) ou dans la réponse aux hormones ($-\text{Log}_{10}(p) = 3,41$) (Figure 36, B). De manière intéressante, la perte d'expression de $E2f1$ entraîne la diminution de la réponse au stress du réticulum endoplasmique ($-\text{Log}_{10}(p) = 4,36$), mécanisme important dans la sécrétion d'insuline (437). Au contraire, nos résultats montrent une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de la réponse inflammatoire, tels que la production de cytokines ($-\text{Log}_{10}(p) = 12,22$), la réponse immunitaire adaptative ($-\text{Log}_{10}(p) = 11,76$) et dans l'activation des lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire ($-\text{Log}_{10}(p) = 7,55$). De plus, il est intéressant de constater que la perte d'expression d'un activateur du cycle cellulaire dans la cellule β entraîne une augmentation d'expression de gènes impliqués dans la régulation négative de la prolifération cellulaire (Figure 36, C) ($-\text{Log}_{10}(p) = 9,55$).

Les souris $E2f1^{\beta-/-}$ présentant une augmentation du nombre de cellules α au sein de l'îlot, nous nous sommes intéressés à l'expression des marqueurs géniques spécifiques de la cellule α communs aux espèces du poisson-zébre, de la souris et de l'Humain (438), soit 82 gènes (Figure 36, D). Sur ces 82 gènes, seulement 3 gènes (*EYA4*, *OPRLL1* et *SERPINA1D*) présentent un $\text{Log}_2\text{FC} < 0$, signifiant une diminution d'expression, alors que 79 gènes possèdent un $\text{Log}_2\text{FC} > 0$, signifiant une augmentation d'expression. Parmi ces 79 gènes, seulement 5 sont significativement modulés, avec une $P_{adj} < 0,05$, dont le facteur de transcription clé de l'identité de la cellule α , ARX (Aristaless related homeobox) (73) (Figure 36, D). De plus, la diminution de la sécrétion d'insuline pouvant s'expliquer par une diminution des marqueurs de cellule β , l'analyse de l'expression par RNA-seq de ces marqueurs conservés chez le poisson-zébre, la souris et l'Humain a été réalisée (27 gènes) (Figure 36, D). A l'inverse des marqueurs de la cellule α , 25 de ces 27 marqueurs présentent une diminution d'expression ($\text{Log}_2 \text{FC} < 0$), dont 10

ont une $P_{adj} < 0,05$. Parmi ces 10 gènes, nous retrouvons les deux gènes codant l'insuline, *Ins1* et *Ins2*, deux facteurs de transcription clé de la cellule β , *Pdx1* et *Nkx6.1* (439), ainsi que le *Glp-1r*, récepteur du Glp-1, hormone décrite en introduction.

Ainsi, l'analyse du transcriptome des îlots de souris déficientes pour *E2f1* a permis de mettre en évidence que la diminution d'expression de ce facteur de transcription dans la cellule β entraîne une reprogrammation transcriptomique associée à l'activation de nombreuses voies pro-inflammatoires, ayant des effets néfastes sur la fonction de la cellule β (440) et une répression de l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de sécrétion de la cellule β . De plus, ces résultats déterminent que l'expression de nombreux marqueurs identitaires de la cellule β sont diminués et qu'au contraire, l'expression de marqueurs identitaires de la cellule α sont augmentés, suggérant une augmentation du nombre de cellules α comme nous l'avons observé dans les îlots des souris *E2f1* ^{$\beta^{-/-}$} .

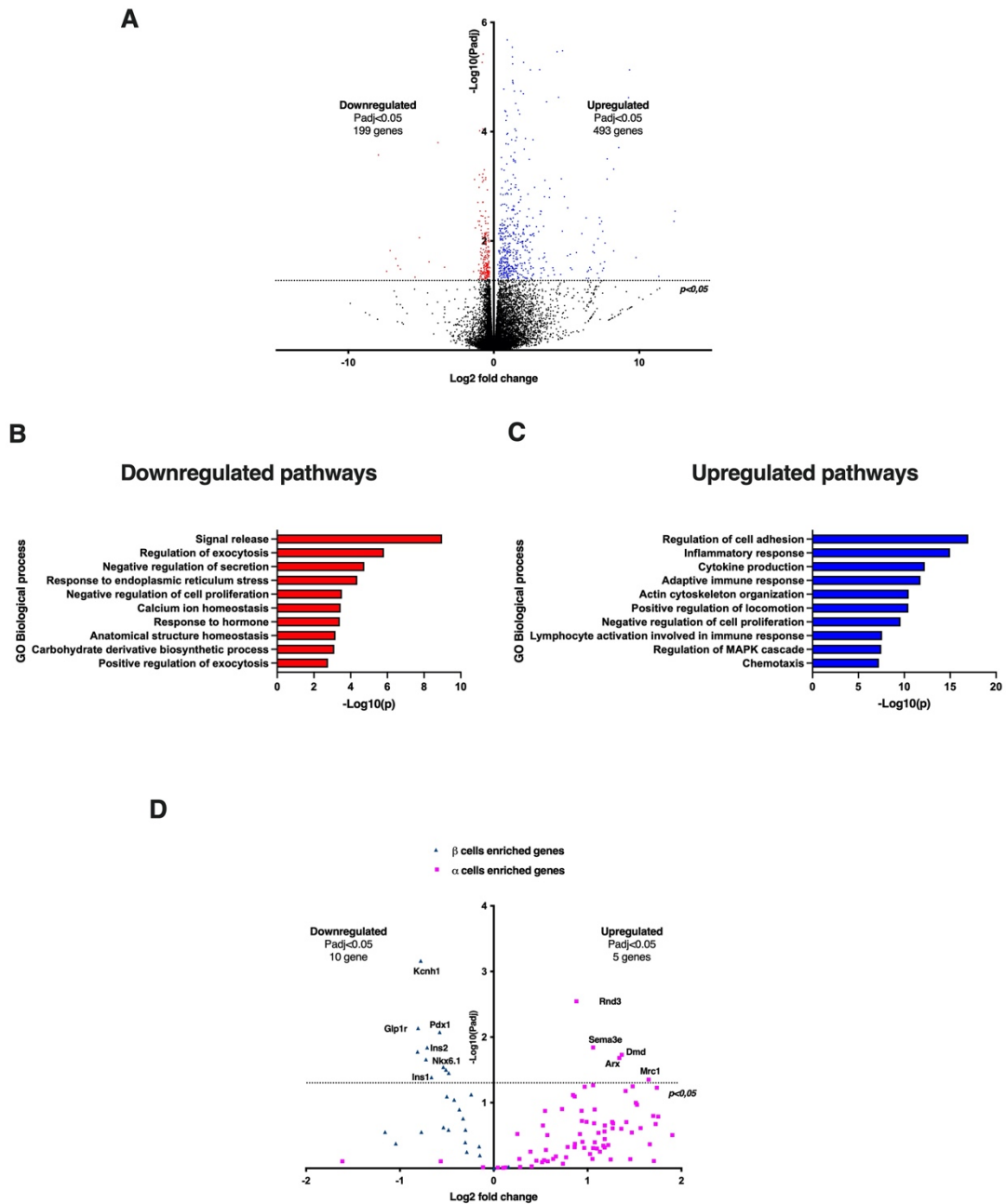


Figure 36 : La délétion de *E2f1* dans la cellule β entraîne une reprogrammation transcriptomique et la modulation de nombreuses voies de signalisation. (A) Volcano-plot représentant la p value ajustée et le différentiel d'expression des souris *E2f1* ^{β /-} par rapport aux souris *E2f1* ^{β /+}. Les gènes différentiellement exprimés avec une pvalue ajustée <0,05 sont indiqués par deux couleurs, en rouge, les 199 gènes régulés négativement et en bleu, les 493 gènes régulés positivement (n=3). (B, C) Analyse des voies de signalisation régulés négativement (rouge) (B) et positivement (bleu) (C) des gènes modulés lors de la délétion de *E2f1* dans la cellule β à l'aide du logiciel Metascape. (D) Volcano plot représentant la p value ajustée et le différentiel d'expression des souris *E2f1* ^{β /-} par rapport aux souris *E2f1* ^{β /+} des marqueurs de cellules β (bleu) et des marqueurs de cellules α (rose).

A la suite de ses résultats et ayant observé une augmentation de la masse de cellules α dans les îlots de souris *E2f1* ^{β /-}, nous nous sommes demandé si les cellules α surnuméraires provenaient d'une augmentation du nombre de cellules α ou de la trans ou dédifférenciation des cellules β en cellules α . Pour répondre à cette question, des expériences de lignage cellulaire de la cellule β ont été réalisées

par l'utilisation d'un modèle de souris dont les cellules ayant exprimé l'insuline sont marquées par une fluorescence dans le rouge. Pour cela, des souris Rip-cre (contrôles) et *E2f1^{β-/-}* ont été croisées avec des souris Tomato/RFP (où un codon stop en amont du gène codant la tomato est flanqué de sites LoxP). Par immunofluorescence, les cellules α ont été marquées à l'aide d'un anticorps anti-glucagon et les cellules β avec un anticorps anti-insuline. Premièrement, l'expression de la tomato a été analysée par l'étude du co-marquage entre la tomato et l'insuline, mais également le co-marquage entre la tomato et glucagon (Figure 37, A, B). Nos résultats mettent en évidence que la tomato est uniquement co-localisée avec les cellules insulines⁺, validant ainsi notre modèle expérimental. Nous avons postulé que si les cellules α provenaient d'une transdifférenciation ou dédifférenciation, une co-localisation entre la tomato et le glucagon serait retrouvée dans les îlots des souris *E2f1^{β-/-}*. Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'aucune co-localisation entre des cellules tomato et des cellules glucagon⁺ n'a été retrouvée dans des îlots de souris *E2f1^{β-/-}* (Figure, 37, C, D), suggérant que la perte d'expression de *E2f1* est liée à une augmentation du nombre de cellules α et non à une trans/dédifférenciation de la cellule β en cellule α .

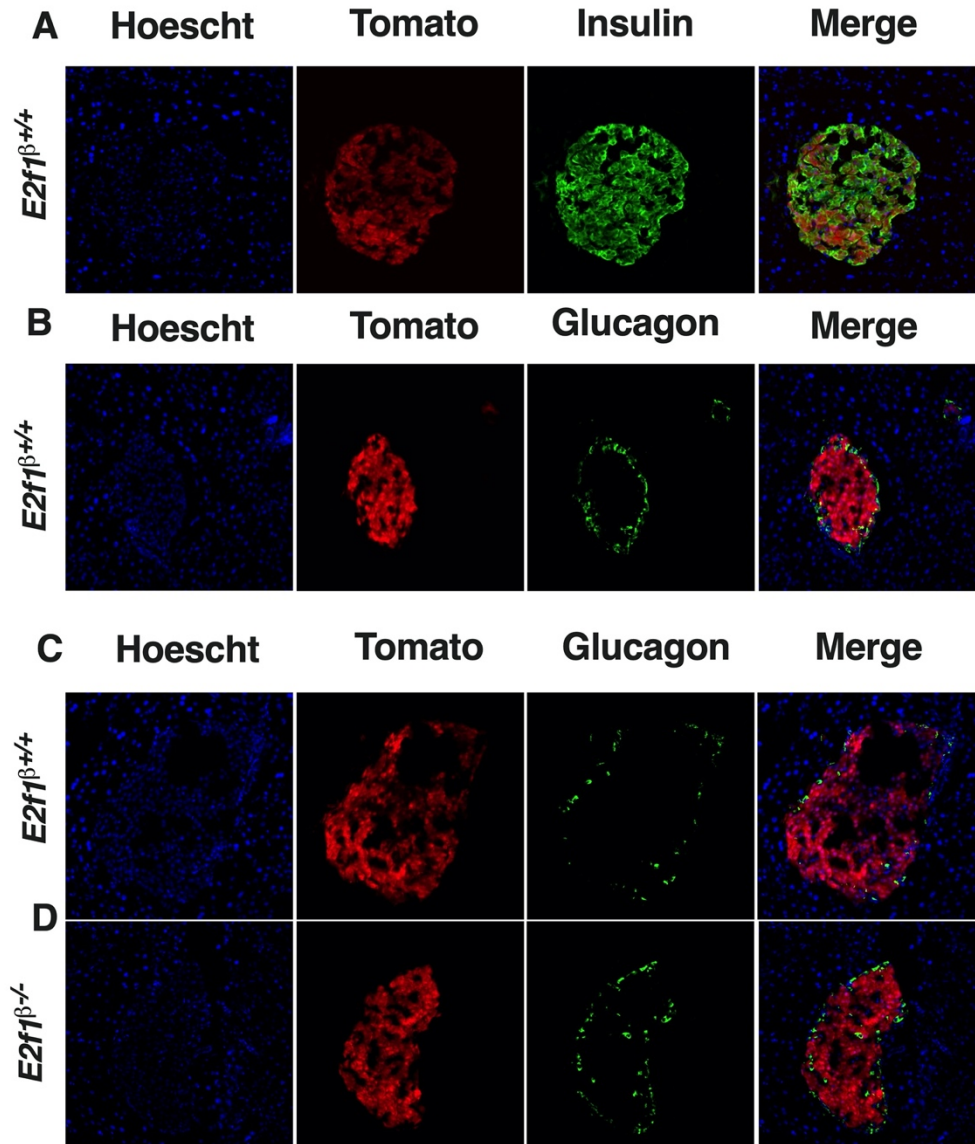


Figure 37 : L'augmentation de la masse des cellules α observée dans les îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ ne provient pas d'une transdifférenciation ou dédifférenciation de la cellule β . **(A)** Marquage immunofluorescent de l'insuline et de la tomato dans des coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta+/+tom}$ sous régime standard. **(B)** Marquage immunofluorescent du glucagon et de la tomato dans des coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta+/+tom}$ sous régime standard. **(C)** Marquage immunofluorescent du glucagon et de la tomato dans des coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta+/+tom}$ sous régime standard. **(D)** Marquage immunofluorescent du glucagon et de la tomato dans des coupes de pancréas de souris $E2f1^{\beta-/-tom}$ sous régime standard

L'analyse de l'expression génique d'îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ sous HFD depuis 30 semaines a également été réalisée. Les résultats mettent en évidence une diminution de l'expression de *MafA* (V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A), facteur de transcription clé dans l'identité de la cellule β , mais également de certains gènes impliqués dans les mécanismes de sécrétion d'insuline tels que *Kcnj11* (Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11) ou *Slc2a2* (solute carrier family 2 member 2) (Figure 38, A). De plus, nos résultats permettent de déterminer, comme observé dans le RNA-seq d'îlots isolés de souris $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime standard (Figure 38, A), une

augmentation de l'expression d'*Arx*, facteur de transcription permettant le maintien d'identité de la cellule α .

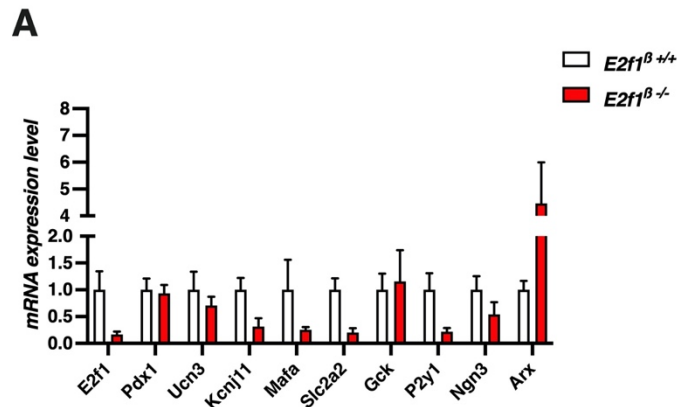


Figure 38 : Les îlots de souris *E2f1*^{β-/-} soumis à un régime riche en graisse vont présenter une diminution de l'expression de marqueurs de cellule β pancréatique (A) Analyse de l'expression en ARNm par qPCR dans des îlots de Langerhans de souris *E2f1*^{+/+} et *E2f1*^{β-/-} soumise à un régime riche en graisse pendant 30 semaines. Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du t de student (A).

1.5 Analyse du cistrome de E2f1 dans la cellule β pancréatique

E2f1 étant un facteur de transcription, l'identification des gènes directement régulés à la chromatine par E2f1 dans la cellule β pancréatique était primordial. Pour répondre à cette question, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à l'aide d'un anticorps ciblant E2f1 (Abcam, Ab179445) suivi d'un séquençage (ChIP-seq) ont été réalisées. Les résultats ont permis de déterminer uniquement 198 sites de fixation de E2f1 dans la cellule β (Données non montrées). Cet anticorps a récemment été retiré du marché suite à de nombreux tests montrant son manque de spécificité vis-à-vis de la protéine E2f1. A cause de la faible fiabilité des anticorps dirigés contre E2f1, la caractérisation des cibles directes de E2f1 dans la cellule β n'a pu être réalisée correctement. Dans l'objectif de contourner ce problème, l'identification des gènes cibles directs de E2f1 a été réalisée en utilisant un système d'expression exogène. En effet, des cellules Min6, lignée cellulaire d'insulinome de souris (441), ont été transfectées avec un plasmide codant pour la forme humaine de E2f1 (hE2f1) fusionnée avec un peptide FLAG afin d'utiliser un anticorps α -FLAG pour immunoprécipiter spécifiquement hE2f1.

Dans un premier temps, la validation de la transfection de notre plasmide dans la lignée Min6 (Figure 39, A) par Western blot a été réalisée. L'utilisation de l'anticorps Flag (Bio-M2, Sigma, F9291) permet de révéler une bande à environ 70 kDa uniquement dans les cellules transfectées pendant 24h et 48 h, validant ainsi la transfection de nos cellules avec notre plasmide d'intérêt (Figure 39, A). Dans

l'objectif d'immunoprécipiter les complexes E2f1 associés à la chromatine, il était également nécessaire de déterminer la localisation subcellulaire de hE2f1 après transfection dans la lignée Min6. Pour cela, un fractionnement cellulaire a été réalisé. L'enrichissement de la Tubuline observé dans la fraction cytoplasmique, comparée à la fraction nucléaire et l'enrichissement de HDAC1 (Histone Déacétylase 1, enzyme nucléaire permettant la déacétylation des histones) dans la fraction nucléaire permet de valider le fractionnement réalisé sur les cellules Min6 (Figure 39, B). Enfin, le fractionnement permet de mettre en évidence que E2f1 est majoritairement nucléaire dans la cellule β , mais que ce facteur de transcription peut également être localisé dans la fraction cytosolique (Figure 39, C).

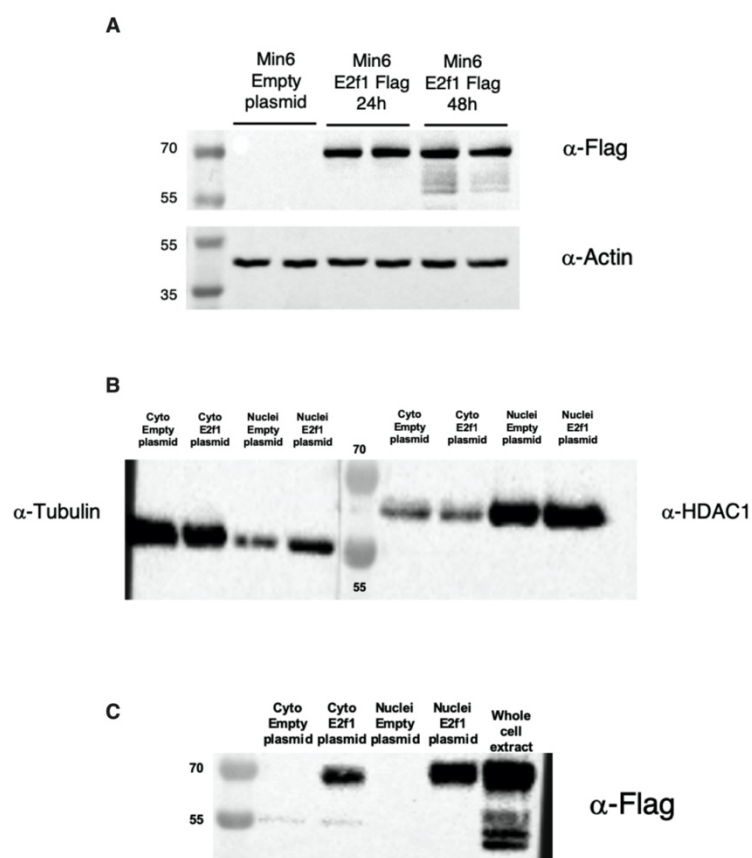


Figure 39 : Validation de la transfection de cellules Min6 avec le plasmide pCMV10-hE2F1-Flag par Western blot. (A) Western blot de la protéine flag (Témoin de transfection) et de l'actine à partir de cellules Min6 transfectées avec un plasmide PCMV10 ou un plasmide PCMV10-hE2F1-Flag pendant 24 ou 48 heures. **(B)** Western blot de la tubuline (protéine cytoplasmique) et de HDAC1 (protéine nucléaire) à partir de lysat protéique de noyau ou de cytoplasme obtenu après fractionnement cellulaire de cellules Min6 transfectées avec un plasmide PCMV10 ou un plasmide PCMV10-hE2F1-Flag pendant 48 heures. **(C)** Western blot de la protéine Flag à partir de lysat protéique de noyau ou de cytoplasme obtenu après fractionnement cellulaire de cellules Min6 transfectées avec un plasmide PCMV10 ou un plasmide PCMV10-hE2F1-Flag pendant 48 heures.

Dans un second temps, la validation de l'immunoprécipitation de la chromatine avec l'anticorps Flag était requis avant de réaliser une expérience de ChIP-Seq. Ezh2 (Enhancer of zeste homolog 2) et Ccne1 (Cycline E1), deux gènes connus comme étant directement régulés à la chromatine par E2f1 ont été

utilisés comme région contrôle (442, 443) et une région intergénique localisée au niveau du chromosome 7 a été utilisée comme contrôle négatif. L'enrichissement observé lors de la transfection avec le plasmide hE2F1-FLAG couplé à une IP-Flag par qPCR après immunoprécipitation de la chromatine sur les promoteurs de *Ezh2* et *Ccne1* (Figure 40, A, B) permet de valider notre ChIP. De plus, l'absence d'enrichissement observé par qPCR sur la région intergénique (Figure 40, C) indique que la fixation de hE2F1-FLAG est spécifique aux promoteurs fixés par E2F1.

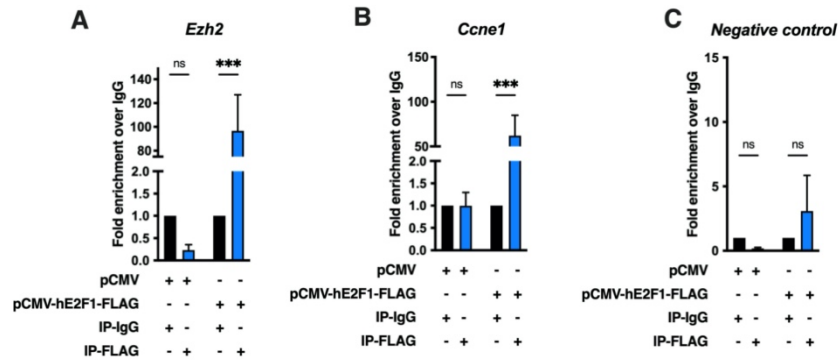


Figure 40 : Validation de la transfection de cellules Min6 avec le plasmide pCMV10-hE2F1-Flag par Western blot. (A) ChIP-qPCR démontrant la fixation de E2f1 sur le promoteur *Ezh2* de cellules Min6 transfectées avec le plasmide PCMV10 ou le plasmide PCMV10-hE2F1-Flag. La chromatine a été incubée avec un anticorps anti-Flag ou anti-IgG et la qPCR a été réalisée à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de la région du promoteur (n=2). **(B)** ChIP-qPCR démontrant la fixation de E2f1 sur le promoteur *Ezh2* de cellules Min6 transfectées avec le plasmide PCMV10 ou le plasmide PCMV10-hE2F1-Flag. La chromatine a été incubée avec un anticorps anti-Flag ou anti-IgG et la qPCR a été réalisée à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de la région du promoteur (n=2). **(C)** ChIP-qPCR démontrant la fixation de E2f1 sur le promoteur *Ezh2* de cellules Min6 transfectées avec le plasmide PCMV10 ou le plasmide PCMV10-hE2F1-Flag. La chromatine a été incubée avec un anticorps anti-Flag ou anti-IgG et la qPCR a été réalisée à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de la région du promoteur (n=2). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par Two-Way ANOVA.

Après séquençage de la chromatine immunoprécipitée, l'intégration des données sur le logiciel Integrative Genome Browser (IGB) a permis d'identifier deux sites de fixations sur les promoteurs de *Ezh2* et *Ccne1* après transfection avec le plasmide hE2F1-FLAG (Figure 41, A) validant ainsi le ChIP-seq. De plus, l'analyse des sites de fixation de hE2F1-Flag a permis de mettre en évidence que le principal motif enrichi est le motif des E2f (pvalue : $3,4^{-27}$), validant de nouveau notre modèle d'étude (Figure 41, B). Par la suite, des analyses bio-informatiques de nos résultats de ChIP-seq ont démontré que dans la cellule β , E2f1 se fixe majoritairement (95%) sur le promoteur de ses gènes cibles et notamment sur la partie proximale au TSS (<1kb) (Figure 41, C).

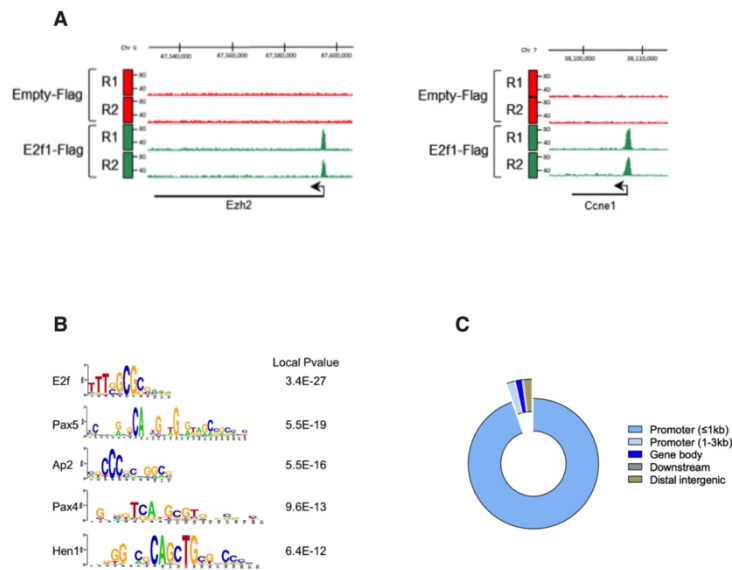


Figure 41 : Validation des résultats du séquençage de l’immunoprécipitation de la chromatine de cellules Min6 transfectées avec le plasmide pCMV10-hE2F1-Flag. (A) Représentation des sites de fixation de E2f1 sur les promoteurs des gènes de *Ezh2* et de *Ccne1* sur des cellules Min6 transfectées avec un plasmide PCMV10 ou PCMV10-hE2F1-Flag à l’aide du logiciel « Integrated Genome browser ». **(B)** Représentation des motifs enrichis des sites de fixation détectés lors du séquençage de l’immunoprécipitation de la chromatine (ChIP-Seq). **(C)** « Pie-Chart » représentant les sites de fixation de E2f1 en fonction de leur localisation sur le génome (Promoteur proximal ou distal, corps du gène, région intergénique).

Par la suite, nous avons voulu déterminer comment se comportait les marques d’histones (activatrices ou inhibitrices) sur les promoteurs des régions fixées par E2f1 dans la cellule Min6. Pour cela, un ChIP-Seq des marques d’histones activatrices telles que H3K4me3, H3K27ac, H3K9ac ou H3K4me1 ou d’une marque d’histone inhibitrice (H3K27me3) a été réalisé et les résultats du ChIP-Seq hE2F1-FLAG ont été intégrés à cette étude (Figure 42).

Min6 cell line



Figure 42 : Stratégie d’analyse utilisée pour déterminer les marques d’histones des régions fixées par E2f1 dans la cellule β pancréatique.

Afin d’étudier la complexité épigénomique des régions fixées par E2f1, nous avons ensuite utilisé le logiciel ChromHMM, qui permet de diviser le génome en portion de 200 paires de bases et de « clusteriser » chaque portion dans 16 segments différents en fonction de la présence ou l’absence des différentes marques d’histones activatrices ou inhibitrices (Figure 43, A). L’intégration des données du ChIP-seq hE2F1-FLAG permet de déterminer que les sites de fixations de E2f1 appartiennent à 3

segments différents (segments 6, 14 et 15, Figure 43, A). Dans les segments 14 et 15, nous retrouvons uniquement les marques activatrices alors que dans le segment 6, les marques activatrices et la marque inhibitrice sont retrouvées. Pour aller plus loin, le niveau d'expression des gènes associées à chaque segment dans la cellule Min6 a été analysé, révélant ainsi que les gènes associés au segment 6 sont des gènes faiblement exprimés dans la cellule, alors que les gènes associés aux états 14 et 15 sont fortement exprimés (Figure 43, B).

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer dans quels segments se retrouvaient les gènes induits ou réprimés dans les îlots des souris *E2f1* ^{β -/-}. Ainsi, au niveau du segment 6, regroupant les gènes peu exprimés dans la cellule β , 110 gènes des 493 gènes induits lors de la délétion de *E2f1* sont retrouvés, alors que seulement 12 gènes des 199 dont l'expression est diminuée sont retrouvés. Au contraire, au niveau des segments 14 et 15, regroupant des gènes fortement exprimés dans la cellule β , 88 et 78 gènes respectivement, diminués dans les îlots des souris *E2f1* ^{β -/-} sont retrouvés (Figure 43, C) et 89 et 137 gènes respectivement, augmentés dans ces îlots, sont déterminés (Figure 43, D, E). Étant donné que les gènes peu exprimés dans la cellule β (segment 6) sont uprégulés en absence de *E2f1*, nous pouvons conclure dans un premier temps du rôle répresseur de *E2f1*. De plus, les données observées dans les segments 14 et 15 regroupant des nombreux gènes downrégulés dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} (166/199) montrent également un rôle activateur de *E2f1* dans la cellule β . Ainsi, nos données mettent en évidence le rôle à la fois activateur et répresseur de *E2f1* dans la cellule β pancréatique.

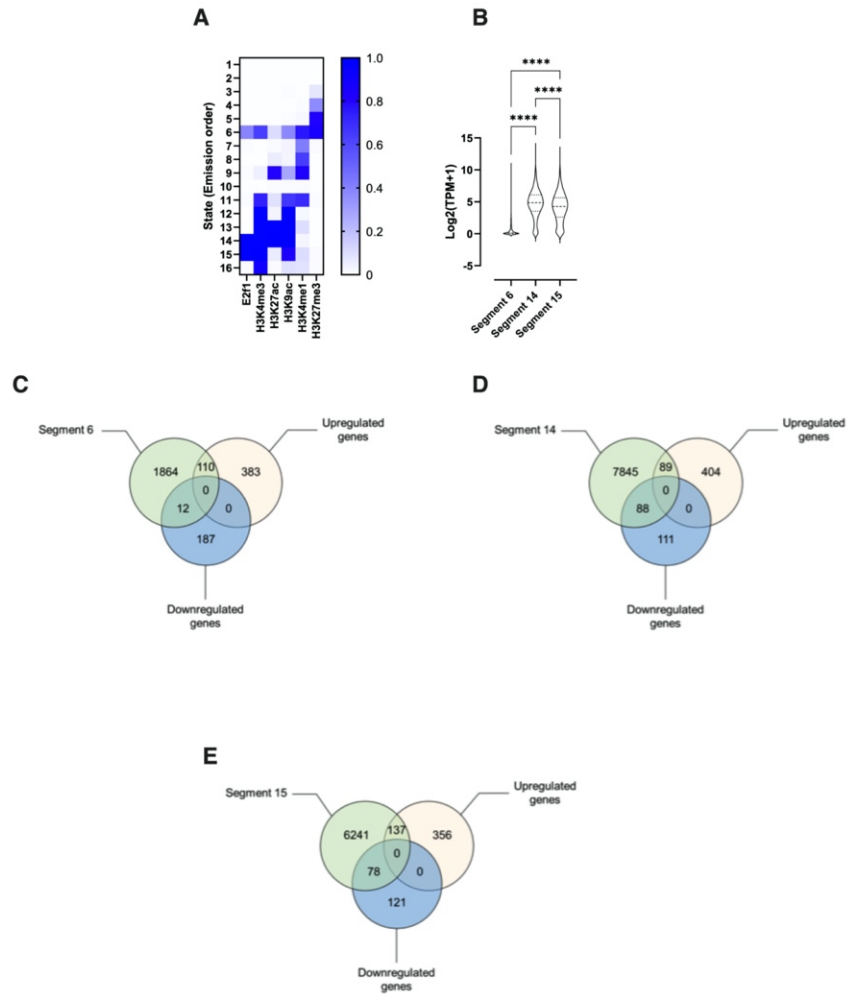


Figure 43 : Dans la cellule β pancréatique, E2f1 va jouer à la fois un rôle activateur et répresseur de la transcription de ses gènes cible. (A) Analyse de la présence ou l'absence des marques d'histones et de la fixation de E2f1 sur l'ensemble du génome regroupés en 16 segments de cellules Min6 à l'aide du logiciel ChromHMM. **(B)** Représentation du niveau d'expression des gènes présents dans l'ensemble des segments où la fixation de E2f1 est détectée (Segment 6, 14, 15). **(C, D, E)** Analyse comparative des gènes présents dans les segments 6, 14 et 15 de cellules Min6 avec les gènes « Uprégulés » et « Downrégulés » dans les îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ comparés aux îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$.

Partie 2 :

**Analyse du rôle de E2f1 dans les
mécanismes de sécrétion d'insuline
médiés par le Glp-1 et identification des
mécanismes moléculaires associés**

II.1 E2f1 contrôle l'expression du récepteur au Glp-1 dans la cellule β pancréatique

Les données de séquençage de l'ARNm d'îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ ont révélé que la perte d'expression de E2f1 entraîne une diminution de l'expression de nombreux marqueurs de l'identité et de la fonction de la cellule β (Figure 36, D). Parmi ces marqueurs était retrouvé le récepteur au Glucagon-like peptide 1, récepteur à 7 domaines transmembranaire permettant la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaire, induisant l'augmentation de la prolifération cellulaire et diminuant l'apoptose de la cellule β (444). De manière intéressante, certains mécanismes biologiques impliqués dans les fonctions de la cellule β et contrôlés par la voie du Glp-1 sont également des mécanismes contrôlés par E2f1 (417-419). Pour finir, il a été montré qu'une délétion du récepteur au *Glp-1* entraînait une modification de la topographie de l'îlot pancréatique avec une augmentation du nombre de cellules α au centre de l'îlot (445), phénomène également observé dans le modèle de souris $E2f1^{\beta-/-}$.

La seconde partie de cette étude a donc pour objectif d'étudier le lien entre la voie E2f1 et celle du Glp-1 et de son récepteur dans la fonction de la cellule β . Pour cela, des tests de tolérance au glucose après gavage ont été réalisés. En effet, l'utilisation du gavage permet la sécrétion massive de Glp-1 par les cellules L intestinales (446) et permet ainsi de voir un défaut de la signalisation du Glp-1 dans les mécanismes de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans un premier temps, nos différents modèles d'études (souris $E2f1^{\beta-/-}$ et $E2f1^{\beta over}$) sous régime standard ont été soumis à des tests oraux de tolérance au glucose (oGTT, Figure 44). Premièrement, les souris $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime standard présentent un phénotype de gluco-intolérance marqué après oGTT (Figure 44, A, B), accompagné d'une diminution de la sécrétion d'insuline 30 minutes après gavage (Figure 44, C). Dans l'objectif de déterminer si cette diminution de sécrétion d'insuline n'était pas induite par une diminution de la production et de sécrétion de Glp-1 suite à une diminution d'expression de *E2f1* dans la cellule β , le niveau de Glp-1 sérique a été mesurée. Nos résultats montrent qu'aucune différence de sécrétion de Glp-1 n'est observée entre les souris $E2f1^{+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ (Figure 44, D). Soumises à un régime riche en graisse, les souris $E2f1^{\beta-/-}$ sont intolérantes au glucose après injection de glucose en *i.p.*, 4 et 8 semaines après le début du régime. Cependant, ces effets métaboliques s'estompent 12 semaines après le début du régime alimentaire. Étant donné qu'un test de tolérance au glucose oral sur les souris $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime standard révèle une intolérance au glucose, l'analyse du phénotype métabolique des souris $E2f1^{\beta-/-}$ après oGTT sous HFD a ensuite été réalisé. Ainsi, les souris $E2f1^{\beta-/-}$ présentent un phénotype d'intolérance au glucose marquée (Figure 44 E, F), associé à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose 30 minutes après gavage (Figure 44, G), sans aucune modification de la sécrétion de Glp-1 10 minutes après l'ingestion de glucose (Figure 4, H).

Par la suite, le phénotype métabolique après oGTT des souris *E2f1^{flover}* a été analysé sous régime standard et riche en graisse. Sous régime standard, cette surexpression permet d'augmenter légèrement la sensibilité au glucose (pvalue AUC = 0,07) (Figure 44 I, J), accompagnée d'une augmentation de la sécrétion d'insuline 30 minutes après injection de glucose (Figure 44, K). Enfin, 16 semaines après la mise sous un régime riche en graisse, une légère augmentation de la tolérance au glucose est observée 15 minutes après injection, néanmoins la gluco-tolérance n'est pas modulée (Figure 44, L, M). De manière intrigante, il a été observé une forte augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Figure 44, N), sans modification de la sensibilité au glucose (Figure 44, L, M) et à l'insuline.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence que la perte d'expression de *E2f1* dans la cellule β entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse à une administration orale de glucose, provoquant une intolérance au glucose, alors que la surexpression de *E2f1* dans la cellule β permet une légère augmentation de cette tolérance au glucose, néanmoins associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à un gavage de glucose. Les résultats obtenus mettent également en évidence que la sécrétion de Glp-1 (entérohormone produite et sécrétée après un repas) n'est pas modifiée lors de la délétion de *E2f1* dans la cellule β . Ces résultats permettent de poser l'hypothèse qu'une modulation de l'expression de *E2f1* dans la cellule β pancréatique provoque une modification de signalisation de la voie du Glp-1 au sein de la cellule β pancréatique.

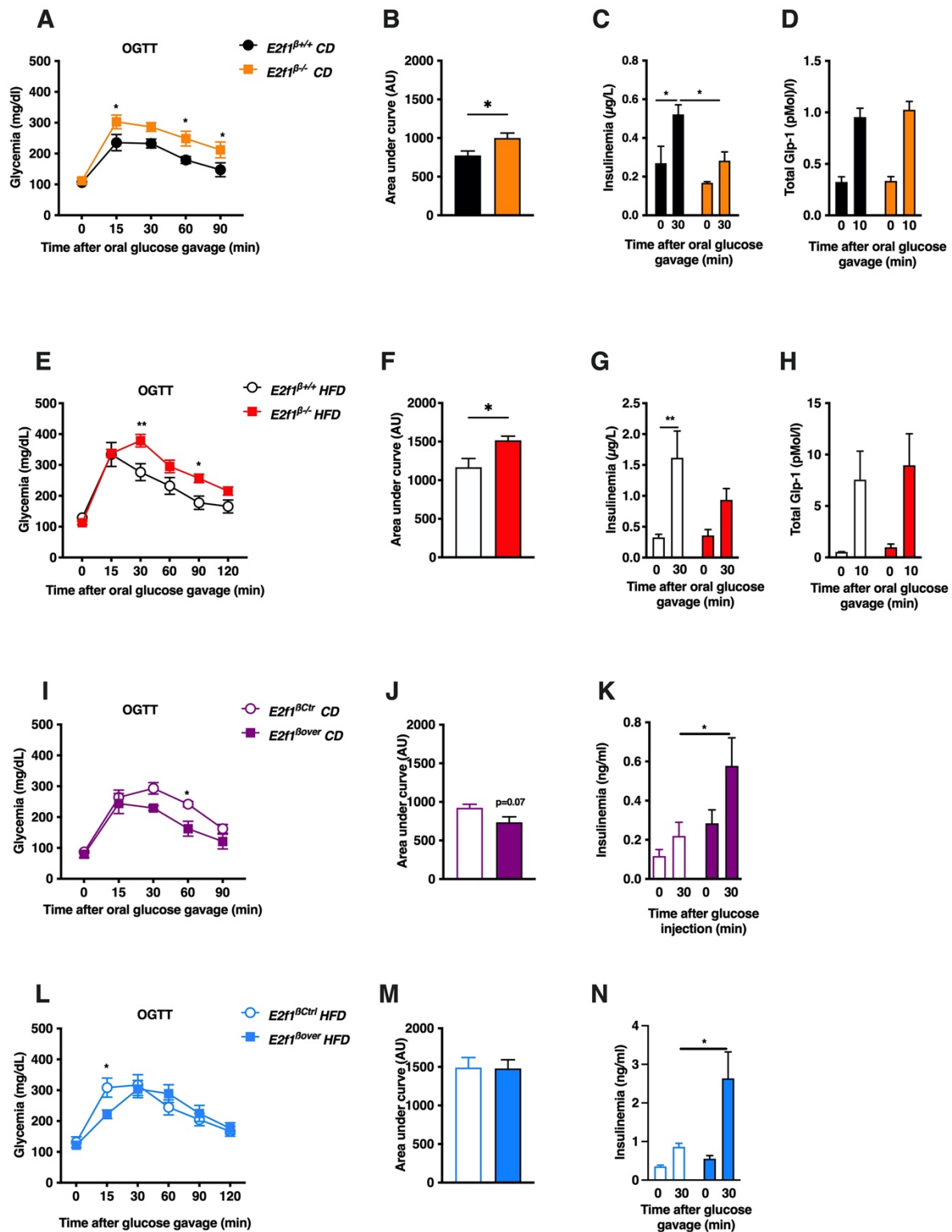


Figure 44 : La délétion de $E2f1$ dans la cellule β entraîne une gluco-intolérance suite à une administration orale de glucose, sans modification de la sécrétion de Glp-1. (A, B, C, D) (A) Test de tolérance au glucose oral, (B) Aire sous la courbe calculée à partir de (A), (C) insulïnémie à 0 et 30 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 16 semaines, (D) et concentration de Glp-1 plasmatique à 0 et 10 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 16 semaines (n=5-7). (E, F, G, H) (E) Test de tolérance au glucose oral, (F) Aire sous la courbe calculée à partir de (E), (G) insulïnémie à 0 et 30 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ sous régime riche en graisse depuis 16 semaines, (H) et concentration de Glp-1 plasmatique à 0 et 10 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 16 semaines (n=7). (I, J, K) (I) Test de tolérance

au glucose oral, **(J)** Aire sous la courbe calculée à partir de **(I)**, **(K)** insulïnémie à 0 et 30 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés de 12 semaines (n=5-). **(L, M, N)** **(L)** Test de tolérance au glucose oral, **(M)** Aire sous la courbe calculée à partir de **(L)**, **(N)** insulïnémie à 0 et 30 minutes après administration orale de glucose sur des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgés sous régime riche en graisse depuis 16 semaines (n=5-). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du *t* de student (B, F, J, M) et par Two-Way ANOVA (A, C, D, E, G, H, I, K, L, N).

Afin de déterminer le rôle de *E2f1* dans la signalisation du Glp-1 dans la cellule β , l'analyse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et à l'exendine-4 (analogue du Glp-1) a été réalisée à l'aide de différents modèles cellulaires et animaux. Dans un premier temps, la diminution d'expression de *E2f1* a été réalisée dans la lignée cellulaire Min6 à l'aide d'une stratégie par ARN interférent (siRNA). Comme observé sur la figure 45A, l'efficacité du traitement par siRNA ciblant *E2f1* est de 50 %. Un test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et à l'exendine-4, analogue du Glp-1, utilisé en clinique dans le traitement d'un diabète de type 2 (447), démontre qu'une diminution de l'expression de *E2f1* entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et diminue également l'effet potentialisateur de la sécrétion médiée par l'analogue du Glp-1 (Figure 45, B). De plus, après isolement d'îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ et un test de sécrétion d'insuline en réponse aux deux sécrétagogues, il a également été observé une perte de l'effet potentialisateur du Glp-1 (Figure 45, C). Ces résultats suggèrent que, à la fois *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*, la diminution d'expression de *E2f1* est associée à une diminution des effets sécrétoires du Glp-1 sur la cellule β .

A l'aide du modèle $E2f1^{\beta over}$, permettant la surexpression de *E2f1* dans la cellule β , il a été mis en évidence qu'une augmentation de l'expression de *E2f1* permettait d'augmenter significativement la sécrétion d'insuline en réponse à l'exendine-4 (Figure 45, D), mécanisme également observé *in vivo*, après un test de tolérance au glucose oral.

Après avoir mis en évidence le rôle important de *E2f1* sur l'effet potentialisateur de la sécrétion d'insuline médiée par le Glp-1, nous avons analysé l'expression de son récepteur dans nos différents modèles d'études. Dans la lignée Min6, la diminution d'expression de *E2f1* de 50 % entraîne une diminution d'environ 60% de l'expression du *Glp-1r* (Figure 45, E). *In vivo*, nos résultats montrent également une diminution de l'expression du *Glp-1r* (Figure 45, F), comme observé lors du séquençage de l'ARNm d'îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ (Figure 45, D). Au contraire, la surexpression de *E2f1* dans la cellule β entraîne une augmentation significative de l'expression du récepteur au Glp-1 (Figure 45, G).

Grâce à la collaboration avec le Pr Julie Kerr-Conte du laboratoire U1190 dirigé par le Pr François Pattou, des manipulations sur des îlots de donneurs humains ont pu être réalisés. La modulation de l'expression génique étant complexe à mettre en œuvre dans un modèle *ex vivo*, il a été décidé d'utiliser un agent pharmacologique afin de diminuer l'activité transcriptionnelle de l'ensemble des

E2Fs, le HLM006474 (427, 428). L'analyse de l'expression génique d'îlots humains traités pendant 48 h avec le HLM006474 montre une diminution d'expression de *E2F1* et du *GLP1R* (Figure 45, H). De plus, cette diminution d'expression du *GLP1R* induit une perte de la potentialisation de la sécrétion d'insuline médiée par l'exendine-4 (Figure 45, I).

Le premier messager après l'activation du récepteur au Glp-1 étant l'AMPC, un dosage du taux d'AMPC en réponse à l'exendine-4 en présence ou en absence de *E2f1* a été effectué afin d'évaluer si la diminution d'expression du *Glp-1r* induite par une baisse de l'expression de *E2f1* module la production d'AMPC cytosolique. Nos résultats mettent en évidence que la perte d'expression de *E2f1* induit une incapacité des cellules Min6 à augmenter leur taux d'AMPC en réponse à l'exendine-4 (Figure 45, J). Enfin, la mitochondrie jouant un rôle crucial dans le mécanisme de sécrétion d'insuline à travers la production d'ATP (448), nous nous sommes intéressés à déterminer quels étaient les effets d'une perte d'expression de *E2f1* et d'un traitement avec un agoniste du Glp-1r sur l'activité mitochondriale à l'aide de la technologie Seahorse®. Les résultats mettent en évidence qu'un traitement pendant 1 heure avec de l'exendine-4 augmente la respiration basale mitochondriale ainsi que la production d'ATP en réponse au glucose. Au contraire, la perte d'activité des E2fs par traitement pharmacologique entraîne une diminution globale de l'activité mitochondriale, en absence ou en présence d'exendine-4 (Figure 45, K). Ainsi, ces données suggèrent que *E2f1* module l'expression du récepteur au Glp-1 dans la cellule β pancréatique et contribue à la potentialisation de la sécrétion d'insuline en réponse au Glp-1.

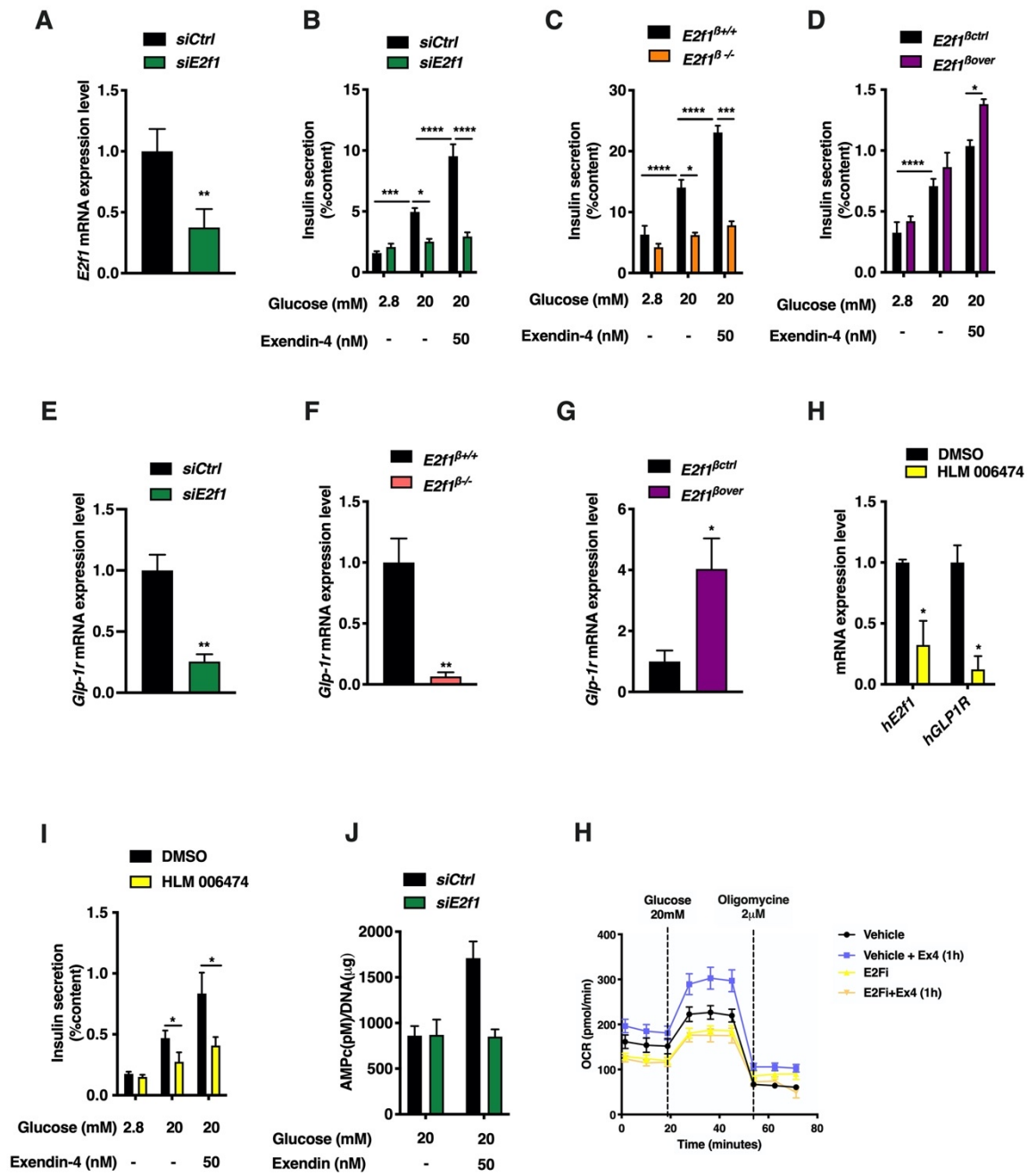


Figure 45 : La modulation d'expression de *E2f1* dans la cellule β va moduler la potentialisation de la sécrétion d'insuline médiée par le Glp-1. (A) Niveau d'expression de l'ARNm de *E2f1* sur des cellules Min6 transfectées pendant 48h avec des siRNA control (*siCtrl*) ou *E2f1* (*siE2f1*) (n=5). (B) Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose sur des cellules Min6 transfectées des siRNA control (*siCtrl*) ou *E2f1* (*siE2f1*) et exposées à 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=7). (C) Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose sur des îlots de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} et exposés à 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=3-9). (D) Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose sur des îlots de souris *E2f1*^{βctrl} et *E2f1*^{βover} et exposés à 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=3-4). (E) Niveau d'expression de l'ARNm du *Glp-1r* sur des cellules Min6 transfectées pendant 48h avec des siRNA control (*siCtrl*) ou *E2f1* (*siE2f1*) (n=5). (F) Niveau d'expression de l'ARNm du *Glp-1r* sur îlots isolés de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} (n=4). (G) Niveau d'expression de l'ARNm du *Glp-1r* sur îlots isolés de souris *E2f1*^{βctrl} et *E2f1*^{βover} (n=4-5). (H) Niveau d'expression de *E2f1* et du *Glp-1r* dans des îlots de donneurs humains traités pendant 48 h avec soit 0,1% de DMSO ou avec 10μM de HLM006474 (n=3). (I) Test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose sur des îlots de donneurs humains traités pendant 48 h avec soit 0,1% de DMSO ou avec 10μM de HLM006474 et exposés à 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=3). (J) Mesure de la production d'AMPc de

cellules Min6 transfectées pendant 48h avec des siRNA control (*siCtrl*) ou *E2f1* (*siE2f1*) et exposées à 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=7). **(H)** Mesure du taux de consommation d'oxygène de cellules Min6 traitées pendant 48 heures avec soit 0,1% de DMSO ou 10 μ M de HLM006474, puis exposées avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 pendant 1h. Au cours de l'expérience, les cellules sont d'abord exposées à 2,8 mM de glucose, puis 20 mM de glucose et pour finir avec 2 μ M d'oligomycine (n=6). Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du *t* de student (A, E, F, G, H) et par Two-Way ANOVA (B, C, D, I, J).

II.2 E2f1 est capable de se fixer au niveau du promoteur du Glp-1r pour activer sa transcription

E2f1 étant un facteur de transcription, il était intéressant de déterminer si le contrôle de l'expression du récepteur au Glp-1 par E2f1 était directement contrôlé par la fixation de E2f1 sur le promoteur du Glp-1r.

Pour répondre à cette question, les résultats du CHIP-Seq réalisés auparavant sur des cellules Min6 transfectées avec un Plasmide hE2F1-FLAG (Figure 39, 40) ont été utilisés dans un premier temps. Couplé à une analyse bioinformatique à l'aide du logiciel IGB, il a été déterminé l'apparition d'un enrichissement localisé au niveau du promoteur du Glp-1r, proche du TSS uniquement pour les cellules transfectées avec le plasmide hE2F1-FLAG (Figure 46, A). Une analyse bioinformatique a révélé également que le promoteur du *Glp1r* contenait possiblement différents sites de fixation pour l'ensemble des E2fs dont la séquence consensus est à majoritairement représentée par TTTGGCGC (Figure 46, B, C). Afin de valider les résultats obtenus par séquençage de l'ADN obtenues par immunoprécipitation de la chromatine, une qPCR a été réalisée après immunoprécipitation de *E2f1* à l'aide du Tag-FLAG. L'enrichissement uniquement observé lors de l'IP-FLAG après transfection avec le plasmide hE2F1-FLAG permet de valider les résultats obtenus en CHIP-Seq et démontre, à nouveau, que E2f1 est capable de se fixer au promoteur du récepteur au Glp-1 (Figure 46, D). Afin d'identifier l'effet transcriptionnel de E2f1 sur le promoteur du *Glp-1r*, nous avons généré et transfecté, dans la lignée Min6, un plasmide permettant l'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur au Glp-1r. Dans l'objectif d'activer ou d'inhiber E2f1, ces cellules ont été co-transfectées avec les plasmides codant pour E2f1 et son partenaire DP-1, mais également avec le répresseur de l'activité transcriptionnelle du complexe E2f1-Dp1, pRb. Les données observées démontrent que la co-transfection de E2f1-Dp1 permet d'augmenter l'activité luciférase, alors que l'ajout du répresseur pRb induit une diminution de cette activité (Figure 46, E). Les résultats suggèrent alors que E2f1 est capable de se fixer au promoteur du récepteur au Glp-1 afin d'activer sa transcription et permettre à la cellule β de potentialiser la sécrétion d'insuline en réponse aux agonistes du Glp-1.

