

Université de Montréal

**Régulation du transport de glucose par le
 β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque**

par
Amélie Pelletier

Département de médecine
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Sciences biomédicales

décembre, 2006

© Amélie Pelletier, 2006



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque

présentée par :
Amélie Pelletier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

.....
John S. Chan, président-rapporteur

.....
Jean-Louis Chiasson, directeur de recherche

.....
Lise Coderre, co-directrice

.....
Vincent Poitout, membre du jury

.....
André Marette, examinateur externe

.....
John S. Chan, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le glucose est une source d'énergie importante pour le cœur. Il est essentiel au maintien des fonctions cardiaques et il a été suggéré qu'une altération de son transport participerait au développement des maladies cardiaques dont le risque est augmenté par le diabète. Les patients diabétiques mal contrôlés présentent souvent des niveaux élevés de corps cétoniques. Puisqu'il existe une corrélation entre les maladies cardiovasculaires et la présence des corps cétoniques, nous avons donc étudié l'effet du β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline et au stress métabolique induit par le 2,4-dinitrophénol (DNP) dans des cultures primaires de cardiocytes de rats adultes.

Tout d'abord, nous avons caractérisé l'effet des corps cétoniques sur la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline. Nos résultats démontrent que seule une exposition chronique au β -hydroxybutyrate crée une résistance à l'insuline dans les cardiocytes. De plus, ce traitement inhibe le transport de glucose en réponse à une stimulation aiguë au pervanadate. Cette diminution du transport de glucose en réponse à l'insuline et au pervanadate pourrait être due à une inhibition de l'activation de la protéine kinase B (PKB).

Nous avons ensuite examiné par quel mécanisme le β -hydroxybutyrate altère l'action de l'insuline. Nos résultats démontrent que le β -hydroxybutyrate inhibe la stimulation de la voie de signalisation PI3K/PKB dans les cardiocytes. Par la suite, nous avons déterminé si le vanadate, un inhibiteur des protéines tyrosines phosphatases, pouvait contrecarrer l'effet des corps cétoniques. Le vanadate peut outrepasser la

résistance à l'insuline induite par le β -hydroxybutyrate en stimulant la voie de signalisation PI3K/PKB et le transport de glucose.

Après avoir étudié l'effet des corps cétoniques sur l'action de l'insuline, nous avons voulu déterminer s'ils avaient un impact sur la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP. Puisque la contribution des enzymes impliquées dans l'augmentation du transport de glucose en réponse au DNP est controversée, nous avons tout d'abord caractérisé les voies de signalisation activées par le DNP. Nos résultats démontrent que le DNP active l'AMPK et la p38MAPK. De plus, l'inhibition de cette voie AMPK/p38MAPK entraîne une réduction partielle du transport de glucose en réponse au DNP. Cela suggère que le DNP active également une voie de signalisation AMPK-indépendante pour stimuler de façon maximale le transport de glucose dans les cardiocytes adultes.

Par la suite, nous avons étudié l'effet des corps cétoniques sur l'action du DNP. Comme pour l'insuline, seule une exposition chronique au β -hydroxybutyrate altère la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP. Le β -hydroxybutyrate régule le transport de glucose en réponse au DNP via l'inhibition de la voie AMPK/p38MAPK et la surproduction d'espèces réactives d'oxygène.

En conclusion, une exposition chronique au β -hydroxybutyrate inhibe la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP. Puisque le glucose joue un rôle primordial dans le maintien des fonctions cardiaques, l'hypercétonémie pourrait avoir un impact majeur sur le développement des maladies cardiovasculaires, en particulier chez les patients atteints de diabète.

Mots-clés : cœur, transport de glucose, insuline, hypoxie, stress oxydatif, hypercétonémie

Abstract

Glucose is a major source of energy for the heart and it is essential to maintain cardiac functions. It has been suggested that alteration of cardiac glucose uptake contributes to the development of cardiovascular disease, which the risk is increased in diabetes. Poorly-controlled diabetics often have elevated concentrations of ketone bodies. Because there is a strong correlation between cardiovascular disease and hyperketonemia, we have studied the effect of β -hydroxybutyrate on the stimulation of glucose uptake in response to insulin and metabolic stress induced by 2,4-dinitrophenol (DNP) in primary cultures of adult rat cardiomyocytes.

Firstly, we have examined the effect of ketone bodies on insulin-stimulated glucose uptake. Our results demonstrate that only chronic exposure to β -hydroxybutyrate induces insulin resistance in cardiomyocytes. Furthermore, this treatment inhibits glucose uptake in response to acute stimulation with pervanadate. This reduction of glucose uptake in response to both insulin and pervanadate may be due to decreased protein kinase B (PKB) activation observed in ketone body-treated cells.

Next, we have examined by which mechanism ketone bodies alter insulin's action and demonstrated that β -hydroxybutyrate reduces insulin-stimulated glucose uptake by inhibiting the activation of the PI3K/PKB signaling pathway in cardiomyocytes. Then, we have determined whether vanadate, a protein tyrosine phosphatase inhibitor, could counteract ketone body's effect. Our results show that vanadate can bypass β -hydroxybutyrate-induced insulin resistance probably by stimulating the PI3K/PKB signaling cascade and glucose uptake.

Because insulin and metabolic stress stimulate glucose uptake through activation of distinct mechanism, we were interested to determine whether ketone bodies also alter DNP's action. However, the exact contribution of the enzymes implicated in metabolic stress-induced glucose uptake was not well characterized in cardiomyocytes. Thus, we examined the signaling cascade activated in response to DNP. Our results demonstrate that DNP activates AMPK and p38MAPK. Furthermore, inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway leads to partial reduction of glucose uptake in response to DNP. Our data suggest that, in addition to the AMPK/p38MAPK signaling pathway, DNP also activates an AMPK-independent signaling cascade to fully stimulate glucose uptake in cardiomyocytes.

Subsequently, we have studied the effect of ketone bodies on DNP's action. Similar to insulin, only chronic exposure to β -hydroxybutyrate alters DNP-induced glucose uptake. This effect is mediated, at least in part, through inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway and overproduction of reactive oxygen species.

In conclusion, chronic exposure to β -hydroxybutyrate inhibits insulin- and DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. Because glucose plays an important role in maintaining cardiac functions, alteration of glucose uptake in hyperketonemic states may participate in cardiovascular disease development, especially in diabetic heart.

Keywords: heart, glucose uptake, insulin, hypoxia, oxidative stress, hyperketonemia

Table des matières

Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières..	vii
Liste des figures	x
Liste des abréviations..	xi
Dédicace... ..	xiv
Remerciements....	xv

CHAPITRE 1 : Introduction

I. Le diabète et les maladies cardiovasculaires	2
A. Les généralités	2
B. Les maladies cardiovasculaires.....	3
C. La cardiomyopathie diabétique.....	5
II. Le métabolisme cardiaque	11
A. Les acides gras	11
1. Les sources.....	11
2. Le transport des acides gras	12
3. La synthèse des triglycérides dans le cœur	14
4. La β -oxydation.....	14
5. Le cycle de Krebs.....	17
6. La phosphorylation oxydative mitochondriale	19
B. Les corps cétoniques.....	21
1. La cétogenèse.....	22
2. L'utilisation des corps cétoniques.....	24
C. Le glucose	25
1. Les sources.....	25
2. Le transport de glucose	25
3. La glycolyse	27
4. Le pyruvate	30
D. Les spécificités du métabolisme cardiaque.....	32
1. Les interactions entre le métabolisme des acides gras et celui du glucose.....	32
2. Les conditions anaérobiques ou de stress métaboliques telles l'hypoxie ou l'ischémie	35
III. La régulation du transport de glucose dans le cœur.....	36
A. Le transport de base	37
B. Le transport de glucose en réponse à l'insuline	38

1.	La voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase-dépendante	38
2.	La voie de signalisation APS/CAP	43
3.	La modulation de l'activité intrinsèque des transporteurs de glucose.....	44
4.	La cessation du transport de glucose	45
C.	Le transport de glucose en réponse au stress métabolique	47
1.	Les particularités du stress métabolique	47
2.	L'activation d'une voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase-indépendante	49
3.	Les autres enzymes candidates possibles.....	51
D.	La modulation du transport de glucose dans le cœur.....	52
1.	Les agonistes.....	52
2.	Les inhibiteurs.....	54
IV.	L'impact des corps cétoniques sur l'organisme	57
A.	Les conditions physiologiques et physiopathologiques qui favorisent la céto-genèse	58
B.	L'influence des corps cétoniques sur le métabolisme des acides gras et du glucose	60
1.	Au niveau du foie.....	60
2.	Au niveau du cerveau.....	61
3.	Au niveau du muscle squelettique	62
4.	Au niveau du cœur	63
C.	Les bienfaits et les effets néfastes des corps cétoniques.....	64
1.	La perte de poids.....	64
2.	L'amélioration des fonctions cérébrales	65
3.	L'effet néfaste sur l'action de l'insuline	67
4.	L'implication dans la prévention ou le développement des maladies cardiovasculaires	68
V.	La rationnelle	71
 CHAPITRE 2 : Résultats		
I.	Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes	75
II.	Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K	106
III.	Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes	142
IV.	Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes	178