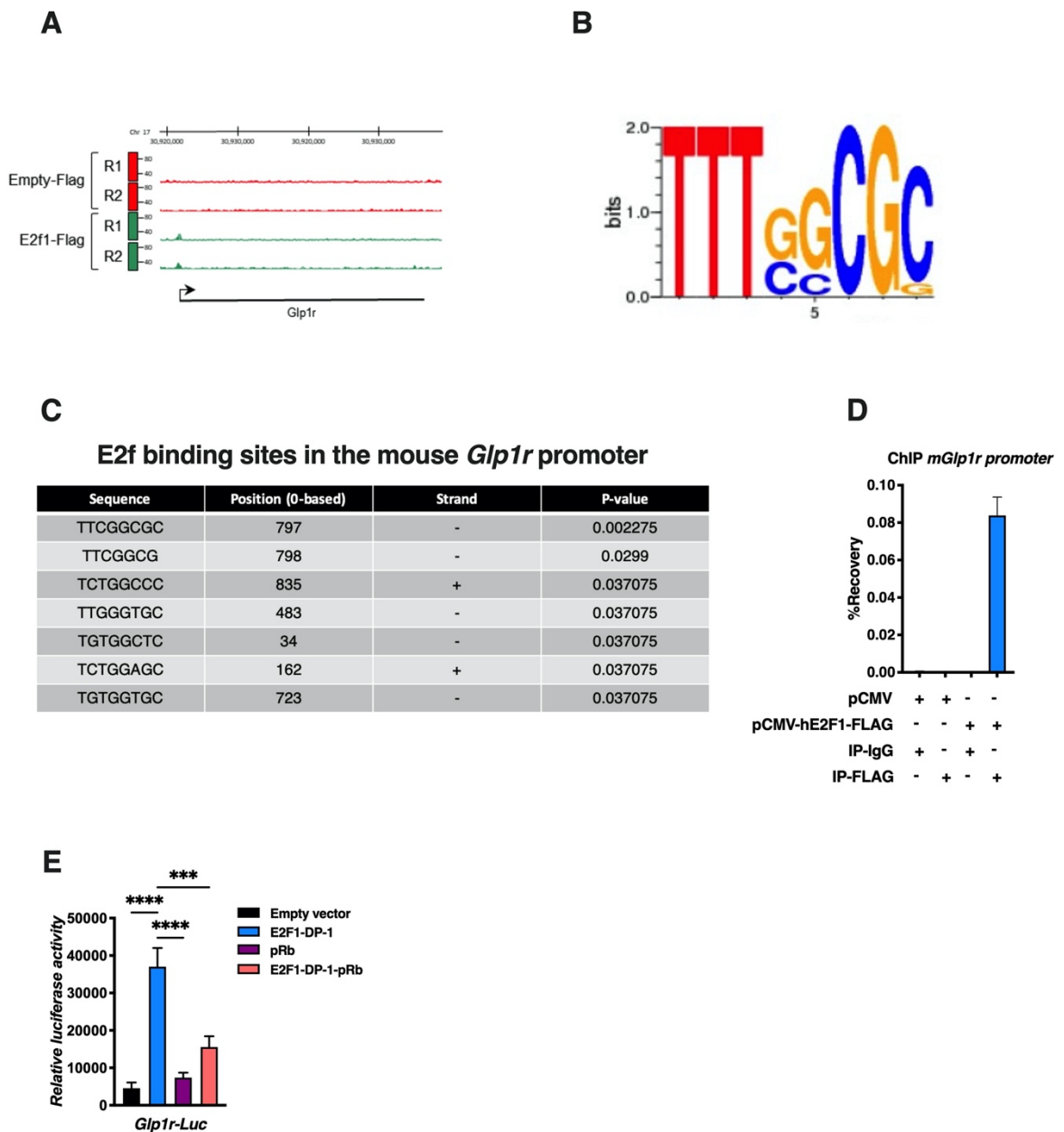


Figure 46 : E2f1 est capable de réguler à la chromatine l'expression du récepteur au Glp-1. (A) Représentation des sites de fixation de E2f1 sur les promoteurs des gènes de *Ezh2* et de *Ccne1* sur des cellules Min6 transfectées avec un plasmide PCMV10 ou PCMV10-hE2F1-Flag à l'aide du logiciel « Integrated Genome browser ». (B) Séquence consensus de E2f1. (C) Possible site de fixation de E2f1 sur le promoteur du *Glp-1r* déterminé à l'aide du logiciel LASAGA-search. (D) ChIP-qPCR démontrant la fixation de E2f1 sur le promoteur *Glp-1r* de cellules Min6 transfectées avec le plasmide PCMV10 ou le plasmide PCMV10-hE2F1-Flag. La chromatine a été incubée avec un anticorps anti-Flag ou anti-IgG et la qPCR a été réalisé à l'aide d'oligonucléotides spécifiques de la région du promoteur (n=2). (E) Les cellules Min6 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le récepteur au Glp-11 murin couplé à la luciférase en présence d'un plasmide pcDNA3 (control négatif), E2F1-DP1, E2F1-DP1-pRB. Les résultats ont été normalisé à l'activité de la β -galactosidase. Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par Two-Way ANOVA (D, E).

II.3 Un traitement à l'analogue au Glp-1 induit l'augmentation de la voie E2f1-pRb

Les mécanismes moléculaires contrôlés par l'activation du récepteur au Glp-1 dans la cellule β ne sont pas complètement identifiés. Dans l'objectif de découvrir de nouvelles voies de signalisation contrôlées par l'exendine-4 dans la cellule β , le kinome (ensemble des kinases) d'îlots de Langerhans de souris contrôles C57Bl6/J traitées avec soit, 20 mM de glucose, soit 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 pendant 30 minutes, a été effectué à l'aide de la technologie Pamgene (Cf Matériel et méthode) (Figure 47, A). L'exendine-4 + glucose comparé au glucose seul induit une augmentation de la phosphorylation de 43 sites sur 41 peptides différents. (Figure 47, B). De manière intéressante et permettant de valider le traitement à l'exendine-4, nous avons observé que l'exendine-4 augmente la phosphorylation de la protéine Creb (C-AMP response element-binding protein) sur la sérine 133, protéine déjà démontrée dans la littérature par Jhala et al., 2013 (12842910) comme étant phosphorylée après l'activation du Glp-1r (Creb^{S133}, Figure 47, B, *Log2 Fold Change* = 0,45, *p* = 0,003). De plus, les résultats observés ont permis de mettre en évidence qu'un traitement à l'exendine-4 pendant 30 minutes augmente le niveau de phosphorylation de la protéine Rb sur les sérines 807/811 (pRb^{S807/811}, Figure 47, B, *Log2 Fold Change* = 0,63, *p* = 0,043), répresseur de l'activité transcriptionnelle de E2f1. A l'aide du logiciel Bionavigator, l'intégration des données de phosphorylation permettant de définir l'activité des kinases a été réalisée (Figure 47, C) et démontre qu'un traitement à l'exendine-4 permet d'augmenter l'activité des Cyclin dépendant kinases, permettant d'expliquer l'augmentation de la phosphorylation de pRb observée (Figure 47, C). Enfin, l'analyse des voies moléculaires modulées par le traitement à l'exendine-4 a été réalisée à l'aide du logiciel « Ingenuity pathway analysis » et permet de déterminer que les voies de signalisation liées à la voie des opioïdes, de l'AMPK, de la PKA, mais aussi de l'activation des GPCR ou des mécanismes moléculaires en lien avec le cancer, sont augmentées lors d'un traitement à l'exendine-4 d'îlots de souris contrôles (Figure 47, D).

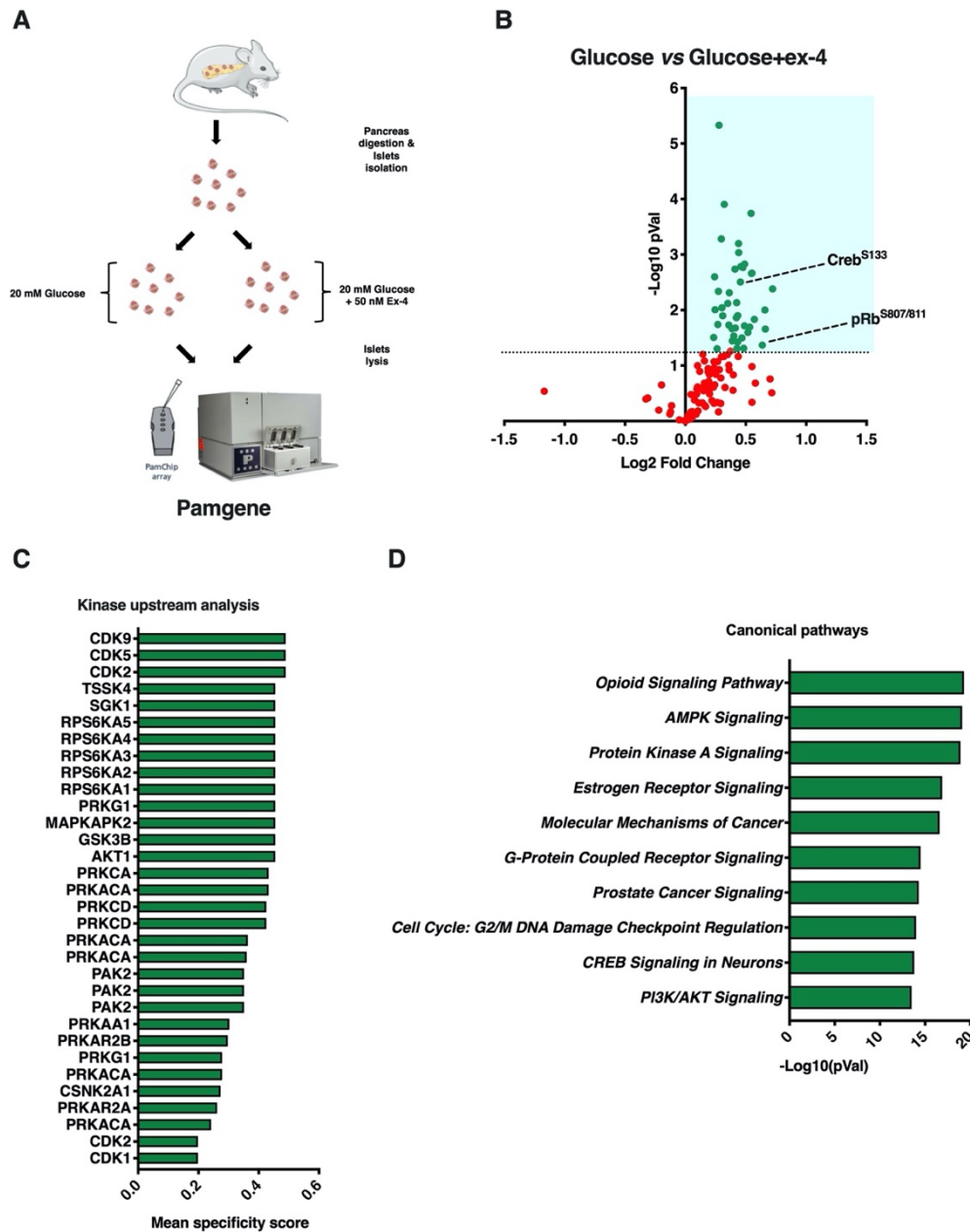


Figure 47 : Un traitement pendant 30 minutes avec de l'exendine-4 va entraîner une augmentation de pRb sur la sérine 807/811 dans des îlots de souris. (A) Représentation schématique de stratégie utilisée pour l'analyse du kinome d'îlots de souris C57Bl6/J traités avec 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 pendant 30 minutes (n=3). **(B)** Volcano Plot représentant les différences de phosphorylation de peptides d'îlots de souris C57Bl6/J traités avec 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 pendant 30 minutes. **(C)** Analyse des kinases impliquées dans le différentiel de phosphorylation de peptides observé en (B) réalisé à l'aide du logiciel Bionavigator (Pamgene). **(D)** Le différentiel de phosphorylation des peptides a été analysé avec le logiciel IPA « Ingenuity pathway analysis » afin de déterminer les voies canoniques contrôlées par l'exendine-4. Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du *t* de student (B).

Dans un second temps, la validation de l'augmentation de la phosphorylation de la Sérine 807/811 de pRb observée par Pamgene a été réalisée dans la lignée Min6 par l'utilisation du Western Blot et de l'immunocytofluorescence (Figure 48). Nos données obtenues par Western Blot permettent de valider l'augmentation de la phosphorylation de pRb en réponse à un traitement à l'exendine-4, sans modification de la quantité totale de la protéine pRb (Figure 48, A, B). De plus, par immunofluorescence,

nous observons également qu'un traitement de 30 minutes à l'exendine-4 sur la lignée Min6 augmente la phosphorylation pRb^{S807/811} dans le noyau de la cellule (Figure 48, C).

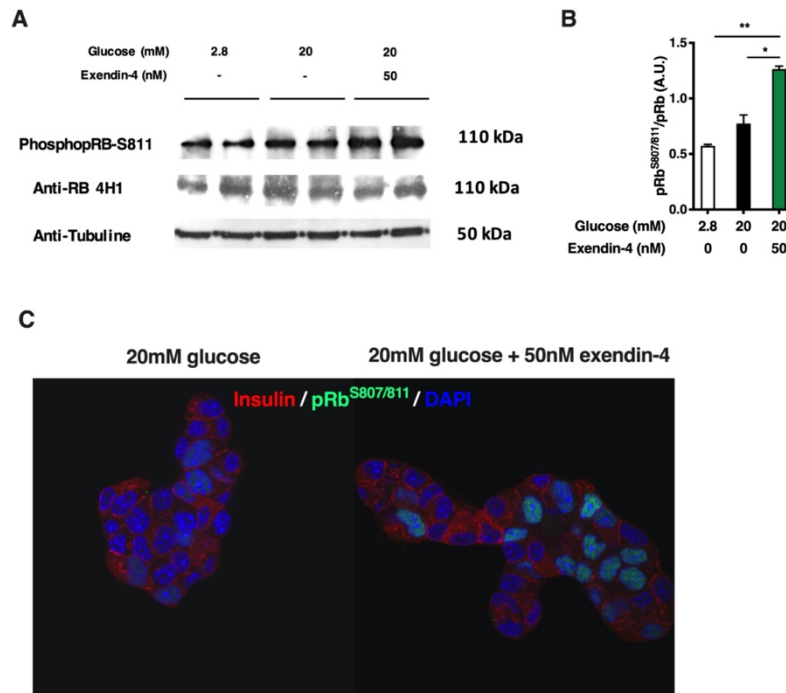


Figure 48 : Sur les cellules Min6, un traitement à l'exendine-4 pendant 30 minutes induit une augmentation de la phosphorylation de pRb sur la sérine 807/811. **(A)** Expérience de Western blot de la tubuline, la protéine Rb totale et de la forme phosphorylée sur la sérine S807/811 de cellules Min6 exposées pendant 30 minutes avec 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4. **(B)** Quantification du niveau protéique de pRb^{S807/811} par mesure de l'intensité de la bande de la forme phosphorylée et non phosphorylée de pRb (n=2). **(C)** Analyse de l'immunofluorescence de pRb^{S807/811} (vert), l'insuline (rouge) et le noyau (DAPI, bleu) de cellules Min6 exposées pendant 30 minutes avec 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 pendant 30 minutes.

Les résultats obtenus précédemment ont permis de mettre en évidence l'induction de la phosphorylation de pRb par un traitement aux analogues du Glp-1. Ainsi, ces données nous ont permis de postuler que l'activation du GLP1R par un traitement à l'exendine-4 pouvait augmenter l'activité transcriptionnelle de E2f1, suite aux données de la littérature montrant que l'activation de la transcription des gènes cibles de E2f1 est dépendante de la phosphorylation de pRb (449). Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de transfection transitoires avec un plasmide contenant les éléments de réponse pour les E2F (E2F-RE) couplé au promoteur de la Thymidine kinase (Tk) et le gène de la luciférase (E2F-RE-Tk-Luc). Ces cellules ont également été co-transfectées avec un plasmide E2f1 et un plasmide Dp1, et/ou avec un plasmide pRb. Les résultats démontrent qu'une élévation de la concentration en glucose à 20mM permet d'augmenter l'activité transcriptionnelle de E2f1 (Figure 49, A) comparé à la condition 2,8 mM de glucose, activité réprimée

par la co-transfection avec le répresseur pRb. De manière intéressante, le traitement à l'exendine-4 potentialise l'activité transcriptionnelle de E2f1. Néanmoins, il est observé que les cellules Min6 traitées avec 50nM d'exendine-4 présentent une atténuation de l'effet répressif de pRb (Figure 49, A). Ces données suggèrent ainsi que l'exendine-4 entraîne une perte de l'effet répresseur de pRb sur l'activité transcriptionnelle de E2f1.

A partir de ces résultats, nous avons postulé que la modulation de l'expression de gènes impliqués dans la fonction des cellules β pouvaient être modulée par un traitement à l'exendine-4. Premièrement, il est maintenant bien établi que E2f1 est capable d'autoréguler son expression (450). Ainsi, comme l'exendine-4 induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle, l'expression de E2f1 en réponse à l'exendin-4 a été analysée dans la lignée Min6. Nous avons constaté que 4h de traitement à l'exendine-4 augmente l'expression de *E2f1* (Figure 49, B). Ce résultat est également retrouvé dans des îlots de souris C57Bl6/J traités à l'exendine-4 pendant 4h (Figure 49, C). Partant du fait que l'expression du récepteur au Glp-1 est diminuée dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-}, nous avons postulé que l'effet transcriptionnel de l'exendine-4 devrait alors être diminué. Ainsi, nous confirmons qu'un traitement de 4h sur les îlots de souris sauvages induit une augmentation de l'expression de E2f1 et que la délétion d'E2f1 n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de E2f1 induite par l'exendine-4 (Figure 49, D)

Étant donné que Pdx1, facteur de transcription contrôlant l'expression du gène de l'insuline, est contrôlé par l'exendine-4 (299, 451), nous avons vérifié si un traitement à court terme avec 50 nM d'exendine-4 module l'expression de *Pdx1* (Figure 49, E, F, G). Dans la lignée Min6, un traitement de 4h avec l'exendine-4 augmente l'expression de Pdx1 (49, E), résultat également observé dans des îlots de souris (Figure 49, F, G). De plus, dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-}, la perte d'expression du *Glp-1r* entraîne une perte des effets transcriptionnels de l'exendine-4 sur le gène *Pdx1* (Figure 49, G).

Enfin, ayant démontré le contrôle de l'expression du *récepteur au Glp-1* par E2f1, nous avons ensuite postulé qu'un traitement court à l'exendine-4 pourrait augmenter l'expression du *Glp-1r*. Néanmoins, dans aucun des modèles utilisés pour cette étude, une augmentation de l'expression du récepteur au Glp-1 est observé après traitement à l'exendine-4 (Figure 49, H, I, J).

L'ensemble de ces données mettent donc en évidence une nouvelle voie moléculaire contrôlé par l'exendine-4 dans la cellule β à travers l'augmentation de la phosphorylation de la protéine Rb et l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de E2f1.

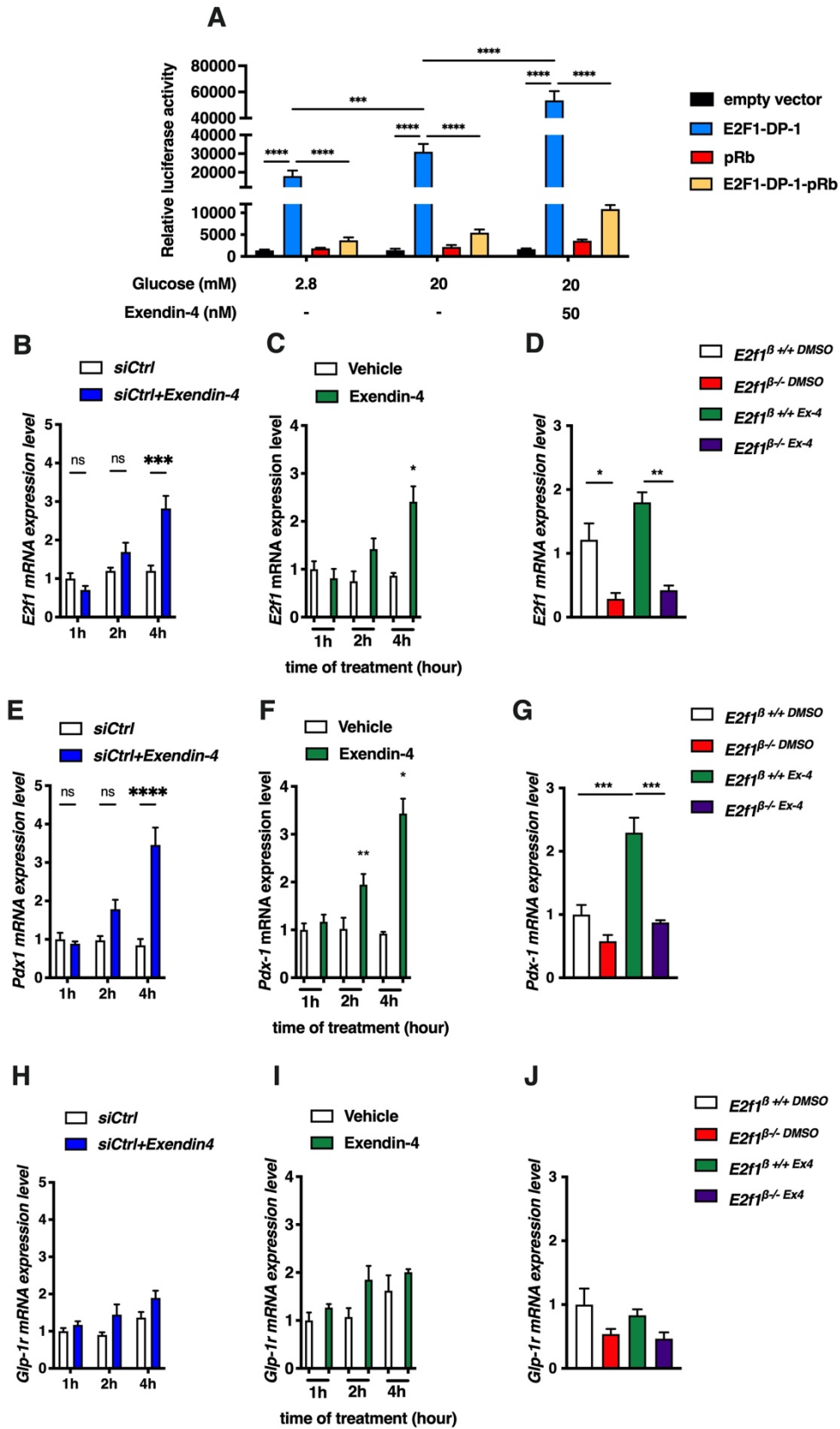


Figure 49 : Le Glp-1 va induire l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de E2f1 et de l'expression de ses gènes cibles. (A) Les cellules Min6 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour E2F-RE-Tk couplé à la luciférase en présence des plasmides pcDNA3 (contrôle négatif), E2F1-DP1, pRb et E2F1-DP1-pRb et traitées pendant 30 minutes avec 2,8 mM de glucose, 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 (n=3). (B, C, D) Niveau d'expression en ARNm du gène *E2f1* dans (B), des cellules Min6 transfectées pendant 48 heures avec un siRNA Ctrl ou E2f1, puis traitées pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4), (C) des îlots de souris C57Bl6/J traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=5), (D) des îlots de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4). (E, F, G) Niveau d'expression en ARNm du gène *Pdx1* dans (E), des cellules Min6 transfectées pendant 48 heures avec un siRNA Ctrl ou E2f1, puis traitées pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4), (F) des îlots de souris C57Bl6/J traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=5), (G) des îlots de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4). (H, I, J) Niveau d'expression en ARNm du gène *Glp-1r* dans (H), des cellules Min6 transfectées pendant 48 heures avec un siRNA Ctrl ou E2f1, puis traitées pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4), (I) des îlots de souris C57Bl6/J traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=5), (J) des îlots de souris *E2f1*^{β+/+} et *E2f1*^{β-/-} traités pendant 1, 2 ou 4h avec 0,1% de DMSO ou 50 nM d'exendine-4 (n=4). Les données sont présentées en moyenne ± s.e.m et sont analysées par Two-Way ANOVA (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J).

Nous avons ensuite analysé le kinome d'îlots de 3 donneurs humains (Tableau 4) traités avec de l'exendine-4 pendant 30 minutes. Nos résultats mettent en évidence que 4 peptides sont significativement phosphorylés lors d'un traitement à l'exendine-4 (KCNB1, IF4E, ERF et MARCS). La phosphorylation de Creb sur la sérine 133 est légèrement, mais non significativement augmentée après traitement au glucose et à l'exendine-4 pendant 30 minutes (Figure 50, A). De manière intéressante, ce traitement induit une forte augmentation, mais non significative de la phosphorylation de pRb sur la sérine 807/811 ($\text{Log}_2 \text{Fold Change} = 3,64$, $p = 0,056$) (Figure 50, A). L'intégration des données de phosphorylation dans le logiciel Bionavigator permet de mettre en évidence l'augmentation de l'activité de certaines kinases tels que RSKL1 ou encore SgK307 (Figure 50, B). De plus, l'activité de CDK4, enzyme connue pour phosphoryler pRB (452) est également augmentée en réponse à l'exendine-4. L'analyse des voies moléculaires modulées par l'action de l'exendine-4 sur l'îlot pancréatique humain permet de confirmer, par le logiciel IPA, l'augmentation des voies moléculaires déjà déterminées sur les îlots de souris (Figure 47), comme la voie de signalisation des opioïdes ou celle de la PKA (Figure 50, C).

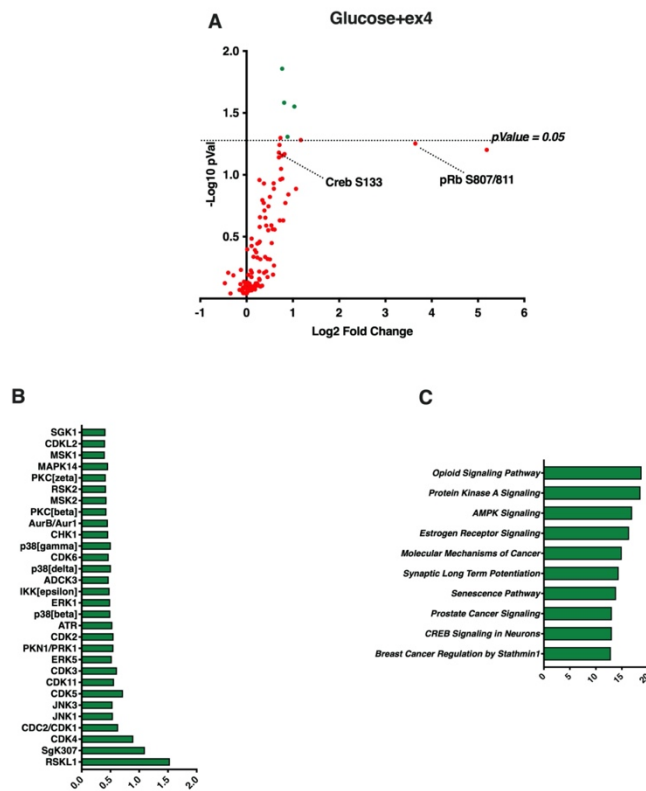


Figure 50 : Sur des îlots de donneurs humains, il semblerait également que le Glp-1 soit capable d'augmenter la phosphorylation de pRb sur la sérine 807/811. **(A)** Volcano Plot représentant les différences de phosphorylation de peptides d'îlots de donneurs humains traités avec 20 mM de glucose ou 20 mM de glucose + 50 nM d'exendine-4 pendant 30 minutes. **(B)** Analyse des kinases impliquées dans le différentiel de phosphorylation de peptides observé en (A) réalisé à l'aide du logiciel Bionavigator (Pamgene). **(D)** Le différentiel de phosphorylation des peptides a été analysé avec le logiciel IPA « Ingenuity pathway analysis » afin de déterminer les voies canoniques contrôlées par l'exendine-4. Les données sont présentées en moyenne \pm s.e.m et sont analysées par un test du *t* de student (A).

Ainsi, l'ensemble de ces données mettent en évidence que, dans des îlots humains, l'exendine-4 module la phosphorylation de la protéine Rb. Cependant, aucune différence significative n'est observée. Ces résultats peuvent s'expliquer par la grande hétérogénéité dans les échantillons d'îlots humains utilisés pour ces expériences de Pamgene (Tableau 4).

Tableau 4 : Caractéristiques des donneurs humains.

Islet preparation	1	2	3
MANDATORY INFORMATION			
Unique identifier	H1032	H1039	H1041
Donor age (years)	35	54	37
Donor sex (M/F)	M	F	F
Donor BMI (kg/m ²)	35.2	24.2	24.3
Donor HbA _{1c} or other measure of blood glucose control	5.4	6.3	5.8

Origin/source of islets ^b	ECIT	ECIT	ECIT
Islet isolation centre	LILLE	LILLE	LILLE
Donor history of diabetes? Please select yes/no from drop down list	No	No	No
If Yes, complete the next two lines if this information is available			
Diabetes duration (years)	NA	NA	NA
Glucose-lowering therapy at time of death ^c	NA	NA	NA
RECOMMENDED INFORMATION			
Donor cause of death	Stroke	Stroke	Anoxia
Warm ischaemia time (h)	No	No	No
Cold ischaemia time (h)	4h34	6h22	5h30
Estimated purity (%)	80	80	70
Estimated viability (%)	95.5	94.7	93.3
Total culture time (h) ^d	18	18	19
Glucose-stimulated insulin secretion or other functional measurement ^e	7,19	3,04	N/A
Handpicked to purity? Please select yes/no from drop down list	No	No	No

Conclusion

Les objectifs de cette thèse étaient multiples. Le premier objectif consistait à valider notre modèle d'étude et analyser le phénotype métabolique de souris déficientes pour *E2f1* ou surexprimant la forme humaine de *E2F1* dans la cellule β pancréatique. Les résultats obtenus ont mis en évidence qu'une diminution de l'expression de *E2f1* est associée au développement d'une intolérance au glucose marquée des souris, associée à une perte de sécrétion d'insuline. Cette diminution d'expression entraîne également une modification de l'architecture de l'îlot de Langerhans, caractérisée par une augmentation du nombre de cellules α sans modification du nombre de cellules β pour les souris sous régime standard. La mise en place d'un régime riche en graisse sur les souris *E2f1* ^{β -/-} entraîne une amélioration de la tolérance au glucose après 12 semaines, alors que les souris sous régime standard présentent une gluco-intolérance. Cependant, cette diminution de la gluco-intolérance s'accompagne toujours d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Nos résultats ont également mis en évidence que la surexpression de *E2F1* dans la cellule β améliore légèrement la gluco-tolérance des souris, associée à une forte augmentation de la sécrétion d'insuline, sans modification de l'architecture des îlots des souris surexprimant *E2F1*.

Le second objectif de ma thèse était de disséquer et comprendre les mécanismes moléculaires contrôlés par *E2f1* dans la cellule β . L'analyse du transcriptome de souris *E2f1* ^{β -/-} met en évidence une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et une diminution de gènes impliqués dans les mécanismes de sécrétion et d'exocytose, permettant d'expliquer, en partie, la diminution de sécrétion d'insuline observée chez les souris *E2f1* ^{β -/-}. Nos résultats démontrent également une diminution de l'expression de marqueurs de cellules β et une augmentation concomitante des marqueurs de cellules α , résultat corrélé avec l'augmentation du nombre de cellules α observé dans les îlots des souris *E2f1* ^{β -/-}. L'analyse du cistrome de *E2f1* a mis en évidence le double rôle de *E2f1* dans la cellule β , avec des effets à la fois activateur et répresseur de la transcription.

Notre analyse de transcriptomique ayant démontré une diminution de l'expression du récepteur au Glp-1 dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-}, le troisième objectif de ma thèse a été d'étudier le rôle *E2f1* dans les mécanismes de sécrétion d'insuline médiée par le Glp-1. Ainsi, nous avons mis en évidence que la modulation d'expression d'*E2f1* est liée à une modulation d'expression du récepteur au Glp-1, associée à une diminution ou une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse à un agoniste du Glp-1. Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine et de transfection transitoire couplées à la luciférase, nos études ont mis en évidence que *E2f1* est capable de se fixer directement au promoteur du récepteur au Glp-1 et de moduler sa transcription.

Le dernier objectif de ma thèse consistait à analyser l'impact d'un traitement avec l'agoniste du Glp-1r sur la modulation de l'activité de kinases présentes dans la cellule β par la technologie Pamgene. Les résultats obtenus ont mis en évidence que le traitement de cellules β avec un agoniste au Glp-1 pendant un temps court de 30 minutes induisait une augmentation de la phosphorylation de la protéine Rb, associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de E2f1 et une diminution des effets répresseurs de pRb sur E2f1. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle de E2f1 observée induit ainsi une augmentation de l'expression de ses gènes cibles dans la cellule β tels que *Pdx1*.

Ainsi, l'ensemble des données de ma thèse a permis de démontrer un rôle direct de E2f1 dans la fonction et le maintien de l'identité de la cellule β pancréatique par la modulation de l'expression de certains gènes clé impliqués dans le contrôle de ces mécanismes. Finalement, notre étude aura permis de démontrer qu'une nouvelle voie de signalisation est contrôlée par le Glp-1 dans la cellule β , la voie E2f1-pRb.

Discussion et perspectives

I. Effets de E2f1 dans la fonction de la cellule β

E2f1 est un facteur de transcription principalement décrit comme contrôlant la progression du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire et le développement de cancers (352). Cependant, son rôle et ses effets dans les cellules différenciées et non prolifératives restent à déterminer. De manière intrigante, les régulateurs du cycle cellulaire, y compris E2f1, sont exprimés au sein de cellules qui ne prolifèrent pas, suggérant un rôle important de ces régulateurs dans la fonction des cellules différenciées. Les premières études montrant le rôle de E2f1 dans la cellule β ont été réalisées en 2003 et 2004 (419, 453, 454), et ont mis en évidence que la délétion globale de *E2f1* chez la souris entraîne une diminution de la prolifération post-natale des cellules β , accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (417). Par la suite, une nouvelle étude a mis en évidence à nouveau l'effet de E2f1 dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose à travers le contrôle de l'expression de *Kcnj11*, gène codant pour la sous-unité Kir6.2 du canal potassique ATP dépendant impliqué dans le mécanisme de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (419). Cependant, le rôle spécifique de E2f1 dans la cellule β n'était pas connu et il n'était pas exclu que les phénotypes observés dans les souris *E2f1*^{-/-} pouvaient provenir de communications inter-organes défectueuses. Dans ce contexte, au cours de ma thèse, nous avons généré un modèle unique de souris permettant d'inactiver ou de sur-exprimer *E2f1* spécifiquement dans la cellule β . Ma thèse a permis de contribuer à mieux comprendre le rôle spécifique de ce facteur de transcription dans la cellule β . En effet, j'ai pu démontrer que les souris *E2f1* ^{β -/-} présentent également un phénotype de gluco-intolérance associé à une diminution de la sécrétion d'insuline, démontrée à la fois *in vivo* et *ex vivo* à partir de 12 semaines d'âge. L'analyse du transcriptome (ensemble des ARN présent dans la cellule) d'îlots de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} démontre que la délétion de *E2f1* dans la cellule β entraîne la diminution de voies de signalisation impliquées dans les mécanismes d'exocytose et de sécrétion, ainsi que de gènes impliqués dans l'homéostasie calcique (Figure 36). L'exocytose étant le mécanisme permettant le relargage des granules d'insulines dans la circulation sanguine (455), la diminution d'expression de gènes impliqués dans ce mécanisme pourrait permettre d'expliquer la perte de sécrétion d'insuline en réponse au glucose observée chez les souris *E2f1* ^{β -/-}. D'ailleurs, il a été constaté une diminution dans l'expression des gènes impliqués dans l'exocytose d'îlots de donneurs humains présentant un DT2 (456). De plus, nos résultats ont mis en évidence une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie calcique. Le calcium est également un médiateur important de la sécrétion d'insuline (457). En effet, dans la cellule β , le glucose est métabolisé, entraînant une cascade de signalisation et l'entrée de calcium intra-cellulaire, permettant l'exocytose des granules d'insuline. Une

diminution des gènes impliqués dans ces mécanismes, comme nous l'avons observé dans notre modèle *E2f1*^{β-/-} au cours de ce travail de thèse, pourrait également expliquer la diminution de sécrétion d'insuline, phénomène également observé dans les cellules β d'îlots de donneurs diabétiques (457).

De plus, l'analyse transcriptomique des îlots de souris *E2f1*^{β-/-} montre une diminution de la réponse au stress du réticulum. Cette réponse, nommée « UPR » (*Unfolded Protein Response*), se traduit par l'activation de voies de signalisation intra-cellulaire (PERK, ATF6 et IRE1) qui permet de protéger la cellule contre ce stress et maintenir, ainsi, une homéostasie cellulaire normale. Une dérégulation de la réponse UPR est un mécanisme important dans l'échec de la cellule β à compenser l'insulino-résistance et le développement d'un DT2 suite à une diminution de la production et de la sécrétion d'insuline (458). Ainsi, la diminution de la réponse au stress du RE observée dans les îlots de souris *E2f1*^{β-/-} est un autre mécanisme qui pourrait expliquer la diminution de sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Enfin, il a été observé une augmentation de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire dans les îlots de souris *E2f1*^{β-/-} et notamment une augmentation de gènes impliqués dans la production de cytokines et l'activation de lymphocytes. Les maladies métaboliques et le DT2 sont fortement associés à une augmentation de la réponse inflammatoire, caractérisée par une modification de la production de cytokine et de cellules immunitaires au sein de l'îlot (459). Récemment, des études ont montré le rôle important de certaines cytokines dans les mécanismes de sécrétion d'insuline (460, 461), mais également dans le développement de la dysfonction de la cellule β (440) à travers la modification de la balance cytokines délétères opposées aux cytokines protectrices. Récemment, une étude menée par le laboratoire du Professeur Marc Donath a mis en évidence que l'Interleukine-1β (IL-1β) est responsable d'une diminution de l'expression de *E2f1* dans la cellule β, induisant une diminution d'expression de Kir6.2 et une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, accompagnées d'une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (462). Ainsi, nos résultats, combinés à ceux de la littérature, montrent le rôle potentiellement important de *E2f1* dans la réponse inflammatoire au sein de l'îlot, pouvant contrôler, par ce mécanisme, la fonction de la cellule β. A l'avenir, il serait intéressant d'analyser le rôle de *E2f1* dans la réponse inflammatoire au sein de l'îlots. La composition en macrophage de l'îlot est un facteur important dans la physiologie de la cellule β. Les îlots comportent deux types de macrophages, ceux appelés les « peri-islets macrophages », localisés en périphérie de l'îlot, et les « intra-islets macrophages » localisés entre les différents types de cellules endocrines de l'îlot (463). Ces deux populations de macrophages semblent jouer des rôles importants dans la fonction et le développement de la cellule β (464). Pour tester l'hypothèse d'un lien entre *E2F1* et macrophages de

l'îlot, il serait intéressant de déterminer dans un premier temps la différence de composition de l'îlots de Langerhans en cellules immunes entre des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$. D'un point de vue fonctionnel, il a été démontré que la déplétion en macrophages d'îlots de souris à l'aide du Clodronate induit une amélioration de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (465). Ainsi, il serait utile, dans notre modèle de souris, de tester les effets de cette molécule afin de déterminer si la diminution de la sécrétion d'insuline suite à l'augmentation de l'inflammation observée dans les îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ peut être améliorée en modifiant la composition en macrophage de l'îlot. L'obésité induisant une augmentation de la réponse inflammatoire de l'îlot de Langerhans, ainsi qu'une augmentation de la quantité de macrophages résidants de l'îlot (465), il serait également intéressant de réaliser l'ensemble de ces expériences dans un modèle induit d'obésité chez la souris, par l'utilisation d'un régime riche en graisse, et de déterminer le rôle de E2f1 dans la réponse inflammatoire de l'îlot suite à un stress métabolique.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont également permis de démontrer que le phénotype de gluco-intolérance apparaît entre 8 et 12 semaines de vie. Ces résultats signifient que la perte d'expression de $E2f1$ dans la cellule β , à partir du moment où l'insuline est détectée ($\approx E13,5$), n'entraîne pas de défaut fonctionnel de la cellule β avant 12 semaines. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la mise en place de système de compensation ou d'adaptation des voies de signalisation dans les îlots de souris $E2f1^{\beta-/-}$ dans l'objectif de compenser la diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il serait ainsi intéressant, par la suite, d'analyser d'abord le transcriptome d'îlots de souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ âgées de 4 et de 8 semaines, puis de le comparer au profil d'expression génique après 12 semaines afin de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires se mettant en place progressivement qui pourraient expliquer le défaut fonctionnel de la cellule β et déterminer, ainsi, les voies de signalisation modulées. Ce développement différé de l'hyperglycémie est également retrouvé dans les souris $E2f1^{-/-}$ où ces animaux ne présentent pas de phénotype métabolique, ni de modification de la structure de l'îlot pancréatique avant 16 semaines (417).

Une des limites de notre étude concerne l'utilisation du modèle Rip-Cre (429), modèle induisant une perte d'expression d'E2f1 au cours du développement de la cellule β et avant la mise en place de la prolifération post-natale, mécanisme important pour le développement de l'îlot pancréatique. Ainsi, du fait du rôle important de E2f1 dans les mécanismes de différenciation et de prolifération (bien que la masse de cellules β ne soit pas modulée dans notre modèle), il serait intéressant d'utiliser un modèle de délétion génique de $E2f1$ à l'âge adulte. Pour cela, des souris $E2f1^{LoxP/LoxP}$ seraient croisées avec des souris Mip-Cre^{ERT} (466), puis l'injection de Tamoxifène permettrait l'activation de la Cre-Recombinase et la délétion de $E2f1$ à l'âge adulte. Ainsi, le développement de ce nouveau modèle permettrait de montrer le rôle direct du régulateur du cycle cellulaire, E2f1, dans la fonction et l'identité de la cellule

β mature. A l'inverse, une délétion précoce de *E2f1* dans les progéniteurs pancréatiques, à l'aide de souris Pdx1-Cre ou Ngn3-Cre, serait également très informative. En effet, deux études ont montré le rôle important de la voie E2f1-pRb dans le contrôle de la voie Ngn3 et Pdx-1 (421).

II. Effets de E2f1 dans la morphologie de l'îlot pancréatique

La première étude s'intéressant au rôle de E2f1 dans la cellule β pancréatique avait permis de déterminer le rôle important de ce facteur dans la prolifération post-natale des cellules β . Dans cette étude, les auteurs ont montré que les souris *E2f1*^{-/-} présentent une diminution de la masse du pancréas associée à une diminution de la taille de l'îlot pancréatique à 16 semaines. L'absence de différence dans la morphologie de l'îlot chez les souris *E2f1*^{-/-} jeunes indique que E2f1 ne participe pas ou que sa perte d'expression peut être compensée dans les mécanismes de développement du pancréas. Cela suggère que E2f1 participerait davantage à la prolifération post-natale des cellules β (417) qu'à leur développement. Contrairement aux souris *E2f1*^{-/-}, les souris *E2f1* ^{β -/-} ne présentent pas de diminution du poids du pancréas (données non montrées), ni de la taille des îlots, ou de la masse de cellules β (Figure 29). Ainsi, la prolifération post-natale des cellules β de souris *E2f1* ^{β -/-} ne semble pas être altérée en comparaison aux souris *E2f1*^{-/-}, invalidées globalement. Ces résultats pourraient s'expliquer par la mise en place de différents systèmes de compensation afin d'éviter la réduction de la masse de cellules β . Les résultats de notre séquençage d'ARN ont ainsi montré une augmentation d'expression de *E2f3* dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} (données non montrées). Une étude a montré que la surexpression ectopique de *E2f3* dans des îlots humains et de rat permet d'augmenter la prolifération des cellules β pancréatiques adultes et améliore la tolérance au glucose dans un modèle de souris diabétiques de type 1 (467). De plus, de nombreuses études ont montré le rôle important de E2f1 et E2f3 dans la prolifération cellulaire et que la surexpression de l'une ou de l'autre protéine est suffisante pour induire la répllication cellulaire (468). De plus, des études suggèrent que la perte de fonction de l'un ou de l'autre E2f entraîne une compensation de l'autre (468). Ainsi, la présence d'une masse de cellule β normale en absence de l'expression de *E2f1* dans la cellule β pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression de *E2f3*.

Le régime HFD induit une insulino-résistance (Figure 32, M). Le développement de cet IR conduit à une augmentation de la prolifération de la cellule β afin d'augmenter la sécrétion d'insuline et compenser la perte de sensibilité de l'insuline des différents tissus cibles. La mise sous un régime riche en graisse (HFD) pendant 30 semaines des souris *E2f1* ^{β -/-} a démontré une diminution significative de la masse des cellules β pancréatiques. Ces résultats suggèrent un défaut de la prolifération des cellules β en absence de E2f1 dans des conditions de stress métabolique. Des études du transcriptome d'îlots de souris soumises à un régime riche en graisse ou standard pendant 24 semaines ont montré que l'expression

de *E2f1* est diminuée au cours du temps chez les souris sous régime standard, alors que l'expression de *E2f1* reste significativement plus élevée au cours des 12 premières semaines lors d'un régime riche en graisse, montrant ici que l'aspect prolifératif induit par le régime riche en graisse pourrait intervenir par le maintien d'un niveau constant de l'expression de *E2f1* (469). Des études ont montré que la prolifération des cellules β en cas de régime riche en graisse démarre après 3 jours de régime et est maintenue jusqu'à 10 semaines, afin de pallier l'IR (470), pouvant ainsi expliquer la diminution d'expression de *E2f1* observée 16 semaines après le début du régime riche en graisse. De plus, l'expression de nombreux gènes du cycle cellulaires contrôlés par *E2f1*, tels que les Cyclines A2, B1 et D2, démontre le rôle important de *E2f1* dans l'induction de la prolifération en réponse au développement de l'IR. Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de poser l'hypothèse que la perte d'expression de *E2f1* dans la cellule β pancréatique pourrait empêcher l'augmentation de la prolifération de la cellule β afin de compenser le développement de l'IR. Cependant, notre étude a mis en évidence que 12 semaines après la mise en place du régime riche en graisse, aucune différence dans la tolérance au glucose n'a été observée entre les souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} (alors qu'à 4 et 8 semaines, le phénotype de gluco-intolérance observé sur les souris sous régime standard est présent). Ainsi, il se pourrait que ces souris utilisent d'autres systèmes de compensation de cellules β indépendants de la prolifération dans l'objectif de contrer l'insulino-résistance (néogenèse de cellules β , diminution de l'apoptose, ...). Il serait alors intéressant, à la suite de cette étude, d'analyser le transcriptome de souris *E2f1* ^{β +/+} et *E2f1* ^{β -/-} soumises à un régime standard ou riche en graisse pendant 12 semaines afin de comparer les différences d'expressions de gènes pouvant être impliqués dans l'ensemble des mécanismes de compensation de la cellule β , comme observé au cours du développement de l'insulino-résistance.

L'absence de modification de la masse de cellules β dans les îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} est associée à une augmentation significative de la masse de cellules α avec l'apparition de cellules α au centre de l'îlot pancréatique, normalement localisées en périphérie de l'îlot (13). L'analyse du transcriptome d'îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} a révélé une augmentation significative de marqueurs de cellules α tels que *Arx* (Figure 36, D). Ces résultats suggèrent que les cellules α surnuméraires pourraient provenir d'une transdifférenciation ou d'une dédifférenciation de la cellule β en cellule α . L'utilisation d'un système permettant le lignage cellulaire à travers l'expression de la tomato spécifiquement dans la cellule β nous a permis de mettre en évidence que ces cellules α surnuméraires ne proviennent pas d'une dédifférenciation ou d'une transdifférenciation des cellules β suite à une absence de colocalisation entre la tomato et le glucagon (Figure 37). Ainsi, ces cellules surnuméraires pourraient provenir d'une augmentation de la prolifération de cellules α ou d'une augmentation de la néogénèse de cellules α au cours du développement de l'îlot. L'analyse du transcriptome a montré une diminution de

l'expression du marqueur de cellules β , Nkx6.1 (Log2FC = -0,53, -Log10pvalue =1,54, Figure 36, D), dans les îlots de souris $E2f1^{\beta/-}$. Des études récentes ont mis en évidence le rôle important de Nkx6.1 dans le contrôle direct *via* la chromatine de l'expression du facteur de transcription clé de la cellule α , Arx (471). Nos résultats d'immunoprécipitation de la chromatine ont également révélé que E2f1 est capable de se fixer au promoteur de Nkx6.1 et de contrôler son expression (Figure 51).

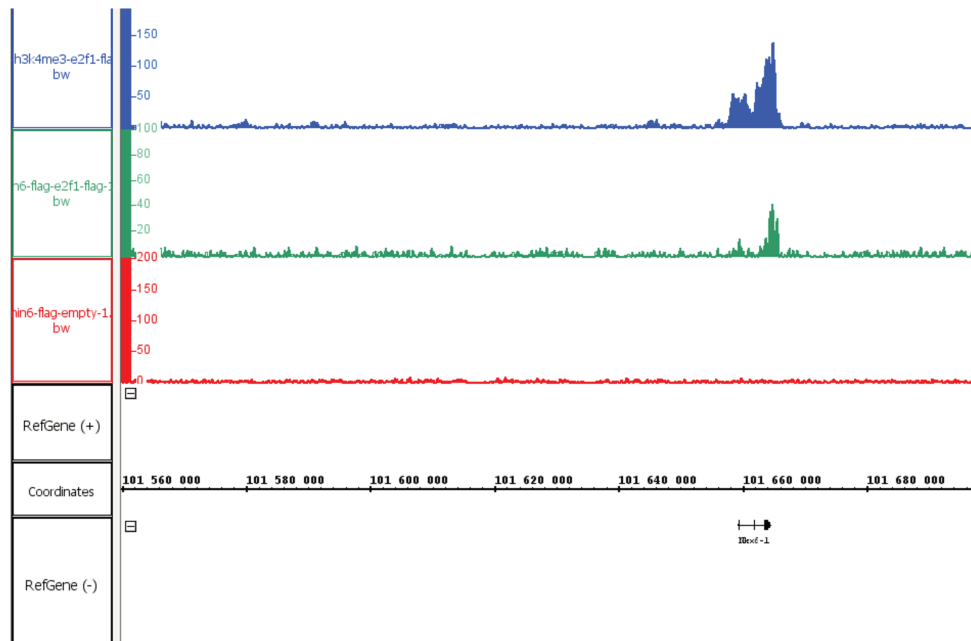


Figure 51 : Dans la cellule Min6, le promoteur de Nkx6.1 est actif (H3K4me3) et est fixé par E2f1.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la perte d'expression de $E2f1$ au cours du développement de la cellule β pourrait entraîner une diminution de l'expression de Nkx6.1, induisant la perte d'un programme identitaire de cellule β et l'activation de l'expression d'Arx, permettant le développement de cellules α surnuméraires. D'autre part, une hypothèse serait basée sur le lien entre inflammation et cellules α . En effet, une étude récente a montré le rôle important de la réponse inflammatoire dans l'augmentation de la masse des cellules α (472) et a déterminé que la production d'IL-6 entraîne une augmentation de la masse de cellules α (473). Nos résultats de transcriptomique des îlots de souris $E2f1^{\beta/-}$ ont montré une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire et, notamment, de la production de cytokines. Ainsi, l'augmentation de la masse de cellules α observée dans les îlots de souris $E2f1^{\beta/-}$ pourrait être expliquée par l'ensemble de ces mécanismes.

De plus, une étude sur des îlots de souris déficientes pour le Glp-1r ($Glp-1r^{-/-}$) a mis en évidence une augmentation de la masse de cellule α au centre de l'îlot, suggérant un rôle potentiel de la voie de signalisation du Glp-1 dans le développement du pancréas endocrine et dans la différenciation des cellules endocrine (445). Cependant, les mécanismes permettant cette modification de structure de

l'îlot chez les souris *Glp-1r^{-/-}* ne sont pas encore connus. Nos résultats ont montré une augmentation du nombre de cellules α au centre de l'îlot, effet semblable à celui observé dans le modèle *Glp-1r^{-/-}*, associée à une diminution d'expression du *Glp-1r*. Ainsi, l'absence de la signalisation du Glp-1 au sein de l'îlot pancréatique, comme je l'ai démontré lors de ma thèse, pourrait être un autre mécanisme permettant d'expliquer l'augmentation de la masse de cellules α dans les îlots de souris *E2f1 ^{β -/-}*.

Pour continuer mon travail de thèse, il me semblerait intéressant de comprendre le rôle et la provenance de ces cellules α surnuméraires. Pour cela, l'analyse du transcriptome spécifique des cellules α à l'aide du séquençage de l'ARN de cellule unique (Single-cell RNA-Seq) d'îlots de souris *E2f1 ^{β -/-}* serait une approche très informative. La comparaison avec le transcriptome de cellules α d'îlots de souris *E2f1 ^{β +/+}* permettrait de déterminer l'existence d'une nouvelle population de cellules α avec un transcriptome de cellule α différent et ainsi déterminer le mécanisme permettant d'expliquer l'apparition de ces nouvelles cellules en absence de *E2f1* dans la cellule β . De plus, nos expériences d'immunofluorescence montrent que l'augmentation de la masse de cellules α provenait de souris âgées de 12 semaines qui présentent un phénotype métabolique de gluco-intolérance. Dans l'objectif de mieux comprendre l'apparition de ces cellules α , l'analyse morphologique d'îlots de souris après la naissance jusqu'à 12 semaines pourrait être réalisée afin de déterminer si ce phénotype s'acquiert au cours du développement pancréatique ou en situation post-natale. De plus, aucune étude physiologique de la cellule α n'a été réalisée sur les îlots de souris *E2f1 ^{β -/-}*. Il serait alors intéressant de déterminer si ces cellules surnuméraires sont fonctionnelles, notamment à l'aide de tests de sécrétion de glucagon sur des îlots isolés ou en mesurant la glucagonémie sur des souris pendant une période de jeûne.

III. Étude de la relation entre la voie E2f1 et celle du Glp-1 dans la cellule β pancréatique

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont également mis en évidence le rôle important de E2f1 dans le contrôle de l'expression du *Glp1r* et dans les mécanismes de sécrétion d'insuline médiée par les analogues du Glp-1. Au cours de ces deux dernières décennies, des efforts considérables ont été faits dans l'objectif de développer des agonistes du Glp-1r afin de traiter le DT2 (297). En effet, les agonistes du Glp-1r améliorent la glycémie chez les patients atteints de DT2 à travers l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'insuline, ainsi que l'augmentation de la prolifération et de la survie de la cellule β (284). Ainsi, cibler la voie de signalisation du Glp-1 pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante. Cependant, il a été rapporté que l'effet incrétine est diminué chez l'Homme lors d'une obésité et d'un DT2 (474, 475). Il me semblait alors intéressant de déterminer les

mécanismes moléculaires permettant d'expliquer la perte d'efficacité de ces traitements à long terme. Certaines études ont montré que l'expression du récepteur au Glp-1 est diminuée au sein de l'îlot lors d'un DT2 et d'une hyperglycémie chronique (476, 477). Une autre étude a également montré que l'exposition chronique des cellules β à une concentration élevée de glucose induisait un défaut de la signalisation du Glp-1 au sein de la cellule β suite à une diminution de l'internalisation à la membrane du Glp-1r, montrant une nouvelle fois l'effet délétère d'une situation d'hyperglycémie chronique sur le développement d'une résistance au Glp-1. Ainsi, déterminer les voies moléculaires permettant le contrôle de l'expression du Glp-1r pourrait être intéressant pour le traitement du DT2. Il est connu que Pax6 (70) et Fxr (Farnesoid X receptor) (478) modulent directement l'expression du Glp-1r à la chromatine. Cibler ces voies pourrait s'avérer efficace pour rétablir l'expression du Glp-1r chez les sujets diabétiques. Dans notre étude, nous montrons que E2f1 est un nouveau régulateur de l'expression du récepteur au Glp-1 dans la cellule β pancréatique (Figure 45, D), et cibler la voie E2f1 dans la cellule β pourrait être une stratégie alternative. Cependant, compte-tenu des effets prolifératifs de E2f1, il faut rester prudent sur les stratégies thérapeutiques visant à moduler l'expression et/ou l'activité des régulateurs du cycle cellulaire. L'équipe de P. Marchetti a démontré que les îlots de patients diabétiques de type 2 présentent une diminution de l'expression de *E2f1* (436). Ainsi, la diminution d'expression du *Glp-1r* observé chez les sujets DT2 pourrait peut-être s'expliquer par la diminution d'expression de *E2f1*.

Une étude précédente avait montré que l'activation de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la cellule β était régulée par le glucose et l'insuline. A travers notre nouvelle étude, nous déterminons un nouveau mécanisme physiologique de l'activation de la voie E2f1-pRb-Cdk, *via* l'activation du Glp-1r par son agoniste (Figure 48). En effet, nos résultats ont mis en évidence que la signalisation du Glp-1 dans la cellule β permet d'augmenter la phosphorylation de pRb et l'activité transcriptionnelle de E2f1. Nos résultats tendent à valider des résultats de l'équipe de Mina Woo (479) qui montrent qu'un traitement de cellules Ins1 avec de l'exendine-4 diminue les niveaux en ARNm et en protéine de pRb et augmente l'expression de E2f1 après 24h de traitement. De plus, cette étude a mis en évidence que la surexpression de pRb, induisant une diminution de l'activité transcriptionnelle de E2f1 dans la cellule β , atténue l'effet de l'exendine-4 dans les mécanismes de prolifération de la cellule β dépendant du Glp-1 (479). Cependant, les effets du Glp-1 dans la fonction de la cellule β n'a pas été mesurée dans cette étude. Nos résultats mettent en évidence à nouveau le rôle important de la voie E2f1-pRb-Cdk4 dans la signalisation du GLp-1 au sein de la cellule β . Une autre étude a montré le rôle important de Cdk4 dans la prolifération et la différenciation de cellules progénitrices pancréatiques adultes (480). Ainsi, la surexpression ectopique de la Cycline D, de Cdk4 et du Glp-1 dans des souris dont un diabète de type 1 est induit à l'aide de la Streptozotocine (molécule induisant la destruction des cellules β)

favorise la régénération de cellules β , permettant aux souris DT1 de retrouver une glycémie physiologique et de contrecarrer ainsi la maladie (480). De plus, il a été reporté dans la littérature que l'exendine-4 stimule l'expression en ARNm et protéique de la cycline D1 (CcnD1) (481) à travers la production d'AMPc, et de la cycline A2 (CcnA2) (482) à travers les effets de Pdx1, permettant ainsi la stimulation de la prolifération de la cellule β . Étant donné que la voie E2f1-pRb-Cdk4 module positivement l'expression de CcnD1 et CcnA2, les résultats obtenus au cours de ma thèse suggèrent que la progression du cycle cellulaire de la cellule β lors d'un traitement avec un agoniste du Glp-1r pourrait être associé à une augmentation de l'expression ou de l'activité transcriptionnelle de la voie E2f1-pRb-Cdk4, comme observé dans nos résultats (Figure 48). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que les effets prolifératifs du Glp-1 sur la cellule β pancréatique seraient médiés par la voie E2f1-pRb-Cdk4.