CHAPITRE 3 : Discussion

I. Effet aiguë versus chronique du β-hydroxybutyrate sur le transport de glucose	218
II. Effet du β-hydroxybutyrate sur la voie de signalisation activée par l'insuline	223
III. Effet des composés de vanadate sur la résistance à l'insuline	227
A. Effet d'une exposition aiguë au pervanadate	227
B. Effet d'une exposition chronique au vanadate.....	228
IV. Effet du β-hydroxybutyrate sur la voie de signalisation activée par le DNP	229
A. Caractérisation de la voie de signalisation activée par le DNP	229
B. Effet du β -hydroxybutyrate sur l'activation de la voie de signalisation AMPK-dépendante	234
V. Limites du modèle	236
VI. Conclusion	237
VII. Perspectives	238
A. Les mécanismes d'action des corps cétoniques sur le transport de glucose	238
1. Implication du stress oxydatif.....	238
2. Activation du cycle de Randle	240
B. Implication des corps cétoniques dans le développement des maladies cardiovasculaires	240
1. Effet des corps cétoniques sur la mort cellulaire	241
2. Effet des corps cétoniques sur la fonction cardiaque.....	241
Bibliographie.....	243
Annexe : Accord des coauteurs et permission de l'éditeur pour les articles présentés dans cette thèse	282

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique des différents facteurs qui contribuent au développement des maladies cardiovasculaires	3
Figure 2 :	Les différentes voies de signalisation activées par l'insuline	8
Figure 3 :	La régulation du transport des acides gras vers le cytoplasme puis vers la matrice mitochondriale	13
Figure 4 :	La β -oxydation des acides gras	17
Figure 5 :	Le cycle de Krebs	18
Figure 6 :	La phosphorylation oxydative mitochondriale	20
Figure 7 :	La régulation de la cétogenèse et de l'utilisation des corps cétoniques	23
Figure 8 :	La glycolyse	28
Figure 9 :	La régulation de la phosphofructokinase-1 (PFK-1), une enzyme clé de la glycolyse	29
Figure 10 :	La régulation du métabolisme du pyruvate	32
Figure 11 :	Le cycle de Randle	34
Figure 12 :	Les deux voies de signalisation responsables de la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline	39
Figure 13 :	Les enzymes responsables de la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique	48
Figure 14 :	La régulation de la production et de la dégradation des ROS	56
Figure 15 :	Représentation schématique du modèle expérimental	237

Liste des abréviations

ACC :	acétyl CoA carboxylase
Acyl CoA :	acylcoenzyme A
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADP :	adénosine diphosphate
AGE :	produit avancé de glycation
AICAR :	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside
AMP :	adénosine monophosphate
AMPK :	adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase
AMPKK :	adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase kinase
Ang II :	angiotensine II
APS :	adaptor protein containing PH and SH2 domains
ARN :	acide ribonucléique
ATP :	adénosine triphosphate
C3G :	CRK SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor
Ca ²⁺ :	calcium
CAMK :	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CAP :	Cbl-associated protein
CAT :	carnitine : acylcarnitine translocase
Cbl :	Casitas B lymphoma
CoA :	coenzyme A
CO ₂ :	dioxyde de carbone
CPT :	carnitine palmitoyl transférase
CrkII :	CT10 regulator of kinase II
Cyt C :	cytochrome C
DAG :	diacylglycérol
<i>db/db</i> :	souris ayant une mutation sur le récepteur de la leptine
DGAT :	diacylglycérol acyltransférase
DN- :	dominant négatif
DNP :	2,4-dinitrophénol
eNOS :	endothelial nitric oxide synthase

ERK :	extracellular signal-regulated kinase
FABP :	protéine liant les acides gras ou fatty acid binding protein
FAD ⁺ :	flavine adénine dinucléotide
FADH ₂ :	flavine adénine dinucléotide réduit
FAT/CD36 :	translocase ou fatty acid translocase
FATP :	protéine transporteur d'acide gras ou fatty acid transport protein
GAPDH :	glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GSK3 :	glycogen synthase kinase-3
GLUT :	transporteur de glucose
GPAT :	glycérol-3-phosphate acyltransférase
GTP :	guanosine triphosphate
H ⁺ :	hydrogène
HDL :	high-density lipoprotein
HMG CoA :	hydroxy-méthylglutarate CoA
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
HSL :	lipase hormono-sensible
IKK :	I kappa B kinase
Ip :	intra-péritonéal
IR :	récepteur à l'insuline
IRS :	insulin-receptor substrate
JNK :	Jun N-terminal kinase
K :	potassium
KD- :	kinase dead
kDa :	kilo Dalton
KO :	knockout
LDL :	low-density lipoprotein
LPL :	lipoprotéine lipase
MAPK :	mitogen-activated protein kinase
MCD :	malonyl CoA décarboxylase
MCT :	transporteur de monocarboxylate
MCV :	maladie cardiovasculaire

MEK :	MAPK/ERK kinase
mTOR :	mammalian target of rapamycin
NAC :	N-acétyl cystéine
NAD ⁺ :	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NF- κ B :	nuclear factor kappa B
NO :	oxyde nitrique
O ₂ ⁻ :	anion superoxyde
·OH :	radical d'hydroxyl
OHB :	β -hydroxybutyrate
PAI-1 :	plasminogen activator inhibitor-1
PDH :	pyruvate déshydrogénase
PDK :	pyruvate déshydrogénase kinase
PDK1 :	phosphoinositide-dependent kinase 1
PFK :	phosphofructokinase
pH :	potentiel hydrogène
PH :	pleckstrin homology
PI3K :	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP3 :	phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKB :	protéine kinase B
PKC :	protéine kinase C
PTEN :	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
PTP :	protéine tyrosine phosphatase
ROS :	espèce réactive d'oxygène
SERCA :	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SCOT :	succinyl CoA :3-cétoacyl CoA-transférase
SH2 :	<i>src</i> homology 2
SOD :	superoxyde dismutase
TG :	triglycérides
TNF- α :	tumor necrosis factor-alpha
VLDL :	very low-density lipoprotein

À tous ceux que j'aime

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Jean-Louis Chiasson ainsi que ma co-directrice Lise Coderre pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans leur laboratoire. En plus de m'avoir appris beaucoup au niveau scientifique, les six dernières années passées en leur compagnie m'ont également permis d'évoluer sur le plan personnel.

Par la suite, j'aimerais remercier, par ordre alphabétique pour ne pas faire de jalouses, Susanne Bordeleau, Nathalie Julien, Vivianne Larose et Annie Tardif pour leur aide et leur support accordés au quotidien durant ce périple tumultueux.

Un gros merci à toute l'équipe de Marc Prentki pour m'avoir si bien accueillie parmi vous. Votre rigueur scientifique et vos qualités humaines m'ont vraiment poussées à toujours me surpasser. Une pensée toute spéciale pour Érik Joly qui fut d'une aide particulière.

Finalement, je voudrais remercier mon conjoint, mes parents, mon frère, France et mes ami(e)s pour leur amour inconditionnel et leur support indéfectible dans les moments plus difficiles. Je vous aime tellement !

CHAPITRE 1

Introduction

I. LE DIABÈTE ET LES MALADIES CARDIOVASCULAIRES

A. Les généralités

Le diabète est une maladie en progression constante qui prend des proportions épidémiques à travers le monde, et plus particulièrement dans les pays en voie de développement situés en Afrique, Asie et Amérique du Sud (Stumvoll et coll., 2005). Présentement, au-delà de 170 millions d'individus sont atteints du diabète et ce chiffre pourrait grimper jusqu'à 300 millions d'ici 2025 (King et coll., 1998). Cette montée remarquable du diabète est principalement due à la mauvaise alimentation (riche en énergie) et au mode de vie sédentaire adoptés par la population. Ceci se traduit par une obésité précoce et généralisée qui favorise le développement du diabète chez des populations de plus en plus jeunes. Le diabète est une maladie très inquiétante puisqu'elle est la première cause d'insuffisance rénale terminale et d'amputation non traumatique et la deuxième cause de cécité (Klein et coll., 1996; Caputo et coll., 1994). Mais, surtout, le diabète représente une cause majeure du développement des maladies cardiovasculaires (MCV). Les patients diabétiques ont deux à cinq fois plus de risque de développer des MCV que les personnes non-diabétiques (Zimmet et coll., 2001; Kannel et coll., 1974). Leur risque d'avoir un épisode cardiovasculaire est similaire à celui d'un patient ayant un antécédent d'infarctus du myocarde (Haffner et coll., 1998; Malmberg et coll., 2000). Finalement, les MCV sont responsables de 65 % à 75 % des mortalités enregistrées chez les patients atteints du diabète de type 2 (Libby et coll., 2005) et ce pourcentage semblerait même quelque peu supérieur chez les patients diabétiques de type 1 (Krolewski et coll., 1987; Laing et coll., 2003). Ainsi, il est

primordial de comprendre quels facteurs reliés à la présence du diabète favorisent le développement des MCV.

B. Les maladies cardiovasculaires

Le syndrome métabolique (ou syndrome X) est un terme qui fut mis de l'avant à la fin des années '80 afin de décrire un ensemble de perturbations métaboliques qui prédisposent fortement au développement et à la progression de l'athérosclérose et du diabète de type 2. L'hyperglycémie, l'obésité abdominale, la dyslipidémie, l'hypertension et la résistance à l'insuline représentent les cinq composantes clés du syndrome métabolique qui contribuent à accélérer la formation des plaques d'athérosclérose (Figure 1). La présence d'athérosclérose, conséquence du syndrome métabolique, est responsable, à tout de moins en partie, de l'augmentation des MCV observée chez les patients diabétiques (Massie, 2002).

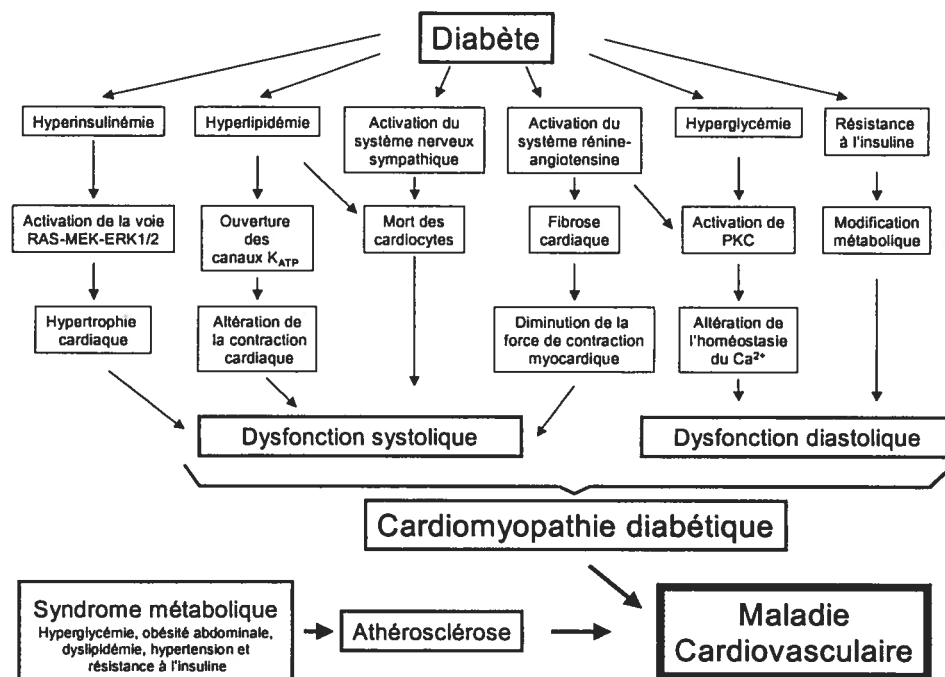


Figure 1: Représentation schématisée des différents facteurs qui contribuent au développement des maladies cardiovasculaires. Voir les sections I. B. et I. C. pour la discussion.

Tout d'abord, l'hyperglycémie peut entraîner une dysfonction endothéliale qui représente une étape précoce dans le processus d'athérosclérose (Ross, 1993). L'hyperglycémie exerce son effet délétère sur l'endothélium via quatre voies moléculaires: l'activation de protéine kinase C (PKC) classique via la formation de diacylglycérol (DAG), l'augmentation de la voie des hexosamines, l'augmentation de la production de produits avancés de la glycation (AGE) et l'augmentation de la voie des polyols (Brownlee, 2005). L'activation de ces quatre voies convergent vers la surproduction d'espèce réactive d'oxygène (ROS) qui accroît le stress oxydatif au niveau des cellules endothéliales.

L'obésité abdominale favorise la relâche de multiples facteurs par le tissu adipeux pouvant participer à la formation de plaque d'athérosclérose. Ainsi, la présence élevée d'adipocytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) et le PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) peut entraîner des dommages majeurs au niveau de l'endothélium vasculaire (Yudkin et coll., 1999; Matsuzawa, 2005; Lyon et Hsueh, 2003; Moller et Kaufman, 2005).

L'augmentation des triglycérides et la diminution du HDL (high-density lipoprotein) cholestérol au niveau sanguin caractérisent principalement la dyslipidémie. L'altération des niveaux de triglycérides et de HDL exerce également un effet pro-athérosclérotique au niveau vasculaire (Carmena et coll., 2004).

L'hypertension est associée à l'activation du système rénine-angiotensine (Sachetelli et coll., 2006). L'angiotensine II (Ang II) entraîne l'activation de plusieurs processus conduisant à l'augmentation de la vasoconstriction, du stress oxydatif, de

l'inflammation, de l'expression de PAI-1, de thrombose, etc (Caglayan et coll., 2005). Tous ces changements contribuent à la dysfonction endothéliale et au développement de l'athérosclérose.

Finalement, la résistance à l'insuline peut également avoir des effets délétères sur la fonction endothéliale. Il a été démontré que la vasodilatation, induite par l'oxyde nitrique (NO), était réduite chez les patients insulino-résistants (Williams et coll., 1996). L'insuline est un puissant frénateur de la lipolyse. Lorsqu'un patient est insulino-résistant, l'insuline ne peut plus bloquer totalement ce processus ce qui entraîne une augmentation des acides gras circulants. Lorsque trop élevés, les acides gras endommagent les parois artérielles et rendent l'endothélium plus propice à l'apoptose (mort cellulaire), l'inflammation et la formation de thrombose (Oram et Bornfeldt, 2004).

Ainsi, tous ces facteurs favorisent de façon indépendante la formation de plaque d'athérosclérose et contribuent au développement des MCV chez les patients diabétiques.

C. La cardiomyopathie diabétique

Bien que l'athérosclérose représente un facteur déterminant dans le développement des MCV, il est à noter qu'il existe aussi une composante propre au diabète, indépendante de la formation des plaques d'athérosclérose, nommée cardiomyopathie diabétique (Figure 1). Le cœur d'une personne diabétique comporte plusieurs caractéristiques qui le distinguent du cœur d'un sujet sain. Chez le patient diabétique, les fonctions systolique et diastolique du cœur sont diminuées en raison de changements au niveau de l'homéostasie du Ca^{2+} et de changements au niveau structural myocardique tels la présence d'apoptose, de fibrose extracellulaire et d'hypertrophie des

cardiocytes (Marwick, 2005). Normalement la dysfonction diastolique survient avant la dysfonction systolique.

La dysfonction diastolique se caractérise principalement par une relaxation prolongée et une augmentation de la pression ventriculaire en fin de diastole (Poirier et coll., 2001). L'hyperglycémie observée dans le diabète est un facteur qui contribue à la dysfonction diastolique. Comme mentionné précédemment, l'hyperglycémie augmente l'activation de la PKC et la production d'hexosamine, de polyols et d'AGE. Tous ces changements sont responsables de l'altération de l'expression et de la fonction du récepteur à ryanodine et des canaux SERCA ATPase (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase pump) (Poornima et coll., 2006). Il en résulte un ralentissement de l'accumulation du Ca^{2+} à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique ce qui entraîne une diminution moins rapide du Ca^{2+} intracellulaire durant la période de diastole (Ren et coll., 1996; Ren et coll., 1999; Vila Petroff et Mattiazzi, 2001). Ces modifications du transport de Ca^{2+} induisent un découplage excitation-contraction (Stratton et coll., 2000).

Le système nerveux sympathique pourrait également jouer un rôle délétère dans la cardiomyopathie diabétique. Les niveaux d'expression des récepteurs adrénergiques β_1 et β_2 , responsables de l'augmentation de la force de contraction, sont diminués lors du diabète. De plus, les récepteurs β_3 , qui médient les effets cardiosuppresseurs, sont augmentés en pareilles circonstances (Moniotte et coll., 2001; Dincer et coll., 2001). Ces changements pourraient contribuer à accroître la période de relaxation caractéristique de la dysfonction cardiaque.