La limitation de ces études repose néanmoins sur le fait que les données ont été obtenues avec des temps de traitement court à l'exendine-4 (de 30 minutes à 4h). Les mécanismes de prolifération cellulaires sont des mécanismes qui peuvent se mettre en place rapidement chez la souris, néanmoins, pour induire une augmentation significative de la masse de cellules β , il faudrait réaliser ces expériences sur des temps plus longs (au minimum 15 jours). Ainsi, pour déterminer le rôle de E2f1 dans la médiation des effets prolifératifs du Glp-1 sur la cellule β pancréatique, il serait intéressant de traiter *in vivo* des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$ pendant 15 jours et de comparer ainsi la masse, le taux de prolifération (à l'aide du Ki-67 ou du BrDU) et d'apoptose des îlots des souris $E2f1^{\beta+/+}$ et $E2f1^{\beta-/-}$. De plus, il serait également intéressant d'analyser l'ARNm de ces îlots en réalisant son séquençage dans l'objectif de déterminer les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer les effets bénéfiques du Glp-1 dépendant de l'expression de E2f1 et de l'activation de la voie E2f1-pRb-Cdk4.

Une autre limitation dans notre étude a été de déterminer les effets transcriptionnels de E2f1 et le contrôle de la phosphorylation de pRb dans la cellule Min6, modèle d'insulinome de souris. Cette cellule a été établie à partir d'une tumeur pancréatique développée dans une souris transgénique possédant le gène codant l'antigène SV40 Large T (Simian Vacuolating Virus 40 TAg) sous le contrôle du promoteur à l'insuline (441). La protéine SV40 Large T est une oncoprotéine dérivée du polyomavirus SV40 qui se fixe à la protéine pRb, empêchant sa fixation au complexe E2f1-Dp1 et induisant une activité transcriptionnelle continue de E2f1. Ainsi, l'utilisation du modèle Min6 dans l'étude de l'activation de la voie E2f1-pRb-Cdk4 n'est pas le modèle idéal. Cependant, nos résultats, à l'aide de la technologie Pamgene, ont montré que le traitement d'îlots de Langerhans de souris, cellules primaires non transformées, avec de l'exendine-4 augmente la phosphorylation de pRb, résultats par la suite validés dans la lignée Min6 (Figure 47). Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que, malgré l'utilisation de cette lignée cellulaire, l'exendine-4 induit la phosphorylation de

pRb et l'activité transcriptionnelle de E2f1. Cependant, pour la suite de cette étude, il serait intéressant de valider ces résultats également sur des îlots de souris traités à l'exendine-4 ou la lignée humaine développée par le Dr Raphaël Scharfmann, EndoCBH-1 (483).

Conclusion générale de la thèse

Cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau rôle de E2f1 dans le métabolisme et l'homéostasie du glucose.

La première partie de cette étude s'est intéressée à comprendre le rôle de E2f1 dans la fonction et l'identité de la cellule β pancréatique à l'aide d'un modèle de souris déficientes pour *E2f1* dans la cellule β . Nos résultats ont permis de démontrer que E2f1 est nécessaire pour maintenir le mécanisme de sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ce contrôle de la sécrétion se fait par le contrôle transcriptionnel de gènes impliqués dans les processus d'exocytose et de sécrétion de la cellule β , mécanismes clés de la sécrétion d'insuline. De plus, la délétion génique de *E2f1* induit l'augmentation de gènes impliqués dans l'inflammation, processus pouvant s'avérer délétère pour la sécrétion d'insuline. Par la suite, nos résultats ont mis en évidence que la délétion de E2f1 dans la cellule β entraîne une augmentation de la masse de cellules α , sans modification de la masse de cellules β .

Dans un second temps, les résultats de séquençage de l'ARN d'îlots de souris *E2f1* ^{β -/-} ont démontré une diminution d'expression du récepteur au Glp-1. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence que E2f1 était nécessaire pour contrôler l'expression du récepteur au Glp-1 *via* un contrôle direct à la chromatine, et que la perte d'expression de E2f1 induit une perte des effets potentialisateurs du Glp-1 sur la sécrétion d'insuline par la cellule β .

Pour finir, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme physiologique permettant d'activer la voie E2f1-pRb-Cdk4. Nos résultats ont montré que le Glp-1 est capable de phosphoryler la protéine pRb, induisant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de E2f1 et l'induction de l'expression de ses gènes cibles dans la cellule β .

De par ses rôles bénéfiques dans la cellule β , il serait intéressant de cibler la voie E2f1 pour restaurer la sécrétion d'insuline chez les patients diabétiques. Cependant, compte tenu des rôles de E2f1 dans la prolifération et le développement de nombreux cancers, cibler la voie E2f1 s'avère être un challenge difficile à relever. C'est pourquoi identifier l'ensemble des mécanismes permettant de mieux comprendre la perte de sécrétion d'insuline et d'identité au cours du DT2 est primordiale dans le développement de futurs traitements thérapeutiques.

Références bibliographiques

1. Suda K, Nobukawa B, Takase M, Hayashi T. Pancreatic segmentation on an embryological and anatomical basis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2006;13(2):146-8.
2. Dolensek J, Rupnik MS, Stozer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1):e1024405.
3. Ellis C, Ramzy A, Kieffer TJ. Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(10):612-28.
4. Meldolesi J. Membranes and membrane surfaces. Dynamics of cytoplasmic membranes in pancreatic acinar cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1974;268(891):39-53.
5. Iwatsuki N, Petersen OH. Electrical coupling and uncoupling of exocrine acinar cells. *J Cell Biol.* 1978;79(2 Pt 1):533-45.
6. Wasle B, Edwardson JM. The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cell Signal.* 2002;14(3):191-7.
7. Githens S. The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1988;7(4):486-506.
8. Reichert M, Rustgi AK. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4572-8.
9. Grapin-Botton A. Ductal cells of the pancreas. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(3):504-10.
10. Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, et al. Coupling modes and stoichiometry of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by slc26a3 and slc26a6. *J Gen Physiol.* 2006;127(5):511-24.
11. Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22855-61.
12. Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med.* 2018;7(3).
13. Kim A, Miller K, Jo J, Kilimnik G, Wojcik P, Hara M. Islet architecture: A comparative study. *Islets.* 2009;1(2):129-36.
14. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(9):1087-97.
15. Wang X, Misawa R, Zielinski MC, Cowen P, Jo J, Periwal V, et al. Regional differences in islet distribution in the human pancreas--preferential beta-cell loss in the head region in patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2013;8(6):e67454.
16. Rorsman P, Ashcroft FM. Pancreatic beta-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev.* 2018;98(1):117-214.
17. El-Gohary Y, Sims-Lucas S, Lath N, Tulachan S, Guo P, Xiao X, et al. Three-dimensional analysis of the islet vasculature. *Anat Rec (Hoboken).* 2012;295(9):1473-81.
18. Konstantinova I, Lammert E. Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays.* 2004;26(10):1069-75.
19. Thorens B. Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16 Suppl 1:87-95.
20. Tam PP, Behringer RR. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev.* 1997;68(1-2):3-25.
21. Larsen HL, Grapin-Botton A. The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;66:51-68.
22. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* 1993;12(11):4251-9.
23. Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development.* 2000;127(22):4905-13.
24. Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J, Madsen OD, Serup P, Hecksher-Sorensen J. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev.* 2007;28(6):685-705.

25. Johansson KA, Grapin-Botton A. Development and diseases of the pancreas. *Clin Genet*. 2002;62(1):14-23.
26. Kesavan G, Sand FW, Greiner TU, Johansson JK, Kobberup S, Wu X, et al. Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell*. 2009;139(4):791-801.
27. Pan FC, Bankaitis ED, Boyer D, Xu X, Van de Castele M, Magnuson MA, et al. Spatiotemporal patterns of multipotentiality in Ptf1a-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration. *Development*. 2013;140(4):751-64.
28. Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, et al. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*. 1995;121(1):11-8.
29. Brissova M, Shiota M, Nicholson WE, Gannon M, Knobel SM, Piston DW, et al. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*. 2002;277(13):11225-32.
30. Denes J. [Clinical experience with "Elmex" products]. *Fogorv Sz*. 1976;69(8):343-5.
31. Lottmann H, Vanselow J, Hessabi B, Walther R. The Tet-On system in transgenic mice: inhibition of the mouse pdx-1 gene activity by antisense RNA expression in pancreatic beta-cells. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(5-6):321-8.
32. Boone LR, Brown A. Variants of the HR strain of Sindbis virus lethal for mice. *J Gen Virol*. 1976;31(2):261-3.
33. Krapp A, Knofler M, Ledermann B, Burki K, Berney C, Zoerkler N, et al. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev*. 1998;12(23):3752-63.
34. Afelik S, Chen Y, Pieler T. Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue. *Genes Dev*. 2006;20(11):1441-6.
35. Sakikubo M, Furuyama K, Horiguchi M, Hosokawa S, Aoyama Y, Tsuboi K, et al. Ptf1a inactivation in adult pancreatic acinar cells causes apoptosis through activation of the endoplasmic reticulum stress pathway. *Sci Rep*. 2018;8(1):15812.
36. Shih HP, Seymour PA, Patel NA, Xie R, Wang A, Liu PP, et al. A Gene Regulatory Network Cooperatively Controlled by Pdx1 and Sox9 Governs Lineage Allocation of Foregut Progenitor Cells. *Cell Rep*. 2015;13(2):326-36.
37. Seymour PA, Freude KK, Tran MN, Mayes EE, Jensen J, Kist R, et al. SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(6):1865-70.
38. Seymour PA, Freude KK, Dubois CL, Shih HP, Patel NA, Sander M. A dosage-dependent requirement for Sox9 in pancreatic endocrine cell formation. *Dev Biol*. 2008;323(1):19-30.
39. Manfroid I, Ghaye A, Naye F, Detry N, Palm S, Pan L, et al. Zebrafish sox9b is crucial for hepatopancreatic duct development and pancreatic endocrine cell regeneration. *Dev Biol*. 2012;366(2):268-78.
40. Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade. *Dev Biol*. 2003;258(1):105-16.
41. Vanhorenbeeck V, Jenny M, Cornut JF, Gradwohl G, Lemaigre FP, Rousseau GG, et al. Role of the Onecut transcription factors in pancreas morphogenesis and in pancreatic and enteric endocrine differentiation. *Dev Biol*. 2007;305(2):685-94.
42. Zhang H, Ables ET, Pope CF, Washington MK, Hipkens S, Means AL, et al. Multiple, temporal-specific roles for HNF6 in pancreatic endocrine and ductal differentiation. *Mech Dev*. 2009;126(11-12):958-73.
43. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1607-11.
44. Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, et al. Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J*. 2002;21(23):6338-47.

45. Wang S, Jensen JN, Seymour PA, Hsu W, Dor Y, Sander M, et al. Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9715-20.
46. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, et al. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature*. 1999;400(6747):877-81.
47. Johansson KA, Dursun U, Jordan N, Gu G, Beermann F, Gradwohl G, et al. Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell*. 2007;12(3):457-65.
48. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 1997;386(6623):399-402.
49. Wang J, Elghazi L, Parker SE, Kizilocak H, Asano M, Sussel L, et al. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol*. 2004;266(1):178-89.
50. Collombat P, Mansouri A. [Pax4 transdifferentiates glucagon-secreting alpha cells to insulin-secreting beta endocrine pancreatic cells]. *Med Sci (Paris)*. 2009;25(8-9):763-5.
51. Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, et al. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn*. 2008;237(1):51-61.
52. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*. 2009;138(3):449-62.
53. Kanatsuka A, Tokuyama Y, Nozaki O, Matsui K, Egashira T. Beta-cell dysfunction in late-onset diabetic subjects carrying homozygous mutation in transcription factors NeuroD1 and Pax4. *Metabolism*. 2002;51(9):1161-5.
54. Tokuyama Y, Matsui K, Ishizuka T, Egashira T, Kanatsuka A. The Arg121Trp variant in PAX4 gene is associated with beta-cell dysfunction in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006;55(2):213-6.
55. Holm P, Rydlander B, Luthman H, Kockum I, European Consortium for IGS. Interaction and association analysis of a type 1 diabetes susceptibility locus on chromosome 5q11-q13 and the 7q32 chromosomal region in Scandinavian families. *Diabetes*. 2004;53(6):1584-91.
56. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):240.
57. Matsuoka TA, Artner I, Henderson E, Means A, Sander M, Stein R. The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(9):2930-3.
58. Zhang C, Moriguchi T, Kajihara M, Esaki R, Harada A, Shimohata H, et al. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol*. 2005;25(12):4969-76.
59. Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I, Li WC, Toschi E, Jermendy A, et al. Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*. 2011;54(3):583-93.
60. Hang Y, Yamamoto T, Benninger RK, Brissova M, Guo M, Bush W, et al. The MafA transcription factor becomes essential to islet beta-cells soon after birth. *Diabetes*. 2014;63(6):1994-2005.
61. Eto K, Nishimura W, Oishi H, Udagawa H, Kawaguchi M, Hiramoto M, et al. MafA is required for postnatal proliferation of pancreatic beta-cells. *PLoS One*. 2014;9(8):e104184.
62. Zhou Q, Law AC, Rajagopal J, Anderson WJ, Gray PA, Melton DA. A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell*. 2007;13(1):103-14.
63. Oster A, Jensen J, Serup P, Galante P, Madsen OD, Larsson LI. Rat endocrine pancreatic development in relation to two homeobox gene products (Pdx-1 and Nkx 6.1). *J Histochem Cytochem*. 1998;46(6):707-15.
64. Nelson SB, Schaffer AE, Sander M. The transcription factors Nkx6.1 and Nkx6.2 possess equivalent activities in promoting beta-cell fate specification in Pdx1+ pancreatic progenitor cells. *Development*. 2007;134(13):2491-500.

65. Taylor BL, Liu FF, Sander M. Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. *Cell Rep.* 2013;4(6):1262-75.
66. Gauthier BR, Gosmain Y, Mamin A, Philippe J. The beta-cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6. *Biochem J.* 2007;403(3):593-601.
67. Talchai C, Xuan S, Lin HV, Sussel L, Accili D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell.* 2012;150(6):1223-34.
68. Gu C, Stein GH, Pan N, Goebbels S, Hornberg H, Nave KA, et al. Pancreatic beta cells require NeuroD to achieve and maintain functional maturity. *Cell Metab.* 2010;11(4):298-310.
69. Swisa A, Avrahami D, Eden N, Zhang J, Feleke E, Dahan T, et al. PAX6 maintains beta cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *J Clin Invest.* 2017;127(1):230-43.
70. Gosmain Y, Katz LS, Masson MH, Cheyssac C, Poisson C, Philippe J. Pax6 is crucial for beta-cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion. *Mol Endocrinol.* 2012;26(4):696-709.
71. Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, et al. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev.* 2003;17(20):2591-603.
72. Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Krull J, Berger J, Riedel D, Herrera PL, et al. Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *J Clin Invest.* 2007;117(4):961-70.
73. Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaut C, Vieira A, Ben-Othman N, et al. The inactivation of Arx in pancreatic alpha-cells triggers their neogenesis and conversion into functional beta-like cells. *PLoS Genet.* 2013;9(10):e1003934.
74. Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, et al. The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development.* 2005;132(13):2969-80.
75. Artner I, Le Lay J, Hang Y, Elghazi L, Schisler JC, Henderson E, et al. MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes.* 2006;55(2):297-304.
76. Artner I, Hang Y, Mazur M, Yamamoto T, Guo M, Lindner J, et al. MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes.* 2010;59(10):2530-9.
77. Artner I, Blanchi B, Raum JC, Guo M, Kaneko T, Cordes S, et al. MafB is required for islet beta cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):3853-8.
78. Conrad E, Dai C, Spaeth J, Guo M, Cyphert HA, Scoville D, et al. The MAFB transcription factor impacts islet alpha-cell function in rodents and represents a unique signature of primate islet beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;310(1):E91-E102.
79. Katoh MC, Jung Y, Ugboma CM, Shimbo M, Kuno A, Basha WA, et al. MafB Is Critical for Glucagon Production and Secretion in Mouse Pancreatic alpha Cells In Vivo. *Mol Cell Biol.* 2018;38(8).
80. Wu Y, Zhang X, Wang J, Jin G, Zhang X. Research progress of the transcription factor Brn4 (Review). *Mol Med Rep.* 2021;23(3).
81. Heller RS, Stoffers DA, Liu A, Schedl A, Crenshaw EB, 3rd, Madsen OD, et al. The role of Brn4/Pou3f4 and Pax6 in forming the pancreatic glucagon cell identity. *Dev Biol.* 2004;268(1):123-34.
82. Hussain MA, Lee J, Miller CP, Habener JF. POU domain transcription factor brain 4 confers pancreatic alpha-cell-specific expression of the proglucagon gene through interaction with a novel proximal promoter G1 element. *Mol Cell Biol.* 1997;17(12):7186-94.
83. Hussain MA, Miller CP, Habener JF. Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *J Biol Chem.* 2002;277(18):16028-32.
84. Sutherland EW, De Duve C. Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *J Biol Chem.* 1948;175(2):663-74.
85. Wendt A, Eliasson L. Pancreatic alpha-cells - The unsung heroes in islet function. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;103:41-50.

86. Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC. Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the intraislet insulin hypothesis. *Diabetes*. 2006;55(4):1051-6.
87. Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L, Habener JF. Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing. *J Biol Chem*. 1986;261(25):11880-9.
88. Rouille Y, Martin S, Steiner DF. Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem*. 1995;270(44):26488-96.
89. Heimberg H, De Vos A, Pipeleers D, Thorens B, Schuit F. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem*. 1995;270(15):8971-5.
90. Rix I, Nexoe-Larsen C, Bergmann NC, Lund A, Knop FK. Glucagon Physiology. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
91. Kaneko K, Shirotani T, Araki E, Matsumoto K, Taguchi T, Motoshima H, et al. Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999;44(2):83-92.
92. Gromada J, Hoy M, Buschard K, Salehi A, Rorsman P. Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules. *J Physiol*. 2001;535(Pt 2):519-32.
93. Xu E, Kumar M, Zhang Y, Ju W, Obata T, Zhang N, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab*. 2006;3(1):47-58.
94. Kuhara T, Ikeda S, Ohneda A, Sasaki Y. Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of GH, glucagon, and insulin in sheep. *Am J Physiol*. 1991;260(1 Pt 1):E21-6.
95. Andrews SS, Lopez SA, Blackard WG. Effect of lipids on glucagon secretion in man. *Metabolism*. 1975;24(1):35-44.
96. Olofsson CS, Salehi A, Gopel SO, Holm C, Rorsman P. Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium. *Diabetes*. 2004;53(11):2836-43.
97. Gao R, Yang T, Zhang Q. delta-Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. *Biology (Basel)*. 2021;10(2).
98. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. 2000;141(1):111-7.
99. Omar-Hmeadi M, Lund PE, Gandasi NR, Tengholm A, Barg S. Paracrine control of alpha-cell glucagon exocytosis is compromised in human type-2 diabetes. *Nat Commun*. 2020;11(1):1896.
100. Grube D, Bohn R. The microanatomy of human islets of Langerhans, with special reference to somatostatin (D-) cells. *Arch Histol Jpn*. 1983;46(3):327-53.
101. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J Histochem Cytochem*. 2015;63(8):575-91.
102. Brakch N, Galanopoulou AS, Patel YC, Boileau G, Seidah NG. Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett*. 1995;362(2):143-6.
103. Francis BH, Baskin DG, Saunders DR, Ensink JW. Distribution of somatostatin-14 and somatostatin-28 gastrointestinal-pancreatic cells of rats and humans. *Gastroenterology*. 1990;99(5):1283-91.
104. Gopel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P. Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol*. 2000;528(Pt 3):497-507.
105. Ekblad E, Sundler F. Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY. *Peptides*. 2002;23(2):251-61.

106. Holzer P, Reichmann F, Farzi A. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut-brain axis. *Neuropeptides*. 2012;46(6):261-74.
107. McGowan BM, Bloom SR. Peptide YY and appetite control. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(6):583-8.
108. Weir GC, Samols E, Loo S, Patel YC, Gabbay KH. Somatostatin and pancreatic polypeptide secretion: effects of glucagon, insulin, and arginine. *Diabetes*. 1979;28(1):35-40.
109. Aragon F, Karaca M, Novials A, Maldonado R, Maechler P, Rubi B. Pancreatic polypeptide regulates glucagon release through PPYR1 receptors expressed in mouse and human alpha-cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(2):343-51.
110. Kim W, Fiori JL, Shin YK, Okun E, Kim JS, Rapp PR, et al. Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion. *FEBS Lett*. 2014;588(17):3233-9.
111. Sakata N, Yoshimatsu G, Kodama S. Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8).
112. Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):63-9.
113. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656-60.
114. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000;407(6806):908-13.
115. Granata R, Baragli A, Settanni F, Scarlatti F, Ghigo E. Unraveling the role of the ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas. *J Mol Endocrinol*. 2010;45(3):107-18.
116. Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(1):124-9.
117. Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, et al. Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept*. 2005;126(1-2):67-71.
118. Dezaki K, Kakei M, Yada T. Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*. 2007;56(9):2319-27.
119. Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(2):701-4.
120. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, et al. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab*. 2016;5(7):449-58.
121. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, et al. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic beta-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signal-regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signaling. *Endocrinology*. 2007;148(2):512-29.
122. Marchetti P, Bugliani M, De Tata V, Suleiman M, Marselli L. Pancreatic Beta Cell Identity in Humans and the Role of Type 2 Diabetes. *Front Cell Dev Biol*. 2017;5:55.
123. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Heinrikson RL, et al. Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(3):1260-4.
124. Davidson HW, Peshavaria M, Hutton JC. Proteolytic conversion of proinsulin into insulin. Identification of a Ca²⁺-dependent acidic endopeptidase in isolated insulin-secretory granules. *Biochem J*. 1987;246(2):279-86.
125. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1):25-53.
126. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. 1995;96(5):2489-95.

127. Orci L, Ravazzola M, Baetens D, Inman L, Amherdt M, Peterson RG, et al. Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(24):9953-7.
128. McCulloch LJ, van de Bunt M, Braun M, Frayn KN, Clark A, Gloyn AL. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol Genet Metab*. 2011;104(4):648-53.
129. Jitrapakdee S, Wutthisathapornchai A, Wallace JC, MacDonald MJ. Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia*. 2010;53(6):1019-32.
130. Ashcroft FM. K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 2):243-6.
131. Mikhailov MV, Campbell JD, de Wet H, Shimomura K, Zadek B, Collins RF, et al. 3-D structural and functional characterization of the purified KATP channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J*. 2005;24(23):4166-75.
132. Jahn R, Fasshauer D. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*. 2012;490(7419):201-7.
133. Hamilton JA, Kamp F. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes*. 1999;48(12):2255-69.
134. Berne C. The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets. The biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids. *Biochem J*. 1975;152(3):667-73.
135. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes*. 2006;55 Suppl 2:S16-23.
136. Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, et al. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. 2003;422(6928):173-6.
137. Newsholme P, Gaudel C, McClenaghan NH. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:91-114.
138. Levine R, Goldstein M, et al. The action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomized dogs. *J Biol Chem*. 1949;179(2):985.
139. Petruzzelli LM, Ganguly S, Smith CJ, Cobb MH, Rubin CS, Rosen OM. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(22):6792-6.
140. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM, Dull TJ, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 1985;313(6005):756-61.
141. Pomytkin I, Costa-Nunes JP, Kasatkin V, Veniaminova E, Demchenko A, Lyundup A, et al. Insulin receptor in the brain: Mechanisms of activation and the role in the CNS pathology and treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(9):763-74.
142. Han S, Liang CP, DeVries-Seimon T, Ranalletta M, Welch CL, Collins-Fletcher K, et al. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions. *Cell Metab*. 2006;3(4):257-66.
143. Xu GG, Rothenberg PL. Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes*. 1998;47(8):1243-52.
144. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):117-23.
145. De Meyts P. The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
146. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(1).
147. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(1):31-44.
148. Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(6):383-96.

149. Vazirani RP, Verma A, Sadacca LA, Buckman MS, Picatoste B, Beg M, et al. Disruption of Adipose Rab10-Dependent Insulin Signaling Causes Hepatic Insulin Resistance. *Diabetes*. 2016;65(6):1577-89.
150. Lin HV, Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab*. 2011;14(1):9-19.
151. Owen JL, Zhang Y, Bae SH, Farooqi MS, Liang G, Hammer RE, et al. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16184-9.
152. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;157:107843.
153. Long B, Lentz S, Koyfman A, Gottlieb M. Euglycemic diabetic ketoacidosis: Etiologies, evaluation, and management. *Am J Emerg Med*. 2021;44:157-60.
154. Avitabile NA, Banka A, Fonseca VA. Glucose control and cardiovascular outcomes in individuals with diabetes mellitus: lessons learned from the megatrials. *Heart Fail Clin*. 2012;8(4):513-22.
155. Stewart JM, Coassin M, Schwartz DM. Diabetic Retinopathy. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
156. Varghese RT, Jialal I. Diabetic Nephropathy. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
157. Murphy-Lavoie HM, Ramsey A, Nguyen M, Singh S. Diabetic Foot Infections. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
158. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986;314(21):1360-8.
159. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. *BMC Public Health*. 2015;15:255.
160. Zhao LP, Alshiekh S, Zhao M, Carlsson A, Larsson HE, Forsander G, et al. Next-Generation Sequencing Reveals That HLA-DRB3, -DRB4, and -DRB5 May Be Associated With Islet Autoantibodies and Risk for Childhood Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(3):710-8.
161. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med*. 2008;359(26):2849-50.
162. Pociot F, Lernmark A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2331-9.
163. Hyoty H. Viruses in type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2016;17 Suppl 22:56-64.
164. Grossman ES, Hargreaves JA. Variable cemento-enamel junction in one person. *J Prosthet Dent*. 1991;65(1):93-7.
165. Verduci E, Mameli C, Amatruda M, Petitti A, Vizzuso S, El Assadi F, et al. Early Nutrition and Risk of Type 1 Diabetes: The Role of Gut Microbiota. *Front Nutr*. 2020;7:612377.
166. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. 2019;12:1179551419844521.
167. Bergenstal RM, Tamborlane WV, Ahmann A, Buse JB, Dailey G, Davis SN, et al. Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2010;363(4):311-20.
168. Bekiari E, Kitsios K, Thabit H, Tauschmann M, Athanasiadou E, Karagiannis T, et al. Artificial pancreas treatment for outpatients with type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;361:k1310.
169. Feutren G, Papoz L, Assan R, Vialettes B, Karsenty G, Vexiau P, et al. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet*. 1986;2(8499):119-24.
170. Vantyghem MC, de Koning EJP, Pattou F, Rickels MR. Advances in beta-cell replacement therapy for the treatment of type 1 diabetes. *Lancet*. 2019;394(10205):1274-85.
171. Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA, Takita M, Itoh T, Levy MF. Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation. *Am J Transplant*. 2014;14(2):428-37.

172. Nair GG, Liu JS, Russ HA, Tran S, Saxton MS, Chen R, et al. Recapitulating endocrine cell clustering in culture promotes maturation of human stem-cell-derived beta cells. *Nat Cell Biol.* 2019;21(2):263-74.
173. Pan G, Mu Y, Hou L, Liu J. Examining the therapeutic potential of various stem cell sources for differentiation into insulin-producing cells to treat diabetes. *Ann Endocrinol (Paris).* 2019;80(1):47-53.
174. Vazin T, Freed WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. *Restor Neurol Neurosci.* 2010;28(4):589-603.
175. Hrvatin S, O'Donnell CW, Deng F, Millman JR, Pagliuca FW, Dilorio P, et al. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(8):3038-43.
176. Lemper M, Leuckx G, Heremans Y, German MS, Heimberg H, Bouwens L, et al. Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to beta-like cells. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1117-30.
177. Ben-Othman N, Vieira A, Courtney M, Record F, Gjernes E, Avolio F, et al. Long-Term GABA Administration Induces Alpha Cell-Mediated Beta-like Cell Neogenesis. *Cell.* 2017;168(1-2):73-85 e11.
178. Li J, Casteels T, Frogne T, Ingvorsen C, Honore C, Courtney M, et al. Artemisinins Target GABAA Receptor Signaling and Impair alpha Cell Identity. *Cell.* 2017;168(1-2):86-100 e15.
179. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J.* 2012;27(4):269-73.
180. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15019.
181. Gerstein HC, Santaguida P, Raina P, Morrison KM, Balion C, Hunt D, et al. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;78(3):305-12.
182. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007;445(7130):881-5.
183. Schellenberg ES, Dryden DM, Vandermeer B, Ha C, Korownyk C. Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2013;159(8):543-51.
184. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care.* 1999;22(2):233-40.
185. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia.* 2019;62(1):3-16.
186. Alejandro EU, Gregg B, Blandino-Rosano M, Cras-Meneur C, Bernal-Mizrachi E. Natural history of beta-cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol Aspects Med.* 2015;42:19-41.
187. Taylor SI, Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Cama A, McKeon C. Mutations in insulin-receptor gene in insulin-resistant patients. *Diabetes Care.* 1990;13(3):257-79.
188. Brown AE, Walker M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiol Rep.* 2016;18(8):75.
189. Knowles JW, Xie W, Zhang Z, Chennamsetty I, Assimes TL, Paananen J, et al. Identification and validation of N-acetyltransferase 2 as an insulin sensitivity gene. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1739-51.
190. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet.* 2009;41(10):1110-5.
191. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia.* 2012;55(10):2565-82.
192. Hiratani K, Haruta T, Tani A, Kawahara J, Usui I, Kobayashi M. Roles of mTOR and JNK in serine phosphorylation, translocation, and degradation of IRS-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;335(3):836-42.
193. Lara-Castro C, Garvey WT. Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(4):841-56.

194. Krssak M, Falk Petersen K, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM, Rothman DL, et al. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia*. 1999;42(1):113-6.
195. Snel M, Jonker JT, Schoones J, Lamb H, de Roos A, Pijl H, et al. Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:983814.
196. Dong XC, Copps KD, Guo S, Li Y, Kollipara R, DePinho RA, et al. Inactivation of hepatic Foxo1 by insulin signaling is required for adaptive nutrient homeostasis and endocrine growth regulation. *Cell Metab*. 2008;8(1):65-76.
197. Carreau S. Human Sertoli cells produce inhibin in vitro: an additional marker to assess the seminiferous epithelium development. *Hum Reprod*. 1995;10(8):1947-9.
198. Tang Z, Zhang W, Wan C, Xu G, Nie X, Zhu X, et al. TRAM1 protect HepG2 cells from palmitate induced insulin resistance through ER stress-JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;457(4):578-84.
199. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
200. Duncan IJ. Designing environments for animals--not for public perceptions. *Br Vet J*. 1992;148(6):475-7.
201. Romeo GR, Lee J, Shoelson SE. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1771-6.
202. de Alvaro C, Teruel T, Hernandez R, Lorenzo M. Tumor necrosis factor α produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor κ B kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17070-8.
203. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11(2):191-8.
204. Uysal KT, Wiesbrock SM, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology*. 1998;139(12):4832-8.
205. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15(8):914-20.
206. Guzik TJ, Skiba DS, Touyz RM, Harrison DG. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. *Cardiovasc Res*. 2017;113(9):1009-23.
207. Sachdeva MM, Stoffers DA. Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion. *Mol Endocrinol*. 2009;23(6):747-58.
208. Hull RL, Kodama K, Utschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia*. 2005;48(7):1350-8.
209. Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*. 1997;88(4):561-72.
210. Duquenne M, Folgueira C, Bourouh C, Millet M, Silva A, Clasadonte J, et al. Leptin brain entry via a tanycytic LepR-EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function. *Nat Metab*. 2021.
211. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes*. 1989;38(1):49-53.
212. Beith JL, Alejandro EU, Johnson JD. Insulin stimulates primary beta-cell proliferation via Raf-1 kinase. *Endocrinology*. 2008;149(5):2251-60.
213. Miyawaki K, Inoue H, Keshavarz P, Mizuta K, Sato A, Sakamoto Y, et al. Transgenic expression of a mutated cyclin-dependent kinase 4 (CDK4/R24C) in pancreatic beta-cells prevents progression of diabetes in db/db mice. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;82(1):33-41.
214. Cozar-Castellano I, Takane KK, Bottino R, Balamurugan AN, Stewart AF. Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes*. 2004;53(1):149-59.

215. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10 Suppl 4:32-42.
216. Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, Rizza RA, Butler PC. beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging. *Diabetes Care*. 2013;36(1):111-7.
217. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(1):102-10.
218. Mezza T, Muscogiuri G, Sorice GP, Clemente G, Hu J, Pontecorvi A, et al. Insulin resistance alters islet morphology in nondiabetic humans. *Diabetes*. 2014;63(3):994-1007.
219. Yoneda S, Uno S, Iwahashi H, Fujita Y, Yoshikawa A, Kozawa J, et al. Predominance of beta-cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(5):2053-61.
220. Thorel F, Nepote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature*. 2010;464(7292):1149-54.
221. Baeyens L, Bouwens L. Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes Metab*. 2008;10 Suppl 4:170-8.
222. Mezza T, Sorice GP, Conte C, Sun VA, Cefalo CM, Moffa S, et al. beta-Cell Glucose Sensitivity Is Linked to Insulin/Glucagon Bihormonal Cells in Nondiabetic Humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(2):470-5.
223. van der Meulen T, Mawla AM, DiGruccio MR, Adams MW, Nies V, Dolleman S, et al. Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets. *Cell Metab*. 2017;25(4):911-26 e6.
224. Turrel C, Bailbe D, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes*. 2001;50(7):1562-70.
225. Lee YS, Lee C, Choung JS, Jung HS, Jun HS. Glucagon-Like Peptide 1 Increases beta-Cell Regeneration by Promoting alpha- to beta-Cell Transdifferentiation. *Diabetes*. 2018;67(12):2601-14.
226. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S154-9.
227. Hosokawa H, Hosokawa YA, Leahy JL. Upregulated hexokinase activity in isolated islets from diabetic 90% pancreatectomized rats. *Diabetes*. 1995;44(11):1328-33.
228. Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem*. 2002;277(42):39163-8.
229. Zhao S, Mugabo Y, Iglesias J, Xie L, Delghingaro-Augusto V, Lussier R, et al. alpha/beta-Hydrolase domain-6-accessible monoacylglycerol controls glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab*. 2014;19(6):993-1007.
230. Marchetti P, Suleiman M, De Luca C, Baronti W, Bosi E, Tesi M, et al. A direct look at the dysfunction and pathology of the beta cells in human type 2 diabetes. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;103:83-93.
231. Fernandez-Alvarez J, Conget I, Rasschaert J, Sener A, Gomis R, Malaisse WJ. Enzymatic, metabolic and secretory patterns in human islets of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1994;37(2):177-81.
232. Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, et al. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes*. 2004;53(3):624-32.
233. Taneera J, Lang S, Sharma A, Fadista J, Zhou Y, Ahlqvist E, et al. A systems genetics approach identifies genes and pathways for type 2 diabetes in human islets. *Cell Metab*. 2012;16(1):122-34.
234. Solimena M, Schulte AM, Marselli L, Eehalt F, Richter D, Kleeberg M, et al. Systems biology of the IMIDIA biobank from organ donors and pancreatectomised patients defines a novel transcriptomic signature of islets from individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2018;61(3):641-57.
235. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, et al. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2005;48(2):282-9.

236. MacDonald MJ, Longacre MJ, Langberg EC, Tibell A, Kendrick MA, Fukao T, et al. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(6):1087-91.
237. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One*. 2010;5(7):e11499.
238. Ostenson CG, Gaisano H, Sheu L, Tibell A, Bartfai T. Impaired gene and protein expression of exocytotic soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor complex proteins in pancreatic islets of type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2006;55(2):435-40.
239. Hanley SC, Austin E, Assouline-Thomas B, Kapeluto J, Blachman J, Moosavi M, et al. {beta}-Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2010;151(4):1462-72.
240. Marchetti P, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, et al. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5535-41.
241. Marchetti P, Bugliani M, Lupi R, Marselli L, Masini M, Boggi U, et al. The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia*. 2007;50(12):2486-94.
242. Masini M, Bugliani M, Lupi R, del Guerra S, Boggi U, Filipponi F, et al. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2009;52(6):1083-6.
243. Lysy PA, Weir GC, Bonner-Weir S. Making beta cells from adult cells within the pancreas. *Curr Diab Rep*. 2013;13(5):695-703.
244. Masini M, Martino L, Marselli L, Bugliani M, Boggi U, Filipponi F, et al. Ultrastructural alterations of pancreatic beta cells in human diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2017;33(6).
245. van der Meulen T, Huisin MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol*. 2015;54(2):R103-17.
246. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of beta-Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):1044-54.
247. Amanat S, Ghahri S, Dianatinasab A, Fararouei M, Dianatinasab M. Exercise and Type 2 Diabetes. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1228:91-105.
248. Stephenson EJ, Smiles W, Hawley JA. The relationship between exercise, nutrition and type 2 diabetes. *Med Sport Sci*. 2014;60:1-10.
249. Meng S, Cao J, He Q, Xiong L, Chang E, Radovick S, et al. Metformin activates AMP-activated protein kinase by promoting formation of the alpha-beta-gamma heterotrimeric complex. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3793-802.
250. He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, et al. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. 2009;137(4):635-46.
251. Howell JJ, Hellberg K, Turner M, Talbott G, Kolar MJ, Ross DS, et al. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab*. 2017;25(2):463-71.
252. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323-32.
253. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, et al. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018;24(12):1919-29.
254. Coll AP, Chen M, Taskar P, Rimmington D, Patel S, Tadross JA, et al. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature*. 2020;578(7795):444-8.
255. Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S368-76.
256. Wang LC, Fang FS, Gong YP, Yang G, Li CL. Characteristics of repaglinide and its mechanism of action on insulin secretion in patients with newly diagnosed type-2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(38):e12476.

257. Kolterman OG, Kim DD, Shen L, Ruggles JA, Nielsen LL, Fineman MS, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of exenatide in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Health Syst Pharm.* 2005;62(2):173-81.
258. Damholt B, Golor G, Wierich W, Pedersen P, Ekblom M, Zdravkovic M. An open-label, parallel group study investigating the effects of age and gender on the pharmacokinetics of the once-daily glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide. *J Clin Pharmacol.* 2006;46(6):635-41.
259. Marbury TC, Flint A, Jacobsen JB, Derving Karsbol J, Lasseter K. Pharmacokinetics and Tolerability of a Single Dose of Semaglutide, a Human Glucagon-Like Peptide-1 Analog, in Subjects With and Without Renal Impairment. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(11):1381-90.
260. Herzberg-Schafer S, Heni M, Stefan N, Haring HU, Fritsche A. Impairment of GLP1-induced insulin secretion: role of genetic background, insulin resistance and hyperglycaemia. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14 Suppl 3:85-90.
261. Hasan FM, Alsahli M, Gerich JE. SGLT2 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104(3):297-322.
262. Merovci A, Solis-Herrera C, Daniele G, Eldor R, Fiorentino TV, Tripathy D, et al. Dapagliflozin improves muscle insulin sensitivity but enhances endogenous glucose production. *J Clin Invest.* 2014;124(2):509-14.
263. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thevenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med.* 2015;21(5):512-7.
264. Saponaro C, Gmyr V, Thevenet J, Moerman E, Delalleau N, Pasquetti G, et al. The GLP1R Agonist Liraglutide Reduces Hyperglucagonemia Induced by the SGLT2 Inhibitor Dapagliflozin via Somatostatin Release. *Cell Rep.* 2019;28(6):1447-54 e4.
265. Thanabalasingham G, Pal A, Selwood MP, Dudley C, Fisher K, Bingley PJ, et al. Systematic assessment of etiology in adults with a clinical diagnosis of young-onset type 2 diabetes is a successful strategy for identifying maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Care.* 2012;35(6):1206-12.
266. Urakami T. Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019;12:1047-56.
267. Sacks DA, Hadden DR, Maresh M, Deerochanawong C, Dyer AR, Metzger BE, et al. Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes Care.* 2012;35(3):526-8.
268. Fonseca VA. Defining and characterizing the progression of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2:S151-6.
269. Baz B, Riveline JP, Gautier JF. ENDOCRINOLOGY OF PREGNANCY: Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(2):R43-51.
270. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci.* 2009;16(10):921-37.
271. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(6 Pt 1):1667-72.
272. Kalkhoff RK, Kissebah AH, Kim HJ. Carbohydrate and lipid metabolism during normal pregnancy: relationship to gestational hormone action. *Semin Perinatol.* 1978;2(4):291-307.
273. Catalano PM, Tyzbir ED, Wolfe RR, Calles J, Roman NM, Amini SB, et al. Carbohydrate metabolism during pregnancy in control subjects and women with gestational diabetes. *Am J Physiol.* 1993;264(1 Pt 1):E60-7.
274. Kim C. Gestational diabetes: risks, management, and treatment options. *Int J Womens Health.* 2010;2:339-51.
275. Yasuhi I, Soda T, Yamashita H, Urakawa A, Izumi M, Kugishima Y, et al. The effect of high-intensity breastfeeding on postpartum glucose tolerance in women with recent gestational diabetes. *Int Breastfeed J.* 2017;12:32.
276. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007;132(6):2131-57.

277. Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA, Dupre J. Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide. *Recent Prog Horm Res.* 1975;31:487-532.
278. Tricoli JV, Bell GI, Shows TB. The human glucagon gene is located on chromosome 2. *Diabetes.* 1984;33(2):200-2.
279. Sarwal D, Bordoni B. Physiology, Enteroglucagon. *StatPearls.* Treasure Island (FL)2021.
280. Daniels D, Mietlicki-Baase EG. Glucagon-Like Peptide 1 in the Brain: Where Is It Coming From, Where Is It Going? *Diabetes.* 2019;68(1):15-7.
281. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. 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.* 1995;44(9):1126-31.
282. Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion.* 1995;56(2):117-26.
283. Krieger JP, Langhans W, Lee SJ. Vagal mediation of GLP-1's effects on food intake and glycemia. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt B):372-80.
284. Muller TD, Finan B, Bloom SR, D'Alessio D, Drucker DJ, Flatt PR, et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab.* 2019;30:72-130.
285. Hansen L, Holst JJ. The effects of duodenal peptides on glucagon-like peptide-1 secretion from the ileum. A duodeno-ileal loop? *Regul Pept.* 2002;110(1):39-45.
286. Tomas A, Jones B, Leech C. New Insights into Beta-Cell GLP-1 Receptor and cAMP Signaling. *J Mol Biol.* 2020;432(5):1347-66.
287. Moon MJ, Park S, Kim DK, Cho EB, Hwang JI, Vaudry H, et al. Structural and molecular conservation of glucagon-like Peptide-1 and its receptor confers selective ligand-receptor interaction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:141.
288. Huang Y, Wilkinson GF, Willars GB. Role of the signal peptide in the synthesis and processing of the glucagon-like peptide-1 receptor. *Br J Pharmacol.* 2010;159(1):237-51.
289. Runge S, Thogersen H, Madsen K, Lau J, Rudolph R. Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11340-7.
290. Al-Sabah S, Donnelly D. A model for receptor-peptide binding at the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor through the analysis of truncated ligands and receptors. *Br J Pharmacol.* 2003;140(2):339-46.
291. Song G, Yang D, Wang Y, de Graaf C, Zhou Q, Jiang S, et al. Human GLP-1 receptor transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators. *Nature.* 2017;546(7657):312-5.
292. Sonoda N, Imamura T, Yoshizaki T, Babendure JL, Lu JC, Olefsky JM. Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(18):6614-9.
293. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:289-319.
294. Gray SM, Xin Y, Ross EC, Chazotte BM, Capozzi ME, El K, et al. Discordance between GLP-1R gene and protein expression in mouse pancreatic islet cells. *J Biol Chem.* 2020;295(33):11529-41.
295. Ast J, Arvaniti A, Fine NHF, Nasteska D, Ashford FB, Stamataki Z, et al. Author Correction: Super-resolution microscopy compatible fluorescent probes reveal endogenous glucagon-like peptide-1 receptor distribution and dynamics. *Nat Commun.* 2020;11(1):5160.
296. Scrocchi LA, Marshall BA, Cook SM, Brubaker PL, Drucker DJ. Identification of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of GLP-1 receptor signaling. *Diabetes.* 1998;47(4):632-9.
297. Drucker DJ. Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab.* 2018;27(4):740-56.
298. Gromada J, Dissing S, Rorsman P. Desensitization of glucagon-like peptide 1 receptors in insulin-secreting beta TC3 cells: role of PKA-independent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 1996;118(3):769-75.

299. Wang X, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. 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*. 2001;142(5):1820-7.
300. Gheni G, Ogura M, Iwasaki M, Yokoi N, Minami K, Nakayama Y, et al. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. *Cell Rep*. 2014;9(2):661-73.
301. Shigetou M, Ramracheya R, Tarasov AI, Cha CY, Chibalina MV, Hastoy B, et al. GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *J Clin Invest*. 2015;125(12):4714-28.
302. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998;396(6710):474-7.
303. Wang Y, Egan JM, Raygada M, Nadiv O, Roth J, Montrose-Rafizadeh C. Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells. *Endocrinology*. 1995;136(11):4910-7.
304. Moritz W, Leech CA, Ferrer J, Habener JF. Regulated expression of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel subunits in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2001;142(1):129-38.
305. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(10):3434-8.
306. Wang X, Cahill CM, Pineyro MA, Zhou J, Doyle ME, Egan JM. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*. 1999;140(10):4904-7.
307. Lawrence MC, Bhatt HS, Easom RA. NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1. *Diabetes*. 2002;51(3):691-8.
308. Bulotta A, Hui H, Anastasi E, Bertolotto C, Boros LG, Di Mario U, et al. Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J Mol Endocrinol*. 2002;29(3):347-60.
309. Zhou J, Pineyro MA, Wang X, Doyle ME, Egan JM. Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors. *J Cell Physiol*. 2002;192(3):304-14.
310. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, et al. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. 2000;49(5):741-8.
311. Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, Drucker DJ. beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes*. 2005;54(2):482-91.
312. Hussain MA, Porras DL, Rowe MH, West JR, Song WJ, Schreiber WE, et al. Increased pancreatic beta-cell proliferation mediated by CREB binding protein gene activation. *Mol Cell Biol*. 2006;26(20):7747-59.
313. Wang Q, Li L, Xu E, Wong V, Rhodes C, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. *Diabetologia*. 2004;47(3):478-87.
314. Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M. Protein kinase C zeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*. 2001;50(10):2237-43.
315. Miao XY, Gu ZY, Liu P, Hu Y, Li L, Gong YP, et al. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide regulates pancreatic beta-cell proliferation and apoptosis via an AMPK/mTOR/P70S6K signaling pathway. *Peptides*. 2013;39:71-9.
316. Jhala US, Canettieri G, Srean RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, et al. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev*. 2003;17(13):1575-80.

317. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(1):471-8.
318. Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia*. 2004;47(5):806-15.
319. Kapodistria K, Tsilibary EP, Kotsopoulou E, Moustardas P, Kitsiou P. Liraglutide, a human glucagon-like peptide-1 analogue, stimulates AKT-dependent survival signalling and inhibits pancreatic beta-cell apoptosis. *J Cell Mol Med*. 2018;22(6):2970-80.
320. Cai Y, Wang Q, Ling Z, Pipeleers D, McDermott P, Pende M, et al. Akt activation protects pancreatic beta cells from AMPK-mediated death through stimulation of mTOR. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(10):1981-93.
321. Fonseca SG, Gromada J, Urano F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(7):266-74.
322. Yusta B, Baggio LL, Estall JL, Koehler JA, Holland DP, Li H, et al. GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab*. 2006;4(5):391-406.
323. Cunha DA, Ladriere L, Ortis F, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Lupi R, et al. Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB. *Diabetes*. 2009;58(12):2851-62.
324. Cunha DA, Gurzov EN, Naamane N, Ortis F, Cardozo AK, Bugliani M, et al. JunB protects beta-cells from lipotoxicity via the XBP1-AKT pathway. *Cell Death Differ*. 2014;21(8):1313-24.
325. Hayes MR, Leichner TM, Zhao S, Lee GS, Chowansky A, Zimmer D, et al. Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell Metab*. 2011;13(3):320-30.
326. Redondo A, Trigo MV, Acitores A, Valverde I, Villanueva-Penacarrillo ML. Cell signalling of the GLP-1 action in rat liver. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;204(1-2):43-50.
327. Ding X, Saxena NK, Lin S, Gupta NA, Anania FA. Exendin-4, a glucagon-like protein-1 (GLP-1) receptor agonist, reverses hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology*. 2006;43(1):173-81.
328. Wang XC, Gusdon AM, Liu H, Qu S. Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation. *World J Gastroenterol*. 2014;20(40):14821-30.
329. Petit JM, Cercueil JP, Loffroy R, Denimal D, Bouillet B, Fourmont C, et al. Effect of Liraglutide Therapy on Liver Fat Content in Patients With Inadequately Controlled Type 2 Diabetes: The Lira-NAFLD Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(2):407-15.
330. Chen J, Zhao H, Ma X, Zhang Y, Lu S, Wang Y, et al. GLP-1/GLP-1R Signaling in Regulation of Adipocyte Differentiation and Lipogenesis. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(3):1165-76.
331. Jiang Y, Wang Z, Ma B, Fan L, Yi N, Lu B, et al. GLP-1 Improves Adipocyte Insulin Sensitivity Following Induction of Endoplasmic Reticulum Stress. *Front Pharmacol*. 2018;9:1168.
332. Challa TD, Beaton N, Arnold M, Rudofsky G, Langhans W, Wolfrum C. Regulation of adipocyte formation by GLP-1/GLP-1R signaling. *J Biol Chem*. 2012;287(9):6421-30.
333. Lynch L, Hogan AE, Duquette D, Lester C, Banks A, LeClair K, et al. iNKT Cells Induce FGF21 for Thermogenesis and Are Required for Maximal Weight Loss in GLP1 Therapy. *Cell Metab*. 2016;24(3):510-9.
334. Beiroa D, Imbernon M, Gallego R, Senra A, Herranz D, Villarroya F, et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*. 2014;63(10):3346-58.
335. Xu F, Lin B, Zheng X, Chen Z, Cao H, Xu H, et al. GLP-1 receptor agonist promotes brown remodelling in mouse white adipose tissue through SIRT1. *Diabetologia*. 2016;59(5):1059-69.
336. Wei Y, Mojsov S. 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 Lett*. 1995;358(3):219-24.
337. Noyan-Ashraf MH, Momen MA, Ban K, Sadi AM, Zhou YQ, Riazi AM, et al. GLP-1R agonist liraglutide activates cytoprotective pathways and improves outcomes after experimental myocardial infarction in mice. *Diabetes*. 2009;58(4):975-83.

338. Kim M, Platt MJ, Shibasaki T, Quaggin SE, Backx PH, Seino S, et al. GLP-1 receptor activation and Epac2 link atrial natriuretic peptide secretion to control of blood pressure. *Nat Med.* 2013;19(5):567-75.
339. Green CJ, Henriksen TI, Pedersen BK, Solomon TP. Glucagon like peptide-1-induced glucose metabolism in differentiated human muscle satellite cells is attenuated by hyperglycemia. *PLoS One.* 2012;7(8):e44284.
340. Li Z, Ni CL, Yao Z, Chen LM, Niu WY. Liraglutide enhances glucose transporter 4 translocation via regulation of AMP-activated protein kinase signaling pathways in mouse skeletal muscle cells. *Metabolism.* 2014;63(8):1022-30.
341. Jeon JY, Choi SE, Ha ES, Lee HB, Kim TH, Han SJ, et al. GLP1 improves palmitate-induced insulin resistance in human skeletal muscle via SIRT1 activity. *Int J Mol Med.* 2019;44(3):1161-71.
342. Kovesdi I, Reichel R, Nevins JR. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell.* 1986;45(2):219-28.
343. Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG, Jr. RB associates with an E2F-like, sequence-specific DNA-binding protein. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1991;56:187-95.
344. Bandara LR, La Thangue NB. Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature.* 1991;351(6326):494-7.
345. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell.* 1991;65(6):1053-61.
346. Qin XQ, Chittenden T, Livingston DM, Kaelin WG, Jr. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev.* 1992;6(6):953-64.
347. Kaelin WG, Jr., Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell.* 1992;70(2):351-64.
348. Helin K, Lees JA, Vidal M, Dyson N, Harlow E, Fattaey A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell.* 1992;70(2):337-50.
349. Shan B, Zhu X, Chen PL, Durfee T, Yang Y, Sharp D, et al. Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 1992;12(12):5620-31.
350. Ivey-Hoyle M, Conroy R, Huber HE, Goodhart PJ, Oliff A, Heimbrook DC. Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 1993;13(12):7802-12.
351. Lees JA, Saito M, Vidal M, Valentine M, Look T, Harlow E, et al. The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol.* 1993;13(12):7813-25.
352. Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(6):326-38.
353. Adams MR, Sears R, Nuckolls F, Leone G, Nevins JR. Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol Cell Biol.* 2000;20(10):3633-9.
354. Iaquinta PJ, Lees JA. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(6):649-57.
355. Maiti B, Li J, de Bruin A, Gordon F, Timmers C, Opavsky R, et al. Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18211-20.
356. Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.* 2003;22(23):6289-98.
357. Zhang Y, Venkataraj VS, Fischer SG, Warburton D, Chellappan SP. Genomic cloning and chromosomal assignment of the E2F dimerization partner TFDP gene family. *Genomics.* 1997;39(1):95-8.
358. Stevaux O, Dyson NJ. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(6):684-91.
359. Ginsberg D, Vairo G, Chittenden T, Xiao ZX, Xu G, Wydner KL, et al. E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.* 1994;8(22):2665-79.

360. Li JM, Hu PP, Shen X, Yu Y, Wang XF. E2F4-RB and E2F4-p107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor beta through E2F binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):4948-53.
361. Hijmans EM, Voorhoeve PM, Beijersbergen RL, van 't Veer LJ, Bernards R. E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol Cell Biol*. 1995;15(6):3082-9.
362. Zhan L, Huang C, Meng XM, Song Y, Wu XQ, Miu CG, et al. Promising roles of mammalian E2Fs in hepatocellular carcinoma. *Cell Signal*. 2014;26(5):1075-81.
363. de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G. Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42041-9.
364. Blais A, Dynlacht BD. E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(6):658-62.
365. Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science*. 2002;296(5570):1132-6.
366. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011;21(3):381-95.
367. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*. 2007;26(37):5310-8.
368. DeGregori J. The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602(2):131-50.
369. Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, et al. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol*. 2001;21(14):4684-99.
370. Ren B, Cam H, Takahashi Y, Volkert T, Terragni J, Young RA, et al. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*. 2002;16(2):245-56.
371. Shan B, Lee WH. Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8166-73.
372. Elliott MJ, Dong YB, Yang H, McMasters KM. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3590-7.
373. Cao Q, Xia Y, Azadniv M, Crispe IN. The E2F-1 transcription factor promotes caspase-8 and bid expression, and enhances Fas signaling in T cells. *J Immunol*. 2004;173(2):1111-7.
374. Fortin A, MacLaurin JG, Arbour N, Cregan SP, Kushwaha N, Callaghan SM, et al. The proapoptotic gene SIVA is a direct transcriptional target for the tumor suppressors p53 and E2F1. *J Biol Chem*. 2004;279(27):28706-14.
375. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 2005;24(17):2810-26.
376. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-49.
377. Gookin S, Min M, Phadke H, Chung M, Moser J, Miller I, et al. A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLoS Biol*. 2017;15(9):e2003268.
378. Burke JR, Liban TJ, Restrepo T, Lee HW, Rubin SM. Multiple mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain. *J Mol Biol*. 2014;426(1):245-55.
379. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.
380. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(4):1286-90.
381. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnicka-Worms H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 1994;14(12):8420-31.
382. Zhang L, Wang C. F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F. *Oncogene*. 2006;25(18):2615-27.

383. Dubrez L. Regulation of E2F1 Transcription Factor by Ubiquitin Conjugation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10).
384. Ding L, Cao J, Lin W, Chen H, Xiong X, Ao H, et al. The Roles of Cyclin-Dependent Kinases in Cell-Cycle Progression and Therapeutic Strategies in Human Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6).
385. Kahoul Y, Oger F, Montaigne J, Froguel P, Breton C, Annicotte JS. Emerging Roles for the INK4a/ARF (CDKN2A) Locus in Adipose Tissue: Implications for Obesity and Type 2 Diabetes. *Biomolecules.* 2020;10(9).
386. Pierce AM, Gimenez-Conti IB, Schneider-Broussard R, Martinez LA, Conti CJ, Johnson DG. Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(15):8858-63.
387. Pierce AM, Schneider-Broussard R, Gimenez-Conti IB, Russell JL, Conti CJ, Johnson DG. E2F1 has both oncogenic and tumor-suppressive properties in a transgenic model. *Mol Cell Biol.* 1999;19(9):6408-14.
388. Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell.* 1996;85(4):537-48.
389. Wu Z, Zheng S, Yu Q. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(12):2389-97.
390. Yoon MK, Ha JH, Lee MS, Chi SW. Structure and apoptotic function of p73. *BMB Rep.* 2015;48(2):81-90.
391. Poppy Roworth A, Ghari F, La Thangue NB. To live or let die - complexity within the E2F1 pathway. *Mol Cell Oncol.* 2015;2(1):e970480.
392. Stanelle J, Putzer BM. E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med.* 2006;12(4):177-85.
393. Polager S, Kalma Y, Berkovich E, Ginsberg D. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene.* 2002;21(3):437-46.
394. Prost S, Lu P, Caldwell H, Harrison D. E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. *Oncogene.* 2007;26(24):3572-81.
395. Lin PS, McPherson LA, Chen AY, Sage J, Ford JM. The role of the retinoblastoma/E2F1 tumor suppressor pathway in the lesion recognition step of nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2009;8(7):795-802.
396. Ceruti JM, Scassa ME, Flo JM, Varone CL, Canepa ET. Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2005;24(25):4065-80.
397. Huber K, Mestres-Arenas A, Fajas L, Leal-Esteban LC. The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism. *FEBS J.* 2021;288(12):3813-33.
398. Bolsoni-Lopes A, Alonso-Vale MI. Lipolysis and lipases in white adipose tissue - An update. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(4):335-42.
399. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:30.
400. Chen J, Yang Y, Li S, Yang Y, Dai Z, Wang F, et al. E2F1 Regulates Adipocyte Differentiation and Adipogenesis by Activating ICAT. *Cells.* 2020;9(4).
401. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2002;3(1):39-49.
402. Maixner N, Pecht T, Haim Y, Chalifa-Caspi V, Goldstein N, Tarnovskii T, et al. A TRAIL-TL1A Paracrine Network Involving Adipocytes, Macrophages, and Lymphocytes Induces Adipose Tissue Dysfunction Downstream of E2F1 in Human Obesity. *Diabetes.* 2020;69(11):2310-23.
403. Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.* 1996;10(21):2794-804.
404. Usui I, Haruta T, Iwata M, Takano A, Uno T, Kawahara J, et al. Retinoblastoma protein phosphorylation via PI 3-kinase and mTOR pathway regulates adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;275(1):115-20.

405. Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Boye HA, et al. Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4112-7.
406. Moreno-Navarrete JM, Petrov P, Serrano M, Ortega F, Garcia-Ruiz E, Oliver P, et al. Decreased RB1 mRNA, protein, and activity reflect obesity-induced altered adipogenic capacity in human adipose tissue. *Diabetes*. 2013;62(6):1923-31.
407. Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, et al. Cdk4 promotes adipogenesis through PPARgamma activation. *Cell Metab*. 2005;2(4):239-49.
408. Lagarrigue S, Lopez-Mejia IC, Denechaud PD, Escote X, Castillo-Armengol J, Jimenez V, et al. CDK4 is an essential insulin effector in adipocytes. *J Clin Invest*. 2016;126(1):335-48.
409. Conner EA, Lemmer ER, Omori M, Wirth PJ, Factor VM, Thorgeirsson SS. Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene*. 2000;19(44):5054-62.
410. Zhang Y, Xu N, Xu J, Kong B, Copple B, Guo GL, et al. E2F1 is a novel fibrogenic gene that regulates cholestatic liver fibrosis through the Egr-1/SHP/EID1 network. *Hepatology*. 2014;60(3):919-30.
411. Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, Giralt A, Lai Q, Blanchet E, Delacuisine B, et al. E2F1 mediates sustained lipogenesis and contributes to hepatic steatosis. *J Clin Invest*. 2016;126(1):137-50.
412. Giralt A, Denechaud PD, Lopez-Mejia IC, Delacuisine B, Blanchet E, Bonner C, et al. E2F1 promotes hepatic gluconeogenesis and contributes to hyperglycemia during diabetes. *Mol Metab*. 2018;11:104-12.
413. Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, et al. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*. 2014;510(7506):547-51.
414. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
415. Jin J, Valanejad L, Nguyen TP, Lewis K, Wright M, Cast A, et al. Activation of CDK4 Triggers Development of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Rep*. 2016;16(3):744-56.
416. Bantubungi K, Hannou SA, Caron-Houde S, Vallez E, Baron M, Lucas A, et al. Cdkn2a/p16Ink4a regulates fasting-induced hepatic gluconeogenesis through the PKA-CREB-PGC1alpha pathway. *Diabetes*. 2014;63(10):3199-209.
417. Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J. Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-) mice. *J Clin Invest*. 2004;113(9):1288-95.
418. Grouwels G, Cai Y, Hoebeke I, Leucx G, Heremans Y, Ziebold U, et al. Ectopic expression of E2F1 stimulates beta-cell proliferation and function. *Diabetes*. 2010;59(6):1435-44.
419. Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, et al. The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol*. 2009;11(8):1017-23.
420. Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clape C, Chavey C, et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011;13(9):1146-52.
421. Kim SY, Rane SG. The Cdk4-E2f1 pathway regulates early pancreas development by targeting Pdx1+ progenitors and Ngn3+ endocrine precursors. *Development*. 2011;138(10):1903-12.
422. Vasavada RC, Cozar-Castellano I, Sipula D, Stewart AF. Tissue-specific deletion of the retinoblastoma protein in the pancreatic beta-cell has limited effects on beta-cell replication, mass, and function. *Diabetes*. 2007;56(1):57-64.
423. Cai EP, Wu X, Schroer SA, Elia AJ, Nostro MC, Zacksenhaus E, et al. Retinoblastoma tumor suppressor protein in pancreatic progenitors controls alpha- and beta-cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(36):14723-8.
424. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet*. 1999;22(1):44-52.
425. Marzo N, Mora C, Fabregat ME, Martin J, Usac EF, Franco C, et al. Pancreatic islets from cyclin-dependent kinase 4/R24C (Cdk4) knockin mice have significantly increased beta cell mass and are physiologically functional, indicating that Cdk4 is a potential target for pancreatic beta cell mass regeneration in Type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47(4):686-94.

426. Saccaan AI, Thibault S, Hong M, Kondegowda NG, Nichols T, Li R, et al. CDK4/6 Inhibition on Glucose and Pancreatic Beta Cell Homeostasis in Young and Aged Rats. *Mol Cancer Res.* 2017;15(11):1531-41.
427. Ma Y, Kurtyka CA, Boyapalle S, Sung SS, Lawrence H, Guida W, et al. A small-molecule E2F inhibitor blocks growth in a melanoma culture model. *Cancer Res.* 2008;68(15):6292-9.
428. Rosales-Hurtado M, Lebeau A, Bourouh C, Cebrian-Torrejon G, Albalat M, Jean M, et al. Improved synthesis, resolution, absolute configuration determination and biological evaluation of HLM006474 enantiomers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019;29(3):380-2.
429. Herrera PL, Orci L, Vassalli JD. Two transgenic approaches to define the cell lineages in endocrine pancreas development. *Mol Cell Endocrinol.* 1998;140(1-2):45-50.
430. Scheijen B, Bronk M, van der Meer T, Bernardis R. Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(10):3656-68.
431. Lee C, Huang CH. LASAGNA-Search: an integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *Biotechniques.* 2013;54(3):141-53.
432. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun.* 2019;10(1):1523.
433. Chirumamilla CS, Fazil M, Perez-Novo C, Rangarajan S, de Wijn R, Ramireddy P, et al. Profiling Activity of Cellular Kinases in Migrating T-Cells. *Methods Mol Biol.* 2019;1930:99-113.
434. Denechaud PD, Fajas L, Giralt A. E2F1, a Novel Regulator of Metabolism. *Frontiers in endocrinology.* 2017;8:311.
435. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol.* 1981;150(4):467-86.
436. Lupi R, Mancarella R, Del Guerra S, Bugliani M, Del Prato S, Boggi U, et al. Effects of exendin-4 on islets from type 2 diabetes patients. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(6):515-9.
437. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in beta-cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2016;56(2):R33-54.
438. Tarifeno-Saldivia E, Lavergne A, Bernard A, Padamata K, Bergemann D, Voz ML, et al. Transcriptome analysis of pancreatic cells across distant species highlights novel important regulator genes. *BMC Biol.* 2017;15(1):21.
439. Aigha, II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic beta cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):459.
440. Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic beta-Cell Dysfunction. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:515136.
441. Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, et al. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology.* 1990;127(1):126-32.
442. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 2003;22(20):5323-35.
443. Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(26):12146-50.
444. Nadkarni P, Chepurny OG, Holz GG. Regulation of glucose homeostasis by GLP-1. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;121:23-65.
445. Ling Z, Wu D, Zambre Y, Flamez D, Drucker DJ, Pipeleers DG, et al. Glucagon-like peptide 1 receptor signaling influences topography of islet cells in mice. *Virchows Arch.* 2001;438(4):382-7.
446. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295(6):E1323-32.
447. Nielsen LL, Young AA, Parkes DG. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept.* 2004;117(2):77-88.
448. Maechler P. Mitochondrial function and insulin secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379(1-2):12-8.

449. Mendoza PR, Grossniklaus HE. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;134:503-16.
450. Johnson DG, Ohtani K, Nevins JR. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* 1994;8(13):1514-25.
451. Kodama S, Toyonaga T, Kondo T, Matsumoto K, Tsuruzoe K, Kawashima J, et al. Enhanced expression of PDX-1 and Ngn3 by exendin-4 during beta cell regeneration in STZ-treated mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327(4):1170-8.
452. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 1997;8(2):287-301.
453. Iglesias A, Murga M, Laresgoiti U, Skoudy A, Bernales I, Fullaondo A, et al. Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice. *J Clin Invest.* 2004;113(10):1398-407.
454. Li FX, Zhu JW, Tessem JS, Beilke J, Varella-Garcia M, Jensen J, et al. The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12935-40.
455. Vakilian M, Tahamtani Y, Ghaedi K. A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene.* 2019;706:52-61.
456. Andersson SA, Olsson AH, Esguerra JL, Heimann E, Ladenvall C, Edlund A, et al. Reduced insulin secretion correlates with decreased expression of exocytotic genes in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;364(1-2):36-45.
457. Klec C, Ziomek G, Pichler M, Malli R, Graier WF. Calcium Signaling in ss-cell Physiology and Pathology: A Revisit. *Int J Mol Sci.* 2019;20(24).
458. Lemaire K, Schuit F. Integrating insulin secretion and ER stress in pancreatic beta-cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14(10):979-81.
459. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):98-107.
460. Dror E, Dalmas E, Meier DT, Wueest S, Thevenet J, Thienel C, et al. Postprandial macrophage-derived IL-1beta stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. *Nat Immunol.* 2017;18(3):283-92.
461. Hajmrle C, Smith N, Spigelman AF, Dai X, Senior L, Bautista A, et al. Interleukin-1 signaling contributes to acute islet compensation. *JCI Insight.* 2016;1(4):e86055.
462. Boni-Schnetzler M, Hauselmann SP, Dalmas E, Meier DT, Thienel C, Traub S, et al. beta Cell-Specific Deletion of the IL-1 Receptor Antagonist Impairs beta Cell Proliferation and Insulin Secretion. *Cell Rep.* 2018;22(7):1774-86.
463. Ying W, Fu W, Lee YS, Olefsky JM. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and beta-cell abnormalities. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(2):81-90.
464. Geutskens SB, Otonkoski T, Pulkkinen MA, Drexhage HA, Leenen PJ. Macrophages in the murine pancreas and their involvement in fetal endocrine development in vitro. *J Leukoc Biol.* 2005;78(4):845-52.
465. Ying W, Lee YS, Dong Y, Seidman JS, Yang M, Isaac R, et al. Expansion of Islet-Resident Macrophages Leads to Inflammation Affecting beta Cell Proliferation and Function in Obesity. *Cell Metab.* 2019;29(2):457-74 e5.
466. Tamarina NA, Roe MW, Philipson L. Characterization of mice expressing Ins1 gene promoter driven CreERT recombinase for conditional gene deletion in pancreatic beta-cells. *Islets.* 2014;6(1):e27685.
467. Rady B, Chen Y, Vaca P, Wang Q, Wang Y, Salmon P, et al. Overexpression of E2F3 promotes proliferation of functional human beta cells without induction of apoptosis. *Cell Cycle.* 2013;12(16):2691-702.
468. Kong LJ, Chang JT, Bild AH, Nevins JR. Compensation and specificity of function within the E2F family. *Oncogene.* 2007;26(3):321-7.

469. Gao R, Fu Q, Jiang HM, Shen M, Zhao RL, Qian Y, et al. Temporal metabolic and transcriptomic characteristics crossing islets and liver reveal dynamic pathophysiology in diet-induced diabetes. *iScience*. 2021;24(4):102265.
470. Mosser RE, Maulis MF, Mouille VS, Dunn JC, Carboneau BA, Arasi K, et al. High-fat diet-induced beta-cell proliferation occurs prior to insulin resistance in C57Bl/6J male mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015;308(7):E573-82.
471. Schaffer AE, Taylor BL, Benthuyzen JR, Liu J, Thorel F, Yuan W, et al. Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic Beta cell identity. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003274.
472. Bru-Tari E, Cobo-Vuilleumier N, Alonso-Magdalena P, Dos Santos RS, Marroqui L, Nadal A, et al. Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model of experimental autoimmune diabetes. *Sci Rep*. 2019;9(1):9515.
473. Ellingsgaard H, Ehses JA, Hammar EB, Van Lommel L, Quintens R, Martens G, et al. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(35):13163-8.
474. Ahren B. Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives. *Diabetes Metab*. 2013;39(3):195-201.
475. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, Larsen S, Madsbad S, Volund A, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007;56(8):1951-9.
476. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, et al. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes*. 2007;56(6):1551-8.
477. Pan QR, Li WH, Wang H, Sun Q, Xiao XH, Brock B, et al. Glucose, metformin, and AICAR regulate the expression of G protein-coupled receptor members in INS-1 beta cell. *Horm Metab Res*. 2009;41(11):799-804.
478. Kong X, Feng L, Yan D, Li B, Yang Y, Ma X. FXR-mediated epigenetic regulation of GLP-1R expression contributes to enhanced incretin effect in diabetes after RYGB. *J Cell Mol Med*. 2021.
479. Cai EP, Luk CT, Wu X, Schroer SA, Shi SY, Sivasubramaniyam T, et al. Rb and p107 are required for alpha cell survival, beta cell cycle control and glucagon-like peptide-1 action. *Diabetologia*. 2014;57(12):2555-65.
480. Chen S, Shimoda M, Chen J, Matsumoto S, Grayburn PA. Transient overexpression of cyclin D2/CDK4/GLP1 genes induces proliferation and differentiation of adult pancreatic progenitors and mediates islet regeneration. *Cell Cycle*. 2012;11(4):695-705.
481. Kim MJ, Kang JH, Park YG, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, et al. Exendin-4 induction of cyclin D1 expression in INS-1 beta-cells: involvement of cAMP-responsive element. *J Endocrinol*. 2006;188(3):623-33.
482. Song WJ, Schreiber WE, Zhong E, Liu FF, Kornfeld BD, Wondisford FE, et al. Exendin-4 stimulation of cyclin A2 in beta-cell proliferation. *Diabetes*. 2008;57(9):2371-81.
483. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic beta cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3589-97.

Annexe 1

Pancreatic β -cell specific loss of *E2f1* impairs insulin secretion and β -cell identity through the epigenetic repression of non β -cell programs

Frédéric Oger^{1, 7}, Cyril Bourouh^{1, 7}, Xavier Gromada¹, Maeva Moreno¹, Charlène Carney¹, Emilie Courty¹, Nabil Rabhi^{1, #}, Emmanuelle Durand¹, Souhila Amanzougarene¹, Lionel Berberian¹, Mehdi Derhourhi¹, Laure Rolland¹, Sarah Anissa Hannou¹, Pierre-Damien Denechaud^{2, ¶}, Zohra Benfodda³, Patrick Meffre³, Lluis Fajas², Julie Kerr-Conte⁴, François Pattou⁴, Philippe Froguel^{1, 5}, Amélie Bonnefond¹ and Jean-Sébastien Annicotte^{1, 6*}

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, CNRS, U1283 - UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

² Center for Integrative Genomics, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

³ Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, F-30021 Nîmes cedex 1, France

⁴ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1190 - EGID, F-59000 Lille, France

⁵ Department of Metabolism, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK

⁶ Lead contact

⁷ Contributed equally to this work

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

¶ Present address: Inserm, UMR1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, F-31000 Toulouse, France

*Correspondence: jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S. A.)

INSERM U1283-EGID (INSERM / CNRS / Université de Lille / Institut Pasteur de Lille) - Faculté de Médecine - Pôle recherche

1 place de Verdun - 59045 Lille Cedex - France

Phone: +33.(0)3 74 00 81 00

Running title: E2F1 and beta-cell identity

Abstract

The loss of pancreatic β -cell identity emerges as an important feature of type 2 diabetes development, but the molecular mechanisms are still elusive. Here, we explore the cell-autonomous role of the cell cycle regulator and transcription factor E2F1 in the maintenance of β -cell identity and insulin secretion. We show that the β -cell-specific loss of *E2f1* function in mice triggers glucose intolerance associated with defective insulin secretion, an altered α -to- β -cell ratio, a downregulation of many β -cell genes and a concomitant increase of non- β -cell markers. Mechanistically, the epigenomic profiling of non-beta cell upregulated gene promoters identified an enrichment of bivalent H3K4me3/H3K27me3 or H3K27me3 marks. Conversely, downregulated genes were enriched in active chromatin H3K4me3 and H3K27ac histone marks. We find that histone deacetylase inhibitors modulate E2F1 transcriptional and epigenomic signatures associated with these β -cell dysfunctions. Finally, the pharmacological inhibition of E2F transcriptional activity in human islets also impairs insulin secretion and the expression of β -cell identity genes. Our data suggest that E2F1 is critical for maintaining β -cell identity through a sustained repression of non β -cell transcriptional programs.

Introduction

Type 2 Diabetes (T2D) is a progressive metabolic disorder characterized by permanent high blood glucose levels due to inadequate pancreatic β -cell response to peripheral insulin resistance. Normally, β -cells respond to obesity and aging associated insulin loss of sensibility by increasing insulin secretion to avoid rising glycemia. However, in case of imbalance between insulin secretion and action, the emerging chronic hyperglycemic state progressively leads to massive β -cell dysfunction and decreased mass (484). Importantly, single cell transcriptomic analysis of human pancreatic islet cells from diabetic and healthy individuals allowed the community to define specific gene signatures of endocrine cell types and revealed a complex multi cellular lineage identity of T2D (485-487). In addition, recent studies demonstrated a loss of transcriptional maturity (488) and cell-type-specific regulatory profiles underlying T2D (489). Moreover, histology studies of diabetic human pancreata found a significant increase in bi-hormonal Insulin+ (Ins+)/Glucagon+ (Glu+) cells suggesting an altered β -cell identity (490-492). Accordingly, recent studies using β -cell lineage tracing murine models have demonstrated that islet cells have the capacity to directly trans-differentiate to another islet cell fate and/or de-differentiate to a progenitor-like cell (491, 493-495). In this context, both genetic and epigenetic mechanisms are important to maintain adult β -cell fate and function in mouse and human (52, 220, 471, 496-502). Yet, the molecular actors controlling β -cell mass, identity maintenance and cellular plasticity remain poorly understood.

Gene transcription and chromatin states are tightly regulated to ensure the appropriate transcriptome for a specific cell type. Many transcription factors have been identified as key regulators of β -cell identity and function, including Pdx1 (503), Pax6 (69), Nkx6.1 (471) and Nkx2.2 (500). Interestingly, pleiotropic transcription factors are also involved in the control of β -cell functions and glucose homeostasis, suggesting their important roles in activating or repressing gene transcription. Amongst those, members of E2F transcription factors (E2F1 to E2F8) family play critical roles in cell survival and proliferation, by regulating the gene expression of several proteins involved in cell-cycle progression (352, 391). The transcriptional activity of E2F1, the founder member of the family, is regulated by several protein complexes including the retinoblastoma tumor suppressor family (pRB, p107, p130), cyclin-dependent kinases (such as CDK4) and their regulatory partner cyclins (Ccn), as well as the family of the cdk inhibitors (CDKi, such as p16^{Ink4A} encoded by the *Cdkn2a* locus) (391). Interestingly, the role of the cell cycle machinery goes beyond the unique regulation of cell proliferation. Indeed, modulating the expression levels of these cell cycle regulators revealed an important role for these proteins in glucose homeostasis (434) and diabetes development through the control of

β -cell mass (504, 505). Although *E2F1* gene expression is decreased in human T2D islets (436), the causal effect of E2F1 deficiency on impaired β -cell mass, function and T2D development is not elucidated. In particular, the cellular and molecular mechanisms underlying the contribution of E2F1 as a transcription factor to β -cell identity and/or plasticity in mice and humans remain unknown. We recently demonstrated that the germline deletion of *E2f1* in the obese and diabetic *db/db* mouse model, despite lowering liver steatosis, does not protect against diabetes or obesity (411). Interestingly, we observed decreased plasma insulin levels, increased plasma glucose and glucose intolerance in *db/db::E2f1^{-/-}* mice compared to *db/db::E2f1^{+/+}* controls (411). These metabolic alterations in a diabetic background raises the possibility that E2f1 may contribute to islet morphology, cell identity and function in a cell-autonomous manner. To test this hypothesis, we generated mice lacking *E2f1* in β cells and identified that E2F1 is necessary for maintaining β -cell identity gene expression in both mouse models and human islets. By combining cellular and mouse models to pharmacological approaches, our results identify E2F1 as a critical transcription factor necessary to maintain proper β -cell gene expression and function, while repressing non β -cell transcriptional programs.

Material and methods

Materials and Oligonucleotides. Chemicals, unless stated otherwise, were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-insulin (ab7842), anti-glucagon (ab11909) and IgG (ab37415 ChIP grade) antibodies for ChIP-seq experiments were from Abcam ; anti-E2F1 (sc-193 for immunofluorescence on mouse tissues) antibody was from Santa Cruz Biotechnology. H3K4me3 (#61379), H3K27ac (#39685) and H3K27me3 (#61017) antibodies were from Active motif. The HLM006474 compound (427) was synthesized as previously described (428).

Animal Experiments. Mice were maintained according to European Union guidelines for the use of laboratory animals. In vivo experiments were performed in compliance with the French ethical guidelines for studies on experimental animals (animal house agreement no. A 59-35015, Authorization for Animal Experimentation no.59-350294, project approval by our local ethical committee no. CEEA 482012, APAFIS#2915-201511300923025v4). All experiments were performed with male mice. Mice were housed under a 12-hr light/dark cycle and given a regular chow (A04;Safe).

E2f1^{-/-} (B6; 129S4-*E2f1*^{tm1Meg/J}) mice and *db*/⁺ mice (Janvier Labs) were crossed to obtain *db/db*::*E2f1*^{+/+} and *db/db*::*E2f1*^{-/-} mice and were previously described in (411). *CMV-CDK4*^{R24C} (506) and *Cdkn2a*^{-/-} (507) were described elsewhere and were crossed with *E2f1*^{-/-} mice to obtain *E2f1*^{-/-}::*CMV-CDK4*^{R24C} and *E2f1*^{-/-}::*Cdkn2a*^{-/-}. *E2f1* floxed (*E2f1*^{flox/flox}, Taconic Biosciences, NY, USA) mice were previously described (411, 412). The congenic mice carrying the floxed *E2f1* allele were thereafter mated with rat insulin II promoter (RIP)-Cre mice (508) and then further intercrossed to generate pure mutant RIPcre^{Tg/+}::*E2f1*^{flox/flox} mice. A PCR genotyping strategy was subsequently used to identify RIPcre^{+/+}::*E2f1*^{flox/flox} (*E2f1*^{flox/flox}), RIPcre^{Tg/+}::*E2f1*^{+/+} (RIPCre/+), and RIPcre^{Tg/+}::*E2f1*^{flox/flox} (*E2f1*^{β-/-}) mice.

Metabolic phenotyping experiments were performed according to the EMPRESS protocols. Intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (ipGTT and ITT, respectively) were performed as previously described (419, 509) on 16-hr-fasted animals for ipGTT and 5-hr-fasted animals for ITT. Glycemia was measured using the Accu-Check Performa (Roche Diagnostics). Circulating insulin levels were measured using the mouse Insulin ELISA kit (Merckodia).

Immunofluorescence, Immunohistochemistry and Morphometry. Immunofluorescence

and immunohistochemistry were performed exactly as described previously (419, 509). Pancreatic tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned at 5 μ m. For immunofluorescence microscopy analyses, after antigen retrieval using citrate buffer, 5- μ m formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) pancreatic sections were incubated with the indicated antibodies. Immunofluorescence staining was revealed by using a fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (for E2f1; Santa Cruz), Alexa-conjugated anti-mouse (for glucagon co-staining with E2f1) or anti-guinea pig (for insulin co-staining with E2f1) secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst. For morphometric analysis, three to ten animals from each genotype were analyzed, and images were processed and quantified using ImageJ software by an observer blinded to experimental groups.

Pancreatic Islet Studies. For mouse islet studies, pancreata were digested by type V collagenase (C9263; 1.5 mg/ml) for 10 min at 37°C as described previously (509). Briefly, after digestion and separation in a density gradient medium, islets were purified by handpicking under a microscope and cultured during 16 hours before subsequent analysis. For glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) tests, approximately twenty islets were exposed to either 2.8 mM or 20 mM glucose in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer containing 0.5% fatty-acid-free Bovine Serum Albumin (BSA). Insulin released in the medium was measured 1 hr later using the mouse insulin ELISA kit (Merckodia). For expression studies, mouse isolated islets were snap-frozen in liquid nitrogen before RNA extraction. Human pancreatic tissue was harvested from brain-dead, non-diabetic adult human donors (see [Supplementary Table S1](#) for donor information). Isolation and islets culture were performed as described elsewhere (510). Human islets were treated for 48 hours with DMSO 0.1% or HLM006474 at 10 μ M. Data are expressed as a ratio of total insulin content. For mRNA and protein quantification, human islets were isolated as described above and snap-frozen for further processing.

Cell Culture and Pharmacological Treatments. Min6 cells (AddexBio) were cultured in DMEM (Gibco) with 15% fetal bovine serum, 100 mg/ml penicillin-streptomycin, and 55 mM beta-mercaptoethanol. Cells were treated with Trichostatin A (TSA) at 0.5 μ M and subjected to GSIS or RNA extraction 16 hr later. Min6 cells were treated with HLM006474 (10 μ M) or DMSO 0.1% (427, 428) for 48 hr before GSIS assay or RNA extraction.

RNA extraction, qPCR and RNA-Sequencing. Total RNA was extracted from cells and tissues using trizol reagent (Life Technologies) as described previously. mRNA expression

was measured after reverse transcription by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with FastStart SYBR Green master mix (Roche) using a LightCycler Nano or LC480 instruments (Roche). qRT-PCR results were normalized to endogenous cyclophilin reference mRNA levels. The results are expressed as the relative mRNA level of a specific gene expression using the formula $2^{-\Delta Ct}$. The complete list of primers is presented in [Supplementary Table S2](#). For RNA sequencing, total RNA was extracted from Min6 cells or pancreatic islets using the RNeasy Plus Microkit (Qiagen) following manufacturer's instructions. RNA quality was verified using RNA 6000 nanochips on the Agilent 2100 bioanalyzer. Purified RNA (50ng) with RNA integrity number ≥ 6.5 was subsequently used for library preparation (TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit, Illumina) and sequenced on a HiSeq2500 system (Illumina). 3 biological replicates per condition were sequenced using paired-end mode. A mean of 54 million paired-end reads of 75 bp were generated for each sample. After initial checks and validation of sequence quality, RNA-seq reads were aligned to the mouse reference genome (mm10) using TopHat2. Subsequently, both quantification and annotation of the reads were performed using Bioconductor package Rsubread. Finally, the differential gene expression analyses were performed using Bioconductor package DESeq2. Using a $P < 0.05$ adjusted for multiple comparisons as threshold, we then performed pathway analysis using Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Qiagen), Metascape (432) and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA; <http://software.broadinstitute.org/gsea/>).

Chromatin immunoprecipitation and ChIP sequencing. ChIP experiments were performed on formaldehyde-fixed Min6 cells. Briefly, $20 \cdot 10^6$ Min6 cells were treated with formaldehyde at a final concentration of 1% to crosslink DNA and protein complexes during 10 min. The reaction was stopped by the addition of glycine (0.125 M) during 5 min. Cells were lysed and DNA-protein complexes were sheared using the Bioruptor Pico (Diagenode, ref B01060010) for 8 minutes. The sheared chromatin was immunoprecipitated with either the non-specific antibody IgG (Santa Cruz, sc2025), H3K4me3 (Active motif, #61379), H3K27me3 (Active motif, #61017) or H3K27ac (Active motif, #39685). 1 ng of eluted and purified DNA was used to prepare DNA sequencing library with the Nextflex rapid DNA seq kit 2.0 (Perkin Elmer, NOVA-5188-01) on the NextSeq 500 system (Illumina) using single read 100 base pairs mode. The demultiplexing of sequence data (from BCL files generated by Illumina sequencing systems to standard FASTQ file formats) was performed using bcl2fastq Conversion Software (Illumina; version 2.20). Trimming of residuals adapters and low quality reads was performed using TrimGalore (version 0.4.5). Subsequently, sequence reads from FASTQ files were mapped to the mouse genome (mm10) using Bowtie2 Aligner (version 2.3.5.1). Finally, peak-calling was performed with MACS2 software (version 2.2.7.1). Further bioinformatic analyses of the public data sets

and those of this study were performed using the open web-based platform Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu>). A list of ChIP-seq and RNA-seq data sets used in this study can be found in [Supplementary Table S3](#).

Rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein (RIME).

Chromatin Immunoprecipitation: Min6 cells were transfected with an empty vector (pCMV-FLAG, negative control) or a vector encoding human *E2F1* gene coupled to a FLAG tag for immunoprecipitation (pCMV-hE2F1-FLAG). 48h after transfections, cells were fixed in 1% formaldehyde for 15 min and quenched with 0.125 M glycine. Chromatin was isolated by the addition of lysis buffer, followed by disruption with a Dounce homogenizer. Lysates were sonicated and the DNA sheared to an average length of 300-500 bp. Genomic DNA (Input) was prepared by treating aliquots of chromatin with RNase, proteinase K and heat for de-crosslinking, followed by ethanol precipitation. Pellets were resuspended and the resulting DNA was quantified on a NanoDrop spectrophotometer. Extrapolation to the original chromatin volume allowed quantitation of the total chromatin yield. An aliquot of chromatin (150 ug) was precleared with protein G agarose beads (Invitrogen). Proteins of interest were immunoprecipitated using 15 ug of antibody against FLAG (#F9291) and protein G magnetic beads. Protein complexes were washed then trypsin was used to remove the immunoprecipitate from beads and digested the protein sample. Protein digests were separated from the beads and purified using a C18 spin column (Harvard Apparatus). The peptides were vacuum dried using a speedvac.

Mass Spectrometry: Digested peptides were analyzed by LC-MS/MS on a Thermo Scientific Q Exactive Orbitrap Mass spectrometer in conjunction with a Proxeon Easy-nLC II HPLC (Thermo Scientific) and Proxeon nanospray source. The digested peptides were loaded on a 100 micron x 25 mm Magic C18 100Å 5U reverse phase trap where they were desalted online before being separated using a 75 micron x 150 mm Magic C18 200Å 3U reverse phase column. Peptides were eluted using a 90 minutes gradient with a flow rate of 300nl/min. An MS survey scan was obtained for the m/z range 300-1600, MS/MS spectra were acquired using a top 15 method, where the top 15 ions in the MS spectra were subjected to HCD (High Energy Collisional Dissociation). An isolation mass window of 1.6 m/z was for the precursor ion selection, and normalized collision energy of 27% was used for fragmentation. A five second duration was used for the dynamic exclusion.

Database Searching: Tandem mass spectra were extracted by Unspecified version Unspecified. Charge state deconvolution and deisotoping were not performed. All MS/MS samples were analyzed using X! Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE

(2013.02.01.1)). X! Tandem was set up to search the mouse-F-_20150428_KK0vMm database (unknown version, 90758 entries) the cRAP database of common laboratory contaminants (www.thegpm.org/crap; 114 entries) plus an equal number of reverse protein sequences assuming the digestion enzyme trypsin. X! Tandem was searched with a fragment ion mass tolerance of 20 PPM and a parent ion tolerance of 20 PPM. Carbamidomethyl of cysteine was specified in X! Tandem as a fixed modification. Glu->pyro-Glu of the n-terminus, ammonia-loss of the n-terminus, gln->pyro-Glu of the n-terminus, deamidated of asparagine and glutamine, oxidation of methionine and tryptophan, dioxidation of methionine and tryptophan and acetyl of the n-terminus were specified in X! Tandem as variable modifications.

Criteria for Protein Identification: Scaffold (version Scaffold_4.5.3, Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS/MS based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they exceeded specific database search engine thresholds. X! Tandem identifications required at least $-\text{Log}(\text{Expect Scores})$ scores of greater than 1.5. Protein identifications were accepted if they contained at least 1 identified peptides. Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Proteins sharing significant peptide evidence were grouped into clusters.

List Filtering: Final list generation was done by taking all proteins with a spectral count of five and above from each replicate reaction and comparing them in a venn-diagram against IgG control replicates. Proteins unique to both experimental replicates were then applied to the PANTHER database for protein ontology results.

Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm s.e.m. Data are derived from multiple experiments unless stated otherwise. Statistical analysis was performed using a two-tailed unpaired *t*-test or one-way or two-way ANOVA with Tukey's post hoc test comparing all groups to each other, using GraphPad Prism 7.0 software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

Results

Increased alpha to beta cell ratio in the pancreas of germline *E2f1*-deficient mice.

To investigate the contribution of *E2f1* to islet morphology, we performed immunofluorescence staining of insulin and glucagon in the pancreas of wild-type and global *E2f1* knock-out mice. The detailed analysis of *E2f1*-deficient pancreas revealed a decreased proportion of ins+ β -

cell and a concomitant expansion of the glu⁺ α -cell percentage per islet in chow-fed 16 week-old animals, as demonstrated through the quantification of insulin and glucagon positive cells in *E2f1*^{+/+} and *E2f1*^{-/-} pancreas (Figures 1A-B, Supplementary figures S1G). In the *db/db* background, *E2f1* deficient animals displayed a further increase of the α -cell number per islet, while exhibiting an even lower β -cell count compared to *db/db::E2f1*^{+/+} controls (Figures 1 C-D).

To test whether *bona fide* regulators of E2F1 activity could rescue the altered α -to- β -cell ratio observed in *E2f1*^{-/-} mice, we used 2 different genetically-engineered mouse models (Supplementary figures S1A). First, the R24C mouse model of CDK4 hyperactivation (CMV-CDK4^{R24C}) constitutively expresses a mutant CDK4 protein that restores β -cell mass and function during diabetes development (424, 511, 512). As previously observed (424), α -to- β -cell ratio was decreased in *CMV-Cdk4*^{R24C} pancreas (Supplementary figures S1B, S1C and S1G). We then generated compound mutant mouse models with both *E2f1* deficiency and overactive CDK4 (*E2f1*^{-/-::CMV-Cdk4}^{R24C}). Interestingly, the increased β -cell number observed in *CMV-Cdk4*^{R24C} pancreas was blunted in *E2f1*^{-/-::CMV-Cdk4}^{R24C} mice, with a concomitant increase of glucagon immunofluorescent staining (Supplementary figures S1D and S1G). We replicated these data in the second model using *Cdkn2a*-deficient mice (*Cdkn2a*^{-/-;(507)}), an upstream regulator of the E2F1-CDK4-pRb signaling pathway involved in β -cell function (513-515). Although Glu⁺ and Ins⁺ immunofluorescent positive cell staining was conserved between *Cdkn2a*^{+/+} and *Cdkn2a*^{-/-} pancreas (Supplementary figures S1E and S1G), *E2f1*^{-/-::Cdkn2a}^{-/-} compound mutant mice displayed an altered α -to- β -cell ratio with a decrease of Ins⁺ and an increase Glu⁺ cell numbers, respectively (Supplementary figures S1F and S1G). Altogether, these results suggest a specific role of *E2f1* in maintaining pancreatic β cell numbers under normal conditions but also in a diabetic environment associated to glucose intolerance, insulin resistance and obesity.

β -cell specific *E2f1* deficiency impairs glucose tolerance, insulin secretion and alters α -to- β cell ratio.

To determine whether *E2f1* regulates insulin-producing β -cell fate and function in a cell-autonomous manner, we generated β -cell specific *E2f1* deficient mice by crossing *E2f1* floxed (*E2f1*^{fl/fl}) with RIP-Cre (*Rip-Cre*^{+/+}) mice (508). Quantitative RT-PCR showed a 91 % tissue-specific reduction in *E2f1* expression in pancreatic islets isolated from *E2f1* ^{β -/-} mice

(Supplementary figure S2A). β -cell specific deletion of *E2f1* was also confirmed at the protein level by immunofluorescence analysis (Supplementary figure S2B). *E2f1* ^{β -/-} mice had normal body weight (Supplementary figure S2C) and fasting glycemia when fed a chow diet (Supplementary figure S2D). When challenged with a bolus of glucose, *E2f1* ^{β -/-} mice exhibit glucose intolerance (Figures 2A-B), primarily due to decreased insulin secretion in response to glucose (Figure 2C) rather than defective insulin sensitivity (Figure 2D). GSIS experiments on mouse pancreatic islets isolated from *E2f1*^{fl/fl} and *E2f1* ^{β -/-} further confirmed insulin secretion defects in response to glucose (Figure 2E). Interestingly, an immunofluorescence analysis of sections from control and *E2f1* ^{β -/-} pancreas demonstrated increased glucagon-positive cells and an increased α -to- β -cell ratio in β -cell specific *E2f1* KO islets (Figures 2F-G). The number of cells per islet section remained unchanged between control and *E2f1* ^{β -/-} pancreas (Supplementary figure S2E). As observed in germline *E2f1* deficient mice (Figure 1), these data suggest that β -cell expression of *E2f1* is necessary to maintain insulin secretion and glucose homeostasis associated to normal α -to- β -cell ratio.

Loss of β -cell identity markers in *E2f1* deficient pancreatic islets

E2F1 is a transcription factor that controls gene expression in several cellular systems. In order to get a global view of the transcriptional mechanisms associated with the loss of *E2f1* expression in the β cell, we performed RNA sequencing (RNA-seq) in control (*E2f1*^{fl/fl}) and *E2f1* ^{β -/-} isolated islets. As expected, the floxed region of the *E2f1* gene spanning exon 2 and 3 was not covered in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets compared to *E2f1*^{fl/fl} isolated islets, indicating specific and efficient gene deletion through the *Cre* recombinase activity in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets (Supplementary figure S3A). The analysis of the transcripts revealed that 692 annotated genes were differentially expressed across the two groups (adjusted P Value (AdjP) <0.05). Interestingly, a vast majority of the genes were upregulated in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets (493 genes, Figure 3A and Supplementary Table S4), with only 199 down-regulated genes associated with the loss of *E2f1* expression in β cells (Figure 3A and Supplementary Table S4). This first observation suggests that *E2f1* expression is not only necessary to activate, but also to repress gene transcription within the β cell. Analysis of the RNA-seq data of downregulated genes with metascape software revealed an enrichment of gene networks involved in signal release, regulation of exocytosis and negative regulation of secretion (Figure 3B). Conversely, upregulated genes in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets were associated with the regulation of cell adhesion, inflammatory response and cytokine production (Figure 3C). To better understand the relationship between the observed metabolic phenotype (*i.e.* glucose

intolerance and defective insulin secretion), increased glu⁺ cells, decreased ins⁺ cells and *E2f1* deficiency, we filtered gene sets to focus on β - and α -cell genes being conserved between zebrafish, mouse and human (438). Notably, a total of 15 genes from 109 conserved genes (82 and 27 for α -cell and β -cell genes, respectively) were differentially expressed. Interestingly, most of the conserved β -cell genes were found to be decreased in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets (Figure 3D and Supplementary figure S3B), whereas most of the conserved α -cell genes were upregulated upon *E2f1* deficiency (Figure 3D and Supplementary figure S3C). Gene Set Enrichment Analysis (GSEA (516)) further confirmed an enriched signature of decreased expression of β -cell markers (Figure 3E) and conversely, an increased expression of α -cell markers in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets (Figure 3F). We further confirmed these changes in the expression of selected α - and β -cell markers at the transcriptional level by qPCR in an independent experiment: indeed we observed a strong decrease in transcript levels of *Pdx1*, *Mafa* ($p=0.13$), *Ins2*, *Pcsk9*, *Foxo1* and *Glp1r* in *E2f1* ^{β -/-} islets (Supplementary figure S3D). Conversely, α -cell specific Aristaless-related homeobox (*Arx*) mRNA levels were increased in *E2f1* ^{β -/-} islets (Supplementary figure S3E). Altogether these results suggest that the β -cell specific deletion of *E2f1* induces a transcriptional reprogramming characterized by a loss of β -cell identity genes associated to an increased expression of non β -cells markers.

The treatment with the E2F inhibitor HLM006474 inhibits glucose-stimulated insulin secretion and impairs β - and α -cell gene expression in Min6 cells and human islets.

To assess the effect of E2F1 activity on β -cell identity markers in human islets, we made use of the E2F pan-inhibitor HLM006474 previously shown to inhibit the binding of E2Fs to their DNA target genes (517) and E2F1 transcriptional activity (428). Consistent with our previous findings in HEK293 cells (428), a 48h treatment of Min6 cells with this inhibitor triggered a decrease in *E2f1* transcriptional activity, as measured by transient transfection experiments using an E2F reporter gene (Figure 4A). In addition, the treatment of Min6 cells with this inhibitor induced a marked decrease in glucose-stimulated insulin secretion (Figure 4B) and in the expression of several β -cell markers, including *Ins1*, *Pdx1*, *Pax4* and *Nkx2.2* (Figure 4C). The treatment of human islets with the E2F inhibitor for 48 hours also decreased GSIS (Figure 4D) and β -cell marker expression levels with a concomitant increase in the expression of α -cell genes (Figure 4E). Therefore, the pharmacological inhibition of E2F activity impairs β -cell function and gene expression in both mouse cell line and human islets, suggesting that E2F1 activity is also required in human islets to maintain proper insulin secretion and β -cell identity genes, as observed in mice.

Maintenance of β -cell identity is dependent on histone deacetylase and E2F1 activities.

Our transcriptome analysis revealed a 2.5-fold more up- than downregulation of global gene expression in $E2f1^{\beta-/-}$ isolated islets. Comparative analysis of log₁₀ transcription levels (Log₁₀(TPM+1)) of up- and downregulated genes values demonstrated that the expression of upregulated genes in $E2f1^{\beta-/-}$ islets was significantly increased upon $E2f1$ deficiency compared to wild-type controls whereas the expression of downregulated genes was not significantly modulated (Figure 5A). Considering that E2f1 could play a dual role in the regulation of gene expression in pancreatic β cells, we postulated that this mechanism could be related to a distinct epigenomic profile within promoter of genes that are up- and down-regulated in $E2f1^{\beta-/-}$ islets. Using a recently published chromatin-state segmentation model (501), we probed the activation/repressive level of these promoters by monitoring several epigenome marks such as active and poised promoters (tri-methylation of lysine 4 in histone H3 [H3K4me3]) and enhancers (acetylation of lysine 27 in histone H3 [H3K27ac]). Intersecting publicly available data of chromatin immunoprecipitation followed by next-generation sequencing (ChIP-seq) from healthy C57Bl6/J mouse pancreatic islets (GSE 110648 (501)) and our RNA-seq data, we grouped up- and down regulated genes according to their chromatin state (Figure 5B and Supplementary Table S4). 61% of the upregulated genes in $E2f1^{\beta-/-}$ pancreatic islets were associated to a silent chromatin state in healthy C57Bl6/J mouse pancreatic islets characterized by bivalent H3K4me3/H3K27me3 and Polycomb-repressed (H3K27me3) marks. Conversely, 82% of the down-regulated genes showed an enrichment in active chromatin state characterized by RNA-Pol2 recruitment, H3K4me3 and H3K27ac histone marks.

While H3K4me3, H3K27ac and H3K27me3 ChIP-seq data were available for mouse islets, we then performed ChIP-seq experiments in Min6 cells as a surrogate of β cell. H3K4me3, H3K27ac and H3K27me3 ChIP-seq signals were thus interrogated within promoter (centered to transcription start site [TSS] +/- 1 kb) of up- and downregulated genes both in Min6 cells and mouse pancreatic islets (Figures 5C-D and Supplementary figures 4A-B). H3K4me3 as well as H3K27ac signals were stronger within promoter of genes that are downregulated in $E2f1^{\beta-/-}$ isolated islets compared to upregulated genes, both in Min6 cells and mouse pancreatic islets (Figure 5C and Supplementary figures 4A-B). Conversely, H3K27me3 ChIP-seq signals were lower in the promoter region of downregulated genes compared to upregulated genes (Figure 5D and Supplementary figures 4A-B). We then analyzed our integrated RNA-seq/ChIP-

seq data using the “upstream regulator analysis” function of Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to identify potential contributors that could associate to the phenotype of *E2f1*^{β-/-} isolated islets, which would be related to epigenomics. Among the most significant upstream regulators of the upregulated genes, the HDAC inhibitor trichostatin A (TSA) signaling pathway was predicted to be significantly activated (Table 1), suggesting that HDAC could regulate an E2f1-dependent gene program. Consequently, having shown that (i) the levels of upregulated genes were significantly increased upon β-cell specific *E2f1* deletion (Figure 5A), (ii) H3K27ac signal was weaker within the promoter region of upregulated genes compared to downregulated genes (Figure 5C) and (iii) TSA may modulate the E2f1-dependent epigenome, we next hypothesized that E2f1 could repress the expression of upregulated genes through an HDAC (histone deacetylase)-dependent mechanism. To ascertain this hypothesis, Min6 cells were treated during 16h with the pan-HDAC inhibitor trichostatin A (TSA, 0.5 μM). Interestingly, via RNA-seq, we evidenced that the expression of upregulated genes in *E2f1*^{β-/-} islets was significantly increased in response to TSA treatment compared to vehicle-treated cells whereas the expression of downregulated genes was not significantly modulated (Figure 5E), as observed in *E2f1*^{β-/-} islets. These results showed that the pharmacological HDAC inhibition in Min6 cells partly mimicked the effects observed in *E2f1*^{β-/-} pancreatic islets on the expression of upregulated genes, suggesting that an E2f1/HDAC complex could contribute to regulate the expression of these genes in the β cell. Conversely, these results also indicated that E2f1-dependent downregulation of genes probably occurred through an HDAC-independent mechanism. To go further in the characterization of the molecular mechanisms linking E2f1 to HDAC in the β cell, we measured the acetylation levels of promoter (TSS +/- 1 kb) of up- and down-regulated genes in Min6 cells by probing H3K27ac level in response to TSA treatment through ChIP-seq experiments. Interestingly, TSA treatment increased H3K27ac levels within the promoter of upregulated genes compared to vehicle-treated cells, whereas H3K27ac levels were less affected within the promoter of down-regulated genes (Figure 5F). In addition, H3K27me3 ChIP-seq signals were lower in the promoter region of upregulated genes upon TSA treatment (Figure 5G), whereas no effects were observed upon TSA treatment on downregulated genes. These results were in accordance with gene expression analysis (Figure 5E) and support a role for HDAC activity in the transcriptional repression of E2f1 target genes in β cell whereas HDAC enzymes may probably not be involved in the E2f1-mediated transcriptional activation.

Interactomic analysis by rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein (RIME) identifies HDAC1 and HDAC6 as partners of E2f1 in β cell.

We next asked whether E2f1 could directly interact with HDAC enzymes in β cell. Rather than addressing this using coimmunoprecipitation strategies targeting a series of specific HDAC, we decided to follow a global interactomic approach by using the rapid immunoprecipitation mass spectrometry of endogenous protein (RIME) technology (518) enabling the identification of E2f1-associated proteins at proteome-wide level in Min6 cells. Consequently, E2f1 was over-expressed in Min6 cells through transfection of a plasmid encoding E2f1 cDNA fused to Flag tag followed by an anti-Flag-based E2f1 immunoprecipitation in order to identify E2f1 interacting proteins through mass spectrometry analysis. RIME analysis revealed that 245 peptides were found to be associated with E2f1 in Min6 cells (Table 2 and Supplementary figure 5A). As expected, E2f1 peptides were the most significantly enriched peptides thus validating our approach. Interestingly, peptides from HDAC6 and HDAC1 were also significantly enriched providing evidence that these two HDAC enzymes were associated with E2f1 in Min6 cells at the chromatin level (Table 2). Altogether, these results suggest that E2f1-mediated transcriptional repression may occur through interactions with HDAC1 and/or HDAC6.

Discussion

In the present study, we show that the transcription factor E2F1 plays an essential role in maintaining β -cell function and identity through the control of transcriptomic and epigenetic programs within the pancreatic islets. Germ-line as well as β -cell specific *E2f1* deficient mice exhibit impaired glucose homeostasis and decreased β -cell functions that are associated to a gene expression reprogramming. A detailed analysis of the transcriptome and epigenome of the pancreatic islet reveals that E2f1 is necessary to maintain several key genes for cell adhesion and inflammatory processes in a repressive state through the maintenance of epigenomic marks including H3K27me3 (Figure 5). We showed that the β -cell specific loss of *E2f1* function also leads to an altered α -to- β -cell ratio, while maintaining islet size, associated to insulin secretion defects in response to glucose and affects β -cell identity maintenance. In addition, through the use of the E2Fs inhibitor HLM006474, which selectively disrupts the binding of E2Fs to its target genes (Figure 4 and (427, 428)), we demonstrated here that a pharmacological intervention lowering the E2F1 transcriptional activity could mimic the genetic effects of *E2f1* deficiency on the maintenance of β -cell identity and function, in mouse β -cell lines and human islets. Indeed, the treatment of human islets with this compound not only blunts β -cell function by impairing GSIS, but also leads to an alternative transcriptional program

that affects the expression of α - and β -cell markers. Our results, associated to those showing that E2F1 overexpression stimulates β -cell proliferation and function (418), suggest that carefully targeting this pathway might be of interest for the maintenance of β -cell functions in the context of diabetes.

Our study is the first one to demonstrate a direct, cell-autonomous contribution of E2f1 in controlling not only GSIS but also β -cell identity maintenance, without affecting the pancreatic islet cell number. The role of E2F1 in the control of cell cycle and proliferation has been extensively studied, particularly in the context of cancer (391). However, its function in non-proliferating fully differentiated cells, including β cells, remains to be precisely deciphered. The observation that cell cycle regulators, including E2F1, are expressed in cells that are not proliferating, suggest that they may be involved in adaptive pathways that are independent of cellular proliferation. We and others have demonstrated that this pathway plays a key role in post-natal β -cell proliferation (417, 453, 454), glucose homeostasis and insulin secretion (418, 419, 462). Studies also revealed that the Cdk4-E2F1-pRb pathway controls the fate of pancreatic progenitors through the transcriptional control of the expression of *Ngn3* and *Pdx1* as well as Pdx1 protein stability (421, 423, 519). Most of these studies, including those from our group, were performed using germ-line *E2f1* deficient mice, which precludes to ascertain a cell-autonomous role of E2f1 in the endocrine pancreas and β -cell functions. To better appreciate the specific role of E2F1 in β cells, we specifically knocked-down *E2f1* in the β cell using the Cre/loxP technology. Although we cannot rule out an early role for E2f1 in pancreatic progenitors due to the use of the RIP-Cre mice (508), our data demonstrate that E2f1 expression within the β cell is necessary to maintain a proper gene expression to regulate insulin secretion and glucose homeostasis.

The complexity of E2F1 biology resides in the fact that it can positively or negatively regulate the expression of its target genes. Our data suggest that E2F1 is part of a repressor complex that regulates β cell identity. In line with this, we observe that most of the genes with altered expression in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets were upregulated, suggesting that the repressive effects of E2F1 are key in maintaining β -cell identity and subsequent β -cell function. Accordingly, repression of non β -cell programs is crucial for maintaining β -cell identity. *Pdx1* (503), *Pax6* (69), *Nkx6.1* (471) and *Nkx2.2* (500) are key transcription factor required to maintain gene repression of non- β -cell programs. Interestingly, *Nkx6.1* mRNA levels are decreased in *E2f1* ^{β -/-} isolated islets, suggesting that E2F1 could modulate β cell functions through *Nkx6.1* regulation. Chromatin regulators and epigenomic features play important roles in the control

of β -cell identity and plasticity (520-522). Indeed, the modulation of islet enriched transcription factor activity, including Pdx1 or Nkx2.2, involves their interaction with coregulators such as Dnmt1, Dnmt3a or Hdac1 (523-525) or their accessibility to chromatin, as demonstrated for the β -cell specific deletion of protein arginine methyltransferase 1 (Prmt1) that results in the loss of β -cell identity and diabetes development (526). In addition, recent studies also indicate that loss of Polycomb silencing in human and mouse β -cells contributes to loss of β -cell identity in diabetes (501). Indeed, the β -cell specific deletion of *Eed*, a component of the Polycomb repressive complex (PRC)-2, triggers β -cell dysfunctions, dedifferentiation and diabetes development associated to chromatin-state-associated transcriptional dysregulation (501). The findings that loss of PRC2 activity induces β -cell plasticity through epigenomic reprogramming at both active and silent genes suggest that maintaining proper and specific histone marks and chromatin state at precise loci is crucial to maintain normal β -cell functions and avoid T2D development. Interestingly, most of the upregulated genes in *E2f1* ^{β -/-} pancreatic islets were characterized by bivalent H3K4me3/H3K27me3 and Polycomb-repressed (H3K27me3) marks. In addition, epigenomic interventions triggering ectopic acetylation and gene derepression contribute to β -cell dysfunctions. Indeed, blocking HDAC activity through the use of the HDAC inhibitor SAHA, impairs glucose intolerance in mice fed a HFD (501). Here we show that the loss of *E2f1* function triggers transcriptional dysregulation of specific genes that are in a bivalent (*i.e.* H3K4me3/H3K27me3 and Polycomb-repressed (H3K27me3) marks) and active (*i.e.* RNA-Pol2 recruitment, H3K4me3 and H3K27ac histone marks) state in healthy pancreatic islets, suggesting an ectopic acetylation in the promoter region of upregulated genes in *E2f1* ^{β -/-} islets and decreased activation of the promoter region of downregulated genes. Accordingly, the use of the HDACi TSA also impairs the expression of genes regulated by *E2f1* in pancreatic islets. Although E2F1 is a ubiquitous transcription factor that is weakly expressed within β cell compared to *bona fide* β -cell genes, we speculate that this transcriptional regulator may cooperate with β -cell transcription factors and/or the chromatin machinery such as HDAC or the PRC2 complex to integrate some signals necessary for β -cell maintenance in physiological conditions. Since E2F1 regulates gene expression through its interaction with repressor complexes including pRb, SWI/SNF and HDACs (527-529), our finding that E2F1 mediates repression of non β -cell programs deserves deeper investigations to identify the E2F1 complexes that can trigger these transcriptomic and epigenomic effects in the β -cell and their physio(patho)logical consequences.

In summary, the present data highlight that E2F1 transcriptional activity within pancreatic islets is key for maintaining glucose homeostasis and insulin secretion through the regulation of key β -cell identity genes and the repression of non β -cell programs, both in mouse and human

islets. The observation that E2F1 levels are decreased in human T2D islets (436) suggests that a reduced E2F1 expression or activity may contribute to β -cell failure in diabetes.

Author contributions. F.O., C.B., X.G., M.M., C.C., E.C., N.R., L.R. and S.A.H. contributed to the *in vivo* and cellular experiments. E.D., S.A., L.B., M.D. and A.B. performed the RNA-seq and ChIP-seq experiments and analysis. P.D.D., Z.B., P.M., L.F., J.K.C. and F.P. provided reagents and data. P.F. discussed the results from the study. J.-S.A. designed the study, supervised the project and contributed to experiments and/or their analysis and the funding of this project. F.O., C.B., N.R., P.F., A.B. and J.-S.A. wrote and/or edited the manuscript.

Acknowledgements. We thank Dr Patrick Collombat and Dr Raphael Scharfmann and members of the INSERM U1283/CNRS UMR 8199 for helpful discussions, and Céline Gheeraert for excellent help with ChIP experiments. Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-416 (ECIT Islet for Basic Research program). The authors thank the Experimental Resources platform from Université de Lille, especially Cyrille Degraeve, Yann Lepage, Mélanie Besegher and Julien Devassine for animal care. We thank the Department of Histology from the Lille Medicine Faculty, particularly M.H. Gevaert and R.M. Siminski, for histological preparations. This work was supported by grants from « European Genomic Institute for Diabetes » E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 and Equipex 2010 ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM' Genomics platform, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir I-SITE ULNE / ANR-16-IDEX-0004 ULNE (to P.F., A.B. and J-S. A), Agence Nationale pour la Recherche (BETAPLASTICITY, ANR-17-CE14-0034 to J-S. A.), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to J-S.A.), European Commission, European Research Council (GEPIDIAB 294785 to P.F.), INSERM, CNRS, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche sur le Diabète (to J-S.A.), Université de Lille (to F.O., C.B., X.G., N.R. and J-S.A.), I-SITE ULNE (EpiRNAdiab Sustain grant to J-S.A.), Conseil Régional Hauts de France and Métropole Européenne de Lille (to X.G., N.R. and J-S.A.), F.E.D.E.R. (Fonds Européen de Développement Régional, to N.R., P.F. and J-S.A.) and Société Francophone du Diabète (to S.A.H. and J-S.A).

Conflict of interest. The authors declare no competing financial interests.

Figure legends

Figure 1. Altered α -to- β cell ratio in germline *E2f1*-deficient mice. (A) Representative immunofluorescent staining of insulin and glucagon in pancreatic sections from 16 week old global *E2f1* knockout male mice (*E2f1*^{-/-}) compared to littermate controls (*E2f1*^{+/+}). (B) Quantification of glucagon (Glucagon +) and insulin (Insulin +) labelled cells from (A, n=3 per genotype). (C) Representative immunofluorescent staining of insulin and glucagon in pancreatic sections from 14 to 15 week old global *E2f1* knockout male mice in a *Db/Db* background (*Db/Db::E2f1*^{-/-}) compared to littermate control (*Db/Db::E2f1*^{+/+}). (D) Quantification of glucagon (Glucagon +) and insulin (Insulin +) labelled cells in *Db/Db::E2f1*^{-/-} and *Db/Db::E2f1*^{+/+} mice calculated from C (n=4 per genotype). Values in B and D are expressed as mean \pm s.e.m. and were analysed by two-tailed unpaired *t*-test. **p* < 0.05; ***p*<0.01.