L'hyperlipidémie, caractérisée par une augmentation des triglycérides et des acides gras non-estérifiés, joue également un rôle critique dans la cardiomyopathie diabétique. Il a été démontré que les acides gras non-estérifiés peuvent altérer la contraction cardiaque en ouvrant les canaux K_{ATP} (Liu et coll., 2001). De plus, les acides gras non-estérifiés pourraient directement contribuer à la mort (apoptose) des cellules cardiaques en favorisant la synthèse de céramide (Poornima et coll., 2006), mais ces résultats sont controversés dépendamment du modèle étudié (Zhang et coll., 2001).

Le remodelage cardiaque, caractérisé par la présence de fibrose et de cardiocytes morts ou hypertrophiques, entraîne une diminution de la force de contraction qui pourrait expliquer la dysfonction systolique. Tout d'abord, l'activation locale du système rénine-angiotensine semble en grande partie responsable de la mort cellulaire (apoptose et nécrose) et de la fibrose observées dans la cardiomyopathie diabétique. Il a été démontré que le récepteur à l'Ang II joue un rôle pro-apoptotique (Horiuchi et coll., 1999) et est surexprimé dans le cœur de patient diabétique (Fiordaliso et coll., 2000). De plus, l'Ang II stimule la synthèse de collagène et inhibe sa dégradation ce qui favorise la formation de fibrose (Dostal, 2001). La production de collagène peut également être induite par l'aldostérone dont la synthèse est favorisée par l'hyperglycémie (McFarlane et Sowers, 2003).

L'hypertrophie cardiaque diabétique est aussi responsable de la diminution de la fonction systolique. Bien que le diabète soit caractérisé, entre autre, par la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie observée dans cette pathologie peut accentuer certains effets spécifiques de l'insuline et, ainsi, induire l'hypertrophie cardiaque. L'insuline active trois voies de signalisation distinctes en se liant à son récepteur : deux voies sont

impliquées dans la régulation du transport de glucose (voir section III. B. 1. et III. B. 2.) et une voie est responsable de la réponse mitogénique (Figure 2). L'activation de la voie de Ras-MEK-ERK1/2 est

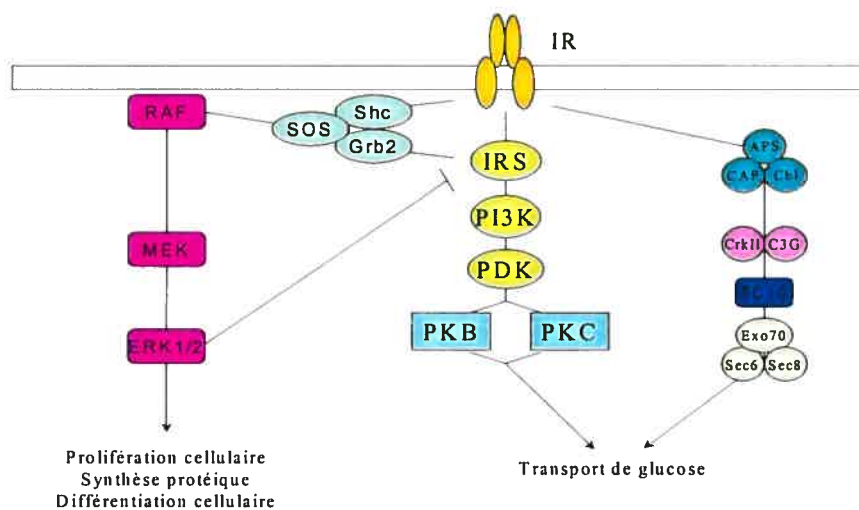


Figure 2: Les différentes voies de signalisation activées par l'insuline. L'insuline active une voie mitogénique responsable de la prolifération cellulaire, la synthèse protéique et la différenciation cellulaire. La voie PI3-K-dépendante et la voie APS/CAP sont responsables de la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline. Voir les sections IC, III. B. 1., III. B. 2. et III. B. 4. pour la discussion. IR, récepteur à l'insuline.

responsable de la réponse mitogénique de l'insuline qui se traduit par l'augmentation de la synthèse protéique, de la différenciation et de la prolifération cellulaire. L'activation de cette voie est impliquée dans l'hypertrophie cardiaque (Lazou et coll., 1994; Gillespie-Brown et coll., 1995; Glennon et coll., 1996). Chez les patients diabétiques, il a été démontré que les adipocytes sont résistants à l'effet de l'insuline sur le transport de glucose alors que l'activation de la voie mitogénique est préservée et même que la stimulation de base de cette voie est augmentée (Carlson et coll., 2003). Ainsi, l'hyperinsulinémie observée dans le diabète accroît l'activation de la voie Ras-MEK-ERK1/2 et, par conséquent, pourrait favoriser le développement de l'hypertrophie cardiaque responsable de la dysfonction systolique. Il est à noter que l'Ang II et

l'hyperglycémie pourrait également contribuer au développement de l'hypertrophie cardiaque (Baker et coll., 1992; Lip et coll., 2000; Felicio et coll., 2000).

Finalement, la résistance à l'insuline, observée lors du diabète, a de fortes répercussions sur le développement de la cardiomyopathie diabétique puisqu'elle altère le métabolisme normal du cœur. Habituellement, le cœur répond à l'insuline par une augmentation de l'utilisation du glucose. Cependant, la présence d'une résistance à l'insuline dans le cœur de patient diabétique diminue l'apport en glucose en réponse à cette hormone. Ainsi, lors d'une augmentation des concentrations sanguines d'insuline, conjointe à une diminution de son action, l'oxydation des acides gras reste élevée et le transport de glucose demeure faible. Ces deux phénomènes exercent des effets majeurs sur la fonction cardiaque. Tout d'abord, cette hausse de l'oxydation des acides gras dans le cœur du sujet diabétique entraîne une augmentation du stress oxydatif (Finck, 2004). Il a été démontré à plusieurs reprises que l'augmentation du stress oxydatif est intimement liée à une altération de l'homéostasie du Ca^{2+} au niveau cardiaque. Par exemple, le stress oxydatif augmente l'oxydation des protéines de transport du Ca^{2+} (Guerra et coll., 1996), diminue la sensibilité des filaments contractiles au Ca^{2+} (Ritchie et Delbridge, 2005) et diminue l'activité et l'expression des canaux SERCA ATPase essentiels à la relaxation musculaire lors de la diastole (Kaplan et coll., 2003). Tous ces changements entraînent des anomalies au niveau du réticulum sarcoplasmique et des sarcomères qui altèrent l'homéostasie du Ca^{2+} , et génèrent des problèmes majeurs au niveau de la contraction cardiaque (Dhalla et coll., 1998). De plus, le glucose joue un rôle primordial dans le maintien des fonctions cardiaques. Ainsi, une diminution de sa captation en réponse à l'insuline pourrait avoir des effets dommageables sur le cœur chez les patients insulino-

résistants. Tout d'abord, il a été rapporté que les animaux déficients en transporteur de glucose GLUT4 développent une hypertrophie cardiaque et des anomalies au niveau de la fonction cardiaque (Katz et coll., 1995; Kaczmarczyk et coll., 2003). Tian et coll. (Tian et Abel, 2001) ont également démontré que le transport de glucose via le GLUT4 représente un mécanisme important pour la protection et le maintien des fonctions cardiaques lors d'ischémie. Il a été proposé qu'une faible oxydation du glucose constitue un facteur déterminant dans la sévérité des dysfonctions cardiaques observées suite à une ischémie (Liu et coll., 1996). L'utilisation de modèle d'animaux diabétiques ont confirmé l'importance du glucose dans le maintien des fonctions cardiaques. Il a été démontré que le traitement de rats diabétiques de type 1 avec de l'insuline améliore les fonctions mécaniques du cœur et rend ce dernier moins sensible aux dommages ischémiques comparativement aux rats non-traités (Malhotra et coll., 1981; Fein et coll., 1981; Broderick et Poirier, 2005). De plus, la surexpression des transporteurs de glucose GLUT4 dans le cœur est suffisante pour normaliser la fonction cardiaque des souris diabétiques *db/db* (Belke et coll., 2000). Finalement, il a été démontré chez l'humain que l'infusion de glucose, lors d'un infarctus du myocarde améliore la fonction cardiaque, réduit l'arythmie ventriculaire et diminue la mortalité post-infarctus (Apstein, 2000). Ainsi, le glucose joue un rôle prédominant dans le maintien des fonctions cardiaques et une altération de sa captation pourrait contribuer au développement de la cardiomyopathie diabétique.

Les MCV représentent donc une complication majeure observée chez les patients atteints de diabète. Bien que la présence d'athérosclérose induite par l'hyperglycémie, l'obésité abdominale, la dyslipidémie, l'hypertension et la résistance à l'insuline est

associée à une augmentation d'évènements cardiovasculaires, la cardiomyopathie diabétique peut se développer indépendamment de la présence d'athérosclérose. Elle est principalement modulée par l'hyperglycémie, l'hyperlipidémie, l'hyperinsulinémie, la suractivation du système rénine-angiotensine et du système nerveux sympathique et la résistance à l'insuline. L'altération du métabolisme du glucose cardiaque joue un rôle prédominant dans le développement de la cardiomyopathie diabétique. Il est donc primordial de bien comprendre comment le cœur régule l'utilisation des différents substrats disponibles.

II. LE MÉTABOLISME CARDIAQUE

Normalement, 95 % de l'ATP formée dans le cœur provient de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Le reste découle de la glycolyse et du GTP obtenu via le cycle de Krebs. La majorité de l'énergie produite provient du métabolisme des acides gras (60 à 70 %). Les corps cétoniques et le glucose ne contribuent qu'à 5-10 % et 25-30 % de la production énergétique, respectivement (Stanley et coll., 2005; Lewin et Coleman, 2003). Le cœur peut également métaboliser le pyruvate, le lactate et les acides aminés, mais leur contribution respective au métabolisme de base est marginale.

A. Les acides gras

1. Les sources

Les acides gras représentent le substrat préférentiel utilisé par le cœur en condition aérobie. Dans le cœur, l'utilisation et la captation d'acides gras sont étroitement reliées aux quantités d'acides gras libres plasmatiques, au travail cardiaque et à la disponibilité en oxygène (Taegtmeier et coll., 1998; Longnus et coll., 2001). Les

acides gras proviennent principalement de deux origines : de la circulation sanguine ou des réserves cardiaques endogènes de triglycérides. Dans la circulation sanguine, on retrouve les acides gras sous différentes formes : libres, liés à l'albumine ou associés en lipoprotéines (chylomicrons et VLDL). Les chylomicrons et les VLDL permettent le transport des triglycérides provenant de l'intestin ou du foie. Les concentrations plasmatiques d'acides gras sont normalement inférieures à 1 mM. Par contre, ces concentrations peuvent augmenter de façon significative durant un jeûne, une ischémie ou la présence de diabète (Stout et coll., 1976; Lopaschuk et coll., 1994; Taskinen et coll., 1985). Le cœur possède la capacité de stocker les acides gras sous forme de triglycérides afin de les utiliser au moment opportun. Ainsi, cette réserve endogène de triglycérides peut combler de 10 à 50 % des besoins énergétiques du cœur (Saddik et Lopaschuk, 1991). Bien que cette réserve joue un rôle primordial dans le métabolisme cardiaque, elle peut également s'avérer toxique dans certaines pathologies telles que l'obésité et le diabète où l'accumulation excessive de triglycérides est associée à la cardiomyopathie (Zhou et coll., 2000; Finck et coll., 2002).

2. *Le transport des acides gras*

Les acides gras peuvent entrer dans les cardiocytes par diffusion passive à travers la membrane ou à l'aide de protéines qui modulent leur transport par diffusion facilitée (Figure 3). Il existe quatre protéines pouvant réguler le transport des acides gras du sang vers l'intérieur des cardiocytes : la lipoprotéine lipase (LPL), la protéine liant les acides gras (FABP), la translocase (FAT/CD36) et la protéine transporteuse d'acide gras (FATP). La LPL est responsable de l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons et des VLDL afin de faciliter l'entrée des acides gras dans la cellule (Xiang et coll., 1999).

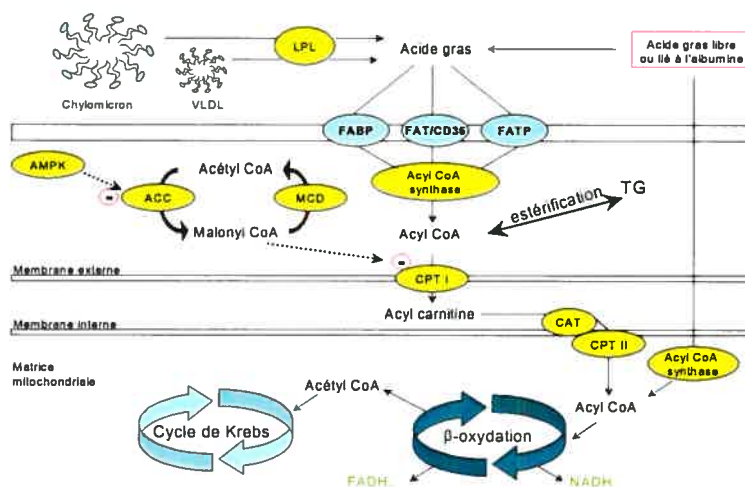


Figure 3: La régulation du transport des acides gras vers le cytoplasme puis vers la matrice mitochondriale. Les acides gras pénètrent la cellule par diffusion simple ou par diffusion facilitée grâce aux transporteurs FABP, FAT/CD36 et FAT. L'entrée de ceux-ci vers la matrice mitochondriale est régulée par le système de transport carnitine-dépendant. Voir les sections II. A. 2. et II. A. 4. pour la discussion. Adapté de Stanley W.C. et coll. *Physiol Rev* 85 : 1093-1129, 2005.

La FABP, la FAT/CD36 et la FATP sont des protéines qui permettent la diffusion des acides gras vers l'intérieur de la cellule. La FABP est requise pour le transport des acides gras à chaîne longue (Binas et coll., 1999). Finalement, la FAT/CD36 est responsable de 70 % du transport des acides gras dans le cœur (Lewin et Coleman, 2003). Une fois entrés dans le cytoplasme, les acides gras sont ensuite dégradés en acylcoenzyme A (acyl CoA) par l'acylcoenzyme A synthase. Cette réaction est dépendante de l'ATP. De toute l'acyl CoA formée, 10 % à 30 % est utilisé pour la formation intracardiaque de triglycérides et 70 à 90 % est oxydé afin d'augmenter la production d'ATP (Stanley et coll., 2005).

3. *La synthèse des triglycérides dans le cœur*

Comme mentionné précédemment, le cœur peut estérifier les acides gras en triglycérides. Cette réaction est catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) afin de former de l'acyl-glycérol-3-phosphate à partir de l'acyl CoA et du glycérol-3-phosphate. Dans le cœur, comme dans le foie et le tissu adipeux, la GPAT est présente sous deux isoformes : microsomale et mitochondriale (Swanton et Saggerson, 1997). Même si ces deux isoformes contribuent à l'augmentation de la synthèse des triglycérides, les données suggèrent que la GPAT mitochondriale est l'isoforme qui a le plus d'influence sur la régulation de la synthèse de triglycérides (Sul et Wang, 1998). L'acyl-glycérol-3-phosphate est tout d'abord acétylé en phosphatidate par l'acyl GPAT pour ensuite être converti en DAG par la phosphatidate phosphohydrolase (Brindley et Waggoner, 1998). La diacylglycérol acyltransférase (DGAT) est la dernière enzyme impliquée dans la voie d'estérification des acides gras puisqu'elle permet la formation de triglycérides à partir du DAG. Les triglycérides stockés peuvent ultérieurement être hydrolysés via la β -oxydation afin de combler les besoins énergétiques du cœur. Pour se faire, il y aura activation de l'acide lipase lysosomale, l'enzyme principalement responsable de la lipolyse cardiaque endogène (Stam et coll., 1986).

4. *La β -oxydation*

L'acyl CoA formé dans le cytoplasme sert majoritairement à la production d'énergie en empruntant la voie de la β -oxydation. Bien qu'une faible partie de la β -oxydation se produise dans les peroxisomes, la mitochondrie est considérée comme étant le principal lieu où la β -oxydation prend place. L'étape cruciale dans l'oxydation des

acides gras est leur entrée dans la matrice mitochondriale puisque la membrane interne de la mitochondrie est imperméable aux acyls CoA (Kerner et Hoppel, 2000). Le système de transport carnitine-dépendant qui permet l'entrée des acides gras vers la matrice mitochondriale constitue donc l'étape limitante de l'oxydation des acides gras. Ce système de transport se divise en trois étapes (Figure 3) (Kerner et Hoppel, 2000). Tout d'abord, la carnitine palmitoyl transférase (CPT) I, située à la surface externe de la mitochondrie, catalyse la substitution du groupement CoA par une carnitine, induisant ainsi la formation d'acyl-carnitine. L'acyl-carnitine est ensuite transportée au travers de la membrane interne de la mitochondrie par la carnitine : acylcarnitine translocase (CAT). Finalement, la CPT II permet la reconversion de l'acyl carnitine en acyl CoA dans la matrice mitochondriale.