Figure 2. The β cell-specific deletion of *E2f1* impairs glucose tolerance and insulin secretion in mice. (A) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed on *E2f1* ^{β -/-} (n=12), RIP-Cre^{+/-} (n=7) and *E2f1*^{fl/fl} (n=8) male mice at 12 weeks of age. (B) Area under the curve (AUC) calculated from (A). (C) Plasma insulin levels at 0 and 30 min after intraperitoneal glucose injection in *E2f1* ^{β -/-} (n=18), RIP-Cre^{+/-} (n=15) and *E2f1*^{fl/fl} (n=6) male mice at 12 weeks of age. (D) Intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) of *E2f1* ^{β -/-} (n=8), RIP-Cre^{+/-} (n=8) and *E2f1*^{fl/fl} (n=8) male mice at 12 weeks of age. (E) Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) at indicated glucose concentrations on islets isolated from *E2f1* ^{β -/-} (n=3) and control *E2f1*^{fl/fl} (n=5) male mice. (F) Representative immunofluorescent staining of insulin and glucagon in pancreatic sections from 3 months old *E2f1* ^{β -/-} and control *E2f1*^{fl/fl} male mice. (G) Ratio of glucagon labelled cells (Glucagon +) over insulin labelled cells (Insulin +) in *E2f1* ^{β -/-} and *E2f1*^{fl/fl} male mice calculated from (F). All values are expressed as mean \pm s.e.m. and were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's test (A, C, D), two-way ANOVA with Tukey's test (B, E, F) or two-tailed unpaired *t*-test (H). **p* < 0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.

Figure 3. RNA-seq analysis of *E2f1* β cell-specific knockout islets reveal altered transcriptional programs. (A) Volcano plot providing adjusted P value (*i.e.*, FDR, false discovery rate) and fold change for all gene transcripts in islets from *E2f1* ^{β -/-} mice. Genes that are differentially expressed compared to *E2f1*^{fl/fl} with an AdjP<0.05 are indicated by two-level

color coding. 199 downregulated protein-coding genes are highlighted in red. 493 upregulated protein-coding genes are highlighted in green (n=3 per genotype for RNA-seq analysis). **(B-C)** Metascape enrichment analysis of downregulated (B) and upregulated (C) genes in *E2f1*^{β-/-} compared to *E2f1*^{fl/fl}. Histogram of enriched terms across input gene lists are shown. **(D)** Evolutionary conserved α- and β-cell markers were recovered from Tarifeno-Saldivia E *et al.* (438) and were used to filter our RNA-seq dataset. Volcano plots provides AdjP values (*i.e.*, FDR, false discovery rate) and fold change for both α- and β-cell marker transcripts in islets from *E2f1*^{β-/-} mice. The α- and β-cell markers are displayed as blue triangle and red square, respectively. Gene symbols of differentially expressed α- and β-cell markers are displayed (AdjP<0.05). **(E-F)** Enrichment plot from Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was conducted with 82 probe sets specifically expressed in α-cells (E) and with 26 probe sets specifically expressed in β-cells (F).

Figure 4. The pharmacological inhibition of E2f transcription factor activity induces a loss of β-cell function in mouse and human islets. **(A)** Min6 cells were transiently co-transfected with the E2F-RE-Tk promoter luciferase construct in the absence (PCDNA3) or presence of E2F1:DP1 heterodimer (E2F1/DP1) and were subsequently treated with DMSO (0.1 %, 48h) or HLM006474-treated (10 μM, 48h). Results were normalized to β-galactosidase activity. **(B)** Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) at indicated glucose concentration on DMSO (0.1 %, 48h) or HLM006474-treated (10 μM, 48h) Min6 cells (n=6). **(C)** qPCR-based analysis of β-cell specific mRNA expression in DMSO (0.1 %, 48h) or HLM006474-treated (10 μM, 48h) Min6 cells (n=3). **(D)** Glucose stimulated insulin secretion (GSIS) at indicated glucose concentration on human islets treated with DMSO (0.1 %, 48h) or HLM006474 (10 μM, 48h) (n=3) (see supplementary Table S1 for donor information). **(E)** qPCR-based analysis of β-cell specific (*INS*, *PDX1*, *PAX4*, *MAFA* and *NEUROD1*) and α-cell specific (*ARX* and *GCG*) mRNA expression in DMSO (0.1 %, 48h) or HLM006474-treated (10 μM, 48h) human islets (n=3). Data are represented as mean ± s.e.m. and were analyzed by two-way ANOVA with Tukey's test (A, B, D) and two-tailed unpaired *t*-test (C, E). *p < 0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

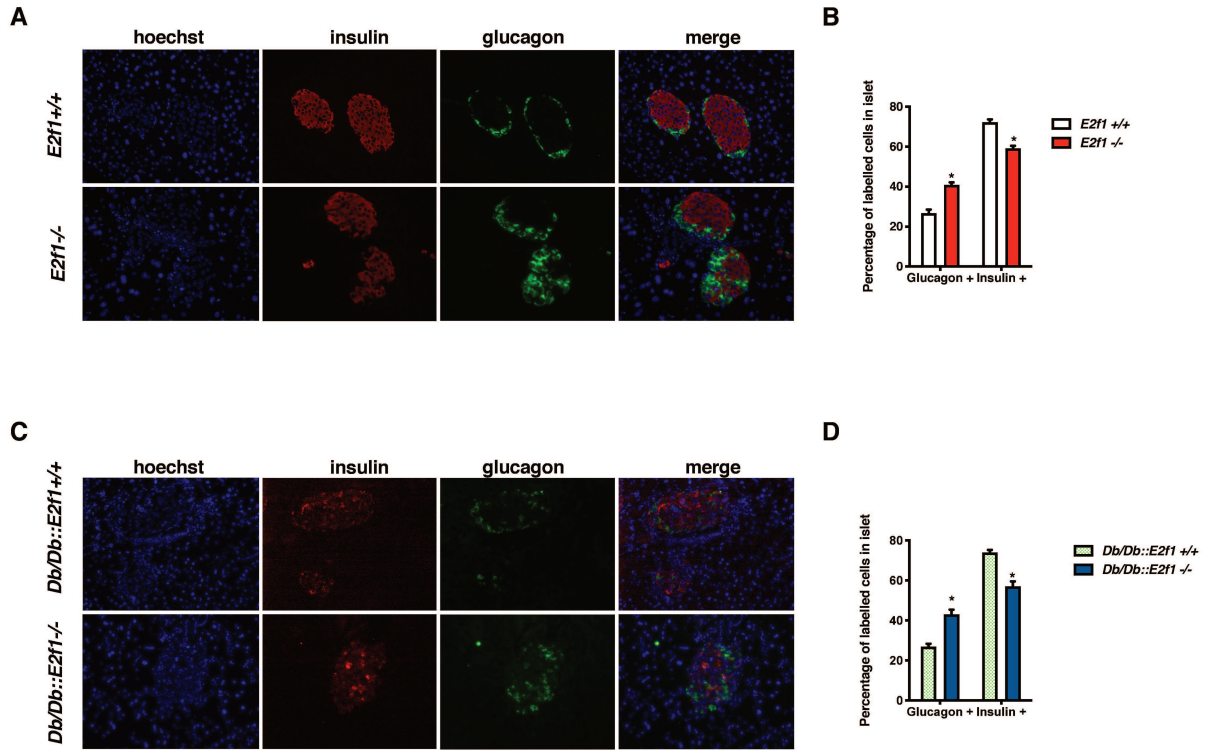
Figure 5. The transcriptional repression of *E2f1* β-cell target genes occurs through an HDAC-dependent mechanism. **(A)** Expression level of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes both in pancreatic islets from control (WT) and *E2f1* knock-out (*E2f1*^{β-/-}) mice. Results are displayed as Log₁₀(TPM+1) calculated from TPM obtained from RNA-seq data. Data are represented as mean s.e.m and were analyzed by unpaired *t*-test (**** p<0.0001). **(B)** Pie-

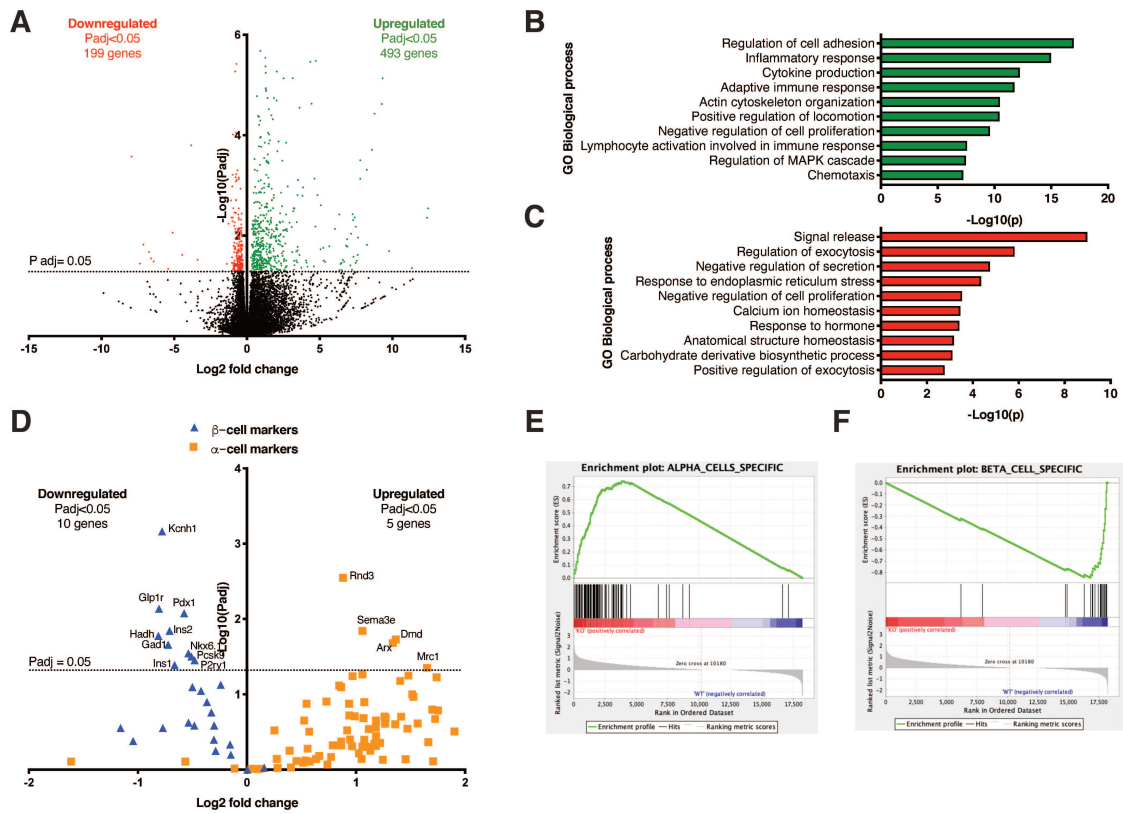
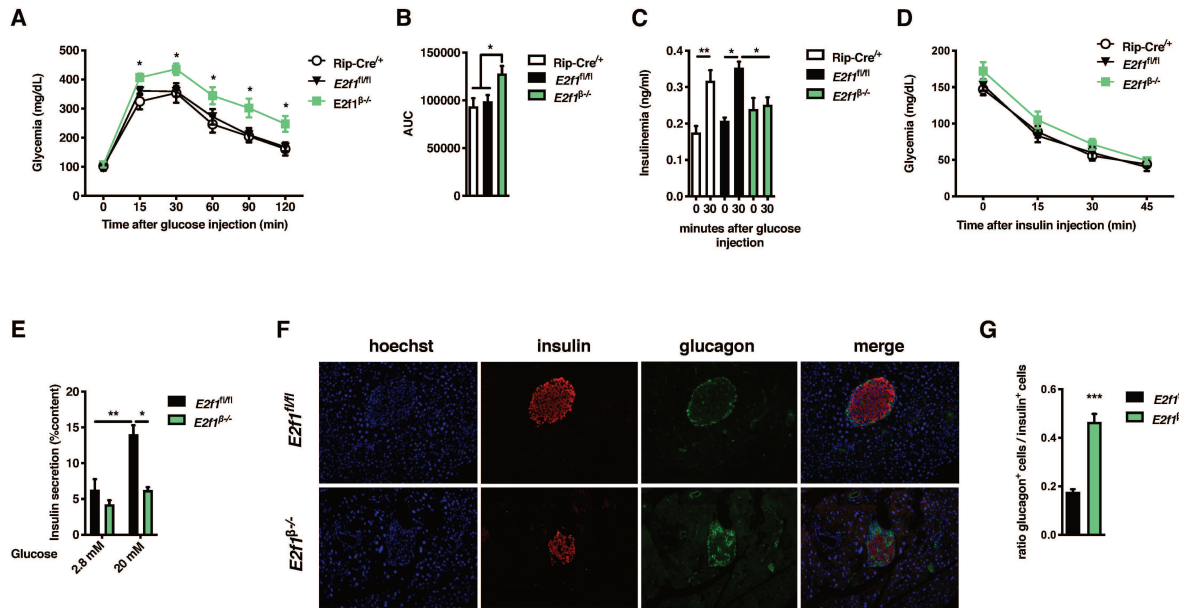
chart displaying chromatin state of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes according to pancreatic islets genes-associated chromatin state stratification from Lu TT *et al.* (501) **(C)** H3K4me3 and H3K27ac ChIP-seq mean signal within promoter (centered to TSS +/- 1kb) of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes both in Min6 cells and mouse pancreatic islets (501). **(D)** H3K27me3 ChIP-seq mean signal within promoter (centered to TSS +/- 1kb) of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes both in Min6 cells and mouse pancreatic islets (501). **(E)** Expression level of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes in TSA-treated Min6 cells. Results are displayed as Log10(TPM+1) calculated from TPM obtained from RNA-seq data. Data are represented as mean ± s.e.m and were analyzed by unpaired *t*-test (**** *p*<0.0001). **(F)** H3K27ac ChIP-seq mean signal within promoter (centered to TSS +/- 1kb) of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes in TSA-treated Min6 cells. **(G)** H3K27me3 ChIP-seq mean signal within promoter (centered to TSS +/- 1kb) of *E2f1*^{β-/-} up- and down- regulated genes in TSA-treated Min6 cells.

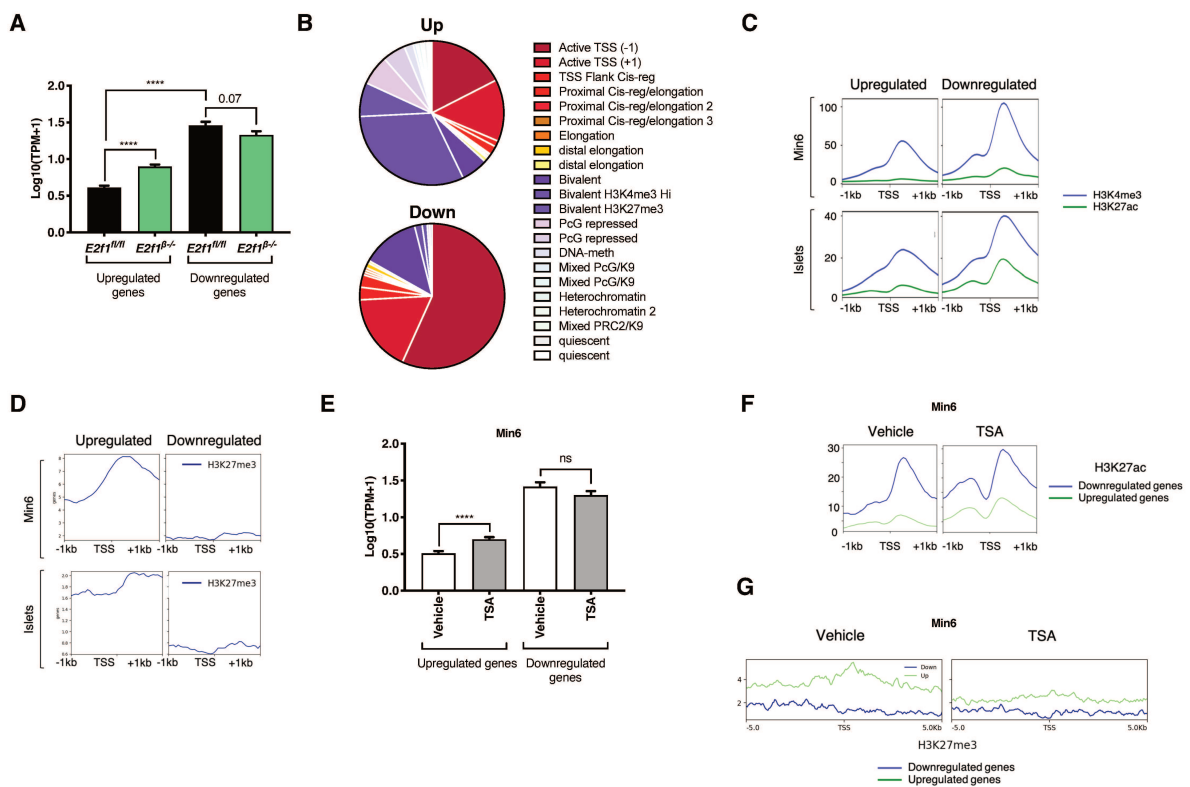
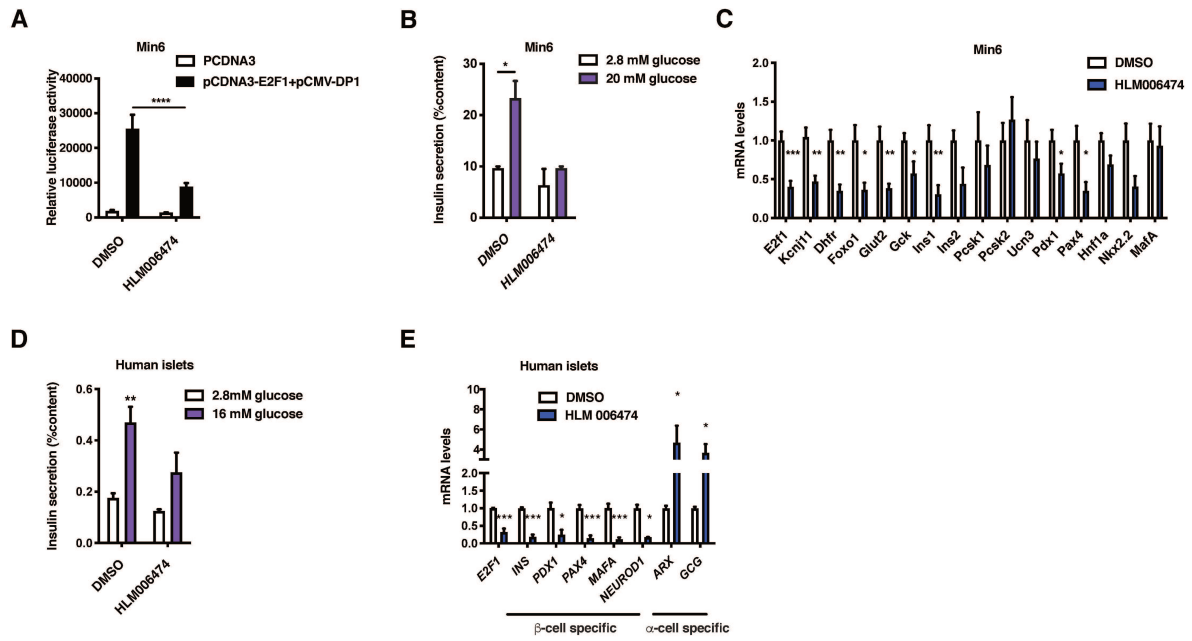
Table 1. Pathway analysis of RNA-sequencing data in pancreatic islets isolated from control *E2f1*^{fl/fl} and β-cell specific *E2f1*^{β-/-} deficient mice identifies potential upstream regulators associated to *E2f1* deficiency.

Table 2. List of peptides associated to E2F1 in Min6 cells identified through RIME experiments. RIME was performed on biological duplicates and common peptides found in both replicates are shown.

References







Annexe 2

A crosstalk between E2F1 and GLP-1 signaling pathways modulates insulin secretion

**Cyril Bourouh¹, Emilie Courty¹, Gianni Pasquetti², Xavier Gromada¹, Nabil Rabhi^{1#},
Charlène Carney¹, Maeva Moreno¹, Raphaël Boutry¹, Laure Rolland¹, Emilie Caron³, Zohra
Benfodda⁴, Patrick Meffre⁴, Julie Kerr-Conte², François Pattou², Philippe Froguel^{1,5}, Amélie
Bonfond¹, Frédéric Oger¹ and Jean-Sébastien Annicotte^{1,6,*}**

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, CNRS, U1283 - UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

²Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1190 - EGID, F-59000 Lille, France

³Inserm, UMR S-1172, Development and Plasticity of Postnatal Brain, F-59000 Lille, France

⁴Univ. Nîmes, EA7352 CHROME, F-30021 Nîmes cedex 1, France

⁵Department of Metabolism, Imperial College London, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK

⁶Lead contact

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

* Correspondence to: jean-sebastien.annicotte@inserm.fr (J.-S. A.)

Abstract

Compromised β -cell function contributes to type 2 diabetes (T2D) development. The glucagon like peptide 1 (Glp-1) has emerged as a hormone with broad pharmacological potential toward T2D treatment, notably by improving β -cell functions. Recent data have shown that the transcription factor E2f1, besides its role as a cell cycle regulator, is involved in glucose homeostasis by modulating β -cell mass, function and identity. Here, we demonstrate a crosstalk between the E2F1, phosphorylation of retinoblastoma protein (pRb) and Glp-1 signaling pathways. We found that β -cell specific *E2f1* deficient mice (*E2f1* ^{β -/-}) presented with impaired glucose homeostasis and decreased glucose stimulated-insulin secretion mediated by exendin 4 (*i.e.*, GLP1R agonist), which were associated with decreased expression of *Glp1r* encoding Glp-1 receptor (GLP1R) in *E2f1* ^{β -/-} pancreatic islets. Decreasing E2F1 transcriptional activity with an E2F inhibitor in islets from nondiabetic humans decreased *GLP1R* levels and blunted the incretin effect of exendin 4 on insulin secretion. Conversely, overexpressing *E2f1* in pancreatic β cells increased *Glp1r* expression associated with enhanced insulin secretion mediated by GLP1R agonist. Interestingly, kinome analysis of mouse islets demonstrated that an acute treatment with exendin 4 increased pRb phosphorylation and subsequent E2f1 transcriptional activity. This study suggests a molecular crosstalk between the E2F1/pRb and GLP1R signaling pathways that modulates insulin secretion and glucose homeostasis.

Introduction

Glucose homeostasis is finely tuned by the coordinated action of glucagon and insulin that are produced by pancreatic α and β cells, respectively. Dysregulation of this homeostatic process leads to type 2 diabetes (T2D), which is characterized by impaired function and mass of pancreatic β cells (484). Since lifestyle modifications are usually ineffective to cure T2D, pharmacological treatments are necessary to restore normoglycemia. However, most of the current therapeutic strategies are ineffective in controlling long-term glycemia, reinforcing the urgent need for new treatments.

Targeting the Glucagon Like Peptide-1 (Glp-1) pathway has demonstrated promising efficacy to treat T2D (297). Glp-1 is an enterohormone produced by intestinal L cells (530) and pancreatic α cells (531) that binds the Glp-1 receptor (GLP1R), a G protein-coupled receptor (GPCR) expressed by several cell types including the pancreatic β cells (532). The activation of this GPCR by natural Glp-1 or synthetic Glp-1 analogs, such as exendin-4 or Liraglutide (533) increases intracellular Ca^{2+} and activates adenylate cyclase to increase cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and subsequent signaling pathways such as Protein kinase A (PKA) or Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (276). These mechanisms favor glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) by pancreatic β cells (534, 535), inhibit glucagon secretion by pancreatic α cell (536) but also increase β -cell proliferation (537-539) and prevent pancreatic β -cell from apoptosis (317, 318, 540). Thus, GLP1R activation contributes to increased β -cell function and β -cell mass.

We and others previously showed that E2F1-pRb-CDK4 pathway plays a major role to control β -cell mass and function (417, 419, 421). The transcription factor E2F1, the first member of the 8 E2F family genes (*i.e.* *E2F1* to *E2F8* (375)), binds the chromatin as a heterodimer with the Dimerization Partner-1 (DP-1) protein. The E2F1 transcriptional activity is finely regulated through its association with members of the retinoblastoma protein family such as pRb (449). During the G0/G1 phase of the cell cycle, the pRb/E2F1 complex at the chromatin inhibits E2F1 activity and the subsequent expression of E2F1 target genes (364, 541). When cells are stimulated by mitogenic signals such as growth factors, cyclin and cyclin-dependant kinase (CDK) complexes, such as CDK4/CyclinD1, phosphorylate pRb (542), leading to pRb release from E2F1, promoting E2F1 transcriptional activity and cell cycle progression. This mechanism is repressed through the activation of CDK inhibitors, namely p16^{INK4A}, that bind to CDK and avoid cyclinD/CDK4 complex formation, and subsequently repress pRb phosphorylation and E2F1 transcriptional activity (543). Although these mechanisms mainly

control the progression of the cell cycle (391), recent studies have reported important roles for the E2F1-pRb-CDK4 pathway beyond the *sole* regulation of cell proliferation (385, 434). Indeed, several reports have demonstrated the role of the E2F1 pathway in the control of metabolic functions in non-proliferative cells, including adipocytes (400, 401), hepatocytes (411, 412, 544), muscle and brown adipose tissue (420, 545) and pancreatic β cells (417-419, 421).

While E2F1 and Glp-1 pathways are both involved in the control of β -cell function and mass, whether they were physiologically connected remained unknown. Here, we demonstrate a crosstalk between the GLP1R and E2F1/pRb pathways in controlling insulin secretion. Using genetic mouse models in which the β -cell expression of *E2f1* is knockdown or the β -cell expression of *E2F1* is enhanced, we demonstrate that E2F1 modulates the Glp-1 signalling pathway through the transcriptional control of *Glp1r* expression by pancreatic β cells. Importantly, we found that a treatment of human islets with the pan E2F inhibitor HLM006474 decreases *E2F1* expression, as observed in type 2 diabetic human islets (436) and promoted a decrease in exendin-4 induced insulin secretion as well as *GLP1R* expression. Our results highlight a new molecular link between Glp-1 signaling and E2F1 in the control of β -cell function.

Material & Methods

Chemicals, antibodies and oligonucleotides

Chemicals, unless stated otherwise, were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-phospho-Rb^{S807/811} (CS#9308) and anti-Rb 4H1 (CS#9309) antibodies were from Cell signaling. Anti-tubulin (T5168), anti-glucagon (G2654) and anti-HA antibodies were from Sigma-Aldrich, anti-insulin (A0564) was from DAKO. The oligonucleotides sequences used for various experiments are listed in Supplementary Table 1. The different plasmids used in this study were previously described (419). For CHIP-qPCR experiments, pCMV10 or pCMV10-hE2F1-Flag were used. The DNA sequence of the mouse *Glp1r* promoter corresponding to 1000 base pairs before the transcription start site was cloned in front of the luciferase gene (e-Zyvec).

Animal experiments

Mice were maintained according to European Union guidelines for the use of laboratory animals. *In vivo* experiments were performed in compliance with the French ethical guidelines for studies on experimental animals (animal house agreement no. 59-350294, Authorization for Animal Experimentation, project approval by our local ethical committee no. APAFIS#2915-201511300923025v4). All experiments were performed with male mice. Mice were housed under a 12-hr light/dark cycle and given a regular chow. For high-fat diet (HFD) studies, 6-week-old mice were placed on a HFD (60% of calories from fat; Research Diet, D12492i) for 16 to 20 weeks. Oral glucose (OGTT) and intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (IPGTT and IPITT respectively) were performed as previously described (546) on 16 hours fasted animals for OGTT and IPGTT and 5 hours fasted animals for ITT. Glycemia was measured using the AccuCheck Performa (Roche Diagnostics). Circulating insulin levels were measured using the insulin ELISA kit (Mercodia). *E2f1* floxed (*E2f1^{L2/L2}*) mice and rat insulin 2 promoter (RIP)-Cre mice were previously described (411, 429) and then further intercrossed to generate pure mutant *RIPcre^{Tg/0}/E2f1^{L2/L2}* mice. A PCR genotyping strategy was subsequently used to identify *RIPcre^{+/+}::E2f1^{flox/flox}* (*E2f1^{β+/+}*) and *RIPcre^{Tg/+}::E2f1^{flox/flox}* (*E2f1^{β-/-}*) mice. Mice harboring the Rosa-26-loxP-LacZ-loxP-h*E2F1* conditional expression cassette (RFC mice) were obtained from Ulrike Ziebold (MDC, Berlin, Germany; (547)). Heterozygous RFC/+ mice were crossed

with RIPcre^{Tg/+} mice to obtain RIPcre^{Tg/+::RFC^{Tg/+}} (*E2f1^{βover}*) and control RIPcre^{+/+::RFC^{Tg/+}} (*E2f1^{βCtrl}*) mice.

Pancreatic islets studies

For mouse islets studies, pancreas was digested by type V collagenase (C9263, 1.5mg/ml) for 10 minutes at 37 °C as previously described (419, 546). After pancreas digestion and separation of pancreatic islets in a polysucrose density gradient medium, islets were purified by handpicking under a microscope and were cultured during 16 hours before experiments. For GSIS experiments, approximately 30 islets were exposed to 2.8 mM glucose, 20 mM glucose or 20 mM glucose and 50 nM exendin-4 (Sigma, E7144) in Krebs-Ringer buffer supplemented with HEPES (Sigma, 83264) and 0.5% fatty-acid free BSA (Sigma, A7030). Insulin released in the medium was measured using the mouse insulin ELISA kit (Merckodia). Data are expressed as a ratio of total insulin content. Human pancreatic tissue was harvested from human, non-diabetic, adult donors. Isolation and pancreatic islet culture were performed as previously described (510). Human islets were treated for 48 hours with the pan-E2F inhibitor HLM006474 at 10μM (276). Data were expressed as a ratio of total insulin content. For mRNA quantification, human islets were isolated as described above and snap-frozen for further processing.

Cell Culture, transfections and siRNA knock-down

Min6 cells (AddexBio) were cultured in DMEM (Gibco) with 15% fetal bovine serum, 100 mg/ml penicillin-streptomycin and 55 mM β-mercaptoethanol (Sigma, M6250). Cells were transfected with non-targeting siRNA mouse negative controls (siCont) and si*E2f1* (#13555, SMARTpool, Dharmacon) using Dharmafect1 (GE Dharmacon) and experiments were performed 48 hours later. Transient transfection experiments were performed in Min6 cells using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Luciferase assays were performed 48 hours post-transfection and normalized to β-galactosidase activity as previously described (419). For pharmacological treatments, Min6 cells and pancreatic islets were treated with HLM006474 (428) at 10μM for 48h. Exendin-4 (Sigma) was used at 50 nM at different time as indicated.

Protein extracts and western blot experiments

Western blot was performed as previously described (548). Min6 cells were washed twice with cold PBS 1X and lysed with cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40) supplemented with Protease Inhibitor cocktail (Roche) and phosphatase inhibitors (ThermoFischer). Immunoblotting experiments were performed using 40 µg of total proteins and loaded on Precast SDS gel (Biorad). After electromigration, proteins were transferred on nitrocellulose membrane during 1h at 110V that were further incubated in TBS-Tween 0.05% (TBS-T) supplemented with 5% of milk. Membranes were incubated 16 h at 4 °C with primary antibodies as indicated in blocking buffer supplemented with 3% of bovine serum albumin or milk. After washing, membranes were incubated 1 h with the secondary antibody conjugated with horseradish peroxidase. The revelation of luminescent bands was performed using Pierce ECL Western blotting substrate or SuperSignal West Dura Extended duration substrate (ThermoFischer) with Chemidoc Xrs+ (Biorad).

***In silico* analysis of the mouse *Glp1r* promoter region**

The DNA sequence of the promoter region of the *Glp1r* gene was obtained from Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Motif search was performed using LASAGNA-Search tool (431).

Chromatin immunoprecipitation

Min6 cells were transfected with the empty vector pCMV10 or pCMV10-hE2F1-Flag. 48 hours after transfection, DNA-protein complexes from Min6 cells were formaldehyde-crosslinked to DNA at a final concentration of 1% for 10 minutes. The reaction was stopped by adding glycine at a concentration of 0.125M during 5 minutes. After cell lysis and sonication with the Bioruptor Pico (Diagenode, ref B01060010) for 8 minutes, proteins were immunoprecipitated with either the non-specific Ig G or anti-Flag 2 antibodies. After washing, protein-DNA complexes were decrosslinked by heating the samples for 16 hours at 65°C. DNA was purified using Mini Elute PCR purification kit (Qiagen) and qPCR were performed using promoter-specific primers.

RNA extraction, measurements and profiling.

Total RNA was extracted from Min6 cells using trizol reagent (Life Technologies). For mouse and human islets, total RNA was extracted with the RNeasy Plus Microkit (Qiagen) following manufacturer's instructions. mRNA expression levels were measured after reverse transcription by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with FastStart SYBR Green master mix (Roche) using a LC480 instrument (Roche). qRT-PCR were normalized to cyclophilin mRNA levels. The results are expressed as the relative mRNA level of a specific gene expression using the formula $2^{-\Delta Ct}$.

Kinome profiling

Serine-threonine kinase (STK) microarrays were purchased from PamGene International BV. Each array contained 140 phosphorylatable peptides as well as 4 control peptides. Sample incubation, detection, and analysis were performed in a PamStation 12 according to the manufacturer's instructions. The experiments were performed on mouse and human pancreatic islets as previously described (548).

Immunohistochemistry and immunofluorescence

Immunofluorescence and immunohistochemistry were performed exactly as described previously (509). Pancreatic tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin and sectioned at 5 μ m. For immunofluorescence microscopy analyses, after antigen retrieval using citrate buffer, 5- μ m formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) pancreatic sections were incubated with the indicated antibodies. Immunofluorescence staining was revealed by using a fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-mouse (for Glucagon and HA), fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (for pRb^{S807/811}), anti-guinea pig (for Insulin) secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst.

Statistical Analysis.

Data are presented as mean \pm s.e.m. Statistical analyses were performed using a two-tailed unpaired Student's t-test, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test or two-way ANOVA with Tukey's *post hoc* tests comparing all groups to each other, using GraphPad Prism 9.0 software. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Results

Loss of β cell-specific *E2f1* expression impairs glucose tolerance under chow diet and during metabolic stress.

To evaluate the role of *E2f1* in the control of glucose homeostasis, we bred *E2f1* floxed mice with Rip-Cre mice to generate pancreatic β cell-specific *E2f1*-deficient mice, named hereafter *E2f1* ^{β -/-}. The β -cell specific recombination efficiency was indeed confirmed through qRT-PCR analysis in islets isolated from *E2f1* ^{β -/-} mice compared to *E2f1* ^{β +/+} controls (Figure 1A). In addition, *E2f1* ^{β +/+} and *E2f1* ^{β -/-} mice displayed comparable body weight (Figure 1B) and fasting glycemia (Figure S1A). To evaluate glucose homeostasis in those mouse models, we performed IPGTT in *E2f1* ^{β +/+} and *E2f1* ^{β -/-} mice fed with chow diet. Figure 1C and 1D shows that glucose clearance was impaired in *E2f1* ^{β -/-} mice, associated with defects in secreting insulin in response to glucose injection (Figure 1E). Similarly, *E2f1* ^{β -/-} mice demonstrated impaired glucose tolerance when challenged with an oral bolus of glucose compared to *E2f1* ^{β +/+} mice (Figure 1F and 1G) associated with an alteration of insulin secretion (Figure 1H). Strikingly, although insulin levels were dampened in *E2f1* ^{β -/-} mice, glucose-induced plasma Glp-1 levels were not affected by the deletion of *E2f1* in β cells (Figure 1I). Because insulin secretion may be challenged in the context of insulin resistance, we next evaluated whether such metabolic dyshomeostasis promoted by β -cell selective *E2f1* knock-down could be exacerbated upon a metabolic stress such as high fat diet (HFD). Accordingly, we challenged controls and *E2f1* ^{β -/-} mice with a HFD (60% of fat) for 16 weeks. Interestingly, despite similar body weight (Figure 1J and Supplementary figure S1B), glucose tolerance during IPGTT (Figures 1K and 1L), and insulin sensitivity (Supplementary figure S1C), insulin secretion was impaired in *E2f1* ^{β -/-} mice as compared to controls fed a HFD (Figure 1M). Again, HFD-fed *E2f1* ^{β -/-} mice demonstrated impaired glucose tolerance when challenged with an oral bolus of glucose compared to *E2f1* ^{β +/+} mice (Figures 1N and 1O). Furthermore, insulin secretion was dampened 30 minutes after oral glucose intake in *E2f1*-deficient mice (Figure 1P), whereas circulating Glp-1 levels before and 10 minutes after an oral glucose bolus were not significantly different between control and *E2f1* ^{β -/-} mice neither when fed a HFD (Figures 1Q). Altogether, our data demonstrate that the loss of *E2f1* expression within β cells impairs glucose homeostasis and insulin secretion upon physiologic conditions and during metabolic stress, despite the lack of differences in both body weight and Glp-1 circulating levels between controls and *E2f1*-deficient mice.

Overexpression of human E2F1 in murine β cells improve glucose homeostasis and insulin secretion upon metabolic stress.

We next investigated whether *E2F1* overexpression in pancreatic β cells of wild type animals could mirror the phenotype observed in *E2f1 ^{β -/-}*, i.e. increase insulin secretion in response to glucose. Therefore, we generated a mouse model that over-expresses the human form of *E2F1* (*hE2F1*) specifically in β cells (*E2f1 ^{β over}*). Human *E2F1* overexpression was confirmed at the mRNA levels (Figure 2A). The β -cell specific expression of hE2F1 proteins was confirmed using co-immunostaining with anti-insulin and anti-HA antibodies, an HA tag being fused with the *hE2F1* transgene (547) (Supplementary figure S2A). Overexpressing human *E2F1* did not affect mouse *E2f1* transcript levels (Supplementary figure S2B). No particular phenotype was observed in these mice when fed with chow diet, including body weight (Figure 2B), fasting glycemia (Supplementary figure S2C), insulin sensitivity (Supplementary figure S2D), and intraperitoneal glucose tolerance (Figures 2C and 2D). Intriguingly, the insulin levels were increased in *E2f1 ^{β over}* mice in response to *in vivo* glucose injection when compared to littermate controls (Figure 2E). Finally, *E2f1 ^{β over}* mice demonstrated a significant improvement of glucose tolerance when challenged with an oral bolus of glucose (Figures 2F and G).

We next sought to evaluate the effect of hE2F1 overexpression in pancreatic β cells on glucose homeostasis when challenged with HFD for 16 weeks. The body weight as well as the weight gain of *E2f1 ^{β over}* mice remained comparable to control mice (Figure 2H and Supplementary figure S2E). When fed a HFD, overexpression of human *E2F1* in pancreatic β cells did not alter the insulin sensitivity (Supplementary Figure S2F) or the glucose tolerance after an intraperitoneal injection of glucose (Supplementary figures S2G and S2H). However, OGTT revealed an improved glucose tolerance in *E2f1 ^{β over}* mice 15 minutes after glucose gavage (Figures 2I and 2J). Interestingly, *E2f1 ^{β over}* mice secreted more insulin 30 minutes after an oral glucose load compared to control mice (Figure 2K). Altogether, our data demonstrate that, mirroring *E2f1 ^{β -/-}* mice, *E2f1 ^{β over}* mice exhibit improved glucose homeostasis and insulin secretion upon physiologic conditions and during metabolic stress. Interestingly, our data highlight a differential outcome of β -cell specific *E2f1* modulation following IPGTT and OGTT raising the possibility that the incretin effects could be dependent on E2F1 levels within the β cell.

Glucose-stimulated insulin secretion potentiation by the Glp-1 agonist exendin-4 is dependent on E2f1.

To evaluate whether Glp-1 agonists modulate E2f1-dependent insulin secretion in a cell-autonomous manner, we performed static GSIS experiments in *E2f1* knockdown mouse Min6 β cell line and their controls. Strikingly, a 55% decrease in *E2f1* mRNA levels was sufficient to blunt GSIS (Figures 3A and 3B). Interestingly, while exendin-4 potentiated glucose effect on insulin secretion in control Min6 cells, that was not the case following *E2f1* knock-down (Figure 3B). To corroborate these findings, we performed a similar GSIS experiments using pancreatic islets isolated from *E2f1* ^{β +/+} and *E2f1* ^{β -/-} mice. Accordingly, whereas *E2f1* ^{β +/+} pancreatic islets well responded to glucose, with an outcome potentiated in the presence of exendin-4, *E2f1*-deficient pancreatic islets failed to exhibit both enhanced response to glucose and potentiation by exendin-4 (Figure 3C). The treatment of non-diabetic human islets with the E2F pan inhibitor HLM006474 (428) provoked a marked decrease in insulin secretion in response to exendin-4 treatment, compared to control, DMSO-treated human islets (Figure 3D). Interestingly, GSIS assays on pancreatic islets isolated from control and *E2f1*^{*over*} mice showed that the overexpression of *E2F1* enhanced the potentiation impact of exendin-4 on glucose-induced insulin secretion (Figure 3E). Altogether, these data suggest that E2f1, both in mouse and human pancreatic islets, affects exendin-4 effects on GSIS.

E2f1 controls *Glp1r* expression in pancreatic β cells.

As E2f1 deficiency did not affect Glp-1 circulating levels (Figures 1I and 1Q) but inhibits insulin secretion in response to glucose stimulation and incretins, we then hypothesize that E2f1 modulates Glp-1 signaling in β cells rather than Glp-1 production. Since Glp-1 agonists modulate insulin secretion through the Glp1r (284) and our data support that β -cell response to exendin-4 depends on E2f1, we analyzed *Glp1r* expression in our different mouse and human models of *E2f1* modulation. Interestingly, the knockdown of *E2f1* in Min6 cells resulted in a significant decrease of *Glp1r* mRNA levels (around 65% of decrease, $p = 0.0022$; Figure 3F). We confirmed these results in *E2f1* ^{β -/-} pancreatic islets (Figure 3G) and in human islets treated with the E2F inhibitor HLM006474 (Figure 3H). Interestingly, this E2F inhibitor not only decreased *GLP1R* expression in islets from nondiabetic humans, but also *E2F1* mRNA levels (Figure 3H). Notably, we observed a mirrored rise in *Glp1r* mRNA levels in isolated islets from *E2f1*^{*over*} mice (Figure 3I). *In silico* analysis revealed the presence of E2f1 binding sites in the promoter region of the *Glp1r* gene (Figure 3J and Supplementary figures S3A and S3B). To

further demonstrate the ability of E2f1-dependent pathway to control *Glp1r* expression, we performed co-transfection experiments in Min6 cells. To monitor *Glp1r* transcriptional regulation, we generated a construct combining the mouse *Glp1r* promoter DNA sequence controlling the expression of the luciferase reporter gene. To activate or repress E2F1 pathways, we used expression vectors encoding E2F1 and its dimerization partner DP-1, as well as pRb, the *bona fide* repressor of E2F1(449). Our data demonstrate that activation of the E2F pathway by expressing the E2F1-DP1 heterodimer increased *Glp1r*-dependent luciferase activity while pRb repressed the increased luciferase activity mediated by E2F1-DP-1 (Figure 3K). Finally, we performed CHIP-qPCR experiments to determine whether E2F1 directly controls the *Glp1r* promoter at the chromatin level. In the absence of reliable antibodies to CHIP E2F1, Min6 cells were transfected with pCMV or pCMV-hE2F1-Flag to immunoprecipitate E2F1 using a Flag antibody. An enrichment at the *Glp1r* promoter was observed when cells were transfected with pCMV-hE2F1-Flag, demonstrating that E2F1 directly binds to the *Glp1r* promoter (Figure 3L). Altogether our data clearly highlight that E2F1 modulates *Glp1r* expression both in mouse and human islets, likely through the control of its promoter region. Strikingly, when E2F1-DP-1 are co-transfected with pRb, the activity of the *Glp1r* promoter is dampened (Figure 3K), showing that the activity of the E2F1-DP-1 complex on the *Glp1r* promoter is regulated by pRb.

Glp-1 increases the phosphorylation of pRb through the activation of CDK signaling pathway in mouse and human pancreatic islets.

Interestingly, the β cell-specific activation of the Glp-1 pathway by GLP1R agonist modulates the activity of several serine and threonine kinases and the subsequent phosphorylation of peptides controlling pancreatic β -cell functions (549). Since the molecular mechanisms of kinase activation controlled by the Glp-1 pathway are not fully understood, a kinome analysis using the Pamgene technology was performed on pancreatic islets isolated from *C57Bl6/J* mice treated with 20 mM glucose compared to 20 mM glucose plus 50 nM exendin-4 for 30 minutes (Figure 4A). Following these treatments, an increase in 43 phosphorylation sites of 41 peptides was observed when pancreatic islets were treated with glucose-exendin-4 compared to glucose alone (Figure 4B and table 1). It is noteworthy that treatment of mouse islets with 20 mM glucose plus 50 nM exendin-4 increased Creb phosphorylation at Serine 133 (Creb^{S133}, Figure 4B, *Log2 Fold Change* = 0.45, *p* = 0.003), as previously shown (316). Strikingly, the co-treatment of mouse pancreatic islets with 20 mM glucose plus 50 nM exendin-4 for 30 minutes increased the phosphorylation level of the pRb on serine 807/811

(pRb^{S807/811}; *Log2 Fold Change* = 0.63, *p* = 0.043), the *bona fide* repressor of E2F1 transcriptional activity. The exendin-4-mediated induction of pRb^{S807/811} phosphorylation was further confirmed in the mouse Min6 β cells through western blotting and immunofluorescence analysis (Supplementary figures S4A, S4B and S4C). Integrating the phosphorylation data using the Bionavigator software developed by Pamgene revealed the specific activation of kinases upon exendin-4 treatment, including several CDKs (Figure 4C). Finally, ingenuity pathway analysis (IPA) further demonstrated that several canonical pathways were controlled by exendin-4 treatment, such as the signaling pathways related to opioid, AMPK or PKA (Figure 4D). Altogether, these results demonstrate that the activation of the Glp-1 pathway by its agonist exendin-4 in mouse pancreatic islets activates several kinases, including CDKs, leading to the phosphorylation of pRb.

Exendin-4 increases E2F1 transcriptional activity.

These data led us to postulate that GLP1R activation through an exendin-4 treatment could increase E2F1 transcriptional activity, since the *E2f1* target gene expression is strongly controlled by the phosphorylation status of pRb (449). To test this hypothesis, we first performed luciferase assays using a plasmid containing E2F responsive elements (E2F-RE) cloned in front of the Thymidine Kinase (Tk) promoter and the luciferase gene (E2F-RE-Tk-Luc). Upon treatment with 2.8 mM glucose, the co-transfection with the E2F1 and DP-1 expression vectors induced luciferase activity compared to control conditions, validating increased E2F1 transcriptional activity in the presence of E2F1 and DP-1 (Figure 5A). The treatment of Min6 cells with 20 mM glucose further increased *E2f1* transcriptional activity when compared to 2.8 mM glucose treatment (Figure 5A). Interestingly, this effect was even more potentiated with a 50 nM exendin-4 treatment (Figure 5A). Altogether, these results suggest that exendin-4 enhanced the transcriptional activity of E2f1 on the promoter of its target genes. On the other hand, the co-transfection with a pRb expression vector nearly abolished *E2f1* transcriptional activity (Figure 5A), thus demonstrating as expected, that pRb inhibits *E2f1* transcriptional activity. However, when Min6 cells were treated with 50 nM of exendin-4, the pRb repressive effect was partially alleviated, thus allowing a weak transcriptional activity of the E2F1-DP1 heterodimer on the E2F-RE-Tk promoter (Figure 5A). These data then suggest that a loss of the pRb repressive activity following the treatment with the GLP1R agonist (Figure 5A). Since exendin-4

increased E2f1 transcriptional activity, we next wondered whether the expression of genes involved in β -cell mass and/or function was modulated upon exendin-4 treatment. Since PDX-1, a master regulator of β -cell identity that controls *Insulin* gene expression (550) is regulated by exendin-4 treatment (299, 451), we checked whether short term treatment with 50nM of exendin-4 (1 to 4 hours) modulated its expression in Min6 cells or mouse pancreatic islets in which *E2f1* expression level is downregulated. Our results showed that treatment with 50 nM of exendin-4 increased the mRNA levels of *E2f1* (Figure 5B) and *Pdx1* (Figure 5C) in Min6 cells transfected with a non-targeting, control siRNA. Knocking down *E2f1* in Min6 cells completely blocked the exendin-4 mediated raise in *E2f1* (Figure 5B) and *Pdx-1* (Figure 5C) mRNA levels. These results were also observed when C57Bl6J pancreatic islets were treated with glucose and exendin-4 (Figures 5D and 5E). Interestingly, treating *E2f1* ^{β -/-} pancreatic islets with exendin-4 failed to increase *E2f1*, confirming the reproducibility and robustness of our model, but most interestingly failed to increase *Pdx1* expression levels (Figures 5F and 5G, respectively). Altogether, these results suggest that exendin-4 modulates pRb phosphorylation and E2F1 transcriptional activity, which in turn modulates insulin secretion through the upregulation of E2f1 dependent genes such as *E2f1* itself or *Pdx1* mRNA levels.

Discussion

Here, we report that E2F1 transcription factor, primarily known to control cell cycle progression (551), plays a key role in pancreatic β -cell function through the control of Glp-1 signaling, both in mice and human islets. Following previous studies demonstrating that E2F1-pRb pathway controls pancreatic β -cell mass (417, 418, 423, 479) and function (419, 462), we identify here a new role for this transcription factor linking this pathway to the druggable Glp-1 signaling. Indeed, we demonstrate that the specific loss of *E2f1* expression in β cells leads to impaired oral glucose tolerance, both under chow and upon metabolic stress, associated to a loss of insulin secretion in response to glucose, despite normal Glp-1 circulating levels. Interestingly, we have also shown that human *E2F1* overexpression in mouse pancreatic β cells counteracts glucose impairment upon metabolic stress by inducing insulin secretion associated with a raise in *Glp1r* mRNA levels. In this study, we also report a crosstalk between Glp-1 and E2F1-pRb signaling pathways, where the Glp1r agonist exendin-4 modulates pRb phosphorylation status, both in mice and human islets, and subsequent E2f1 transcriptional activity (Figure 6).

Along the last 2 decades, a particular emphasis has been put toward the development of specific GLP1R agonists to treat T2D (552). Indeed, GLP1R agonists improve glycaemia in patients with T2D by increasing insulin synthesis, secretion and by inducing β -cell proliferation (276, 553). Although targeting the GLP1R signaling pathway is a promising therapeutic strategy, it has been reported however that the incretin effects decrease in humans with the onset of obesity and T2D, thus urging us to uncover the underlying mechanism involved in the loss of GLP1R agonist sensitivity in obese and T2D patients (474, 475). Several studies suggest that part of this deleterious mechanism could rely on the downregulation of the *Glp1r* expression in different tissues involved in metabolic homeostasis, including pancreatic β cells (476, 477). Indeed, Kimura et al demonstrated that obesity induces a loss of *Glp1r* expression in vascular tissue (554). Other studies have demonstrated that hyperglycemia not only downregulates both *Glp-1* et *Gip* receptors expression in pancreatic islets but also impairs Glp-1 signaling pathway through the loss of *Glp1r* at the β -cell cytoplasmic membrane (555). Then, preserving *Glp1r* expression in metabolic and non-metabolic tissues appears to be crucial to maintain glucose homeostasis. In addition, the identification of the signaling pathways that regulate *Glp1r* expression could represent a new target towards T2D treatment. For instance, Pax6 (70) or farnesoid X receptor (478) directly modulate the *Glp1r* gene expression at chromatin level, thus targeting these pathways might be promising to improve glucose

homeostasis and insulin secretion in a metabolic stress context. We also observe that overexpressing *E2F1* in pancreatic β cells increases *Glp1r* expression and improves glucose tolerance upon high fat diet, suggesting that targeting this pathway would also represent an alternative strategy, with caution regarding the proliferative functions displayed by the E2F1/pRb pathway. Moreover, since *E2F1* expression is decreased in T2D islets (436), our study suggests a putative association between the loss of *GLP1R* expression in T2D patients and the loss of *E2F1* expression. Although single cell RNA sequencing analysis are required to unequivocally demonstrate concomitant decreased levels of *E2F1* and *GLP1R* within the same cell, we can speculate that the long term loss of efficacy of Glp1r agonist treatment to restore glucose homeostasis in T2D patients may be related, at least partially, to impaired E2F1-dependent modulation of *GLP1R* expression.

Following pioneer observations that the E2F1-CDK4-pRb pathway is regulated by glucose and insulin in pancreatic islets (419), we show here that the treatment of pancreatic islets with a Glp1r agonist modulates E2F1 pathway through the phosphorylation of pRb and the activation of the E2F1 transcriptional activity. Our data are in line with previous studies showing that the treatment of Ins1 cells with exendin-4 decreases both mRNA and protein levels of pRb and increases E2f1 protein levels (479). It is well established that exendin-4 and Glp1r agonists increases cell cycle progression through the increased expression of cyclins A2 and cyclin D1, stimulating pancreatic β -cell proliferation (481, 482). Since the E2F1-pRb-CDK4 pathway positively modulates the expression of *Ccna2* and *Ccnd1* (556), our data suggest that the cell cycle progression of pancreatic β cell through the induction of *Ccna2* and *Ccnd1* with exendin-4 treatment could be associated with an increase of E2f1 expression and/or activity. Moreover, in human islets, the treatment with exendin-4 also increases the expression of several cyclins, leading to increased pancreatic β -cell proliferation (557). Here we observed an increase of pRb phosphorylation in pancreatic islets treated with exendin-4 and a raise in *E2f1* expression in Min6 cells treated with exendin-4, suggesting that β -cell proliferation induced by Glp1r agonist could be under the control by the E2F1-pRb pathway.

A limitation of this study is the use of the RIP-Cre mice (429) which allows Cre-recombinase expression at the early stage of pancreatic β -cell differentiation, between E15.5 and E18.5 (558). Since E2f1 plays a key role in both post-natal proliferation of β cells (417) and early pancreas development by targeting *Pdx1* and *Ngn3* expression through the Cdk4 pathway (421), the deletion of the *E2f1* gene using Rip-Cre mice may affect early β -cell differentiation and mass. Therefore, we cannot exclude that the early loss of *E2f1* expression could contribute to decreased *Glp1r* expression in *E2f1*-

deficient pancreatic islets during pancreatic β -cell development. The use of an inducible model, such as the Mip-Cre^{ERT} mice (466), may allow to determine whether the deletion of the *E2f1* gene in non-proliferating adult β cells could also result in impaired glucose homeostasis related to the modulation of *Glp1r* expression by E2F1 in adulthood.

In summary, our study reveals a crosstalk between E2f1 and Glp-1 signaling pathways in both mice and human pancreatic islets. It opens the possibility to understanding the differential effects of Glp-1 in the control of β -cell mass and function and their relevant molecular mechanisms. How this crosstalk modulates β -cell proliferation, which downstream signaling molecules are involved, and how these mechanisms are actionable in T2D pathophysiology remain open questions that require further investigations.

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

Acknowledgements. We thank Dr David Blum, Dr Stéphane Dalle and Dr Benoit Pourcet and members of the INSERM U1283/CNRS UMR 8199/EGID for helpful discussions and critical reading of our manuscript. Human islets were provided through the JDRF award 31-2008-416 (ECIT Islet for Basic Research program). The authors thank UMS2014-US41 and the Experimental Resources platform from Université de Lille, especially Cyrille Degraeve, Mélanie Besegher and Julien Devassine for animal care. We thank the Department of Histology from the Lille Medicine Faculty, particularly M.H. Gevaert and R.M. Siminski, for histological preparations. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR) grants « European Genomic Institute for Diabetes » E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 and Equipex 2010 ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM' Genomics platform, a French State fund managed by ANR under the frame program Investissements d'Avenir I-SITE ULNE / ANR-16-IDEX-0004 ULNE (to P.F., A.B. and J-S.A), ANR BETAPLASTICITY (ANR-17-CE14-0034 to J-S.A.), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to J-S.A.), INSERM, CNRS, Institut Pasteur de Lille (CPER CTRL Melodie, to E.C. and J-S.A.), Association pour la Recherche sur le Diabète (to J-S.A.), Université de Lille (to C.B., F.O., X.G. and J-S.A.), I-SITE ULNE (EpiRNAdiab Sustain grant to J-S.A.), Conseil Régional Hauts de France and Métropole Européenne de Lille (to J-S.A.), F.E.D.E.R. (Fonds Européen de Développement Régional, to P.F. and J-S.A.) and Société Francophone du Diabète (to J-S.A).

Conflict of interest. The authors declare no competing financial interests.