Puisque l'entrée des acides gras dans la mitochondrie constitue une étape importante de la β -oxydation, le transport carnitine-dépendant est hautement contrôlé (Figure 3). La régulation du transport des acides gras vers la mitochondrie se fait surtout via la régulation de la CPT I. Il existe trois isoformes de la CPT I (A, B et C), mais seule la CPT IB est exprimée dans le cœur alors que la CPT IA est retrouvée dans le foie (McGarry et coll., 1983) et la CPT IC dans le cerveau (Price et coll., 2002). L'activité de la CPT I est régulée par la concentration extramitochondriale de malonyl CoA, mais la CPT IA est beaucoup moins sensible que la CPT IB à l'inhibition induite par le malonyl CoA (Foster, 2004). Ce dernier bloque l'activation de la CPT I en se liant du côté cytosolique de la CPT I (Reszko et coll., 2004a). Le malonyl CoA est produit à partir de l'acétyl CoA par l'acétyl CoA carboxylase (ACC) et est dégradé par la malonyl CoA

décarboxylase (MCD). L'ACC est inhibée par phosphorylation via l'AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase), un senseur énergétique. Ainsi, lorsque les ratios d'ATP/AMP ou de phosphocréatine/créatine sont bas, l'AMPK est activée. Ceci entraîne la phosphorylation et l'inhibition de l'ACC se traduisant par une diminution de la synthèse de malonyl CoA. Par conséquent, la CPT I reste activée ce qui favorise l'augmentation du transport des acides gras vers la mitochondrie afin de stimuler la β -oxydation pour rétablir les niveaux d'ATP. Au contraire, quand les niveaux énergétiques sont élevés, l'AMPK est inactivée. Ainsi, la synthèse du malonyl CoA par l'ACC est augmentée ce qui supprime le transport des acides gras vers la matrice mitochondriale (Foster, 2004). Dans le cœur, le taux de synthèse-dégradation du malonyl CoA est très rapide ce qui permet un contrôle très étroit de la β -oxydation (Reszko et coll., 2004b).

Une fois dans la matrice mitochondriale, l'acyl CoA entre dans le cycle de la β -oxydation où une série de quatre réactions entraînent la suppression d'un groupe d'acétyl CoA, la formation des deux coenzymes, le FADH_2 et le NADH , et la libération d'un atome de H^+ à chaque cycle complété (Figure 4) (Guyton et Hall, 1996). Les enzymes impliquées dans la β -oxydation varient dépendamment de la longueur de la chaîne des acides gras qui entrent dans ce cycle (Bing, 1955; Bing et coll., 1954). L'acyl CoA, passé au travers d'un cycle de β -oxydation, est reporté dans ce même cycle jusqu'à sa dégradation complète en acétyl CoA. Comme il se produit rarement, un acyl CoA peut avoir un nombre impair de carbone. À ce moment, dans la réaction finale du cycle, il y a formation de propionyl CoA (molécule à trois carbonnes) au lieu d'acétyl CoA. Le

propionyl CoA peut être métabolisé en succinyl CoA, un intermédiaire du cycle de Krebs (voir ci-après) (Horton et coll., 1994).

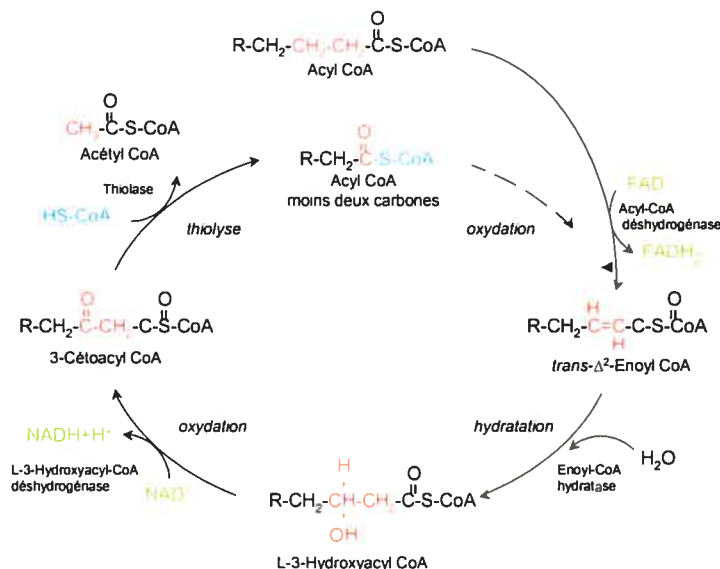


Figure 4: La β -oxydation des acides gras. Voir la section II. A. 4. pour la discussion. Tiré de Horton et coll. *Principe de Biochimie*, De Boeck-Wesmael S.A., Bruxelles 1994, p. 486.

5. Le cycle de Krebs

L'acétyl CoA formé via la β -oxydation est orienté vers le cycle de Krebs. Ce cycle, nommé ainsi en l'honneur du biochimiste allemand Hans Krebs qui a décrit toutes les étapes intermédiaires de cette voie, est aussi appelé cycle de l'acide citrique ou cycle de l'acide tricarboxylique. Le cycle de Krebs a pour but de terminer la décarboxylation de l'acétyl CoA et de produire des coenzymes essentielles pour la synthèse d'ATP via la chaîne de transport des électrons de la phosphorylation oxydative mitochondriale (voir ci-bas) (Jafri et coll., 2001). Le cycle de Krebs est donc l'endroit terminal pour le catabolisme des carbones où leur dégradation génère du gaz carbonique, des atomes d' H^+ , des coenzymes (trois NADH et un $FADH_2$) et une molécule de GTP (Figure 5).

L'acétyl CoA est la molécule fondamentale qui initie le cycle de Krebs. Tout d'abord, le groupement CoA est retiré et l'acétyl se lie à l'oxaloacétate pour former le citrate sous l'effet de la citrate synthase. Le citrate est ensuite converti

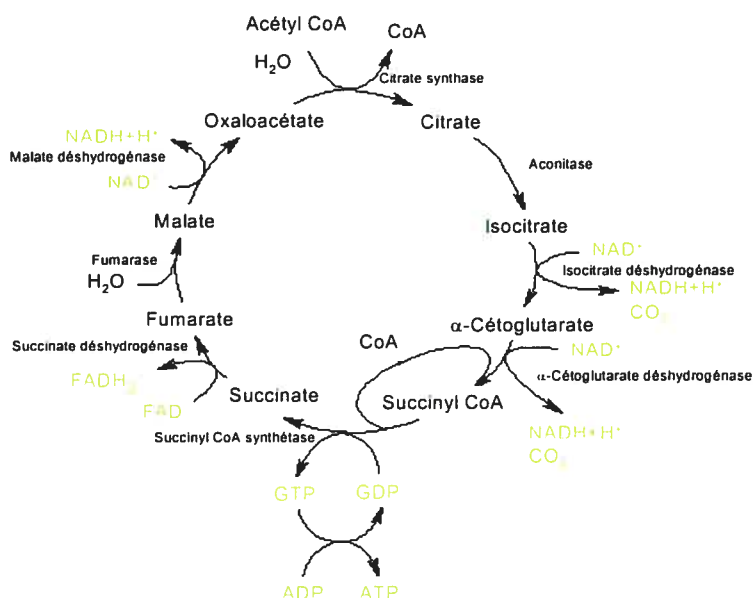


Figure 5 : Le cycle de Krebs. Voir la section II. A. 5. pour la discussion. Tiré du site internet <http://www.personal.kent.edu/~cearley/PChem/Krebs1.gif>, taille 7353 octets, 16-02-2006.

en isocitrate par l'aconitase. Ce dernier est métabolisé en α -cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase puis en succinyl CoA par le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase. Ces troisième et quatrième étape du cycle de Krebs entraînent toutes deux la libération d'une molécule de CO₂ et d'un atome d'H⁺ et la formation d'un NADH. La transformation du succinyl CoA en succinate par la succinyl CoA synthétase permet la formation d'une molécule de GTP. Le succinate est ensuite métabolisé en fumarate par la succinate déshydrogénase pour permettre la formation du FADH₂. Le fumarate est converti en malate par la fumarase pour finalement reformer de l'oxaloacétate à l'aide de la malate déshydrogénase ce qui permet la formation d'un troisième NADH (Jafri et coll.,

2001). L'oxaloacétate reformé peut ensuite se lier à d'autres molécules d'acétyl CoA pour refaire un nouveau cycle et ainsi produire encore plusieurs coenzymes essentielles à la synthèse d'ATP via la phosphorylation oxydative mitochondriale (Horton et coll., 1994).

Dans le cœur, le cycle de Krebs est modulé par la demande énergétique (Nichols et coll., 1994). Ainsi, plusieurs enzymes du cycle de Krebs telles la citrate synthase (Srere et coll., 1973), l'isocitrate déshydrogénase (Williamson et Cooper, 1980) et le complexe α -cétoglutarate déshydrogénase (Williamson et Cooper, 1980) sont inhibées lorsque le ratio NADH/NAD^+ est augmenté. De plus, certaines études suggèrent qu'au moment où il y a augmentation du travail cardiaque, l'élévation des concentrations mitochondriales de Ca^{2+} permet d'accélérer le cycle de Krebs afin de subvenir aux besoins énergétiques accrus (Hansford et Zorov, 1998; Isenberg et coll., 1993).