Figure legends

Figure 1. β cell-specific loss of *E2f1* expression impairs glucose tolerance under chow diet and during metabolic stress. (A) *E2f1* mRNA expression levels from pancreatic islets isolated from control ($E2f1^{\beta+/+}$) and $E2f1^{\beta-/-}$ mice ($n=4$). (B) Body weight of 16 week-old control ($E2f1^{\beta+/+}$) and mutant ($E2f1^{\beta-/-}$) mice fed with chow diet (CD, $n=4-6$). (C, D) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice fed with CD ($n=5-7$) and the corresponding area under curve (AUC, D). IPGTT was performed after 16h of fasting and glucose (2g/kg) was administered by intraperitoneal injection. (E) Insulin plasma levels during IPGTT measured 0 and 15 minutes after glucose injection in CD fed $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice ($n=5-7$). (F,G) Oral glucose tolerance test (OGTT) in $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice fed with CD ($n=4-6$) and the corresponding area under curve (AUC, G). OGTT was performed after 16h of fasting and glucose (2g/kg) was administered by oral gavage. (H) Insulin plasma levels during OGTT measured 0 and 30 minutes after glucose gavage in CD fed $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice ($n=5-6$). (I) Blood Glp-1 levels before and 10 minutes after an oral glucose gavage of $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice ($n=5$). (J) Body weight of $E2f1^{\beta-/-}$ and $E2f1^{\beta+/+}$ mice fed a high fat diet (HFD) for 16 weeks ($n=6$). (K,L) IPGTT in $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice fed with HFD ($n=6$) and the corresponding area under curve (AUC, L). IPGTT was performed after 16h of fasting and glucose (1,5g/kg) was administered by intraperitoneal injection. (M) Insulin plasma levels during IPGTT measured 0 and 30 minutes after glucose injection in HFD fed $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice ($n=6$). (N,O) OGTT (N) and its respective AUC (O, $n=6$). After 16h of fasting, OGTT (glucose 2g/kg) was performed on $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice fed a HFD for 16 weeks ($n=6$). (P) Insulin plasma levels during OGTT at 0 and 30 minutes following glucose challenge in $E2f1^{\beta-/-}$ and $E2f1^{\beta+/+}$ mice fed a HFD for 16 weeks ($n=6$). (Q) Total Glp-1 levels before and 10 minutes after an oral bolus of glucose in $E2f1^{\beta+/+}$ and $E2f1^{\beta-/-}$ mice after 20 weeks of HFD ($n=7$). All values are expressed as mean \pm s.e.m. and were analyzed by two-tailed unpaired *t*-test (A, B, D, G, J, L, O) or two-way ANOVA followed by a Tukey's *post-hoc* test (C, E, F, H, I, K, M, N, P, Q). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 2. The overexpression of E2F1 in pancreatic β cells improves glucose homeostasis and insulin secretion under chow diet and during metabolic stress. (A) mRNA expression of human *E2F1* in pancreatic islets isolated from $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice ($n=6$). (B) Body weight of chow diet (CD) fed $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice ($n=10$). (C) IPGTT was performed after 16h fasting and glucose was administered by intraperitoneal injection

(2g/kg) in $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice ($n=11-15$). **(D)** Area under curve (AUC) of IPGTT from $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice. **(E)** Insulin plasma levels during IPGTT before (0) and 30 minutes following glucose injection. **(F)** Blood glucose levels during OGTT of $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice under CD ($n=5$). **(G)** AUC of OGTT from $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice ($n=5$). **(H)** Body weight of $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice after 16 weeks of HFD ($n=5$). **(I)** OGTT was performed after 16h fasting and glucose was administrated by gavage (2g/kg) in $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice after 16 weeks of HFD ($n=5$). **(J)** AUC of OGTT from $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ mice ($n=5$). **(K)** Insulin plasma levels during OGTT at 0 and 30 minutes following glucose injection. All values are expressed as mean \pm s.e.m. and were analyzed by two-tailed unpaired *t*-test (A, B, D, G, H, J) or two-way ANOVA followed by a Tukey's *post-hoc* test (C, E, F, I, K). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Figure 3. $E2f1$ modulates Glp-1-mediated insulin secretion associated to $Glp1r$ expression. **(A)** $E2f1$ mRNA expression levels from control (*siCtrl*) or $E2f1$ silencing (*siE2f1*) in Min6 cells ($n=5$). **(B)** Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) measured in Min6 cells transfected with a *siCtrl* or *siE2f1* and exposed to 2.8 mM glucose, 20 mM Glucose or 20 mM Glucose + 50 nM exendin-4 ($n=7$). **(C)** GSIS was measured in pancreatic islets isolated from $E2f1^{\beta +/+}$ and $E2f1^{\beta -/-}$ mice exposed to 2.8 mM glucose, 20 mM Glucose or 20 mM Glucose + 50 nM exendin-4 ($n=3-9$). **(D)** GSIS experiment on human isolated islets treated for 48h with vehicle (0.1% DMSO) or 10 μ M HLM006474 and exposed to 2.8 mM glucose, 20 mM Glucose or 16.7 mM Glucose + 50 nM exendin-4 ($n=3$). **(E)** GSIS measured in $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ isolated islets exposed to 2.8 mM glucose, 20 mM Glucose or 20 mM Glucose + 50 nM exendin-4 ($n=3-4$). **(F)** $Glp1r$ mRNA expression levels in *siCtrl* or *siE2f1* Min6 cells ($n=6$). **(G)** $Glp1r$ mRNA expression levels in $E2f1^{\beta +/+}$ and $E2f1^{\beta -/-}$ isolated islets ($n=4$). **(H)** $E2F1$ and $GLP1R$ mRNA expression levels in human islets treated for 48h with vehicle (DMSO 0,1%) or HLM006474 (10 μ M) ($n=3$). **(I)** $Glp1r$ mRNA expression levels in $E2f1^{\beta ctrl}$ and $E2f1^{\beta over}$ isolated islets ($n=4-5$). **(J)** Sequence of the E2F1 responsive element (E2F RE) identified in the mouse $Glp1r$ promoter region. **(K)** Min6 cells were transiently co-transfected with an *mGlp1r*-promoter-luciferase construct (*Glp1r*-Luc vector) in the presence of a pcDNA3 vector (empty vector, negative control), E2F1-DP-1, pRb, E2F1-DP-1-pRb. Results were normalized to β -galactosidase activity and are expressed as relative luciferase units. **(K)** ChIP-qPCR demonstrating E2F1 binding to the mouse $Glp1r$ promoter from Min6 cells transfected with pCMV or pCMV-hE2F1-Flag plasmids. Chromatin from Min6 cells were incubated with IgG or Flag antibodies and qPCR were performed using primers amplifying the DNA region containing the E2F RE sequence found in the $Glp1r$ promoter region ($n=2$). All values are expressed as

mean \pm s.e.m. and were analyzed by two-tailed unpaired *t*-test (A, F, G, H, I), one-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test (K) or two-way ANOVA followed by a Tukey's *post-hoc* test (B, C, D, E). **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; *****p* < 0.0001.

Figure 4. Short term Glp1r activation induces pRb phosphorylation in pancreatic islets.

(A) Schematic representation of the kinome profiling strategy following exendin-4 treatment of mouse pancreatic islets. (B) Volcano plot exhibiting differential peptide phosphorylation in mouse pancreatic isolated islets treated with 20mM glucose (*n*=3) or 20 mM glucose + 50 nM exendin-4 (*n*=3) during 30 minutes. Results were obtained using the Pamgene technology and are expressed as Log₂ Fold Change and $-\text{Log}_{10}$ (pvalue) comparing differential phosphorylation levels between 20mM glucose and 20 mM glucose + 50 nM exendin-4. (C) Analysis of upstream kinases involved in differential peptide phosphorylation using the Bionavigator Software. (D) Differential peptide phosphorylation was analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) and identified canonical pathways controlled by exendin-4 treatment. All values are expressed as mean \pm s.e.m. and were analyzed by two-tailed unpaired *t*-test (B).

Figure 5. Exendin-4 treatment modulates E2f1 transcriptional activity. (A) Min6 cells were transiently co-transfected with an E2F-RE-Tk-luciferase construct (E2F-RE-Tk-Luc vector) in the presence of the empty pcDNA3 vector (negative control), E2F1-DP-1, pRb or E2F1-DP-1-pRb, and treated during 30 minutes with 2.8 mM glucose, 20mM glucose or 20 mM glucose + 50 nM exendin-4 (*n*=3). (B) *E2f1* mRNA expression from Min6 control (*siCtrl*) or *E2f1* silenced (*siE2f1*) cells treated with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) during 1, 2 or 4 hours (*n*=3). (C) *Pdx1* mRNA expression from *siCtrl* or *siE2f1*-Min6 cells treated with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) during 1, 2 or 4 hours (*n*=3). (D) *E2f1* mRNA expression from pancreatic islets isolated from 12-week-old C57Bl6J mice and treated with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) during 1, 2 or 4 hours (*n*=3). (E) *Pdx1* mRNA expression from pancreatic islets isolated from 12-week-old C57Bl6J mice and treated with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) during 1, 2 or 4 hours (*n*=3). (F) mRNA expression of *E2f1* in pancreatic islets isolated from *E2f1*^{β-/-} and *E2f1*^{β+/+} mice treated for 4 hours with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) (*n*=3-4). (G) mRNA expression of *Pdx1* in pancreatic islets isolated from *E2f1*^{β-/-} and *E2f1*^{β+/+} mice treated for 4 hours with 20mM glucose (Gluc) or 20mM glucose and 50nM exendin-4 (Gluc+Ex4) (*n*=3-4).

All values are expressed as mean \pm s.e.m. and were analyzed by two-way ANOVA followed by a Tukey's *post-hoc* test (A, B, C, D, E, F, G). *p < 0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 6. A model linking E2f1 and GLP-1 signaling pathways in pancreatic β cell. In pancreatic β cells, the transcription factor E2f1 binds to the *Glp1r* promoter and positively modulates its expression. In addition, glucose entry in cells through the Slc2a2 (Glut-2) transporter increases the level of ATP and stimulates insulin secretion. Glp1r activation by exendin-4 potentiates glucose-stimulated insulin secretion. In addition, exendin-4 increases pRB phosphorylation, E2f1 transcriptional activity as well as the expression of *E2f1* and *Pdx-1*. In *E2f1*^{B-/-} pancreatic islets, *Glp-1r* expression is decreased, resulting in a loss of potentiation effects of Exendin-4 on GSIS. AC: Adenylate cyclase; ATP: Adenosine tri-phosphate; cAMP: cyclic Adenosine mono-phosphate; GLP-1: Glucagon-like peptide-1; GLP-1R: Glucagon-like peptide-1 receptor; GLUT-2: Glucose transporter 2; E2F1: E2F transcription Factor 1; DP1: Dimerization Partner 1; pRB: Retinoblastoma protein.

Table 1: List of differentially phosphorylated peptides in mouse islets treated with 20 mM of glucose or 20 mM of glucose + 50 nM exendin-4.

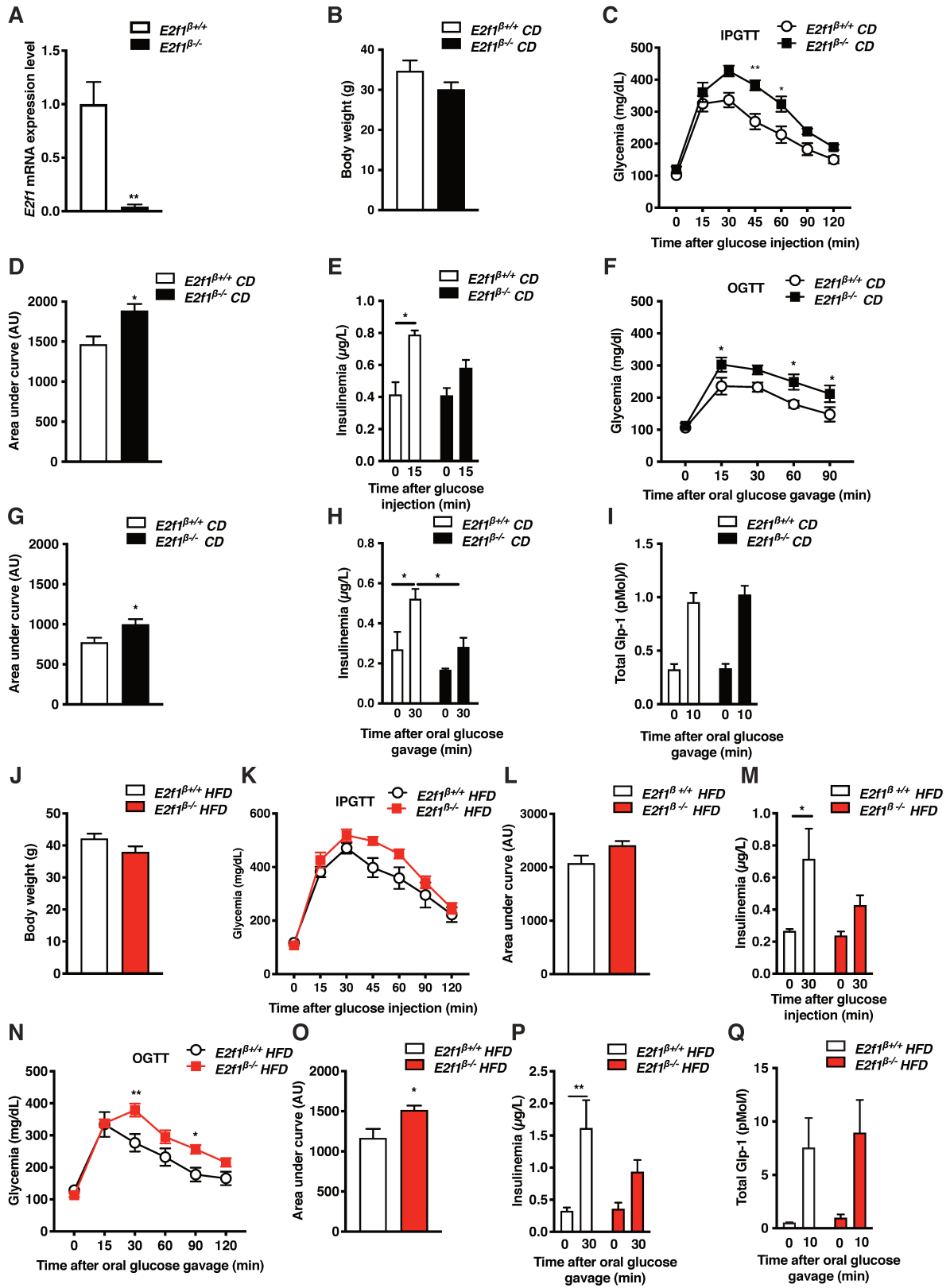
Peptide_Name	Log2FC	-Log10(pValue)
CFTR_761_773	0,278437942	5,331759617
F263_454_466	0,322237641	3,905287939
KPB1_1011_1023	0,544231594	3,743610774
KAP3_107_119	0,297545105	3,281205141
CAC1C_1974_1986	0,439983994	3,19862641
NFKB1_330_342	0,44198814	3,036551092

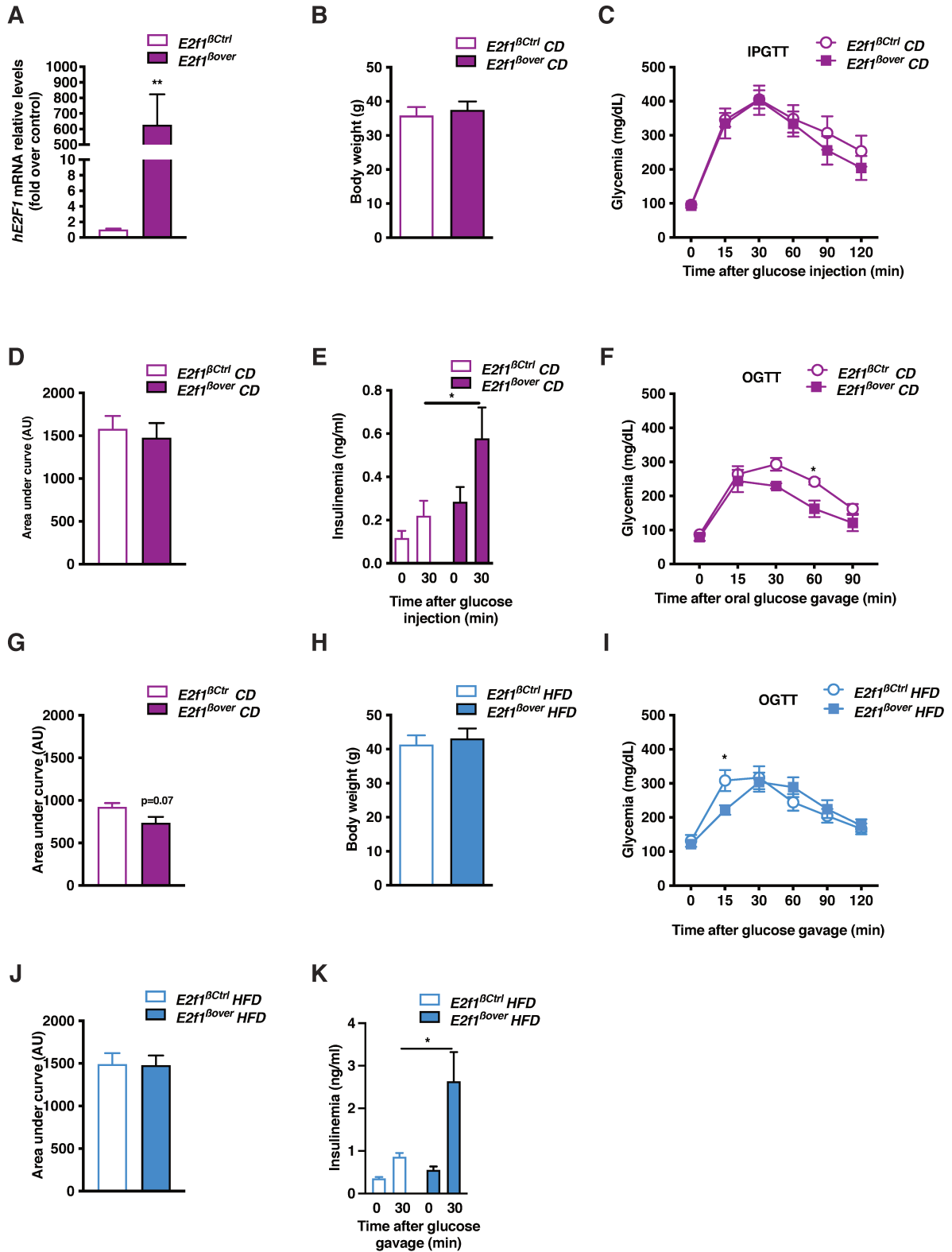
ART_025_CXGLRRWSLGGLRRWSL	0,491295815	2,829761112
TY3H_65_77	0,45895353	2,78406994
PTK6_436_448	0,476699829	2,766736962
MYPC3_268_280	0,41120401	2,738905784
CFTR_730_742	0,551521599	2,666052614
EPB42_241_253	0,547589958	2,660160209
STK6_283_295	0,241895363	2,599866013
CREB1_126_138	0,454896599	2,505216277
DESP_2842_2854	0,721435249	2,382496627
TOP2A_1463_1475	0,27369532	2,337214199
VTNC_390_402	0,364001602	2,311906038
ADRB2_338_350	0,425349236	2,134341853
RS6_228_240	0,351389259	2,120138342
GRIK2_708_720	0,302527428	2,043075465
ACM4_456_468	0,245583534	2,006511129
REL_260_272	0,658538043	2,00029606
PTN12_32_44	0,433181435	1,900544452
KCNA6_504_516	0,30946508	1,898120619
NCF1_321_333	0,422292382	1,862330501
LIPS_944_956	0,571039379	1,832412796
RYR1_4317_4329	0,268713325	1,739918105
RAP1B_172_184	0,35980019	1,728827646
P53_308_323	0,489605993	1,715349209
STMN2_90_102	0,533314526	1,695191174
SCN7A_898_910	0,412901074	1,677944879
GBRB2_427_439	0,385804802	1,664691778
GPSM2_394_406	0,662006855	1,657088411
VASP_150_162	0,517954826	1,597883979
NCF1_296_308	0,400952667	1,531899956
ACM1_444_456	0,233731583	1,506976939
CSF1R_701_713	0,468463272	1,496999651

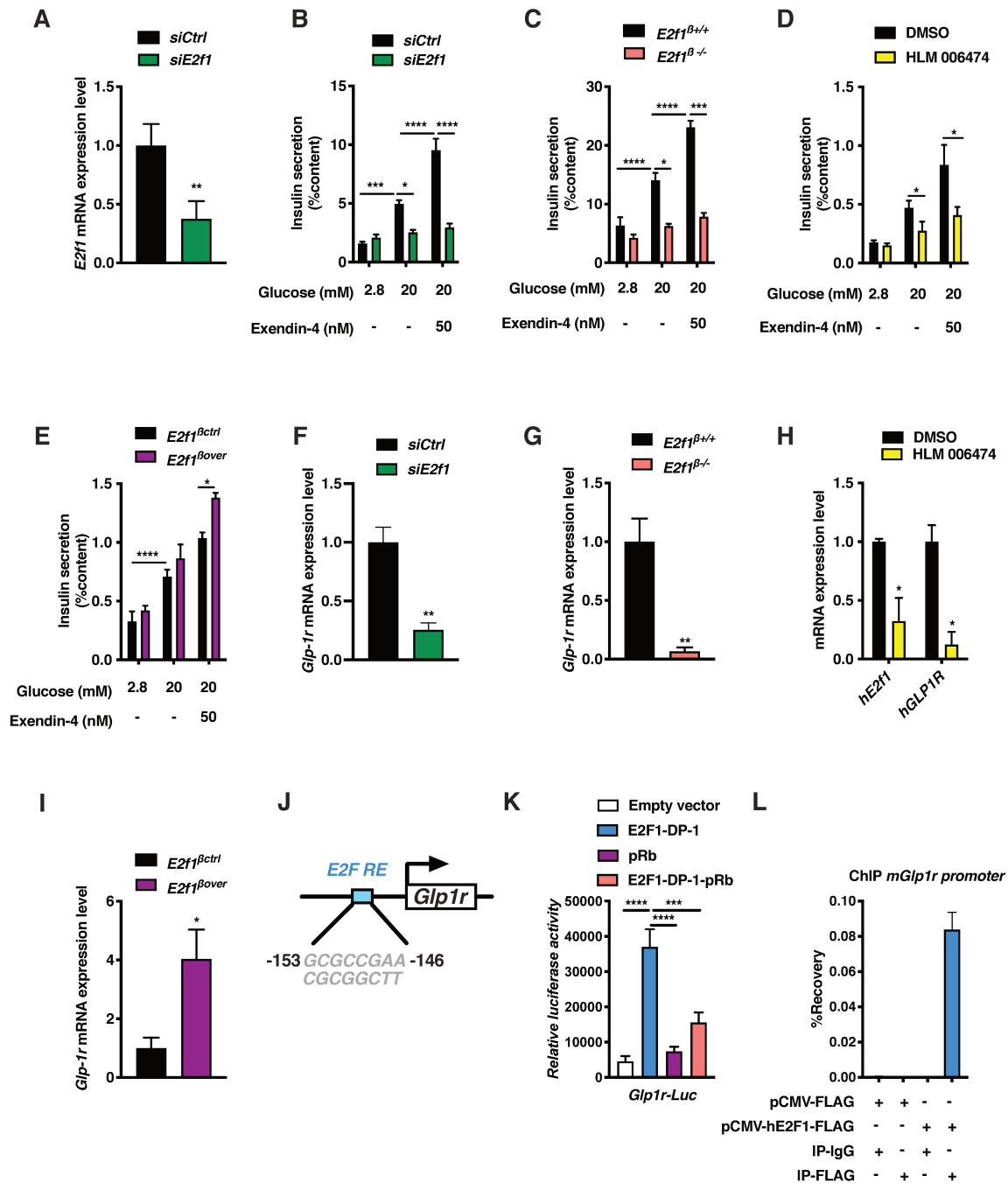
NMDZ1_890_902	0,388525337	1,444377647
K6PL_766_778	0,431940705	1,423819681
RB_803_815	0,63667804	1,366908432
KCNA2_442_454	0,482689857	1,311541664
KCNA3_461_473	0,427431911	1,307606387
KAP2_92_104	0,262349129	1,301506585
RAF1_253_265	0,372395277	1,260661604
ANDR_785_797	0,144718647	1,206507993
KIF2C_105_118_S106G	0,34814772	1,197508754
PLM_76_88	0,437398762	1,163264448
VASP_271_283	0,316580296	1,159928639
IF4E_203_215	0,299196482	1,157372437
ACM5_494_506	0,158276245	1,084326059
E1A_ADE05_212_224	0,267807961	1,073834338
CDN1A_139_151	0,237322807	1,070748828
MPIP1_172_184	0,359512806	1,006353783
ERBB2_679_691	0,100586094	0,997823528
BAD_112_124	0,551744461	0,982427985
RB_242_254	0,238704041	0,955614557
NOS3_1171_1183	0,18843396	0,946799825
PLEK_106_118	0,226697609	0,932844109
GPR6_349_361	0,281752437	0,925135001
FRAP_2443_2455	0,36285305	0,921667898
KAPCG_192_206	0,11823225	0,896310729
NEK2_172_184	0,188770935	0,889058035
ADDB_706_718	0,224111244	0,868373076
GSUB_61_73	0,252330214	0,839803456
RB_774_786	0,198471382	0,8389089
ANXA1_209_221	0,396960884	0,83124898
ESR1_160_172	0,294319004	0,778226067
MPIP3_208_220	0,701477706	0,756986033

PP2AB_297_309	0,193948269	0,714276568
MBP_222_234	0,158284187	0,684763956
PDPK1_27_39	0,57989502	0,683964096
CENPA_1_14	0,196633816	0,654688779
H32_3_18	0,243358299	0,652046094
BRCA1_1451_1463	-0,198002562	0,650452494
CGHB_109_121	0,154372051	0,632171315
FOXO3_25_37	0,100435257	0,614689704
NR4A1_344_356	0,233428642	0,612047911
KCNA1_438_450	0,328167111	0,607014033
MP2K1_287_299	0,173790619	0,591064986
MARCS_160_172	0,0965	0,577141439
H2B1B_27_40	0,196655273	0,557926684
ADDB_696_708	0,394567102	0,553493626
KPCB_19_31_A25S	0,150632858	0,546278049
RADI_559_569	-1,169470906	0,536950757
VASP_232_244	0,715976059	0,510343188
BAD_69_81	0,199600533	0,490755987
GYS2_1_13	0,0941	0,489561781
KS6A1_374_386	0,0465	0,480358957
KPCB_626_639	-0,312117904	0,414669067
AKT1_301_313	-0,326954275	0,397249622
BAD_93_105	0,0751	0,379139344
P53_12_24	0,220404223	0,369771968
VIGLN_289_301	0,551927924	0,339256617
CDK7_163_175	0,264778048	0,335196032
NEK3_158_170	0,141193792	0,32813934
RBL2_655_667	0,111330509	0,326777369
NTRK3_824_836	0,236568034	0,322665551
PDE5A_95_107	0,293000579	0,317922679
BCKD_45_57	-0,113957249	0,278838386

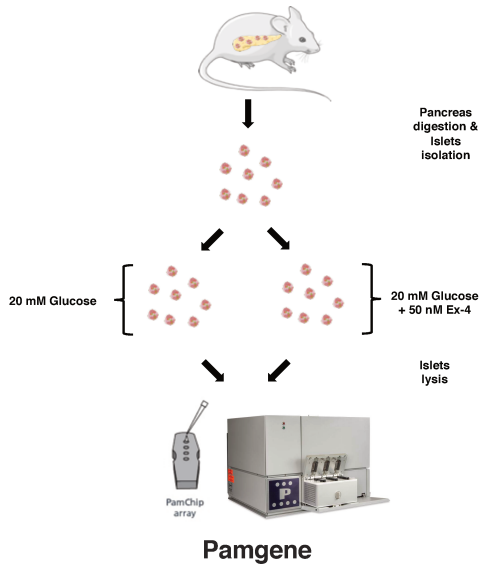
KCNB1_489_501	0,162852213	0,275776027
ERF_519_531	0,16679959	0,261561543
TAU_524_536	-0,220371976	0,198246162
KCC2G_278_289	0,105276741	0,184374174
PRKDC_2618_2630	0,0568	0,168460642
RB_350_362	-0,122649431	0,164536527
COF1_17_29	0,274445355	0,164126941
pTY3H_64_78	0,0457	0,160896065
DCX_49_61	0,0896	0,126626152
ELK1_356_368	-0,128286898	0,125236389
CDC2_154_169	0,0528	0,113166516
MARCS_152_164	0,0287	0,101275344
CD27_212_224	0,0273	0,097819167
ACM1_421_433	0,0241	0,097117629
CA2D1_494_506	0,0206	0,075288462
LMNB1_16_28	0,0542	0,055812501
ACM5_498_510	0,0227	0,033930329
FIBA_569_581	0,0299	0,032636569
PPR1A_28_40	0,0102	0,027891211
PYGL_8_20	-0,05	0,021152878
pVASP_150_164	0,00465	0,012733952
C1R_201_213	-0,0088	0,008277163



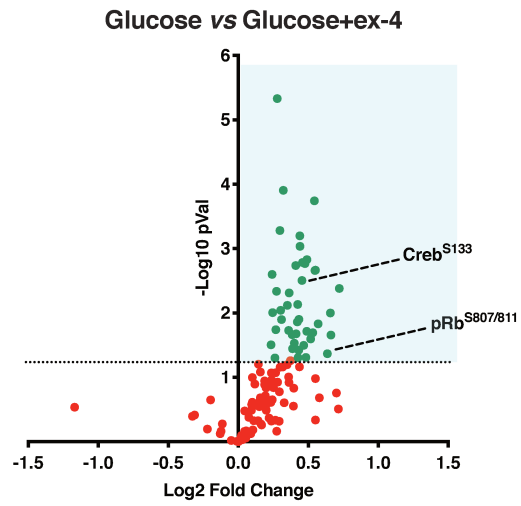




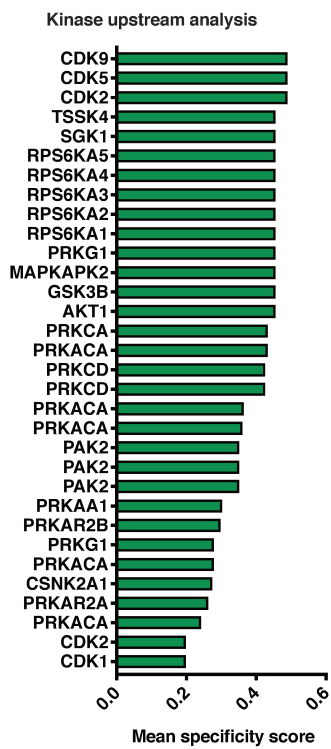
A



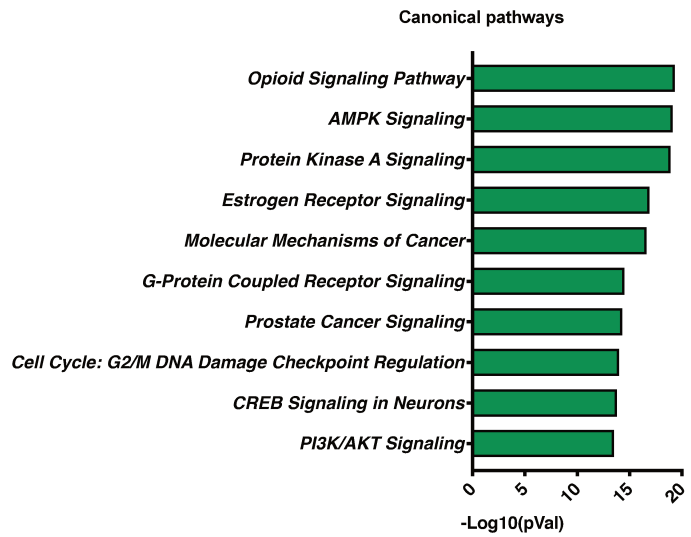
B

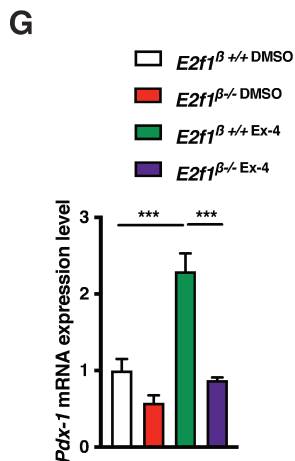
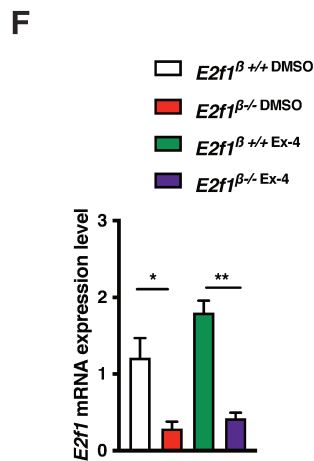
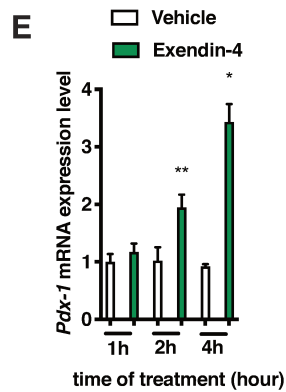
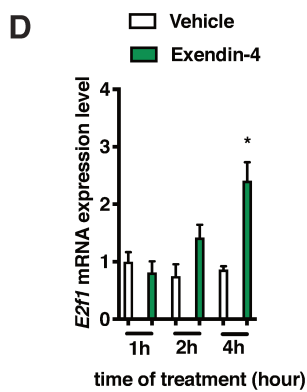
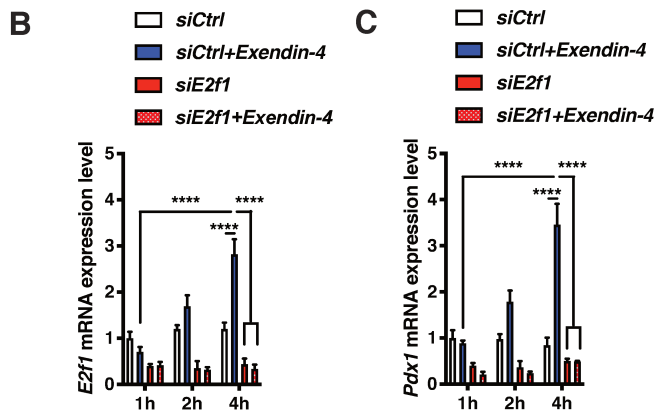
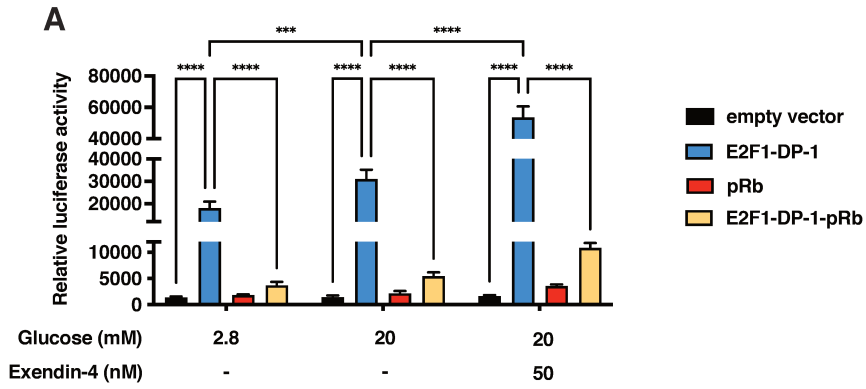


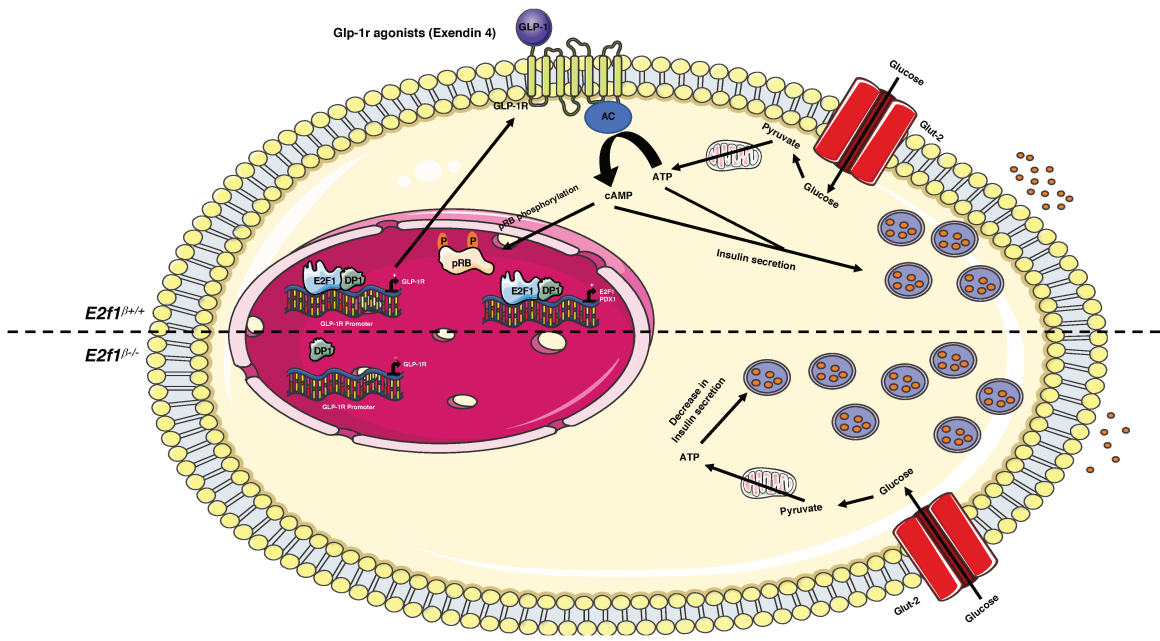
C



D







Annexe 3

Leptin enters the brain through a LepR:EGFR shuttle in tanycytes to regulate peripheral lipogenesis and pancreatic β -cell function

Manon Duquenne¹, Cintia Folgueira^{2#}, Cyril Bourouh^{3#}, Marion Millet^{4,#}, Anisia Silva^{5#}, Jérôme Clasadonte^{1#}, Monica Imbernon¹, Daniela Fernandois¹, Ines Martinez-Corral¹, Soumya Kusumakshi⁶, Emilie Caron¹, S. Rasika¹, Nathalie Jouy^{1,12}, Asturo Oishi⁵, Massimiliano Mazzone⁷, Eric Trinquet⁸, Jan Tavernier⁹, Young-Bum Kim¹¹, Stéphane Ory⁴, Ralf Jockers⁵, Markus Schwaninger¹⁰, Ulrich Boehm⁶, Ruben Nogueiras², Jean-Sébastien Annicotte³, Stéphane Gasman^{4&}, Julie Dam^{5&}, Vincent Prévot^{1&*}

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience & Cognition, UMR_S1172, EGID, F-59000 Lille, France

² CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, 15782, Spain- CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), 15706, Spain

³ Univ. Lille, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France.

⁵ Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶ Experimental Pharmacology, Center for Molecular Signaling (PZMS), Saarland University School of Medicine, 66421, Homburg, Germany

⁷ Laboratory of Tumor Inflammation and Angiogenesis, Center for Cancer Biology, VIB, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, B3000, Belgium

⁸ Cisbio Bioassays, Parc Technologique Marcel Boiteux, BP84175, F-30200 Codolet, France

⁹ VIB-UGent Center for Medical Biotechnology, Gent, Belgium.

¹⁰ Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

¹¹ Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

¹² Flow core Facility, Bioluminescence Imaging Center of Lille, campus HU, UMS2014-US41, F-59000 Lille, France

These authors contributed equally to this work

& These authors jointly supervised this work

Running Title: Tanycytes are conduits for peripheral metabolic signals into the brain

* Corresponding author: Vincent Prévot, Ph.D., Inserm 1172, Bâtiment Biserte,

Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Tel : +33 612-90-38-76

Fax : +33 320-53-85-62

E-mail : vincent.prevot@inserm.fr

SUMMARY

Metabolic health depends on the brain's ability to control food intake and nutrient use versus storage, processes that require peripheral signals such as the adipocyte-derived hormone, leptin, to cross brain barriers and mobilize regulatory circuits. We have previously shown that hypothalamic tanycytes shuttle leptin into the brain to reach target neurons. Here, we show that tanycytes express functional leptin receptor (LepRb), respond to leptin by triggering Ca²⁺ waves and phosphorylation of target genes, and that their transcytotic transport of leptin requires the activation of a LepR:EGFR complex by both leptin and EGF. Selectively deleting LepR in tanycytes blocks leptin entry, triggering not only increased food intake and lipid storage but glucose intolerance through attenuated insulin secretion by pancreatic β -cells, possibly involving alterations in sympathetic nervous tone. This tanycytic LepRb:EGFR-dependent transport of leptin into the brain could thus play a critical role in the pathophysiology of diabetes in addition to obesity.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is a common multigenic disorder affecting almost 10% of the world's population (559). However, the characteristics of this disorder do not appear to be homogeneous across the globe. In Asia, for example, T2D develops in a much shorter time, in a younger age group, and in people with a much lower body-mass index (BMI) than in patients from other parts of the globe (560). In addition, while Asian population studies suggest that a decrease in insulin production by β -cells is crucial for the development of diabetes, impaired insulin sensitivity, i.e. the ability to modulate glucose levels in response to circulating insulin, appears to be a prerequisite for incident diabetes in other ethnicities, including Europeans (560, 561).

Leptin is a 16-kDa peptide hormone produced by adipocytes. It functions as an afferent signal in a negative feedback loop that not only controls feeding and maintains energy homeostasis (562-567), but also regulates glucose metabolism (568, 569) and substrate fluxes (570, 571) by activating leptin receptor (LepR) signaling in the brain. How circulating leptin is transported into the central nervous system to reach its target neurons remains an enigma. However, an increasing body of evidence points to the median eminence, a circumventricular organ in the basal hypothalamus adjacent to the arcuate nucleus (ARH), as a key entrance point for leptin into the metabolic brain (572-574).

By virtue of the fenestrated or porous endothelium of the underlying pituitary portal blood vessels, which replaces a traditional blood-brain barrier (BBB), the median eminence acts as a brain window at which circulating signals, including metabolic hormones, may enter the brain by passive diffusion (575, 576). Among the neuronal populations responsive to metabolic hormones in this region, those of the ventromedial ARH (vmARH) (575, 577) and neurons that extend dendrites into the median eminence can directly sense this local blood-borne information (578). However, the passive diffusion of metabolic signals into the median eminence is limited in extent (575, 577), and tanycytes, a specialized glial cell type lining the floor of the third ventricle (3V), form a blood-cerebrospinal-fluid (CSF) barrier that prevents these circulating metabolic signals from reaching deeper hypothalamic structures through the CSF (572-574). Consequently, in order to reach more distant targets such as neurons of the dorsomedial ARH (dmARH), these signals require an active transport mechanism to cross the tanycytic blood-CSF barrier (579, 580).

In a previous study, we have shown that tanycytes, whose end-feet contact the fenestrated capillaries of the median eminence, themselves internalize and shuttle blood-borne leptin extravasating from these fenestrations into the CSF, in an ERK-dependent manner (581). However, the putative involvement of LepR in this transcytotic transport process has remained unclear, with some authors questioning the expression of LepR by tanycytes (582, 583).

Here, by employing multiple *in vitro* and *in vivo* approaches and several mouse models, we demonstrate that tanycytes do indeed express functional LepR, and that this LepR expression is required for the transcytotic transport of peripheral leptin into the CSF, a process that appears to play a vital role in the central control of pancreatic β cell function, lipid accumulation and subsequent glucose homeostasis.

RESULTS

LepR is expressed and active in tanycytes of the median eminence

In order to verify the expression of LepR by median eminence and ARH tanycytes, we first used the powerful RNAscope approach with probes targeting the long and short forms of LepR, LepRb and LepRa, respectively. Interestingly, while both isoforms were present in tanycytic cell bodies lining the walls of the 3V, this expression was relatively weak compared to the overwhelmingly high expression seen in leptin-responsive neurons of the ARH, providing an explanation for the failure of other, less sensitive, methods to detect tanycytic LepR expression without resorting to the isolation of these cells (Supplementary Figure 1A). We therefore searched for other tools such as novel antibodies capable of reliably detecting LepR protein in order to confirm its presence in median eminence tanycytes. We characterized the recently described biologically active allosteric antibody XPA, which was developed to target mouse LepR (584). Using isolated parts/fragments of the LepR extracellular domain (ECD), we found that the epitope specifically targeted by XPA lies in the cytokine receptor homology 1 (CRH1) domain of mouse LepR (Figure 1A; Supplementary Figure 1B), outside the orthosteric leptin-binding site of the CRH2 domain (Figure 1A, 1B). The use of LepR BRET biosensors indicated that XPA was capable of inducing conformational changes and the oligomerization of LepR, even though these changes were different from the ones promoted by the natural ligand (Figure 1C). Similarly to leptin (50nM), treatment with 100nM XPA consistently triggered STAT3 signaling in HEK293, N46, HeLa and CHO cells

transfected with LepRb (Figure 1D; Supplementary Figure 1C), as well as ERK signaling in HEK293 cells (Figure 1D). XPA also induced the phosphorylation of STAT3 in primary cultures of tanycytes (Figure 1E), which we have previously shown to express LepR and to internalize fluorescently labeled leptin *in vitro* (581). This indicates that, rather than simply being a passive marker of LepR protein expression, XPA is also a vital marker for activated and internalized LepR. Accordingly, a 5 min co-application of fluorescent leptin (125nM) and fluorescent XPA (30nM) to primary tanycyte cultures showed that 100% of the cells that internalized fluorescent leptin also internalized fluorescent XPA, and that 50 to 60% of the endocytosed leptin colocalized with XPA *in vitro* (Figure 1F), indicating that these cells expressed LepR and internalized it in response to leptin binding. To confirm that tanycytes also express LepR *in vivo*, we intravenously administered XPA (2 nmol/animal) or vehicle to mice 2 min before sacrifice. At this short interval, XPA was seen to colocalize with the vimentin-immunoreactive cell bodies and processes of tanycytes arching down to the fenestrated capillary plexus of the median eminence (Figure 1G).

In our quest for further indisputable evidence of LepR expression and function in median eminence tanycytes, we assessed whether tanycytes in living brain slices could respond to leptin and initiate Ca^{2+} signaling, as hypothalamic neurons do (585, 586). To selectively target tanycytes, we generated mice expressing the GCamp3 calcium biosensor under the control of the *Trmp5* promoter, which is selectively expressed in tanycytes in the median eminence and present in the majority of this cell population (Figure 1H) (587), by crossing *Trmp5::Cre* mice with those allowing Cre-dependent expression of GCamp3. Puffing 6 μ M leptin onto the ventricular wall of brain slices against the flow of perfusion resulted in a $[Ca^{2+}]_i$ increase in the cell bodies of median eminence tanycytes, as seen using live imaging (Figure 1H, and 1I). A bath-application of 6 μ M of the point-mutated leptin LAN (L39A/D40A/F41A), which acts as a competitive antagonist by binding LepR but blocking its activity (588), prior to puffing leptin onto tanycytes inhibited the leptin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in these cells (Figure 1I, and 1K), suggesting that LepR activation is required for this signaling cascade. To further test the actual involvement of LepR in this process, we generated mice in which LepR was selectively knocked out in cells expressing the *Trmp5* promoter. In these *Trmp5::Cre; LepR^{loxP/loxP}; GCamp3^{loxP/STOP/loxP}* mice (*Gcamp3^{Trmp5}; LepR^{Trmp5KO}* mice), puffs of leptin failed to promote any change in $[Ca^{2+}]_i$ in tanycytes (Figure 1J, and 1K). However, puffs of 10 mM ATP, a well-known and potent activator of calcium waves in tanycytes (589, 590), readily elevated $[Ca^{2+}]_i$ in both LAN-treated and mutated brain slices, showing the viability of the cells (Figure

1L, Supplementary Figure 2). Together, these data unequivocally show that tanycytes *in vivo* express active LepR, which mediates leptin-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$.

EGFR-mediated LepRb signaling is required for the transcellular trafficking of leptin in tanycytes

To characterize the mechanism by which tanycytes transport blood-borne leptin into the CSF and the rest of the hypothalamus, we next studied the transcytotic route followed by fluorescent leptin using primary cultures of tanycytes. As early as 2 min after the internalization of fluorescent bioactive leptin, the fluorescent signal was detected in EEA1-immunoreactive early endosomes (Figure 2A), where it accumulated for the first 10 min. The fluorescent leptin then exited this subcellular compartment, as indicated by the subsequent decrease in intensity and extinction of fluorescence over time (Figure 2B, Figure 2C, Supplementary Figure 3A), along with leptin release into the culture medium (Figure 2D). Similarly, fluorescent LAN, which binds to but is unable to activate LepR, was also seen to be internalized (Supplementary Figure 3B) and to reach early endosomes (Supplementary Figure 3D). However, the overall intensity of LAN fluorescence inside the cell remained constant over time (Supplementary Figure 3B), and LAN was seen to remain sequestered in EEA1-immunoreactive compartments (Figure 2E, Supplementary Figure 3C-D), suggesting that, in contrast to bioactive leptin, captured LAN could not be released from tanycytes. These results suggest that LepR signaling is not required for leptin uptake, but is required for internalized leptin to complete its transcytotic route across tanycytes into the CSF.

Next, since this transcytosis could be mediated by the leptin signaling cascade, characterized by the rapid activation of a series of tyrosine kinases (TK) and serine/threonine protein kinases (STK), we performed kinome profiling to explore differential global kinase activity in tanycytes in the presence or absence of 125nM leptin for 2, 5, 10 and 15 min. We used the PamGene array, which consists of 140 immobilized tyrosine- and serine/threonine-containing peptides that are the targets of most known kinases (TK and STK PamChips). Peptides whose phosphorylation varied significantly between control and leptin-treated primary tanycytes indicated the putative activation of specific kinases in response to leptin. This kinase analysis revealed the significant activation of the EGFR pathway 2 min after leptin treatment (Figure 2F) and of MAP kinases including ERK2 15 min after leptin treatment (Supplementary Figure 3E). We have previously reported that ERK activation is required for the release of leptin

internalized by tanycytes *in vitro*, and that the alteration of blood-borne leptin shuttling into the hypothalamus in diet-induced obese mice can be rescued by activating ERK using potent inducers such as EGF (581). Here, the novel and unexpected finding that EGFR itself is *trans*-activated by leptin in tanycytes suggests a possible molecular pathway underlying our previous observations.

In vivo, EGFR immunoreactivity was detected both in the cell bodies of tanycytes lining the walls and floor of the 3V and in their distal processes, which contact fenestrated capillaries at the pial surface of the brain in the external zone of the median eminence (Supplementary Figure 4A). Polymerase ligation assays using XPA demonstrated the extensive physical interaction of EGFR and LepRb in both cellular compartments, a phenomenon that is blunted in *Trmp5::Cre; LepR^{loxP/loxP}* mice (Figure 2K), suggesting that LepRb:EGFR signaling in tanycytic end-feet may play a role in the transcellular transport of circulating leptin once it is captured. from the bloodstream.

We then explored this interaction between EGFR and LepR signaling. Co-transfection experiments in HEK293 cells confirmed that EGFR was immunoprecipitated with LepR, suggesting, intriguingly, that the two receptors could physically interact with each other even in the absence of a ligand (Figure 2G). To study the effect of ligand binding on this interaction, we next used Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) in living HEK293 cells to investigate the proximity between leptin and EGF and their cognate receptors within the LepR:EGFR complex (Supplementary Figure 3F). Taking advantage of targeted fluorescently-labeled SNAP receptors (energy donor, Terbium (**Tb**)) and ligands (labeled with the energy acceptor, **d2**), TR-FRET enables the demonstration of the proximity of a ligand at a distance of 10 nm or less to a specific and unique receptor within a heteromeric receptor complex (591). Because leptin does not bind to EGFR, the incubation of fluorescent leptin-d2 even at high concentrations with fluorescently labeled SNAP-EGFR did not lead to any TR-FRET signal (Figure 2H, Supplementary Figure 3F). However, the co-expression of unlabeled LepR in fluorescent SNAP-EGFR-expressing cells in the presence of leptin-d2 gave rise to a significant and specific TR-FRET signal, demonstrating the close proximity between SNAP-EGFR, LepR and leptin-d2 (Figure 2H, Supplementary Figure 3F). This binding of leptin-d2 to the SNAP-EGFR:LepR complex was seen to increase and to reach saturation in a concentration-dependent manner, with an affinity ($K_D(\text{SNAP-EGFR:LepRb}) = 0.42 [0.26-0.49] \text{ nM}$) similar to the affinity of leptin binding to isolated LepR (592) (Figure 2H). EGF binding to EGFR did not modify the affinity of leptin binding to the LepR:EGFR complex (Figure 2H), but the significantly higher B_{max} of the saturation curve indicates that it likely induced a

conformational change in LepR within the molecular complex (Figure 2H; Supplementary Figure 3G). Similarly, cells expressing EGFR and fluorescent SNAP-LepR that were stimulated by EGF-d2 (Supplementary Figure 3H) were seen to emit a specific TR-FRET signal, reflecting the interaction between SNAP-LepR:EGFR:EGF-d2 (Supplementary Figure 3I). A weak TR-FRET signal detected between SNAP-LepR and EGF-d2 in the absence of heterologous EGFR may have arisen from a weak interaction between SNAP-LepR and endogenous EGFR. As suggested by the model fitting of the saturation curve, EGF-d2 interacted with EGFR within the LepR:EGFR complex with the same affinity ($K_D(\text{SNAP-LepRb:EGFR}) = 2.1 [1.6-2.5] \text{ nM}$) as with isolated EGFR alone ($K_D(\text{SNAP-EGFR}) = 3.2 [2.4-3.7]$) (Supplementary Figure 3J). In line with the binding of leptin-d2 or EGF-d2 to their cognate receptors within the complex, the proximity of fluorescent leptin-Tb (energy donor) to EGF-d2 (energy acceptor) was only detected when both LepR and EGFR were co-expressed (Supplementary Figure 3K, 3L), suggesting the formation of a quaternary complex, Leptin:LepR:EGFR:EGF, in these cells.

In isolated tanycytes, combined treatment with leptin and EGF enhanced EGFR and ERK phosphorylation, supporting the intricate collaboration between these two receptors at the level of the tanycytic ERK signaling pathway (Figure 2I). Accordingly, EGF potentiated the leptin:LepR activation of the ERK signaling pathway in HEK293T cells, a reaction that was blunted by pre-treating the cells with the EGFR kinase inhibitor, AG1478 (Figure 2J). Conversely, the inhibition of MEK1/2, the upstream activators of ERK, using U0126 led to the accumulation of fluorescent leptin in EEA1-immunoreactive early endosomes in tanycytes and blunted its release (Figure 2D), thus phenocopying the behavior of fluorescent LAN, which does not activate LepR, after its internalization by tanycytes (Figure 2E, Supplementary Figure 3B, 3C, 3D). We next verified whether this lack of LAN release from the early endosome compartment in tanycytes could be bypassed by directly activating the EGFR-ERK signaling pathway. EGF treatment (1.5nM) strikingly restored the trafficking of fluorescent LAN downstream of early endosomes (Figure 2E) and its probable release by tanycytes, suggesting that EGFR activation occurs downstream of LepR activation (Supplementary Figure 3C). Together, these data indicate that the transcytosis of leptin by tanycytes, which allows it to reach the CSF and distant hypothalamic tissues, requires LepR-EGFR-ERK signaling.

Mice lacking LepR-EGFR signaling in adult tanycytes show increased fat mass gain linked to restricted access of blood-borne leptin to the hypothalamus

To examine the functional role of LepR expression in adult tanycytes, we used the injection of the TAT-Cre recombinant protein into the 3V of *LepR^{loxP/loxP}* mice. The use of *tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* reporter mice revealed that 2 μ l TAT-Cre infusion into the 3V (1.27 μ g/ μ l over 15 min) caused genetic recombination in about 60% of the tanycytes of the median eminence (Supplementary Figure 5A and 5B), but not in tanycytes of the area postrema, another circumventricular organ in the brainstem involved in the regulation of energy homeostasis (593) (Supplementary Figure 5C). In contrast, TAT-Cre infusion into the fourth ventricle (4V) was seen to target both median eminence and area postrema tanycytes (Supplementary Figure 5C), while TAT-Cre infusion into the lateral ventricle was ineffective in inducing Tomato expression in median eminence tanycytes (Supplementary Figure 5A - 5B). FACS isolation of Tomato-positive ependymal cells from microdissected dorsal and ventral aspects of the 3V, which are enriched in ciliated ependymal cells and tanycytes, respectively (Supplementary Figure 5D), showed that LepR expression was readily detected by real-time PCR in the tanycyte-enriched population, but not in classical ependymal cells (Supplementary Figure 5E). Accordingly, FACS isolation of Tomato-positive median eminence tanycytes after the infusion of TAT-Cre into the 3V of *tdTomato^{loxP-STOP-loxP}; LepR^{loxP/loxP}* mice (Figure 3A) showed that the expression of transcripts encoding both the short forms of LepR as well as LepRb was significantly diminished in these cells, when compared to Tomato-positive tanycytes from *tdTomato^{Tan}; LepR^{+/+}* mice (Figure 3B and 3C). Interestingly, the transcript of *Socs3*, a known leptin-responsive transcriptional target (594), was also found to be downregulated in Tomato-positive cells from *tdTomato^{Tan}; LepR^{TanKO}* mice (Figure 3D). Importantly, *LepR* and *Socs3* mRNA levels were not downregulated in Tomato-negative cells (Figure 3B-3D). The TAT-Cre-mediated loss of *LepR* expression in tanycytes was also accompanied by a dramatic decrease in the PLA signal reporting the physical association between LepRb and EGFR (Figure 2K), as seen in *Trmp5::Cre; LepR^{loxP/loxP}* mice.

Interestingly, mice lacking LepR in tanycytes of the median eminence were seen to eat more (Supplementary Figure 6A), specifically in the morning after lights-on (Figure 3E). They also gained significantly more weight (Figure 3F) than both vehicle-injected control littermates with normal tanycytic LepR expression and TAT-Cre-injected heterozygous mice (*LepR^{TanHet}*). This weight gain was associated with a 3-fold increase in fat mass 12 weeks after *LepR* was knocked out in tanycytes (Figure 3G), with a concomitant loss of lean mass (Figure 3H) such that the net gain in body mass remained

moderate (Supplementary Figure 6B). At 12 weeks post-TAT-Cre injection, *LepR^{TanKO}* mice showed a significant increase in visceral (Figure 3I), but not subcutaneous fat mass (Figure 3J) when compared to vehicle-injected *LepR^{loxP/loxP}* littermates. Surprisingly, this weight gain was independent of hyperphagia, since *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with controls gained the same weight as *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* (Figure 3K and 3L). To characterize the reason for this change in body weight, we monitored these mice using an indirect calorimetry system. Weight gain in *LepR^{TanKO}* mice was associated with an increased respiratory exchange ratio (RER) during the light phase both at 4 weeks (Supplementary Figure 6A2) and 12 weeks after TAT-Cre injection (Figure 3M and 3N), a phenomenon that was conserved under the pair-fed condition (Figure 3K), in which *LepR^{TanKO}* mice kept gaining more weight than *LepR^{loxP/loxP}* littermates (Figure 3L), even though energy expenditure (Supplementary Figure 6A3 and 6C) and locomotor activity (Supplementary Figure 6A4 and 6D) remained unchanged. These phenomena were reproduced when tanycytes were transduced with a viral vector expressing Cre under the control of the tanycyte-specific *Dio2* promoter (589), as an alternative to TAT-Cre infusion into the 3V (Supplementary Figure 6A5-A8).

Interestingly, in accordance with the marked increase in fat mass, circulating levels of leptin were seen to be increased as early as 4 weeks after the TAT-Cre-mediated *LepR* deletion in tanycytes (Figure 3O). Taking into account the close relationship between LepR and EGFR and the likely transactivation of LepR to some extent by endogenous EGF (Figure 2, Supplementary Figure 3), we therefore also measured EGF levels in the blood of *LepR^{TanKO}* mice, to determine whether the lack of LepR signaling in these mice would give rise to compensatory changes in the EGF-EGFR signaling pathway. Interestingly, we found that EGF levels, which we could readily detect in the circulation, were increased in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 3P). However, EGF levels were unchanged in wild-type mice given a high-fat diet for 8 weeks as compared to chow-fed controls (Figure 3Q), suggesting that the increase in EGF levels in *LepR^{TanKO}* mice were not related to the higher circulating leptin levels observed in these animals per se (Figure 3O), but rather to central phenomena linked to deficient LepR signaling.

Increased food intake after overnight feeding (Figure 3E) despite elevated adiposity (Figure 3G and 3I) and circulating levels of leptin in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 3O) further raised the possibility that these animals could be developing hypothalamic resistance to circulating leptin, linked to defective leptin transport across the BBB into the CSF by tanycytes, as seen at early stages of diet-induced obesity in various animal models (581, 595). First, to confirm that this phenomenon occurs under physiological

conditions, we assessed endogenous STAT3 activation in the ARH, which has previously been shown to be linked to endogenous LepR activation (580, 596), at lights-on after overnight feeding, when circulating leptin levels are at their highest (597). While the number of P-STAT3-immunoreactive cells lying outside the BBB in the vmARH was seen to be unaffected in *LepR^{TankO}* mice (Supplementary Figure 7A and 7B), the number of P-STAT-3 immunoreactive cells in the dmARH was diminished by about 30% in these mutant mice when compared to *LepR^{loxP/loxP}* control littermates (Supplementary Figure 7A and 7C). We then assessed the ability of exogenous leptin to activate leptin-sensitive hypothalamic neurons 15 min after an intraperitoneal (i.p.) bolus injection. While leptin-induced P-STAT3 activation was unaffected in the vmARH (Figure 4A and 4B), it was still significantly hampered in the dmARH of *LepR^{TankO}* mice when compared to *LepR^{loxP/loxP}* mice (Figure 4A and 4C). To determine how this decreased access to peripheral leptin could impact the neuronal populations of the ARH involved in the control of body homeostasis, we analyzed the expression of several leptin-regulated key transcripts by q-PCR. Figure 4D shows that, in *LepR^{TankO}* mice, transcripts coding for the melanocortin receptor antagonist *Agrp* were significantly induced, whereas *Socs3* mRNA levels were downregulated. Next, we subjected *LepR^{TankO}* mice as well as their control littermates to an i.p. or intracerebroventricular (i.c.v.) injection of exogenous leptin and measured food intake 24h (Figure 4E). While exogenous leptin injected i.c.v. directly into the CSF was equally efficient in reducing feeding in both groups of mice, *LepR^{TankO}* mice, in contrast to *LepR^{loxP/loxP}* mice, were unable to respond to exogenous leptin injected i.p. by decreasing food intake (Figure 4E), suggesting once again that tancytic LepR is necessary for peripheral leptin to reach leptin-sensitive neurons not in the immediate vicinity of fenestrated vessels in the median eminence. Finally, we further verified that the decreased response to peripheral leptin in *LepR^{TankO}* mice was due to an alteration in the LepR-dependent tancytic transport of blood-borne leptin into the hypothalamus by implanting microdialysis probes into the dorsomedial mediobasal hypothalamus of mutant mice and their control littermates. In agreement with the P-STAT3 distribution observed under physiological conditions (Supplementary Figure 7), basal leptin levels in this region were seen to be significantly lower in *LepR^{TankO}* mice than in *LepR^{loxP/loxP}* littermates (Figure 4F). However, 20 min after an i.p. bolus injection of leptin, the rise in hypothalamic leptin levels seen in *LepR^{loxP/loxP}* mice was absent in mice lacking LepR in tanocytes (Figure 4F), although leptin levels increased in *LepR^{TankO}* mice 60 min after exogenous leptin administration, a time point when they had returned to nadir levels in *LepR^{loxP/loxP}* mice (Figure 4F).

Similarly, mice in which EGFR expression in tanycytes was blunted by the AAV1/2-mediated expression of *Egfr* silencing RNAs in these cells (Supplementary Figure 4B, Figure 4G) phenocopied certain aspects of *LepR^{TanKO}* mice, notably the concomitant decrease in lean mass and increase in fat mass with no modification of body weight 8 weeks after infection, when compared with mice infected with a control virus expressing GFP (Figure 4H, 4I and 4J). Like *LepR^{TanKO}* mice, animals with EGFR silencing in tanycytes also showed a hampered ability to respond to an i.p. injection of leptin by decreasing food intake (Figure 4K).

Altogether, these results strongly support the view that tanycytic LepR-EGFR signaling is required for blood-borne leptin to be transported into the hypothalamus and exert its anorexigenic effect, and reveals an unprecedented role for tanycytic leptin transport in the control of body composition.

Mice lacking LepR in tanycytes show hyperlipidemia and lipid accumulation in white adipocytes as well as in the liver

Given the increase in RER in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 3M), indicative of the increased consumption of carbohydrates over lipids to meet energy requirements (114), we next examined how lipid metabolism was altered in mice in which leptin transport into the hypothalamus was defective. The changes in RER and food-intake-independent body weight gain in *LepR^{TanKO}* mice appeared to be due to decreased fatty acid oxidation (Figure 3R), which was associated with an increase in both visceral fat mass (Figure 3G) and leptinemia (Figure 3O) and elevated circulating levels of cholesterol and triglycerides (Figure 5A), but not of non-esterified free fatty acids (NEFAS) (Figure 5B). These data, together with an increase in the size of white adipocytes (Figure 5C), suggest that *LepR^{TanKO}* mice show hyperlipidemia and lipid accumulation in white adipocytes.

In agreement with the increased uptake of free fatty acids into white adipose tissue in response to central leptin deficiency (571), *LepR^{TanKO}* mice showed a marked increase in protein levels of lipoprotein lipase (LPL), an enzyme that promotes the uptake of circulating triglycerides, and acetyl-CoA carboxylase (Acc) and fatty acid synthase (FAS), enzymes crucial for *de novo* lipogenesis, in ependymal fat (Figure 5D and 5E). Of note, the ratio of phospho-Acc to total Acc was decreased in *LepR^{TanKO}* mice

(Figure 5D and 5E), which suggests, in agreement with previously published data (571), that hypothalamic leptin regulates ACC in white adipose tissue. We next examined the expression of the key lipolytic enzyme hormone-sensitive lipase (HSL), the activity of which is also known to be regulated by central leptin signaling (571), and found that the levels of phosphorylation-activated HSL were lower in *LepR^{TanKO}* mice than in control littermates (Figure 5D and 5E). Overall, these results indicate that the lack of LepR in tanycytes favors the accumulation of lipids by promoting lipogenesis and lipid uptake while inhibiting lipolysis in white adipose tissue. Importantly, these effects were independent of feeding since they occurred in both *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* and those pair-fed with the control group.

Increased accumulation of lipids was also noted in the liver of *LepR^{TanKO}* mice using oil red staining (Figure 5F). Accordingly, liver triglyceride content was seen to be increased in these mice even in the pair-fed condition (Figure 5G), whereas circulating triglyceride levels were comparable to those in *LepR^{loxP/loxP}* controls (Figure 5A). Given the absence of any marked change in the expression of enzymes involved in lipid metabolism (Figure 5H and 5I), the increase in lipid accumulation in the liver of *LepR^{TanKO}* mice is likely not due to local *de novo* synthesis but indirectly to the increased weight and hyperlipidemia of these mice.

Mice lacking LepR in tanycytes sequentially develop insulin resistance and defective insulin-secretory capacity

Leptin has long been known to influence glucose homeostasis independent of its effect on body weight regulation (598, 599). These effects appear to be mediated by leptin action on LepR-expressing neurons in the ARH, since the local reintroduction of LepR expression in otherwise LepR-knockout animals normalizes insulinemia in these animals (569). In light of the altered gene expression in ARH neurons observed in our mice, we therefore next investigated the effect of LepR deletion in tanycytes in glucose metabolism. Four weeks after LepR deletion, mice did not appear to have any problem in managing exogenous injections of glucose (Figure 6A). However, monitoring glucose-stimulated insulin release in *LepR^{TanKO}* mice at 4 weeks intriguingly showed that, despite normal glucose tolerance at this early time point (Figure 6A), these mice were secreting more insulin than control *LepR^{loxP/loxP}* or *LepR^{TanHet}* mice both before (12h fasting insulin: *LepR^{TanKO}*, $0.81 \pm 0.12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ vs. *LepR^{loxP/loxP}*, $0.48 \pm 0.06 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and *LepR^{TanHet}*, $0.46 \pm 0.03 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $p = 0.03$ and $p = 0.04$, respectively, one way ANOVA and Tukey's multiple

comparison test) and after glucose injection (Figure 6B), despite an apparently normal response to insulin (Figure 6C), suggestive of a pancreatic β -cell function deficiency. This alteration in the release of insulin by β -cells may thus be linked to the inability of ARH neurons to appropriately perceive circulating leptin levels, as suggested by decreased STAT3 activation after overnight feeding (Supplementary Figure 7) or upon exogenous leptin treatment (Figure 4A, 4C), as well as the downregulation of *Socs3* in the ARH of *LepR^{TanKO}* mutants (Figure 4D).

By 12 weeks after *LepR* deletion, however, *LepR^{TanKO}* mice developed impaired tolerance to exogenous glucose (Figure 6D). This deficient glucose homeostasis was correlated with a significantly lower increase in glucose-stimulated insulin levels in *LepR^{TanKO}* mice, suggesting some degree of pancreatic dysfunction in these mice (Figure 6E). Insulin sensitivity and HOMA were similar in the two genotypes (Figure 6F and 6G). To investigate possible alterations in pancreatic function in mice lacking *LepR* in tanycytes, we investigated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in isolated pancreatic islets from *LepR^{TanKO}* and *LepR^{loxP/loxP}* littermates. Although *LepR* deletion in tanycytes did not affect the total insulin content of islets (Figure 6H), insulin secretion from isolated islets was severely hampered under high glucose conditions in 12-week *LepR^{TanKO}* mice when compared to *LepR^{loxP/loxP}* controls (Figure 6I). Gene expression analysis in islets from 12-week *LepR^{TanKO}* mice compared to controls revealed the increased expression of genes involved in glucose sensing (*Glut2*, *Gck*) and insulin maturation (*Pcsk1*) but decreased expression of key β -cell identity genes such as *Pdx1* ($p=0.065$) and *MafA* (Figure 6J). *LepR^{TanKO}* islets also exhibited an increase in the expression of markers of the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response (UPR^{er}) pathway, including *Atf4* ($p=0.016$), *Xpb1t* and *Chop* (Figure 6K), thought to be associated with impaired β -cell function and T2D development (600). The number of α (glucagon-positive) and β (insulin-positive) cells per islet was similar in the pancreas of the two genotypes (Figure 6L, 6M, 6N). Altogether, these data suggest that the loss of *LepR* function in tanycytes impairs glucose homeostasis and insulin secretion through the transcriptional control of key pancreatic β -cell and UPR^{er} markers, preceded by the development of mild insulin resistance, and that the whole sequence of events unfolds within 3 months of altering the tanycytic shuttling of leptin into the hypothalamus.

To determine whether the restoration of central leptin levels could rescue β -cell function in 12-week *LepR^{TanKO}* mice, we stereotaxically injected 2 μ g of leptin i.c.v. 3h before lights-off. After 12h of fasting,

a glucose tolerance test and measurement of insulin levels 15 min after an i.p. injection of glucose showed that this treatment significantly improved glucose management in *LepR^{TankO}* mice, but had no apparent effect on *LepR^{loxP/loxP}* littermates (Figure 6O). However, i.c.v. leptin injection significantly increased insulin secretion 15 min after glucose injection in both mutant and control mice (Figure 6P). These results demonstrate that the action of tancyte-transported leptin in the hypothalamus is vital to the direct control of β -cell function, likely through the intermediary of leptin-sensing ARH neurons connected to the pancreas via the autonomic nervous system (601), and raise the intriguing possibility that defects in the tancytic leptin shuttle may also play a critical role in the pathophysiology of diabetes.

Impaired access of leptin to the hypothalamus could mediate central effects on glucose and lipid metabolism through altered sympathetic tone

The central effects of leptin on glucose homeostasis appear to involve the melanocortin system (601), which we have shown above to be altered in *LepR^{TankO}* mice, and which impinges upon the sympathetic nervous system (602, 603). In addition, the sympathetic nervous system is also known to mediate the central effects of leptin on white adipose tissue lipid metabolism (571). We therefore next assessed circulating noradrenaline levels in *LepR^{TankO}* mice, with their defective tancytic shuttling of leptin into the hypothalamus (Figure 4E and 4F), and found that the levels of noradrenaline were reduced, suggesting an overt decrease in sympathetic tone when compared to control *LepR^{loxP/loxP}* littermates (Figure 7A). Interestingly, the pancreatic islets of *LepR^{TankO}* animals express more α 2A adrenergic receptors compared to their littermates without affecting the expression of β 2 adrenergic receptors (Figure 7B). α 2A adrenergic receptors are known for their inhibitory action on insulin secretion by the pancreas (604, 605). To further probe the sympathetic nervous system in *LepR^{TankO}* mice, we subjected them to a 2h exposure to cold (4°C) and measured changes in rectal temperature as well as noradrenaline levels. In cold conditions, *LepR^{TankO}* mice experienced a drop in core temperature (Figure 7C), a phenomenon associated with defective cold-induced noradrenaline secretion (Figure 7D). Together, these results suggest a possible mechanistic pathway whereby decreased leptin access to hypothalamic neurons controlling bodily homeostasis alters overall sympathetic tone, which in turn affects peripheral glucose and lipid metabolism. Because previous studies have shown that brain-pancreas and brain-adipose tissue connections involve leptin signaling through the melanocortin system

(601, 606) and because *LepR^{TanKO}* mice show altered levels of *Agrp* transcripts (Figure 4D), it is tempting to speculate that the main hypothalamic neuronal population affected by the defective shuttling of circulating leptin into the brain is that of AgRP-expressing ARH neurons, which mediate melanocortin signaling.

Knocking out LepR in tanycytes blunts the leptin-mediated neuroendocrine response to fasting

Given our previous demonstration that tanycytes play a role in the adaptive response to fasting (580), and because leptin has long been known to play important physiological roles during starvation (607), we next tested the ability of peripheral leptin treatment (1mg/kg/12h) to attenuate the adaptive neuroendocrine response to 24h fasting in *LepR^{TanKO}* mice. While leptin repletion after this period of starvation had no effect on blood glucose, it caused a reduction in food intake over the first 4h and 12h of refeeding and a consequent reduction in weight gain after 24h in *LepR^{loxP/loxP}* mice, but not in *LepR^{TanKO}* littermates (Figure 7E). Interestingly, while 24h fasting dramatically increased corticosterone levels in *LepR^{loxP/loxP}* mice, a phenomenon normalized by leptin replacement therapy, it did not cause any change in corticosterone levels in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 7E).

Overall, our results strongly suggest that in the absence of the tanycytic leptin shuttle, the brain loses its ability to properly respond to physiological challenges and thus to restore bodily homeostasis.

DISCUSSION

Leptin, a hormone secreted by adipocytes in the periphery, plays a fundamental role in the regulation of energy homeostasis by controlling food intake and energy expenditure (562-567). To achieve its central effects, leptin needs to cross the blood-brain barrier and gain access to specific leptin-sensitive neurons in the hypothalamus and elsewhere, a process mediated by tanycytes (581). Our results convincingly show that, in contrast to recent studies that question the expression of the leptin receptor LepR in tanycytes (583), LepR is not only expressed but is functionally active in hypothalamic median eminence tanycytes. Possible explanations for the assumption that LepR is not expressed in tanycytes could be the fact that, like astrocytes, these specialized hypothalamic glia do not express the cre-dependent

reporter genes commonly used in *LepR::Cre* animal models (582) or that most of the alternative detection techniques used so far are not sensitive enough (583). In addition, in the inducible Cre-driver mouse lines used by others (583), the accessibility of the *LepR* gene in tanycytes may be impaired by the use of tamoxifen, which is known to alter chromatin architecture (608), interfere with estrogen receptor activity and impact metabolism on its own (609). These technical problems were overcome in the current study with an array of methods to detect not only the presence of LepR protein in ME tanycytes but also its function. In addition, we demonstrate that LepR signaling in tanycytes plays a critical role in the transcytotic mechanism by which they shuttle blood-borne leptin into the hypothalamus, and show that the leptin-mediated activation of LepR causes the early activation of EGFR, which we had previously and serendipitously shown to be able to rescue diet-induced obese animals from central resistance to peripheral leptin (581). This leptin-LepR-dependent activation of EGFR in tanycytes, which our PLA experiments suggest occurs in tanycytic distal processes that contact the fenestrated endothelium of pituitary portal capillaries *in vivo*, is required for the release of internalized leptin from early endosomes by triggering the downstream ERK signaling pathway. Furthermore, while LepR and EGFR appear to form a complex capable of binding both leptin and EGF, the activation of EGFR by EGF potentiates the effects of leptin on ERK activation while it appears to leave P-STAT3 activation unaffected. The kinetics of EGFR and ERK activation by leptin in primary tanycytes, with the leptin-induced phosphorylation of EGFR occurring at very early time points, within 2 minutes as seen by PamGene technology, and ERK phosphorylation occurring at 15 min, is reminiscent of that reported in gastric cancer cells (610). Although we detected EGF in the circulation in our animals, this EGFR activation in tanycytes could also involve, as in cancer cells, transactivation processes, similar to those in cancer cells, known to occur in tanycytes (611, 612).

Leptin signaling in the brain also exerts specific and complementary peripheral effects on adipose tissue through the regulation of nutrient partitioning by decreasing the expression of key *de novo* lipogenic enzymes and stimulating the levels of phosphorylated HSL, essential for the activation of lipolysis (565, 571). Interestingly, in addition to its mild consequences on body weight, we show that deleting tanycytic LepR expression in the median eminence of adult mice increases food intake, modifies nutrient partitioning to favor the disproportionate use of carbohydrates, thus favoring lipid accumulation, dramatically alters body composition by promoting an increase in fat mass to the detriment of lean mass,

and also impairs the ability of the brain to control glucose homeostasis in association with a marked impairment in pancreatic β cell function and altered sympathetic tone.

The capacity of leptin to regulate these diverse metabolic parameters resides in LepR-expressing neurons in the ARH, namely proopiomelanocortin (POMC) and agouti-related peptide (AgRP) expressing neurons, which are known to be involved in the control of adipose tissue lipogenesis (571) and glucose homeostasis (569), in response to this adiposity signal. For instance, the deletion of LepR in either POMC or AgRP neurons leads to moderate obesity, while the knock-out of LepR in both AgRP and POMC neurons combined has clear cumulative effects on adiposity despite a comparable effect on food intake (613, 614). The fact that our mice mimic this metabolic phenotype suggests that the depletion of LepR in tanycytes precludes the access of leptin to POMC and AgRP neurons and its subsequent actions in these neuronal populations. This hypothesis is supported by the fact that the removal of LepR from tanycytes severely hampers the ability of both endogenous and exogenous leptin to reach the mediobasal hypothalamus and activate leptin-sensitive neurons in the dmARH, and upregulates transcripts for both *Agrp*, a melanocortin receptor antagonist, and downregulates the expression of *Socs3*, a known leptin-responsive gene (594), in the ARH. Interestingly, the melanocortin system is involved not only in glucose homeostasis (569, 601, 615) but also in the sympathetic nervous system-mediated regulation of lipid metabolism in white adipose tissue (571, 606), and both nadir and cold-induced circulating noradrenaline levels are reduced in mice lacking tanycytic LepR. In light of these findings, we propose that deficient leptin-regulated activity in POMC and AgRP neurons of the dmARH alters their capacity to use the melanocortin signaling pathway (616, 617) to communicate with neurons of the autonomous nervous system in the brainstem and the spinal cord (602, 618), and thus their control of peripheral target tissues (565, 619). In keeping with the hypothesis above, we found that the decrease in insulin secretion by pancreatic β cells in mice lacking LepR in tanycytes was associated with a significant increase in their expression of α 2A adrenergic receptors. This is also in agreement with previous studies showing that the activation of these receptors is associated with a decrease in both glucose tolerance and insulin exocytosis by β islets (604). In addition, in humans, a polymorphism leading to the overexpression of the α 2A adrenergic receptor ADRA2A is associated with an increased risk of developing T2D (605). Our results suggest that the removal of leptin receptor expression in tanycytes may lead to a decrease in insulin secretion that can be explained by an overexpression of adrenergic receptors α 2A. Overall, our results fill the gaps in our understanding of the mechanism of

leptin action: i) blood-borne leptin reaches dmARH neurons through a singular route involving transcytotic transport by median eminence tanycytes, which depends on the activation of a LepR:EGFR complex and ERK signaling, ii) leptin then stimulates the dmARH neurons controlling the melanocortin system and sympathetic outflow, and iii) this diminishes lipid storage in adipose tissue and controls glucose homeostasis by shaping the function and plasticity of pancreatic islet cells through their expression of α 2A adrenergic receptors.. Conversely, alterations in tanycytic leptin transport manifest as decreased sympathetic tone, increased visceral adiposity, hepatic steatosis and glucose intolerance with pancreatic dysfunction.

Interestingly, regardless of whether LepR or EGFR signaling in tanycytes is defective in our mouse models, the fat mass gain observed occurs concomitantly with an intriguing loss of lean tissue, resulting in overall weight gain remaining limited. This phenomenon, where obesity is associated with sarcopenia (sarcobesity), is reminiscent of that often seen during aging (620, 621) and may promote the progression of related conditions such as diabetes and frailty (622). A recent study has shown that in mouse models of hyperglycemia and T2D due to defective β cell function, inter-tissue crosstalk involving the liver and amino acid catabolism leads to skeletal muscle atrophy (623). Further studies are required to explore this pathway in mice in which LepR:EGFR signaling complex is defective in tanycytes, to determine how alterations of the tanycytic leptin shuttle impact aging.

Longitudinal human studies show that T2D develops in subjects exhibiting insulin hypersecretion in normoglycemic and prediabetic phases in order to keep glycemia near normal, in a context of chronic nutrient surfeit and obesity-associated insulin resistance, until they reach a threshold at which this compensatory β cell response becomes unsustainable (624). Compensating for insulin resistance by increasing insulin secretion usually requires both enhanced β cell function and expansion of the β cell mass, the latter being stimulated by the increased nutrient supply, including glucose and free fatty acids (625). However, diabetes is a heterogeneous disease (626), and an alternative pattern characterized by the alteration of insulin secretion due to a β cell functional deficit could predominate in some ethnic groups. This phenotypic variability can be seen in a Japanese study in which the proportion of patients progressing to the onset of T2D was 50% in patients with a dysfunction of isolated β cells, as compared to 14% for patients with insulin resistance (627). Intriguingly, an epidemiological study of Korean patients with T2D showed that they developed impaired insulin secretion and insulin resistance 10 years before the onset of diabetes, and impaired β cell compensation with an abrupt decrease in insulin secretion

during the last 2 years before onset (561), underscoring the central role of β cell dysfunction in the pathogenesis of T2D in Asian populations. The existence of two patterns of disease progression can also be seen from the fact that East Asian T2D patients have a much lower BMI than European patients but more intra-abdominal fat for similar BMI values (560). In our current model, the attenuation of tancytic leptin transport leads to an initial increase of insulin secretion despite the absence of insulin resistance. Twelve weeks after selectively deleting LepR in median eminence tancytes, *LepR^{TankO}* mice develop impaired insulin secretion in response to glucose, against a backdrop of increased visceral fat but normal insulin sensitivity. This alteration of glucose-stimulated insulin secretion, which likely underlies the alteration of glucose homeostasis, can be seen at the level of isolated pancreatic islets despite the lack of any apparent change in their size or organization, suggesting a modification of β cell functional integrity instead, mimicking the principal human phenotype described above. Despite this deficiency in β cell function, the reactivation of central control by infusing leptin into the cerebral ventricles 12 weeks after the tancytic leptin shuttle was inactivated by knocking out LepR restored the ability of these mice to manage exogenous glucose, by restoring insulin secretion induced by CSF-borne leptin.

To summarize, the study of our *LepR^{TankO}* mouse model appears to have unmasked two important aspects of leptin action: i) the molecular and cellular mechanisms that regulate the physiological access of leptin to leptin-responsive neurons in the brain, i.e. the LepR-EGFR-ERK-mediated transcytotic transport of blood-borne leptin into the hypothalamus by tancytes, and ii) the link between deficient leptin transport by tancytes and the pathophysiology of pancreatic β cell failure and lipid dysmetabolism in the context of moderate overweight and sarcobesity. Together, these findings shed light on the central control of peripheral lipid and glucose homeostasis by leptin, and create new therapeutic avenues for metabolic disorders.

METHODS

Animals

All C57Bl/6J mice were housed under specific pathogen-free conditions in a temperature-controlled room (21-22°C) with a 12h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. *tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* (IMSR Cat# JAX:007914, RRID:IMSR_JAX:007914) and *GCamP3^{loxP-STOP-loxP}* (IMSR Cat#

JAX:025406, RRID:IMSR_JAX:025406) reporter mice and *LepR*^{loxP/loxP} mice (IMSR Cat# JAX:008327, RRID:IMSR_JAX:008327) (628) were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). *Trmp5::Cre* mice have been engineered by Dr. Ulrich Boehm (University of Saarland, Homburg, Germany) and published elsewhere (587). Animal studies were approved by The Institutional Ethics Committees for the Care and Use of Experimental Animals of the University of Lille; all experiments were performed in accordance with the guidelines for animal use specified by the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU).

TAT-Cre, pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP and AAV(1+2)-GFP-U6-m-EGFR-shRNA delivery

A TAT-Cre fusion protein and the AAV 1/2 *Dio2::Cre* virus (0,5x10¹⁰ genomic particles per µl) were produced as detailed previously (589, 629). AAV(1+2)-GFP-U6-m-EGFR-shRNA was produced by Vector Biolabs (shAAV-258137). All products were stereotaxically infused into the third ventricle (2µL over 7 min at 1,27 mg/ml; anteroposterior, -1.7 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -5.6 mm), the lateral ventricle (Anteroposterior, -0.3 mm; midline, +/- 1 mm; dorsoventral, -3 mm) or the forth ventricle (Anteroposterior, -6 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -4 mm) of 24h fasting isoflurane-anesthetized floxed mice 1 week before experiments for the TAT-Cre one and 3 weeks before experiments for the virus one.

Evaluation of TAT-Cre recombination efficiency

Four weeks after lateral ventricle or 3rd ventricle TAT-Cre infusion in *TdTomato* mice, animals were anesthetized with ketamine (8mg/kg body weight) + xylazine (3mg/kg body weight) before being perfused with Saline (0,9% NaCl) and 4% paraformaldehyde. Brains were collected before being cryoprotected in 20% sucrose solution overnight, embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 16 µm-thick coronal sections were cut and processed for immunofluorescence using chicken anti-Vimentin (1:2000; Millipore Cat# AB5733, RRID:AB_11212377) primary antibodies and Alexa647-conjugated anti-chicken antibody (1/1000; Thermo Fisher Scientific Cat# A-21449, RRID:AB_2535866). Images were acquired using an Axio Imager Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). 8 median eminence representative slides per animal were then coded to conceal treatment groups and

the tanycytes (Vimentin positive cells) were divided into three groups depending their projections (median eminence and arcuate nucleus, ventromedial hypothalamus, dorsomedial hypothalamus). Number of DAPI+/Tomato+/Vimentin+ cells was reported on DAPI+/Vimentin+ cells bordering the 3rd ventricle. The ratio was compared between different groups.

To compare 3rd and 4th ventricle TAT-Cre infusion, the number of FACS -sorted Tomato positive cells was compared in ME and 4th ventricle microdissected samples, 1 week after TAT-cre infusion.

Fluorescence-Activated Cell Sorting and Real-Time PCR Analyses

Isolation of hypothalamic tanycytes using Fluorescence Activated Cell Sorting

Median eminence from TAT-Cre injected *tdTomato*^{loxP/+} and *LepR*^{oxP/loxP}; *tdTomato*^{loxP/+} mice were microdissected, and enzymatically dissociated using Papain Dissociation System (Worthington, Lakewood, NJ) to obtain single-cell suspensions. FACS was performed using an ARIA SORP cell sorter cytometer device (BD Bioscience, Inc). The sort decision was based on measurements of tdTomato fluorescence (excitation 561nm; detection: bandpass 675+/-20nm) by comparing cell suspensions from tdTomato positive and wild-type animals, as indicated in Figure 3A. For each animal, 4000 cells tdTomato positive and negative cells and negative cells were sorted directly into 10µL extraction buffer: 0,1% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) and 0,4 U/µl RNaseOUT™ (ThermoFisher).

Quantitative RT-PCR analyses

For gene expression analyses, mRNAs obtained from microdissected hypothalamic explants or FACS-sorted tanycytes were reverse transcribed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies) and a linear preamplification step was performed for the sorted cells only using the TaqMan® PreAmp Master Mix Kit protocol (P/N 4366128, Applied Biosystems). Real-time PCR was carried out on Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System using exon-boundary-specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems): DARPP32 (Ppp1r1b_Mm00454892_m1); LEPR (Variant 1, long form) (LepR_Mm1265583_m1); LEPR (Variant 3, short form) (LepR_Mm01262070_m1), NPY (NPY-Mm03048253_m1), MECA32 (Plvap-Mm00453379_m1), POMC (POMC-Mm00435874_m1), AgRP (AgRP-**Mm00475829_g1**), CART (CARTPT-**Mm04210469_m1**), Socs3 (Socs3-**Mm00545913_s1**), Ptp1b (Ptp1b-**Mm00448427_m1**) DIO2 (Dio2-Mm00515664_m1), FGF10 (Fgf10-Mm00433275_m1), GPR50 (Gpr50-Mm00439147_m1), SLCO1C1 (Slco1c1-Mm00451845_m1). Control housekeeping genes: r18S (18S-Hs99999901_s1); ACTB (Actb-Mm00607939_s1). Gene expression data were analyzed using SDS 2.4.1 and Data Assist 3.0.1 software (Applied Biosystem).

Glucose Tolerance Test and Insulin dosage

Mice were fasted overnight before the experiment (12 hours). Blood sample for insulin dosage was taken before, 15 and 30 min after glucose administration with glass capillary at the tail. Samples were kept on ice during the experiments before being centrifuged (4°C, 600 rpm, 15 min) to collect serum and frozen at -80°C until insulin ELISA (Mercodia). Basal blood glucose level was measured before glucose i.p administration (1,5 mg glucose/g of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter). One cohort of animals was injected i.c.v with recombinant murine leptin (2µg/animal; Harbor-UCLA Medical Center, California) 3 hours before lights off, mice subjected to fasting overnight (12 hours) and glucose tolerance test as well as insulin dosage performed the next day.

Insulin Tolerance test

Mice were fasted 6 hours before the experiment. Basal blood glucose level was measured before insulin i.p administration (0,75UI/kg of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter)

In vivo leptin sensitivity test

Mice were first separated one per cage and fasted during 3 hours in the afternoon. Then they are divided into two groups which received i.p or i.c.v injections of recombinant murine leptin (3mg/kg; Harbor-UCLA Medical Center, California) or vehicle (PBS pH 8.0) 3 hours before being refeed. Body weight and food intake were measured before, 12h and 24h after treatment period.

Assessment of the role of leptin on corticosterone response to 24h fasting

Two weeks before the fasting, when the lights turn on (8 am), glycemia was measured and blood was withdrawn from the animal's cheek (630) to assess serum corticosterone levels in fed condition. Then, mice were put one per cage and subjected to fasting for 24 hours. Half of fasting mice received leptin (1mg/kg; Harbor-UCLA Medical Center, California) or saline i.p. injections every 12 hours (8 am and 8 pm). At 24h of fasting, blood samples were taken from each animal's cheek before refeeding. Food intake was then measured at 4, 12 and 24 hours after refeeding. Corticosterone levels were quantified by ELISA (55-CORMS-E01; American Laboratory Products Company) according to manufacturer's instructions.

Cold-exposure test: core temperature and noradrenaline measurements Rectal temperature was measured in mice before collecting blood samples from the cheek. One hour later, mice were exposed to cold (4°C) during 2 hours and rectal temperature and blood sample were collected. Delta temperature before and after cold exposure was calculated and fed and fasting noradrenaline serum concentrations were quantified by ELISA (see paragraph below).

Microdialysis in vivo

Nine *LepR^{loxP/loxP};tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* mice were injected in the lateral ventricle with the AAV(1/2) *Dio2::Cre* virus (n=4) or vehicle (n=5). In brief, 25-35g mice were deeply anesthetized with isoflurane (3% in 1 L/min air flow) in an induction chamber, placed in a stereotaxic apparatus equipped with a mask to maintain anesthesia during all the experiment (isoflurane between 1 to 1.5% in 1 L/min air flow). Core body temperature was maintained at 37°C with an electrical blanket controlled by a thermostat. A microdialysis cannula (CMA8 High Cut-off, 100 kDa, 1 mm membrane length; CMA microdialysis AB, Sweden) was implanted over the mediobasal hypothalamus using the stereotaxic coordinates (relative to bregma antero-posterior: -1.3, lateral: -0.3, ventral from brain: -6.1 mm). Microdialysis probe was then perfused with sterile artificial cerebrospinal fluid (CMA Perfusion Fluid CNS. NaCl 147 mmol/L, KCl

2.7mmol/L, CaCl₂, 1.2 mmol/L and MgCl₂ 0.85 mmol/L; CMA, Stockholm, Sweden) at a rate of 2 μ L/min using a microinjection pump (CMA 402; CMA, Stockholm, Sweden). Following a stabilization period of 45 min, one dialysate of 20 min was collected as basal. A vehicle injection (i.p, PBS pH 8.0) was administrated to the mice and two dialysates every 20 min were recovered. Finally, at 60min a Leptin solution was administrated to the mice (i.p, 3mg/Kg in PBS pH 8.0, Harbor-UCLA Medical Center, California) and 5 dialysates of 20 min each were recovered. Brain dialysates were placed in a fraction collector (CMA/820) during the experiment and immediately stored at -80°C until analysis. At end of experiment, mice were euthanized by decapitation and brains stored immediately in fresh paraformaldehyde 4%. Vibratome brain sections of 80 μ m were counterstained with DAPI to verify probe location. Only mice where the probe was position between antero-posterior: -1.2 and -2.3 were included in the analysis.

Leptin, EGF and noradrenaline ELISA assays

Basal leptin concentration in blood serum of *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TankO}* mice and leptin content in microdialysates from brain were measured using ELISA assay (Leptin mice MOB00; R&D systems) according to manufacturer protocol. EGF concentration in blood serum from C57bl6/J in Normal Chow, 8 weeks of High Fat Diet (#D12492; Research Diets), *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TankO}* were quantified by ELISA assay according to the manufacturer's instruction using mouse EGF ELISA kit (EMEGF ; ThermoFisher). Basal noradrenaline concentration in blood serum *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TankO}* mice were quantified from serum with norepinephrine ELISA kit (BA-E5200; Immusmol).

Brain and peripheral tissues analysis

Brain slice preparation and calcium imaging

Eight to 12 weeks old male *GCaMP3^{Trmp5}* and *GCaMP3^{Trmp5}; LepR^{Trmp5}* mice were anaesthetized with isoflurane, and after decapitation, the brain was rapidly removed and put in ice-cold oxygenated (O₂ 95% / CO₂ 5%) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 120 NaCl, 3.2 KCl, 1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucose (300 mOsm, pH 7.4). After removal of the cerebellum, the brain was glued and coronal hypothalamic slices 200 μ m thick containing the median eminence and lateral walls of the third ventricle were cut using a vibratome (VT1200S; Leica) as previously described (631). Before recording, slices were incubated at 35°C for a recovery period of 1 h. After recovery, slices were placed in a submerged recording chamber (31°C; Warner Instruments)

and continuously perfused (2 ml/min) with oxygenated ACSF. Tanycytes were observed with a 40x water immersion objective in an upright Leica DM-LFSA microscope by using infrared differential interference contrast (IR-DIC). To detect GFP fluorescence, a blue illumination was provided via a 470 nm LED and an ORCA-Flash4.0 LT digital CMOS camera (Hamamatsu) was used to collect images. MetaMorph image acquisition software (Molecular Devices) was used to control the illumination and camera. Analysis of imaging data was performed off-line using MetaMorph (Molecular Devices) and Fiji software. Regions of interest (ROI) were drawn around individual tanycyte cell bodies from the infrared and/or the fluorescence images. Changes in fluorescence intensity of GCaMP3 were measured by plotting the intensity of ROI over time, after the intensity of a background ROI had been subtracted. Then, an initial baseline fluorescence signal was computed before drug application at resting state (F_0) and subsequent fluorescence values ($F - F_0 = \Delta F$) were normalized to this ($\Delta F / F_0$). Drugs were applied via puffs from a patch pipette made of borosilicate glass (World Precision Instruments) and pulled on a P1000 puller (Sutter Instrument Co). The tip of the pipette was positioned 25 μm away from tanycyte cell bodies. Puffs were delivered in the opposite direction of the flow of the perfusion chamber at a pressure of 4 psi using a PV820 pneumatic PicoPump (World Precision Instruments). The concentration of Leptin and ATP (Sigma) in the patch pipette was 6 μM and 10 mM (both prepared in ACSF), respectively. To exclude mechanical responses of tanycytes to the puff, patch pipettes were also filled with ACSF alone.

Leptin receptor detection with XPA antibody

Twelve weeks C57bl6/J mice were anesthetized with ketamine (8mg/kg body weight) + xylazine (3mg/kg body weight) before being injected with XPA antibody (2 nmol/animal, Xoma Laboratories) in the jugular vein. As soon as the injection ended, mice were perfused with Saline (0,9% NaCl) and 4% paraformaldehyde. Brains were collected before being cryoprotected in 20% sucrose solution overnight, embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 20 μm -thick coronal sections were cut and processed to reveal XPA with 1 hour incubation at room temperature with Biotin Goat anti-human IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 109-065-003, RRID:AB_2337621). VECTASTAIN® Elite ABC peroxidase kit (PK-6100, Vector Laboratories) was used according to the manufacturer's instructions to amplify the signal. XPA antibody was visualized with TSA Biotin Tyramide kit (SAT70001EA, Perkinelmer) associated with Streptavidin Alexa Fluor® 568 (1:600; Thermo Fisher Scientific Cat# S-11226, RRID:AB_2315774).

Proximity Ligation Assay

Brain slices were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized and saturated with Triton X100 (0.3%) and 5% Horse Serum/PBS solution for 1 h. Primary antibodies XPA (Xoma Laboratories) and anti-EGFR rabbit (Sigma, Ab-1070) were incubated at 4 °C overnight. PLA was performed by the use of a Duolink® In Situ Red Starter Kit Goat/Rabbit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. To assess the specificity of the PLA signal, the whole process was performed with only one primary antibody.

RNAscope fluorescent in situ hybridization

FISH was performed on 2% paraformaldehyde perfused brain sections (*Egfr*) and frozen brain sections (*LepR*) of the median eminence of adult male mice with the RNAscope® Multiplex Fluorescent Kit v2 according to the manufacturer's protocol (Advanced Cell Diagnostics, Inc., Newark, CA, USA). Specific probes were used to detect *LepR* variant 1 (471171 , NM_146146.2 , target region 3220 - 4109), *LepR* variant 3 (496901-C3 , NM_001122899.1 , target region 3291 - 4713), and *Egfr* (443551-C2 , NM_207655.2 , target region 58-2111) mRNAs. Hybridization with a probe against the *Bacillus subtilis* dihydrodipicolinate reductase (*dapB*) gene (320871) was used as negative control. Following *Egfr* FISH, a Vimentin immunostaining was done using Chicken anti-Vimentin antibody (1:500 Millipore Cat# AB1620, RRID:AB_90774), revealed with Goat anti-chicken 647 (1:500 ; Thermo Fisher Scientific Cat# A-21449, RRID:AB_2535). For FISH experiments and immunofluorescent staining of Vimentin, acquisition of images was performed using an inverted confocal microscope (LSM 710, Zeiss, Jena, Germany). Excitation wavelengths of 493/562 nm, 568/643 and 640/740 were selected to image Alexa 488- and Alexa 568-secondary antibodies and TSA plus Fluorescein, Cyanine 3 and Cyanine 5. UV laser (wavelength of 355 nm) was used to image Hoechst and DAPI. Z-stack images were acquired with a W Plan-APOCHROMAT 20x objective (NA 0.5, zoom 1.0). High magnification photomicrographs were acquired with a 63x objective (NA 1.4) using the Airyscan detector (Zeiss). Images to be used for figures were pseudocolored, adjusted for brightness and contrast and merged using Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

pSTAT3 immunohistochemistry and analysis

Adult mice were sacrificed by decapitation in the morning at lights on. Brains were collected before being embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 20 µm-thick coronal sections were cut, postfixed with a solution of 2% paraformaldehyde during one hour and processed for immunofluorescence as previously described (Bouret et al., 2012) using rabbit anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:1000; Cell Signaling Technology Cat# 9131, RRID:AB_331586) primary antibodies and revealed with Goat anti-rabbit 647 (1/500; Molecular Probes Cat# A-21244, RRID:AB_141663). Immunofluorescence images were acquired using an Axio Imager.Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). Slides were then coded to conceal treatment groups, and pSTAT3 immunoreactive (IR) cells counted in eight sections par animal.

Pancreatic Islet Studies

Pancreata were digested by type V collagenase (C9263; 1,5 mg/ml) for 11 min at 37°C as described previously (Annicotte et al., 2009, Rabhi et al., 2016). Briefly, after digestion and separation in a density gradient medium, islets were purified by handpicking under microscope and cultured overnight in a 1640 RPMI (Gibco, 61870-010) media containing 1mM of FBS (Gibco, 10270-106) and Penicillin/streptomycin. For insulin secretion tests, approximately thirty islets were exposed to either 2,8 mM or 20 mM glucose in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer containing 0,5% fatty-acid-free BSA. Insulin released in the medium was measured 1 hour later using the Ultrasensitive Insulin ELISA kit (Merckodia). Data are expressed as a ratio of total insulin content..

RNA Extraction, Measurements and Profiling of pancreatic islets

Total RNA was extracted from islets using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's recommendations. mRNA expression was measured after reverse transcription by real-time qPCR with FastStart SYBR Green master mix (Roche) according to the manufacturer's recommendations and gene-specific oligonucleotides. Real-time qPCR results were normalized to endogenous cyclophilin reference mRNA levels. Results are expressed as the relative mRNA level of a specific gene expression using the formula $2^{-\Delta Ct}$. List of used primers are summarized in the table below.

Gene	Sense Primer	Antisense Primer
Cyclophiline	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC	TTGCCATTCTGGACCCAAA
Glut2	AACCGGGATGATTGGCATGT	GGCGAATTTATCCAGCAGCA
Gck	GCTCAGTGAACCCCGGTCAGC	TGTGCGCAGCTGCTCTGAGG
Kcnj11	CACAAGCTGGGTTGGGGGCTC	TGCCCCTCAGCTGGGTTCTGC
Glp-1r	GTTTCCTCACGGAAGCGCCA	AAGGAACCTGGGGGCCCATC
Ins1	GCCAAACAGCAAAGTCCAGG	GTTGAAACAATGACCTGCTTGC
Pcsk1	TGATGATCGTGTGACGTGGG	GGCAGAGCTGCAGTCATTCT
Pcsk2	AAAGATGGCGCTGCAACAAG	TTGCCAGTGTTGAACAGGT
Pdx1	ATTGTGCGGTGACCTCGGGC	GATGCTGGAGGGCTGTGGCG
MafA	TCCGACTGAAACAGAAGCGG	CTCTGGAGCTGGCACTTCTC
Nkx2.2	GTGCAGGGAGTATTGGAGGC	GAAGGGCCAGAGGAGGAGA
Hnf1a	GGTGCGTGTCTACAACCTGGT	ACCGTACACCGTGGACCTTA
Ucn3	TGATGCCACCTACTTCCTG	CTGTGTTGAGGCAGCTGAAG
NeuroD1	CTTGCCAAGAACTACATCTGG	GGAGTAGGGATGCACCGGGAA
ATF4	ATGGCCGGCTATGGATGAT	CGAAGTCAAACCTCTTTCAGATCCATT
Xbp1t	GAGCAGCAAGTGGTGGATTT	CCGTGAGTTTTCTCCCGTAA
Xbp1s	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
ChOP	CTGCCTTTCACCTTGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
Ero1b	GGGCAAGTCATTAAGGAA	TTTATCGCACCCAACACAGT
PPP1R15a	GAGATTCCTCTAAAAGCTCGG	CAGGGACCTCGACGGCAGC
Pdia4	AGTCAAGGTGGTGGTGGGAAAG	TGGGAGCAAATAGATGGTAGGG
Edem1	AAGTCTCAGGAGCTCAGAGTCATTAA	CGATCTGGCGCATGTAGATG

Immunofluorescence (IF) on pancreatic sections

IF was performed as described previously (Annicotte et al., 2009, Blanchett et al., 2011). Briefly, after antigen retrieval using citrate buffer (Sigma) 5 μ m formalin fixed pancreatic sections were incubated with primary antibodies: Anti-Insulin (1:1000, Agilent Cat# A0564, RRID:AB_10013624), anti-Glucagon (1:1000, Sigma-Aldrich Cat# G2654, RRID:AB_259852). Immunofluorescence stainings were revealed using Goat Alexa 594-conjugated anti Guinea-Pig antibody (1:500, Molecular Probes Cat# A-11076, RRID:AB_141930) and Goat Alexa 488-conjugated anti-Mouse (1:500, Thermo Fisher Scientific Cat# A-11001, RRID:AB_2534069). Nuclei were stained with Hoescht. For morphometric analysis, images were processed by ImageJ software by an observer blinded to experimental groups.

Western Blot analysis on liver and WAT

Tissues were homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Tokyo, Japan) in cold RIPA buffer (containing 200 mM Tris/HCl (pH 7.4), 130 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 10 mM MgCl₂) with anti-proteases and anti-phosphatases (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). The tissue lysates were centrifuged for 30 minutes at 18000 g in a microfuge at 4°C. Liver and White Adipose Tissue total protein lysates were subjected to sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), then electrotransferred on a PVDF membrane and probed successively with the following antibodies: Hormone sensitive lipase/HSL: (Abcam Cat# ab45422, RRID:AB_2135367) ; Phospho-HSL (Ser660) (Cell Signaling Technology Cat# 4126, RRID:AB_490997) ; Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) (Cell Signaling Technology Cat# 3661, RRID:AB_330337) ; Acetyl CoA Carboxylase 1 : (Millipore Cat# 04-322, RRID:AB_673047) ; Lipoprotein lipase (LPL Antibody (H-53)): (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-32885, RRID:AB_2234585) ; Fatty Acid Synthase antibody (FAS): (Abcam Cat# ab128870, RRID:AB_11143436) ; CPT1A: (Abcam Cat# ab128568, RRID:AB_11141632) ; GAPDH: (Millipore Cat# CB1001, RRID:AB_2107426) ; β -actin: (Sigma-Aldrich Cat# A2228, RRID:AB_47669) after incubating the membranes with 5% BSA blocking buffer. For protein detection we used horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako Denmark, Glostrup, Denmark). Specific antigen-antibody bindings were visualized using chemiluminescence method according to the manufacturer's instructions (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Values were expressed in relation to β -actin or GAPDH protein levels.

Blood lipids determinations

Serum cholesterol levels (1001093, Spinreact), triglycerides levels (1001310, Spinreact), free fatty acids levels (436-91995, 434-91795, WAKO) were measured by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

Histomorphology of WAT

WAT samples were fixed in 10% formalin for 24h and then were dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 3µm were made on a microtome and stained by the standard hematoxylin/eosin alcoholic (BioOptica, Italy) and sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan). Digital images were quantified with *ImageJ Software* (National Institute of Health; USA).

Triglycerides content in liver

Approx. 500mg of livers were homogenized for 3min in ice-cold chloroform-methanol (2:1, vol/vol). Triglycerides were extracted during 3hours shaking at room temperature. For phase separation, mili-Q water was added. Samples were centrifuged and the organic bottom layer was recollected. The organic solvent was dried using a Speed Vac and re-dissolved in chloroform. Triglycerides content of the samples were measured after evaporation of the organic solvent (1001310, Spinreact) by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

Oil Red O Staining

Frozen sections of 8µm of liver were cut with a cryostat and stained in filtered oil Red O for 10 min. The sections were washed in distilled water, counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min, and mounted in aqueous mountant. Sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan).

Primary cultures and cell lines experiments

Primary culture of tanycytes

Tanycytes were isolated from the median eminence of 10-day-old (P10) rats as described previously (611).

PamGene arrays

Primary cultures of tanycytes were incubated at 37°C with leptin (125nM) or DMSO for 2 or 15 minutes before washes and snap-freeze. For kinome analysis, STK microarrays were purchased from PamGene International BV (STK pamchips). Sample incubation, detection, and analysis were performed in a PamStation 12 according to the manufacturer's instructions and as previously described (Rabhi et al., 2018).

Fluorescent leptin internalization assay and immunofluorescence on primary culture

Tanycytes were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips (10µg/ml) and incubated in TDM (DMEM/F-12 (#11039, ThermoFisher), 1% L-glutamine (#25030-024, ThermoFisher), 2% penicillin-streptomycin (#P4458, Sigma), insulin (1/1000, #I5500, Sigma), putrescin (1/500, #P5780, Sigma)) for 24 hours before the experiment. Tanycytes were incubated for the indicated amount of time at 37°C with either bioactive fluorescent leptin (Fluorescent-leptin, 125 nM, Cisbio Bioassays) or with fluorescent leptin antagonist (LAN, 125 nM, Cisbio Bioassays) both diluted in TDM. Cells were then fixed for 10min at 4°C with 4% paraformaldehyde (PFA, v/v in PBS) and washed 3 times with PBS 1X. For cointernalization assay, tanycytes were incubated with Fluorescent-leptin and XPA antibodies (30nM in TDM, Xoma Laboratories) for 5 min, washed and fixed. Cells were then washed and permeabilized with 0.1 % Triton-X100 (v/v in PBS) for 5 min at room temperature. Antibodies were all diluted in PBS with 3% BSA and incubated for 45 min at room temperature. Cells were either incubated with primary anti-EEA1 antibodies (1/200; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-6415, RRID:AB_2096822) followed by the Alexa488-conjugated anti-goat antibodies (1/1000; Molecular Probes Cat# A-11055, RRID:AB_2534102) or Alexa488-conjugated anti-human antibodies (1/1000; Molecular Probes Cat# A-11013, RRID:AB_141360) to stain XPA antibodies.

Fluorescent leptin release assay on primary culture

Tanycytes were incubated for 15 min at 37°C with either Fluorescent-leptin (125 nM, Cisbio Bioassays) or LAN (125 nM ; Cisbio Bioassays). Cells were washed with TDM, incubated with TDM for the indicated amount of time and fixed for 10 min at 4°C with 4% PFA. To assess the role of MAPK pathway, tanycytes were pre-incubated for 30 min with the MAPK inhibitor UO126 (10 µM in TDM; #9903; Cell signaling technology). Fluorescent-leptin uptake and release was performed in the presence of UO126. To check

for LAN release with EGF, EGF-TRITC (10 ng/ml; #3481; Molecular probes) was added during the chase.

ELISA

To quantify leptin release, tanycytes were cultivated in 10 cm Petri dish and incubated with recombinant leptin (62.5 nM, Protein Rehovot Laboratory) diluted in TDM for 15 min at 37°C. Cells were then washed and incubated with TDM to chase leptin for the indicated amount of time. Leptin in the medium as well as leptin remaining in cells were quantified by Elisa assay according to the manufacturer's instruction (#MOB00 ; R&D systems). Leptin secretion was expressed as a percent of total leptin.

Image acquisition and analysis

Cells were observed under a confocal microscope TCS SP5 (Leica microsystems) and images were acquired according to Nyquist parameters using a 63x (NA 1.4) oil immersion objective. Single plane images were analyzed using the open source Icy software (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). The cell periphery was manually delineated using phase contrast images and object-based segmentation using wavelet transform algorithm (spot detector plugin) was performed to detect vesicles in each channel. Objects were considered colocalized if the distance between their centroid was less than or equal to 3 pixels. EEA1 segmentation was used to estimate amounts of Leptin in EEA1 compartments and percent of total leptin in EEA1 determined by normalizing the integrated intensity of leptin in EEA1 to total leptin in cells.

Cells lines

HEK293T (human embryonic kidney), HeLa (cervical cancer), CHO (chinese hamster ovary) and N46 hypothalamic cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, life technologies) with 4500 mg/l glucose and 10% fetal calf serum (Invitrogen) in a 10% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. HEK293T cells were transiently transfected (48h) with jetPEI (Polyplus-transfection), with a mock pCDNA3 vector or LepR or EGFR expressing pCDNA3 plasmids, or with LIFR and IL6R expressing pMET7 plasmids. Activation of ERK signaling pathway was performed in transfected HEK29T cells expressing exogenous EGFR, LepRb or both receptors with or without a 1h pretreatment with 1 μ M AG1478 inhibitor (T4182, Sigma) prior to 15min stimulation with EGF (1nM), Leptin (10nM) or both EGF (1nM) + Leptin (10nM).

Western Blot on primary cultures and cell lines

The sequences and protocols for the preparation of the extracellular sub-domains of LepR have been described previously by us (632). Cell lysates (in Laemmli buffer supplemented with 30mM DTT, 2mM orthovanadate and 10mM NaF) were separated by SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with anti-phospho-tyrosine (Tyr-705) STAT3 (Cell Signaling Technology Cat# 9145, RRID:AB_2491009) and anti-STAT3 antibodies (Cell Signaling Technology Cat# 9139, RRID:AB_331757), anti-phospho-tyrosine (Tyr-204) ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-16982, RRID:AB_2139990) and anti-ERK2 (Proteintech Cat# 51068-1-AP, RRID:AB_2250380) antibodies, anti-FLAG tag (Sigma-Aldrich Cat# SAB4301135, RRID:AB_2811010), anti-HA tag (Cell Signaling Technology Cat#3724) or XPA (Xoma Laboratories). Western Blots were scanned on the Odyssey infrared Imaging System (Licor).

Co-Immunoprecipitation

HEK293T cells were transfected with a Flag-EGFR-expressing vector either with LepR-YFP or an empty vector. 48h later, cells were harvested in lysis buffer containing Tris-EDTA-magnesium-1% Triton X-100 and solubilized for 2 hr (4°C, under rotation), centrifuged (14,000 \times g, 45 min), and supernatants were subjected to immunoprecipitation with 2 μ g of antibody anti-GFP (Roche); 4 hr, 4°C, under rotation. Protein G beads (Sigma-Aldrich) were then added, and after a 2 hr incubation, the samples were washed in the 0.1% Triton X-100 buffer by repeated centrifugation (1,000 \times g, 5 min). The remaining pellet was

resuspended in Laemmli buffer (62.5-mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% glycerol, and 0.005% bromophenol blue), denaturated by heating (95°C, 5 min), and subjected to SDS-PAGE analysis.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based LepR biosensor

HEK293T cells were transiently transfected in 12-well plates with 40 ng of LepR-Luciferase plasmid with increasing amounts of LepR-YFP plasmids. Cells were grown overnight and transferred into 96-well-Optiplates (PerkinElmer Life Sciences), pre-coated with 10 µg/mL poly-L-lysine (Sigma), where they were grown for additional 24 h. The next day cells were stimulated with leptin, XPA or vehicle for 30min at 37°C. After washing with PBS, Coelenterazine (Interchim France), a Luciferase substrate was added and cells were subjected to measurement of emission at Luciferase and YFP wavelength on a plate reader Tecan F500 (Tecan; Männedorf, Switzerland).