Deux intermédiaires du cycle de Krebs, l' α -cétoglutarate et l'oxaloacétate sont également impliqués dans des voies dites anaplérotiques. Ces voies utilisent l' α -cétoglutarate et l'oxaloacétate afin de maintenir des niveaux appropriés pour les différents intermédiaires du cycle de Krebs (Jafri et coll., 2001; Gibala et coll., 2000).

6. *La phosphorylation oxydative mitochondriale*

La phosphorylation oxydative mitochondriale est la voie la plus importante pour la synthèse d'ATP. Le principe fondamental de cette voie est de capter l'énergie libérée par la combinaison de l'oxygène et des H^+ pour faire de l'eau et de la transférer à la synthèse d'ATP. Les atomes d' H^+ , le NADH et le FADH_2 générés lors de la β -oxydation, du cycle de Krebs et de la glycolyse sont essentiels à la production d'ATP via

la phosphorylation oxydative mitochondriale (voir ci-bas). Les complexes protéiques de cette voie sont situés dans la membrane interne de la mitochondrie contrairement aux enzymes du cycle de Krebs qui sont localisées dans la matrice. On peut diviser ces complexes en deux groupes : les complexes I à IV permettent le transfert d'électron aux molécule d'oxygène et le complexe V utilise l'énergie libérée par ce transfert d'électron afin de produire l'ATP (Figure 6).

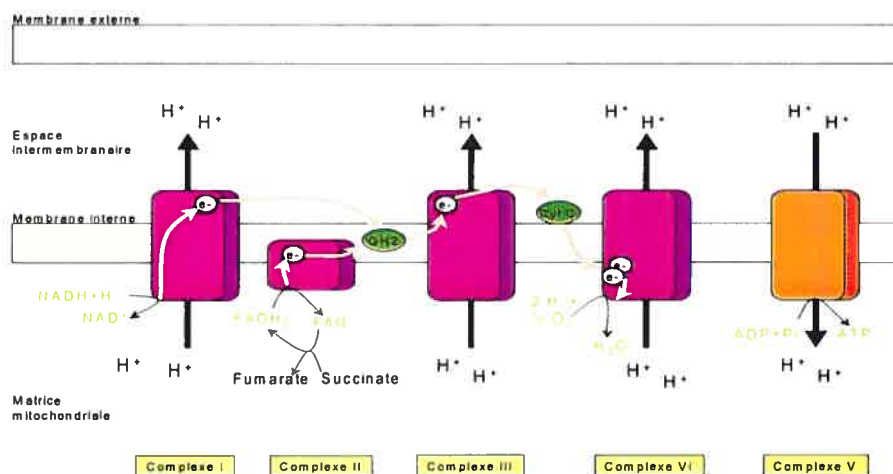


Figure 6 : La phosphorylation oxydative mitochondriale.
Voir la section II. A. 6. pour la discussion. Cyt C, *cytochrome C*

Les électrons apportés par le NADH et l'H⁺ sont tout d'abord transférés au complexe I de la chaîne de transport d'électron où la flavoprotéine agit comme accepteur d'électron. Par la suite, le flux d'électrons passe aux complexes II, III et IV en induisant la réduction et l'oxydation d'une série de transporteurs d'électrons comprenant plusieurs cofacteurs de fer et de cuivre, l'ubiquinone et les cytochromes B, C₁, C, A et A₃. Les électrons voyagent d'un accepteur à l'autre jusqu'au cytochrome A₃ (ou oxydase). Le cytochrome A₃ cède alors ses électrons à l'oxygène qui recueille une paire de protons provenant de la matrice mitochondriale pour former une molécule d'eau. Ce flux

d'électron est couplé à la translocation de proton d' H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondriale. Ainsi, la chaîne de transport d'électron ne synthétise pas directement l'ATP, mais sert plutôt à générer de l'énergie en créant un gradient de protons entre les membranes interne et externe de la mitochondrie. La formation du gradient de protons est utilisée afin de permettre la synthèse d'ATP par chimiosmose. Le complexe V est formé de l'ATP synthétase, enzyme essentielle à la production d'ATP. Le gradient d' H^+ entraîne une grande différence de potentiel des deux côtés de la membrane interne ce qui pousse les protons d' H^+ vers la matrice via l'ATP synthétase. C'est cette étape de la phosphorylation oxydative qui permet la formation d'ATP à partir d'ADP (Guyton et Hall, 1996).

Contrairement au NADH qui transfère ses électrons au complexe I et induit ainsi la formation de trois molécules d'ATP, le $FADH_2$ les transfère directement au complexe II. Parce qu'il contourne le complexe I, le $FADH_2$ permet donc la production de deux molécules d'ATP au lieu de trois (Guyton et Hall, 1996).

B. Les corps cétoniques

Il existe trois types de corps cétoniques : le β -hydroxybutyrate, l'acétoacétate et l'acétone. Dans le sang, seul l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate sont quantitativement importants puisque l'acétone est automatiquement exhalée. Normalement, les concentrations plasmatiques de corps cétoniques sont très faibles ($< 0,1$ mM) (Owen et coll., 1969). Par contre, il existe certaines conditions particulières telles la prise d'une diète cétogène, le jeûne prolongé et le diabète mal contrôlé où ces concentrations peuvent

atteindre de 2 à 6 mM et même 20 mM, respectivement (Musa-Veloso, 2004; Owen et coll., 1969; Laffel, 1999).

1. *La cétogenèse*

La synthèse des corps cétonique se fait principalement à partir des acides gras provenant de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux (Fukao et coll., 2004). La lipolyse est un processus de dégradation des triglycérides en acides gras grâce à différentes lipases dont la lipase hormono-sensible (HSL) très sensible à l'insuline. De faibles quantités d'insuline suffisent pour totalement supprimer la lypolyse (Newsholme et Dimitriadis, 2001). Ainsi, la lipolyse est surtout active lors du jeûne, au moment où les niveaux d'insuline sont les plus bas. Il est à noter que les acides gras libérés sous l'action des lipoprotéines lipases des VLDL et des chylomicrons peuvent également être impliqués dans la synthèse des corps cétoniques (Fukao et coll., 2004).

Le foie est le principal lieu de la cétogenèse en condition physiologique. Par contre, il peut arriver que le cœur produise du β -hydroxybutyrate lorsque les concentrations d'acétoacétate sont élevées (Williamson et Krebs, 1961). Les acides gras utilisés pour la synthèse des corps cétoniques sont captés par le foie. L'entrée des acides gras de la circulation sanguine vers le cytoplasme des hépatocytes se fait à l'aide de protéines spécifiques : LPL, FABP, FAT/CD36 et FATP (section II. A. 2.). Les acides gras sont métabolisés en acyl CoA et empruntent le système de transport carnitine-dépendant pour entrer dans la mitochondrie où ils seront métabolisés en acétyl CoA via la β -oxydation (voir la section II. A. 4.). Cependant, quand les concentrations d'acides gras circulants sont très élevées, la production d'acétyl CoA peut dépasser les besoins

énergétiques de l'organisme. Ainsi, l'acétyl CoA excédentaire est utilisé pour la synthèse des corps cétoniques dans la mitochondrie hépatocytaire. Il est à remarquer que les acétyl CoA dérivés de l'oxydation des acides gras sont utilisés pour la céto-genèse, alors que ceux provenant du métabolisme du glucose sont préférentiellement dirigés vers le cycle de Krebs (Des et coll., 1991).