TR-FRET binding assay

TR-FRET assays are based on the energy transfer between a fluorescently labeled donor molecule (the long-lived fluorophore Terbium cryptate (Tb)) and a fluorescently labeled acceptor (d2). In order to covalently label cell surface EGFR or LepR, with the Tb, the receptor is fused to the SNAP enzyme that can be covalently labeled with the Tb fluorophore at a stoichiometry of 1Tb per 1SNAP-receptor, using a suicide enzyme substrate-Tb. 48 hours post-transfection, HEK293T cells, expressing SNAP-EGFR +LepR or SNAP-LepR +EGFR, and previously plated in P96-well plates pre-coated with 10 µg/mL poly-L-lysine (Sigma), are incubated with 100 nM of Tb-SNAP substrate in Tag-lite labeling medium (Cisbio Bioassays; 1h, 4°C). After several washes, cells are treated with several doses of leptin-d2 or EGF-d2 (CisbioAssays) respectively. For each concentration, non-specific binding was determined by adding an excess of unlabeled leptin or unlabeled EGF (200-500nM). Regarding the binding data analysis, the B_{max} signal and the equilibrium dissociation constant (K_D) values were obtained by fitting the specific binding data points (triplicate) with one-binding site model using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Statistics

Results are given as mean ± standard error mean (SEM). Samples or animals were excluded whether their values were outside the ± 2-fold standard deviation, or whether an objective experimental failure was observed; studies were not blinded to investigators or formally randomized. To test if the

populations follow a Gaussian distribution, a normality test was performed (Kolmogorov-Smirnov test for n between 5-7; Shapiro-Wilk test for $n \geq 7$). For normal distributions, parametric test were used; for two population comparisons, an unpaired t tests was used as indicated in figure legends(633-635)⁷⁶⁻⁷⁸⁷⁶⁻⁷⁸; for multiple comparison test, a one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* multiple comparison test (unless otherwise indicated in the figure legends), was performed. For non-Gaussian distributions was used; Mann-Whitney test were used for two comparison test, and Kruskal-Wallis followed by Dunn *post hoc* test for multiple comparison. Data analysis was performed using GraphPad Prism Software Version 7 (GraphPad, San Diego, CA). The threshold for significance was $p < 0,05$.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence National de la Recherche (ANR, France) Grant ANR-15-CE14-0025 to VP, RJ and SG, « European Genomic Institute for Diabetes » (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 to JSA and VP), DISTALZ (ANR-11-LABX-0009 to VP), BETAPLASTICITY, ANR-17-CE14-0034 to JSA, Université de Lille (to MD, CB and JSA), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, to MD), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to JSA), the European Research Council (ERC) Synergy Grant-2019-WATCH-810331 to V.P., R. N. and M. S, the “Who am I?” laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 (to JD), the DHU Autoimmune and Hormonal Diseases (Authors) (JD), the H2020-MSCA-IF-2016 grant GLUCOTANYCYTES_748134 to MI and the NIH grant R01DK123002 to Y-BK and VP. We thank Laure Rolland for excellent technical help with immunofluorescence analysis of pancreatic sections. We thank Yann Lepage and the UMS2014-US41 for their technical support.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

M.D., C.F., C.B., M.M., A.S., J.C., M.I., D.F., I.M.-C., S.K., E.C., N.J., A.O. and S.O carried out the experiments. M.M., J.T., E.T., M.S., S.K. and U.B. generated tools, vectors and animal models. Y.-B.K., R.J., M.S., U.B, R.N., J.-S.A., S.G., J.D. and V.P. designed and planned the study. All authors contributed to the preparation of the manuscript.

COMPETING INTERETS

The authors declare no competing interest.

FIGURES

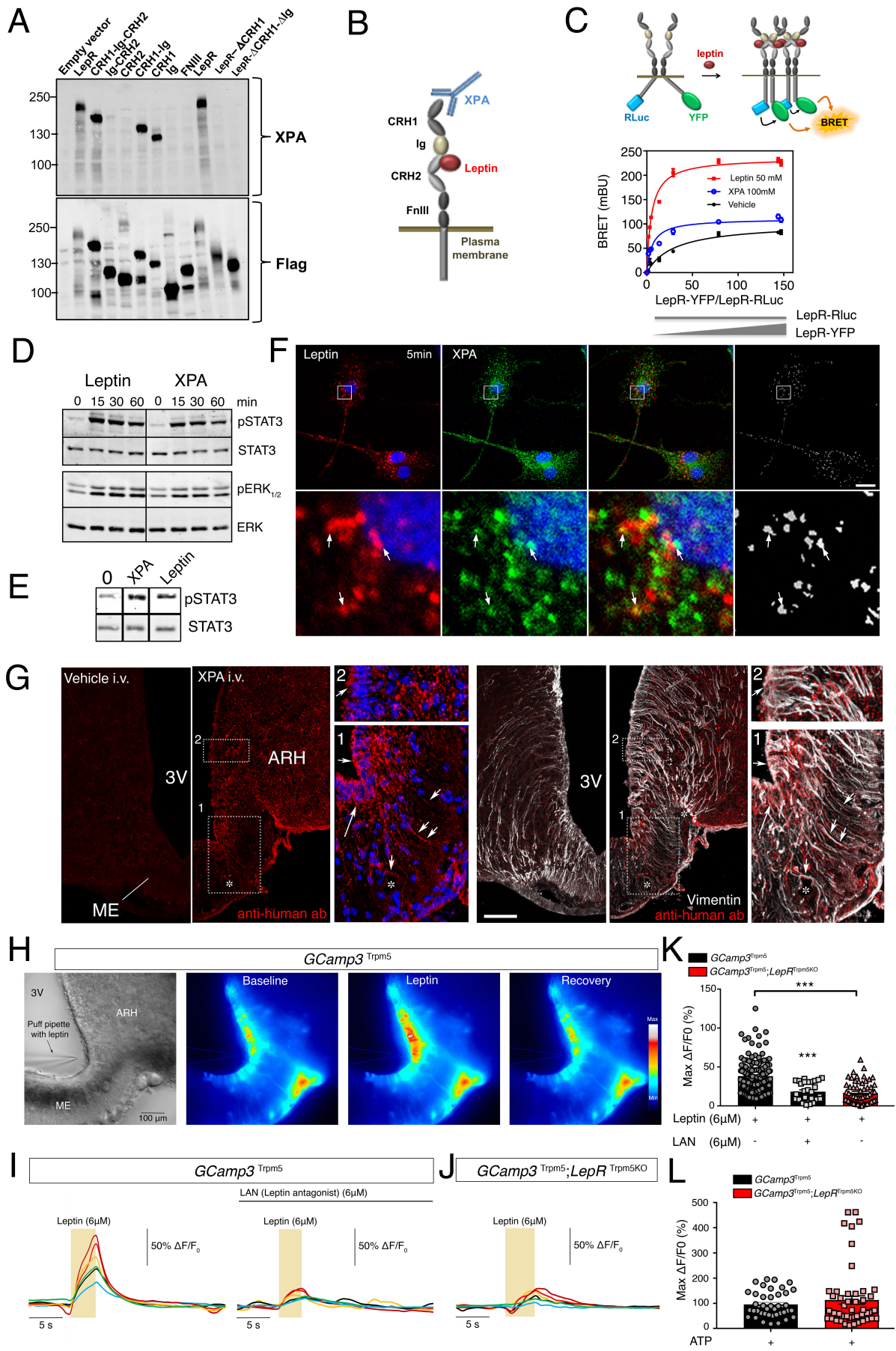


Figure 1. Tanycytes of the median eminence express functional leptin receptors

(A) Western blot detection using the XPA antibody of different exogenously expressed LepR domains in HEK293 cells.

(B) Schematic representation of leptin receptor domains and the XPA binding site.

(C) *Top*: schematic representation of the BRET assay to study the ligand-induced conformational change/interaction between LepR-RLuc and LepR-YFP. *Bottom*: BRET donor saturation curves in HEK293T cells with a constant expression level of LepR-RLuc and increasing levels of LepR-YFP, upon stimulation with vehicle, leptin (50nM) or XPA (100nM) for 30 min at 37 °C.

(D) STAT3 and ERK1/2 phosphorylation in HEK293 cells stably expressing LepR after stimulation with 50 nM leptin or 100 nM XPA for 5, 15, 30 or 60 minutes.

(E) STAT3 phosphorylation in tanycytes upon 50 nM leptin or 100 nM XPA stimulation for 30 minutes.

(F) Leptin colocalizes with LepR in primary tanycytes. Representative confocal images of tanycytes treated for 5 min with 125 nM fluorescent leptin (red) together with 33 nM XPA antibodies against LepR labeled with fluorescent secondary antibodies (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10 μ m.

(G) Representative photomicrograph revealing sites of XPA fixation in tanycytes of the median eminence (vimentin-positive cells) 2 minutes after intravenous XPA injection (2 nmol/animal) *in vivo*. White arrows show XPA (red) and vimentin (white) colocalization. 3V: third ventricle; ARH: arcuate nucleus of the hypothalamus; ME: median eminence. Scale bar: 200 μ m.

(H) Representative image of a living brain slice containing the median eminence from a *GCamp3^{Trpm5}* mouse under bright-field and fluorescence microscopy, showing the reversible increase in intracellular calcium levels in tanycytic cell bodies lining the third ventricle (3V) upon the local application of a puff of leptin (6 μ M) via a glass pipette. ME: median eminence. Scale bar: 100 μ m

(I) Representative curves of GCamp3 fluorescence (calcium current) over time (ΔT) compared to the baseline in tanycytes in living hypothalamic slices during a puff of leptin (yellow rectangle, 6 μ M), alone (left curve) or after pre-treatment with leptin antagonist (LAN, 6 μ M, top black line; right curve), in a *GCamp3^{Trpm5}* mouse.

(J) Same measurement as in (I) in a *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mouse lacking LepR in tanycytes after a puff of leptin (6 μ M, yellow rectangle).

(K) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during the treatment of living brain slices in *GCamp3^{Trpm5}* and *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice, described in (I) and (J). Mann Whitney test; ***: $p < 0.001$; between indicated groups. Values indicate means \pm SEM.

(L) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during a puff of ATP (10 mM) in living brain slices from *GCamp3^{Trpm5}* and *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice. See also Supplementary Figure 1.

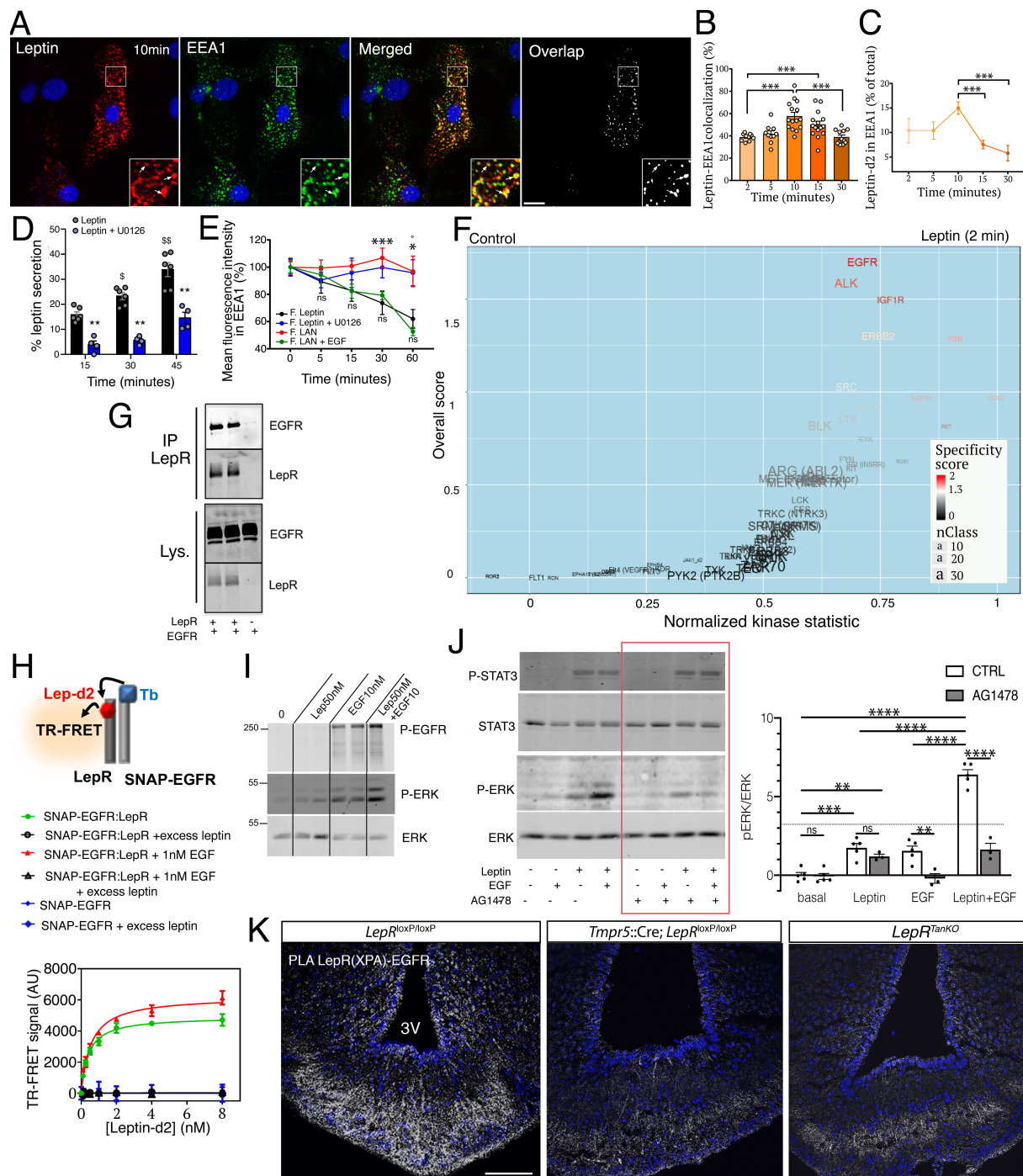


Figure 2. Tancytic EGFR physically interacts with LepR in vivo and plays a role in leptin transcytosis in vitro

(A) Endocytosed leptin colocalizing with early endosomes. Representative confocal images showing primary tancytes treated for 10 min with 125 nM fluorescent leptin (red) and antibodies to the early endosome marker EEA1 (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows in inset point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10 μ m.

(B) Percentage of leptin colocalizing with EEA1 over time following object-based detection of fluorescent leptin and EEA1 vesicles. Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney test was applied. ***: $p < 0.001$

(C) Percentage of endocytosed leptin found in the EEA1-positive compartment over time. Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney test was applied. ***: $p < 0.001$

(D) Leptin secreted into the medium by primary cultures of tanycytes as a percentage of total leptin concentration (intracellular and medium) 15, 30 and 45 minutes after fluorescent leptin addition. Mann-Whitney U test or one-way ANOVA as required. **: $p < 0.01$ leptin vs. leptin + U0126; \$: $p < 0.05$ Leptin 15 min vs. Leptin 30 min and \$\$: $p < 0.01$ Leptin 30 min vs. Leptin 45 min.

(E) Percentage (as % of 0 min time point) of endocytosed fluorescent leptin or fluorescent LAN found in EEA1 compartments over time in cells treated or not with U0126 (leptin) or EGF (LAN). Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney U test was applied. ***: $p < 0.001$

(F) Volcano plot showing differences in peptide phosphorylation between primary cultures of tanycytes treated for 2 min with vehicle (PBS pH 8.0) or leptin (1 μ g/ml in PBS pH 8.0) (n=4). Upstream kinases were identified using the Human Protein Reference Database.

(G) Co-immunoprecipitation of EGFR along with LepR in HEK293T cells; no co-immunoprecipitation of EGFR is observed when LepR is not expressed. IP, immunoprecipitation; Lys., cell lysate.

(H) Schematic representation of the TR-FRET technique (left). Right: specific saturation curves of leptin-d2 binding to its cognate receptor LepR within the LepR:SNAP-EGFR complex at the cell surface are obtained after 3h at 37°C; no TR-FRET signal is detected when SNAP-EGFR is expressed in the absence of LepR. Saturation binding experiments are performed by adding an increasing dose of leptin-d2, combined or not with 1nM EGF, to HEK293 cells expressing SNAP-EGFR alone or in combination with LepR and pre-labeled with the fluorescent SNAP-Tb substrate. The TR-FRET signal is strongly displaced by an excess of unlabeled leptin (200nM). Data are presented as means \pm SD of 3 replicates of 1 representative experiment out of 3 independent experiments. The mean dissociation constant was determined from the average of the Kd values extracted from a fitting analysis of the saturation curve of 3 independent experiments with non-linear regression "one-site specific binding equation.

(I) Phosphorylation of EGFR and ERK upon addition of leptin 50nM, EGF 10nM or both for 30min at 37°C in primary tanycytes.

(J) Phosphorylation of STAT3 and ERK upon addition of leptin 10nM, EGF 1nM or both for 30min at 37°C in HEK293T cells expressing endogenous EGFR and transfected with LepRb in the presence or absence of the EGFR inhibitor AG1478 (1 μ M)

(K) Proximity Ligation Assay (PLA) between LepR and EGFR using XPA and a rabbit anti-EGFR antibody. Scale bar: 100 μ m.

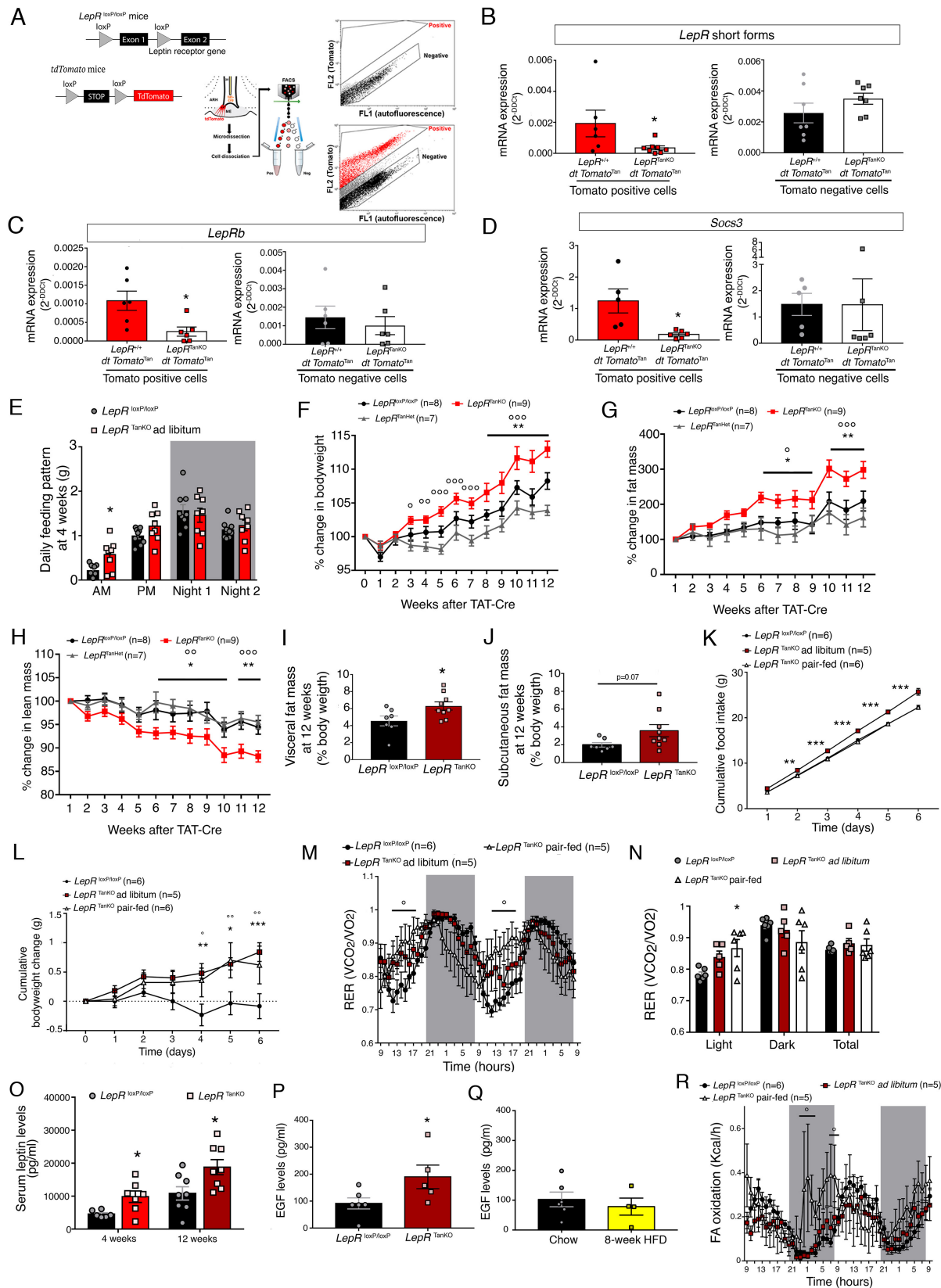


Figure 3. Selective *LepR* deletion in tanycytes causes food-intake-independent body weight gain and increased adiposity

(A) Schematic diagram and gating strategy for sorting Tomato positive cells following vehicle (top panel) and TAT-Cre infusion (bottom panel) into the third ventricle (3V) of *LepR^{+/+};tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* or *LepR^{loxP/loxP};tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* littermates.

(B-D) mRNA expression levels of short forms **(B)** and the long form, LepRb **(C)**, of the leptin receptor, and of Socs3 **(D)** in tdTomato-positive cells (left panels) and tdTomato-negative cells (right panels). A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$; *LepR^{+/+} tdTomato^{Tan}* vs. *LepR^{TanKO} tdTomato^{Tan}*. Values indicate means \pm SEM.

(E) Increased food intake at light on in *LepR^{TanKO}* mice when compared to *LepR^{loxP/loxP}* littermates. *: $p < 0.05$. Values indicate means \pm SEM.

(F-H) Curves representing the kinetics of the % change in bodyweight **(F)**, % change in fat mass **(G)** and % change in lean mass **(H)** between *LepR^{loxP/loxP}*, *LepR^{TanHet}* and *LepR^{TanKO}* through the 12 weeks following the TAT-Cre infusion into the 3V. Two-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*; **: $p < 0.01$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*; °: $p < 0.05$, *LepR^{TanHet}* vs. *LepR^{TanKO}*; °°: $p < 0.01$, *LepR^{TanHet}* vs. *LepR^{TanKO}*; °°°: $p < 0.05$, *LepR^{TanHet}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values represent means \pm SEM

(I,J) Visceral fat mass **(I)** and subcutaneous **(J)** 12 weeks after TAT-Cre infusion. Mann-Whitney U test; *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values indicate means \pm SEM.

(K) Cumulative food intake in *LepR^{TanKO}* pair-fed mice 12 weeks after TAT-Cre infusion compared to their control littermates. 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* pair-fed vs. *LepR^{TanKO}* fed *ad libitum*; ***: $p < 0.001$, *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* pair-fed vs *LepR^{TanKO}* *ad libitum*. Values indicate means \pm SEM.

(L) Cumulative body weight change. 2-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* fed *ad libitum*; **: $p < 0.01$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* fed *ad libitum*; ***: $p < 0.001$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* fed *ad libitum*; °: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* pair-fed; °°: $p < 0.01$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(M) Energy ratio (RER) over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; °: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(N) Mean energy ratio (RER) during light phase, dark phase and total.

Two-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}* pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(O) Circulating leptin levels in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* animals at 4 weeks and 12 weeks after TAT-Cre infusion into the 3V. Mann-Whitney test (4 weeks) and unpaired t-test (12 weeks). *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values represent means \pm SEM.

(P) Basal serum EGF concentration in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Mann-Whitney U test. *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*.

(Q) Basal serum EGF concentrations in C57Bl6/J mice fed normal chow or those fed a high-fat diet for 8 weeks.

(R) Fatty-acid (FA) oxidation over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

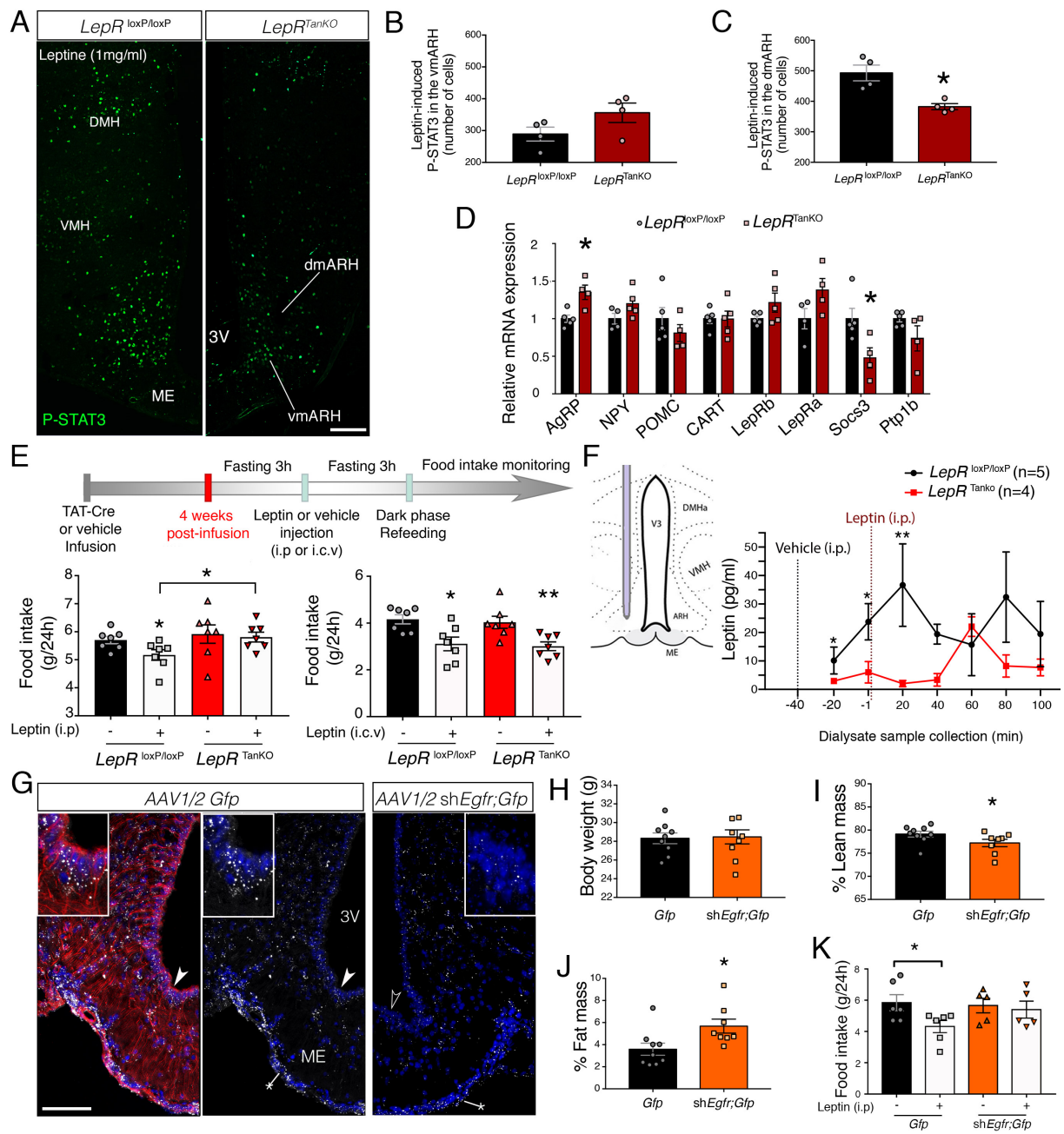


Figure 4. Defective LepR and EGFR signaling in tanycytes causes hypothalamic resistance to circulating leptin.

(A-C) Representative photomicrograph (A) and quantification of leptin-induced P-STAT3 immunofluorescence in the ventromedial (vm) (B) and dorsomedial (dm) arcuate nucleus (ARH) (C). Scale bar: 200µm. Unpaired Student's t-test. *: p<0.05 *LepR^{loxP/loxP}* vs *LepR^{TanKO}*. Values indicate means ± SEM.

(D) Relative mRNA expression levels of several genes known to be involved in the hypothalamic regulation of energy homeostasis and leptin activity in the microdissected mediobasal hypothalamus (MBH) of *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test or Mann-

Whitney U test, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(E) Schematic diagram showing the design of the experiment investigating the anorectic response to either intraperitoneal (i.p) or intracerebroventricular (i.c.v) leptin administration. Bottom left graph represents food intake in $LepR^{loxP/loxP}$ (black and grey bars) and $LepR^{TanKO}$ mice (red and pink bars) 24h after i.p. leptin (3mg/kg, grey and pink bars) or vehicle (PBS pH 8.0, black and red bars) administration. Bottom right graph represents food intake in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice 24h after i.c.v. leptin (2 μ g in 2 μ L) or vehicle (2 μ L PBS pH 8.0) injection. Mann-Whitney U test; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; leptin vs. vehicle and between indicated groups. Values indicate means \pm SEM.

(F) Leptin concentrations in the ARH interstitial liquid collected by microdialysis every 20 minutes following i.p. vehicle (t₋₄₀ min) or leptin (t₋₁ min) injection in $LepR^{loxP/loxP}$ (n= 7) and $LepR^{TanKO}$ mice (n=6). Multiple t-test was applied; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$

(G) Representative photomicrograph of *in situ* hybridization of EGFR using RNAscope technology on fresh-frozen brain sections from the median eminence of C57Bl6/J mice injected with AAV1/2 *Dio2::gfp* or AAV(1+2)-GFP-U6-m-EGFR-shRNA. The left panel shows vimentin-immunoreactivity in red. Arrowheads show the cells seen at higher magnification in insets. Scale bar: 100 μ m (25 μ m in inset).

(H-J) Curves representing the evolution of bodyweight (**H**), % change in fat mass (**I**) and % change in lean mass (**J**) between mice injected with AAV1/2 *Dio2::gfp* (control in black) or AAV(1+2)-GFP-U6-m-EGFR-shRNA (in orange) over 4 weeks following the beginning of the viral activity. 2-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, AAV1/2 *Gfp* vs. AAV1/2 *shEgfr*.

(K) Graph representing food intake in mice injected with AAV1/2 *Dio2::gfp* or AAV(1+2)-GFP-U6-m-EGFR-shRNA 24h after i.p. leptin (1mg/kg) or vehicle (PBS pH 8.0) injection. An unpaired Student's t-test was applied; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; leptin vs. vehicle and between indicated groups. Values indicate means \pm SEM.

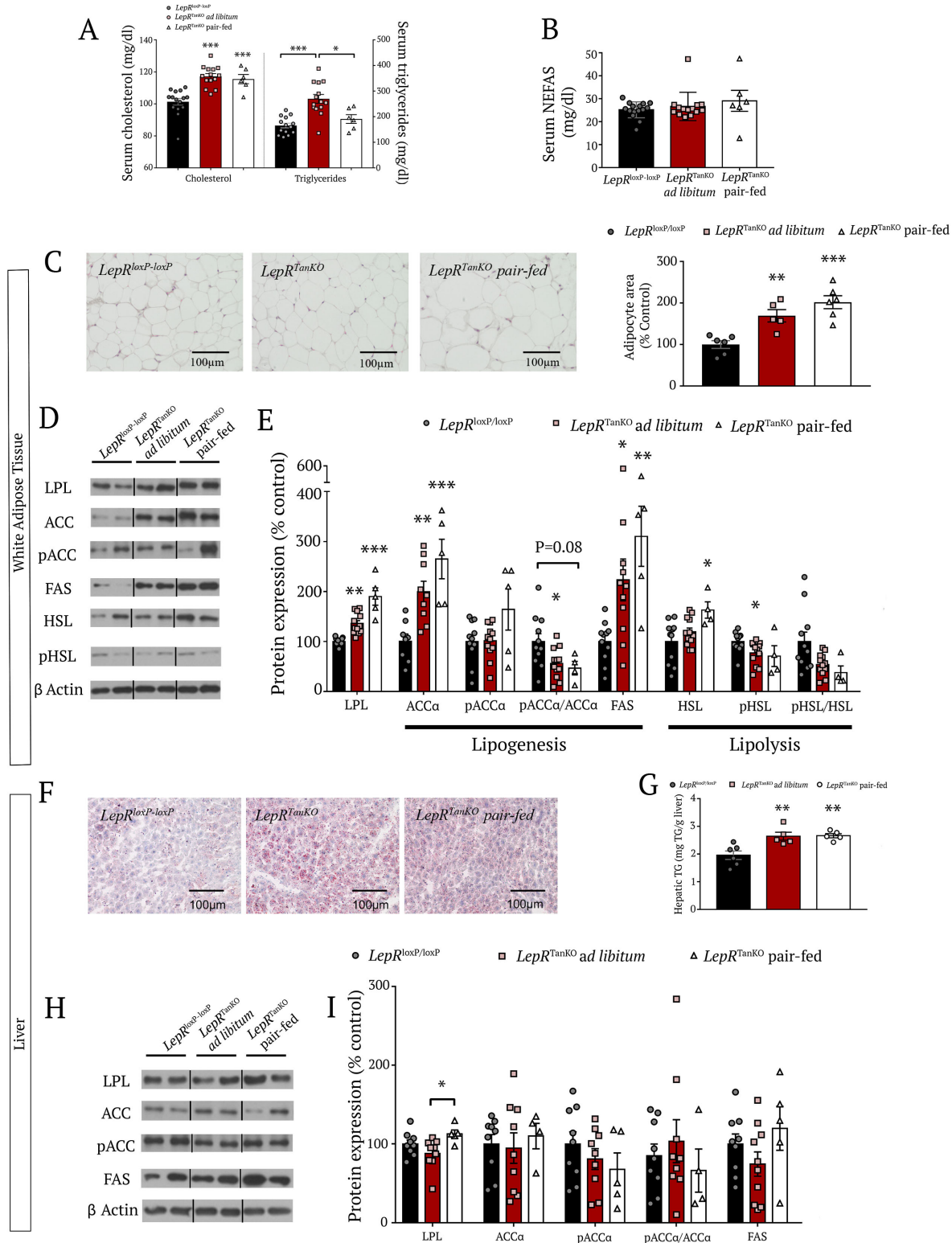


Figure 5: Selective LepR deletion in tanyocytes causes hyperleptinemia and steatosis

(A) Graphs representing serum cholesterol and triglyceride concentrations in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* on chow and $LepR^{TanKO}$ mice pair-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Kruskal-Wallis test with Dunn multiple comparison test were applied depending Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* or $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Values indicate means \pm SEM.

(B) Graph representing serum non-esterified fatty acid (NEFAS) concentrations in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, *LepR^{TanKO} ad libitum* or *LepR^{TanKO} pair fed* vs. *LepR^{loxP/loxP}* mice. Values indicate means \pm SEM.

(C) Representative images of histological hematoxylin-eosin staining of the adipose tissue in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice. Graph shows quantification of adipocyte size. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, *LepR^{TanKO} ad libitum* or *LepR^{TanKO} pair fed* vs. *LepR^{loxP/loxP}* mice. Values indicate means \pm SEM.

(D) Representative western blots of the different proteins mentioned in **(E)**.

(E) Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis or fatty acid lipolysis in white adipose tissue from *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Lipoprotein lipase (LPL) is implicated in the lipids uptake from the circulation to the adipose tissue. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Kruskal-Wallis test with Dunn multiple comparison test. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, *LepR^{TanKO} ad libitum* or *LepR^{TanKO} pair fed* vs. *LepR^{loxP/loxP}* mice. Values indicate means \pm SEM.

(F) Representative Oil-Red-stained images from the liver of *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* and *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice.

(G) Quantification of triglycerides in the liver of *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* and *LepR^{TanKO}* mice paired-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. **: $p < 0.01$, *LepR^{TanKO} ad libitum* or *LepR^{TanKO} pair fed* vs. *LepR^{loxP/loxP}* mice. Values indicate means \pm SEM.

(H) Representative western blots of the different proteins mentioned in **(I)**.

(I) Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis and lipid uptake from the circulation into the liver in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* and *LepR^{TanKO}* mice paired-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. *: $p < 0.05$; *LepR^{TanKO} pair fed* vs. *LepR^{TanKO} ad libitum* mice. Values indicate means \pm SEM.

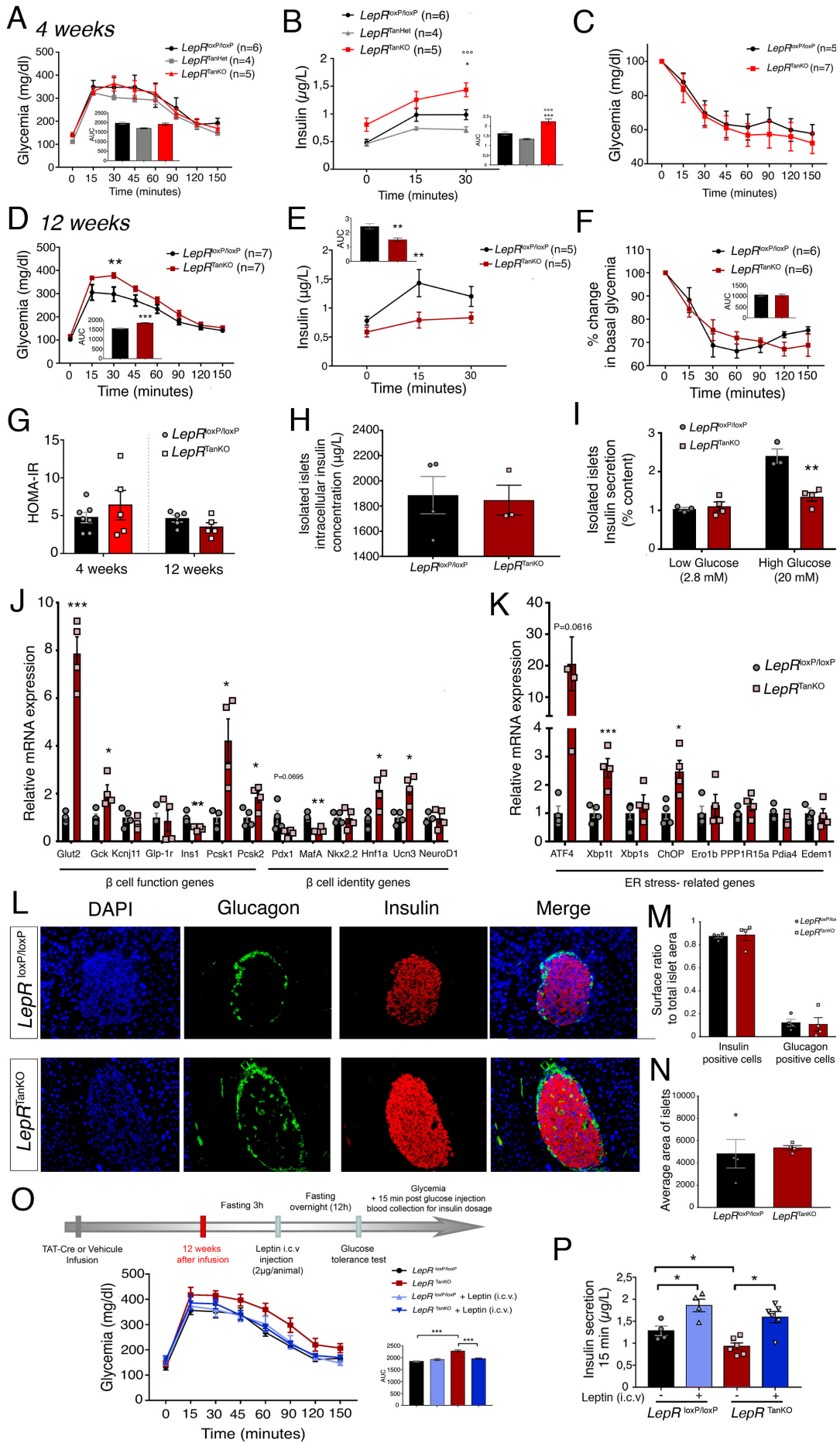


Figure 6. Loss of LepR expression in median eminence tanycytes causes severe pancreatic β cell dysfunction possibly due to defective noradrenaline activity

(A) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$, $LepR^{TanHet}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion. Graph represents the area under the curve; 2-way ANOVA with Tukey's correction. Values indicate means \pm SEM.

(B) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$, $LepR^{TanHet}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$; $^{\circ\circ\circ}$: $p < 0.001$, $LepR^{TanHet}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; $^{\circ\circ\circ}$: $p < 0.001$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$; $^{\circ\circ\circ}$: $p < 0.001$, $LepR^{TanHet}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(C) Graph representing serum insulin concentrations at T0 of the glucose tolerance test; Student's t-test; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(D) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; $^{\circ\circ\circ}$: $p < 0.001$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(E) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(F) Percentage change in basal glycemia during an insulin tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(G) Graph representing insulin secretion from total isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion, following treatment with low or high glucose concentrations. Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(H) Graph representing insulin concentrations in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(I) Relative mRNA expression levels of markers of β cell function and identity in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(J) Relative mRNA expression levels of ER stress markers in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(K) Confocal images representing nuclei (blue), glucagon (green) and insulin (red) in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion.

(L) Graphs representing the ratio between insulin-positive (left) or glucagon-positive area (right) to the total islet surface area in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(M) Graph representing the average surface area of pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(N) Graph representing serum noradrenaline concentrations in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM. Student's t-test; *: $p < 0.05$

(O) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, before (black and red curves) and after (light and dark blue curves) i.c.v. leptin injection (2 μ g/animal). Graph represents the area under the curve; 1-way ANOVA with Tukey's correction; $^{\circ\circ\circ}$: $p < 0.001$ between groups. Values indicate means \pm SEM.

(P) Serum insulin concentrations at 15 minutes during the glucose tolerance test presented in (O). A paired Student's t-test was applied for comparisons between the same group before and after leptin injection and an unpaired Student's t-test between $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$; *: $p < 0.05$. Values indicate means \pm SEM.

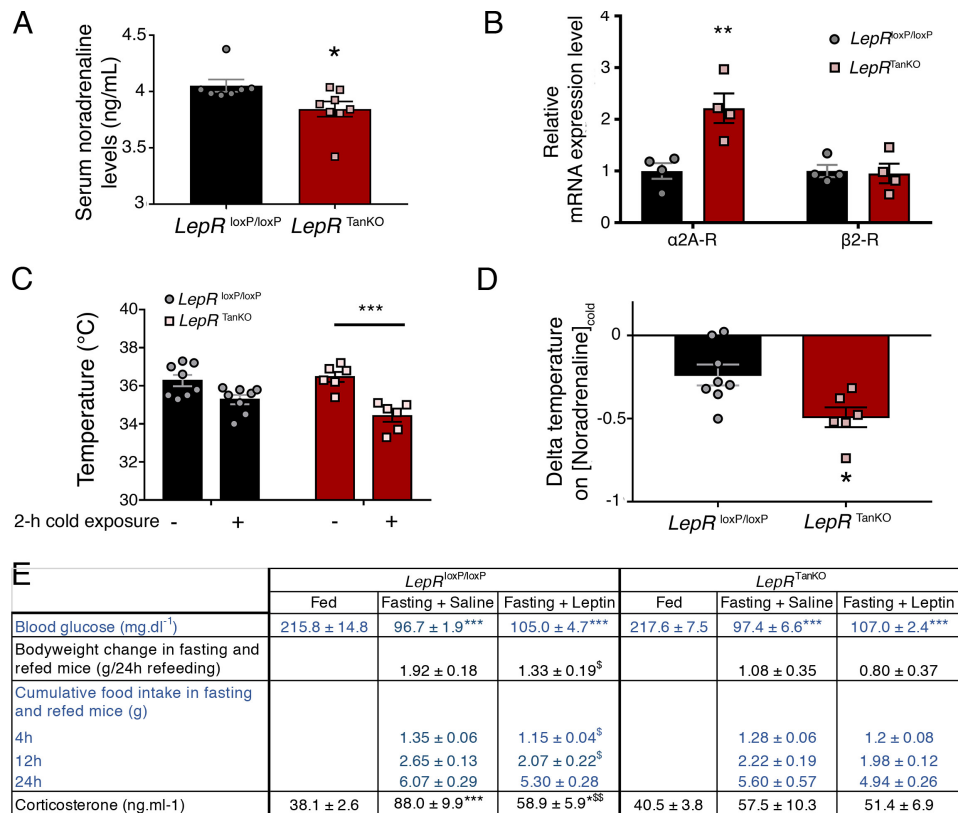


Figure 7. Loss of LepR expression in median eminence tanycytes impairs cold- and fasting-mediated increases in noradrenaline and corticosterone, respectively.

(A) Serum noradrenaline concentrations in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Unpaired Student's t-test. *: $p < 0.05$ *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values indicate means \pm SEM.

(B) Relative mRNA expression levels of adrenergic receptors in isolated pancreatic islets from *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Unpaired Student's t-test. **: $p < 0.01$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values indicate means \pm SEM.

(C) Rectal temperature measured in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion, before and after 2h cold exposure. Paired Student's t-test. *** $p < 0.001$ in *LepR^{TanKO}* before cold exposure vs. *LepR^{TanKO}* after cold exposure. Values indicate means \pm SEM.

(D) Ratio between the delta temperature after-before cold exposure to the serum noradrenaline concentration after cold exposure from *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice. Unpaired Student's t-test. *: $p < 0.05$, *LepR^{loxP/loxP}* vs. *LepR^{TanKO}*. Values indicate means \pm SEM.

(E) Table summarizing data from fed and 24h fasting and refed *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice after saline or leptin (1mg/kg) i.p injection. Unpaired Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's correction as required. *: $p < 0.05$ compared to fed mice; ***: $p < 0,001$ compared to fed mice; \$: $p < 0,05$ and \$\$: $p < 0.01$ compared with fasting mice.

Annexe 4

Improved synthesis, resolution, absolute configuration determination and biological evaluation of HLM006474 enantiomers

Miyanou Rosales-Hurtado^a, Alexandre Lebeau^a, Cyril Bourrouh^d, Gerardo Cebrian-Torres^a, Muriel Albalat^b, Marion Jean^b, Jean-Valère Naubron^c, Jean-Sébastien Annicotte^d, Zohra Benfodda^{a,1}, Patrick Meffre^{a,*,1}

^a UNIV. NIMES, EA7352 CHROME, Rue du Dr G. Salan, 30021 Nîmes Cedex 1, France

^b Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, I2M2, Marseille, France

^c Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, FSCM, Spectropole, Marseille, France

^d CNRS UMR 8199, European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Institut Pasteur de Lille, University of Lille, Lille F-59000, France

ARTICLE INFO

Keywords:

HLM006474 enantiomers

Betti reaction

Solvent-free reaction

Microwave assisted synthesis

Absolute configuration determination

Biological activity

ABSTRACT

An improved green synthesis of the E2F inhibitor HLM006474 is described, using solvent-free and microwave irradiation conditions. The two enantiomers are separated using semi-preparative separation on Chiralpak ID and their absolute configuration is determined by vibrational circular dichroism (VCD) analysis. Biological evaluation of both enantiomers on E2F1 transcriptional activity reveals that the (+)-*R*, but not the (–)-*S* enantiomer is biologically active in repressing E2F1 transcriptional activity.

HLM006474 **1** is a small molecule pan-inhibitor of E2F-DNA binding (Fig. 1) and is a potent inhibitor of melanocytes proliferation.¹ Moreover, HLM006474 **1** synergizes with paclitaxel which suggests that this small molecule may have efficacy in lung cancer.²

Although it is a commercially available compound, HLM006474 **1** is rather expensive. The synthesis of this compound has been described in 2008 using a two-step sequence. First step is a Williamson reaction starting from 4-hydroxy-3-methyl benzaldehyde **2** and bromoethane in dimethylformamide. Second step is a three-component Betti reaction between the obtained 4-ethoxy-3-methyl benzaldehyde **3**, 2-aminopyridine **4** and 2-methyl-3-quinolinol **5** in ethanol (Fig. 2).¹ This procedure suffers from low yield and long reaction time.

Moreover, HLM006474 **1** presents one carbon stereocenter and to the best of our knowledge, it has only been tested on biological systems in racemic form although a difference in biological activity would be expected between the two enantiomers due to the inherent chirality of biological systems. We decided to improve the synthetic access to this compound, perform the resolution and the determination of the absolute configuration of the two enantiomers and evaluate their biological activities as inhibitors of E2F1 transcriptional activity.

The first step of the synthesis is performed using the same conditions as the literature.¹ In our hands, product **3** is obtained in 77% yield

on 64 mmol scale after work up (litt.¹: 65% on 6.6 mmol scale) and is used without further purification in the next step (Fig. 3). The second step is a Betti reaction^{3,4}. Betti reaction is a Mannich-type aminoalkylation multicomponent reaction between ammonia or amines, formaldehyde or aldehydes and enolisable carbonyl compounds or phenol/naphthols. It was originally performed in ethanol as solvent⁵ but these conditions for compound **1** result in low yield and long reaction time.¹ In order to optimize the synthesis of this compound we tried different and/or greener reaction conditions also used for Betti reaction: water,^{6,7} acetonitrile,⁷ PEG-400⁸ as solvent or solvent-free conditions⁹ as well as microwave irradiation (MW)^{10–12} at different temperatures (Fig. 3).

The results are reported in Table 1 (thermal conditions) and Table 2 (microwave irradiation).

Experimental conditions close to the literature¹ led to analogous results (Table 1, entry 1). Using acetonitrile at rt or 85 °C, or PEG-400 as solvent were unsuccessful (Table 1, entries 4–6). Water as solvent at rt increased notably the yield to 29% although a decreased yield was observed with water at reflux (Table 1, entries 2 and 3). Best results (66%) were obtained in solvent-free conditions at 55 °C in only one day reaction time (Table 1, entry 7) but we noticed that a slight excess of amine **4** at 95 °C could have an interesting effect on reaction time

* Corresponding author.

E-mail address: patrick.meffre@unimes.fr (P. Meffre).

¹ These authors contributed equally.

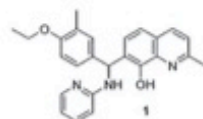


Fig. 1. Structure of HLM006474 1.

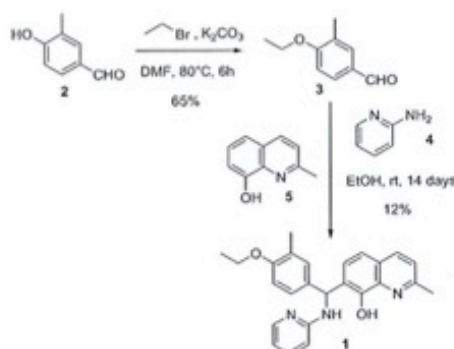


Fig. 2. Synthesis of HLM006474 according to Ma et al.¹.

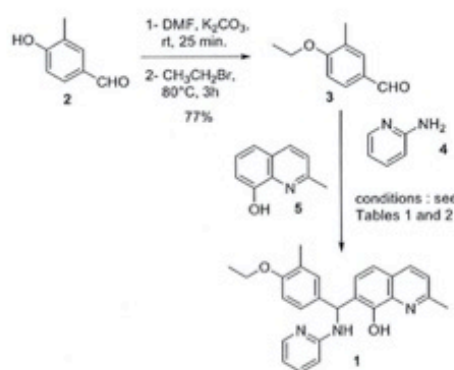


Fig. 3. Improved synthesis of HLM006474.

Table 1
Synthesis of 1 using Betti reaction in different thermal reaction conditions (Fig. 3).

Entry	Temperature	Solvent	Reaction time	Yield ^a in 1
1 ^b	rt	EtOH	10d	15%
2	rt	H ₂ O	8d	29%
3	100 °C	H ₂ O	2d	9%
4	rt	CH ₃ CN	9d	3%
5	85 °C	CH ₃ CN	3d	5%
6	rt	PEG-400	36d	5%
7	55 °C	-	1d	66%
8 ^c	95 °C	-	6.5h	45%

^a Yield after purification on 6 mmol scale unless otherwise noted.

^b Experimental conditions close to Ma et al.¹

^c Reaction performed on 1 mmol scale, 1.2 eq. of amine 4 is used.

Table 2
Synthesis of 1 using Betti reaction and MW irradiation^a (Fig. 3).

Entry	Temperature	Solvent	Reaction time	Yield ^b in 1
1	60 °C	-	12h	33%
2	95 °C	-	6.5h	57%
3	95 °C	-	6.5h	55%
4 ^c	95 °C	-	6.5h	70%
5 ^c	95 °C	-	6.5h	67%
6 ^c	110 °C	-	3h	58%
7 ^c	110 °C	-	3h	58%
8	60 °C	-	24h	71%
9	60 °C	-	24h	71%

^a MW : 300 W.

^b Yield after purification on 1 mmol scale unless otherwise noted.

^c Reactions were run in triplicate – the mean yield is given.

^d Reaction was performed on 6 mmol scale.

^e 1.2 eq. of amine 4 is used.

(decreased to 6.5h) and yield (45%) (Table 1, entry 8). Reaction conditions using microwaves are known to possibly facilitate this reaction. Therefore we decided to study microwave (MW) reaction conditions (Table 2).

Using microwave reaction conditions, a 55–57% yield is obtained in only 6.5h at 95 °C (entries 2 and 3 compared to entry 1) and the yield is increased to 67–70% using 1.2 eq. excess of amine 4 (entries 4 and 5). At 110 °C and in 3h reaction time, however, yields decreased to 58% (entries 6 and 7). Good results (71%) are also obtained at 60 °C in 24 h (entries 8 and 9). The reactions were at first performed on 1 mmol scale in triplicate (entries 2, 4, 6, 8) to ascertain reproducibility and yields were confirmed on 6 mmol scale (entries 3, 5, 7, 9).

Enantiomers of HLM006474 were separated by HPLC over chiral stationary phase. Chiralpak ID, amylose tris(3-chloro-phenylcarbamate) allowed an excellent baseline separation with a heptane/2-PrOH/TEA (50/50/0.1) mixture as mobile phase at analytical scale. Enantiomeric excesses can be easily determined by this developed method, which exhibits an enantioselectivity of 1.7 and a resolution of 3.5. The method was extrapolated at preparative on the same chiral column to obtain 190 mg of each enantiomer with an enantiomeric ratio higher than 99.5/0.5 (See Supplementary data).

Infrared (IR) and vibrational circular dichroism (VCD) spectra were recorded for both enantiomers. Calculations were performed on the (R) enantiomer of HLM006474 (see Supplementary data for details): the conformational studies using SMD(CD₂Cl₂)/CAM-B3LYP/DGTZVP level have shown that 10 conformations A₁–A₁₀ must be used to build the average calculated spectra in IR/VCD. A satisfying agreement between the measured and the average calculated spectra has allowed establishing the absolute configuration (R) of the first eluted enantiomer of HLM006474. The assignment of the absolute configuration was confirmed by comparison of experimental and calculated electronic circular dichroism spectra (see Supplementary data).

E2F1 is a transcription factor that regulates gene expression through DNA binding. HLM006474 is a molecule that blocks E2F transcriptional activity by disrupting E2F-DNA binding.¹ To evaluate whether the HLM006474 enantiomers have different E2F inhibitory activities, we probed E2F1 transcriptional activity after treatment of a human cell line with these molecules. The human embryonic kidney cell line HEK293 was treated for 48 h with DMSO (as a control), 10 μM (R + S)-HLM006474, 10 μM (R)-HLM006474 or 10 μM (S)-HLM006474 (Fig. 4). Luciferase-based reporter studies using a plasmid construct containing canonical E2F DNA-responsive element fused to the luciferase gene confirmed that the E2F1/DP-1 complex potentiates the promoter activity of this heterologous construct upon DMSO treatment. This effect was blunted upon 10 μM (R + S)-HLM006474 and 10 μM (R)-HLM006474, suggesting that these molecules inhibit E2F1/DP-1 transcriptional activity in these conditions. Interestingly, treatment of

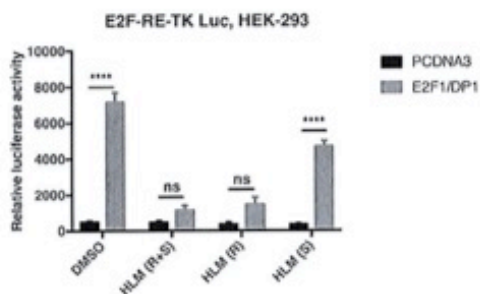


Fig. 4. HEK293 cells were treated for 48 h with DMSO (as a control), 10 μ M (R + S)-HLM006474, 10 μ M (R)-HLM006474 or 10 μ M (S)-HLM006474 and were transiently co-transfected with the E2F-RE-Tk promoter luciferase construct in the absence (pCDNA3) or presence of E2F1/DP1 heterodimer (E2F1/DP1). Results were normalized to β -galactosidase activity. Data are shown as mean \pm SEM. **** $p < 0.001$; ns = not significant.

HEK293 cells with 10 μ M (S)-HLM006474 maintained significant E2F1 transcriptional activity, supporting that this enantiomer has lower inhibitory properties on E2F1 DNA binding activity when compared to the (R) enantiomer. These data suggest that the inhibitory effect of HLM006474 is mainly exerted by the (R) enantiomer.

In conclusion, we have disclosed an efficient green synthesis of the E2F-DNA binding pan-inhibitor HLM006474 **1**. The key step in the synthesis is the three-component Betti reaction in solvent-free conditions allowing the yield, in thermal reaction conditions (66%), to be multiplied by four and the reaction time (24 h) divided by ten compared to the precedent literature (12%, 14 days).¹ Using microwave reaction conditions, reaction time is even more decreased and 60–70% yields can also be obtained in few hours depending on the temperature and stoichiometry of the reactants.

The two enantiomers were separated using preparative chiral HPLC. This concise synthesis and preparative enantiomers separation offer opportunities to study the biological activities of the separated two enantiomers and observe an enhanced biological activity (inhibition activity) of the (R)-enantiomer that may lead to interesting clinical application in cancer therapy.

Acknowledgments

We gratefully thank the French 'Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' for financial support. Mrs Julie Vauris and Mrs Romane Bourguet are acknowledged for technical assistance in chemistry. This work was supported by grants from «European Genomic Institute for Diabetes» (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 to J.-S. A.), Agence Nationale pour la Recherche, France (BETAPLASTICITY, ANR-17-CE14-0034 to J.-S.A.); INSERM, CNRS, Lille University, France (to C.B. and J.-S.A.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.037>.

References

- Ma Y, Kurtyka CA, Boyapalle S, et al. *Cancer Res.* 2008;68:6292–6299.
- Kurtyka CA, Chen L, Crest WD. *PLoS ONE* 2014;9:e96357.
- Betti M. *Gazz Chim Ital.* 1900;30 II:301–309.
- Cardellicchio C, Capozzi MAM, Nasso F. *Tetrahedron Asymmet.* 2010;21:507–517.
- Betti M. *Org. Synth.* 1929;9:60.
- Ghandi M, Olyaei A, Raoufzoghaddan S. *J. Heterocycl. Chem.* 2009;46:914–918.
- Ghandi M, Olyaei A, Raoufzoghaddan S. *Synth. Commun.* 2008;38:4125–4128.
- Kidwai M, Chaudhan R. *Asian. J. Org Chem.* 2013;2:395–398.
- Olyaei A, Raoufzoghaddan S, Sadeghpour M, Ebadzadeh R. *Chin. J. Chem.* 2010;28:825–832.
- Jha A, Paul NK, Tripathi S, Cuzzocrea TS. *Can. J. Chem.* 2006;84:843–853.
- Szalmári I, Filósp F. *Synthesis.* 2009;2009:775–778.
- Shariif A, Mirzaei M, Naimi-Jamal MR. *Monatsh. Für. Chem. Chem. Mon.* 2001;132:875–880.