La première étape de la céto-genèse débute par la formation d'acétoacétyl CoA à partir de deux molécules d'acétyl CoA (Figure 7). Cette réaction est catalysée par une thiolase. Par la suite, un troisième acétyl CoA se greffe à l'acétoacétyl CoA par l'hydroxy-méthylglutarate CoA (HMG CoA) synthase pour former l'HMG CoA. Cette enzyme joue un rôle majeur dans la régulation de la céto-genèse. L'activité de la HMG CoA synthase dépend de la disponibilité des substrats et de son niveau d'expression facilement modulable. Ainsi, une nourriture riche en gras, un jeûne et le diabète entraînent une augmentation significative de l'activité et du niveau d'expression de la HMG CoA synthase (Williamson et coll., 1968; Casals et coll., 1992; Arias et coll., 1997). La HMG CoA lyase catalyse la formation de l'acétoacétate à partir du HMG CoA. L'activité du HMG CoA lyase est aussi stimulée lors de la prise d'une nourriture

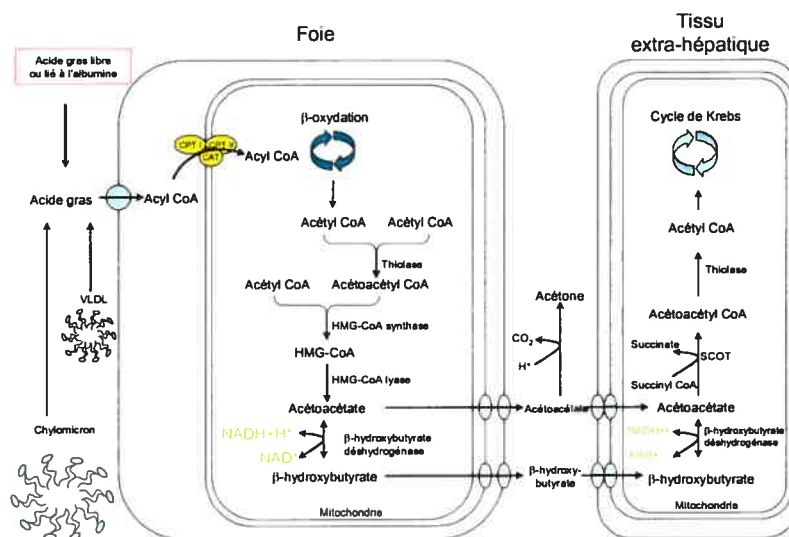


Figure 7 : La régulation de la céto-genèse et de l'utilisation des corps cétoniques.
Voir les sections II. B. 1. et II. B. 2. pour la discussion. \emptyset = MCT, monocarboxylate transporters

riche en gras (Williamson et coll., 1968). La formation du β -hydroxybutyrate résulte d'une réaction enzymatique de l'acétoacétate avec la β -hydroxybutyrate déshydrogénase. Cette réaction entraîne également la production de NAD^+ . Ainsi les niveaux d'acétoacétate et de β -hydroxybutyrate sont représentatifs de l'équilibre d'oxydo-réduction de la matrice mitochondriale (Fukao et coll., 2004).

2. *L'utilisation des corps cétoniques*

Très peu de corps cétoniques sont métabolisés par le foie (Figure 7). Ainsi, une fois synthétisés, l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate traversent les membranes mitochondriales externes et cytoplasmiques de la cellule via les transporteurs MCT (transporteur de monocarboxylate) (Halestrap et Price, 1999) afin de rejoindre la circulation sanguine pour être utilisés par les différents tissus. Dans le sang, l'acétone est formée par décarboxylation lente de l'acétoacétate de façon non-enzymatique. Puisque l'acétone n'est pas métabolisable par l'organisme, elle est donc exhalée hors de l'organisme. Le muscle squelettique peut métaboliser les corps cétoniques, mais les reins, le cerveau et le cœur possèdent une plus grande capacité à les utiliser (Fukao et coll., 2004; Owen et coll., 1967). Le taux d'utilisation des corps cétoniques est proportionnel à la quantité retrouvée dans la circulation (Hawkins et coll., 1971; Chen et coll., 1984). Il a été démontré qu'une augmentation de l'oxydation des corps cétoniques dans le cœur entraîne une diminution de l'oxydation des autres substrats énergétiques tels les acides gras, le glucose et le lactate (Talluto, 1954; Chen et coll., 1984; Stanley et coll., 2003). Ceci laisse suggérer que les corps cétoniques possèdent la capacité de réguler l'utilisation des autres substrats cardiaques.

Dans la mitochondrie des cellules extrahépatiques, le β -hydroxybutyrate est reconverti en acétoacétate grâce à une β -hydroxybutyrate déshydrogénase (isoenzyme distincte de l'enzyme hépatique) entraînant aussi la production de NADH. L'acétoacétate est métabolisé en acétoacétyl CoA par la succinyl CoA :3-cétoacyl CoA-transférase (SCOT) ce qui génère également du succinate à partir du succinyl CoA. La SCOT est principalement exprimée dans le cœur et les reins, alors que sa présence est limitée dans le cerveau et le muscle squelettique et nulle dans le foie (Fukao et coll., 2004). L'acétoacétyl CoA est reconverti en acétyl CoA par une thiolase. Ainsi, l'acétyl CoA peut entrer dans le cycle de Krebs et augmenter la production énergétique.

C. Le glucose

1. Les sources

Bien que le glucose représente une source d'énergie secondaire pour le cœur en condition physiologique puisque la majorité de l'énergie produit provient du métabolisme des acides gras, une altération de leur métabolisme respectif peut entraîner des dysfonctions cardiaques (Belke et coll., 2000). En période post-prandiale, l'hyperglycémie entraîne une élévation de la sécrétion d'insuline qui augmente la captation du glucose par les tissus périphériques (Augustin et coll., 2002). Ainsi, la contribution du glucose comme source d'énergie utilisée par le cœur est augmentée (Randle et coll., 1963). De plus, en période de stress métabolique où la disponibilité de l'oxygène est réduite, comme dans l'ischémie ou l'hypoxie cardiaque, le glucose représente le substrat de prédilection pour le muscle cardiaque (Williamson, 1966;

Rovetto et coll., 1973). Le glucose utilisé par le cœur provient de l'alimentation, des réserves de glycogène et de la néoglucogenèse.

Le foie est le principal lieu de stockage du glycogène en terme de quantité de glycogène par masse de tissu. Le cœur a aussi des réserves internes de glycogène, mais elles sont toutefois cinq fois plus faibles que celles retrouvées dans le muscle squelettique (Botker et coll., 1994). Par contre, les réserves de glycogène dans le cœur sont augmentées par l'apport excessif de glucose exogène ou par l'hyperinsulinémie (Stanley et coll., 1997). La glycogénolyse est le processus métabolique responsable de la production de glucose à partir du glycogène. Dans le cœur, la glycogénolyse est activée par une stimulation adrénergique ainsi que par une diminution des niveaux d'ATP observée lors d'une ischémie ou d'une hypoxie (Stanley et coll., 1997). L'AMPK joue un rôle important dans l'activation de la glycogénolyse au niveau cardiaque en inhibant la glycogène synthase et en activation la glycogène phosphorylase (Longnus et coll., 2003; Polekhina et coll., 2003). La stimulation de la glycogénolyse entraîne la production de glucose-6-phosphosphate. Le glucose-6-phosphate produit est métabolisé via la glycolyse. Le foie fait exception à cette règle puisqu'il possède une enzyme nommée glucose-6-phosphatase capable de convertir le glucose-6-phosphate en glucose. Ainsi, le glucose produit par le foie peut retourner dans la circulation pour être utilisé par d'autres tissus.

La production endogène de glucose à partir d'alanine, de lactate ou de glycérol se fait via la néoglucogenèse. La majorité de la néoglucogenèse se produit dans le foie, alors que le rein ne contribue à peine qu'à 20 % de la production endogène de glucose totale (Moller et coll., 2001). Le glucagon favorise la néoglucogenèse, alors que l'hyperglycémie et l'insuline l'inhibent (Tonelli et coll., 2005).

2. *Le transport de glucose*

Le glucose est capté par les cardiocytes par un processus bien contrôlé dont le détail sera discuté ultérieurement (voir la section III). Les cardiocytes possèdent des transporteurs spécifiques de glucose : GLUT. Les GLUT1 sont responsables du transport de base du glucose en permettant la diffusion du glucose selon le gradient de concentration du substrat. Lorsque le transport de glucose est augmenté en réponse à l'insuline ou à un stress métabolique, la translocation vers la membrane plasmique de vésicules enrichies de transporteurs de glucose GLUT4, est initiée (Young et coll., 2000). La majorité du glucose capté par les cardiomyocytes est oxydé alors que seulement 5 à 10 % est utilisé pour la synthèse de glycogène ou la formation de lactate (Goodwin et coll., 1995; Henning et coll., 1996). Une fois dans les cardiocytes, le glucose est converti en glucose-6-phosphate par l'hexokinase (enzyme nommée glucokinase dans le foie et le pancréas). Cette réaction dépendante de l'ATP est irréversible. Une fois le glucose-6-phosphate produit, ce dernier ne peut plus sortir de la cellule. L'accumulation de glucose-6-phosphate entraîne une rétro-action négative sur l'hexokinase afin de limiter la synthèse de glucose-6-phosphate et, ainsi, prévenir une surexploitation de la glycolyse (voir ci-après). Ainsi, le glucose non-métabolisé par l'hexokinase peut retourner dans la circulation par diffusion facilitée via les GLUTs (Kashiwaya et coll., 1994).

3. *La glycolyse*

La glycolyse est un processus qui permet de dégrader le glucose-6-phosphate, provenant du glucose circulant ou des réserves internes de glycogène, en pyruvate (Figure 8). Cette voie métabolique permet la production net de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH. La majeure partie du contrôle de la glycolyse se fait en

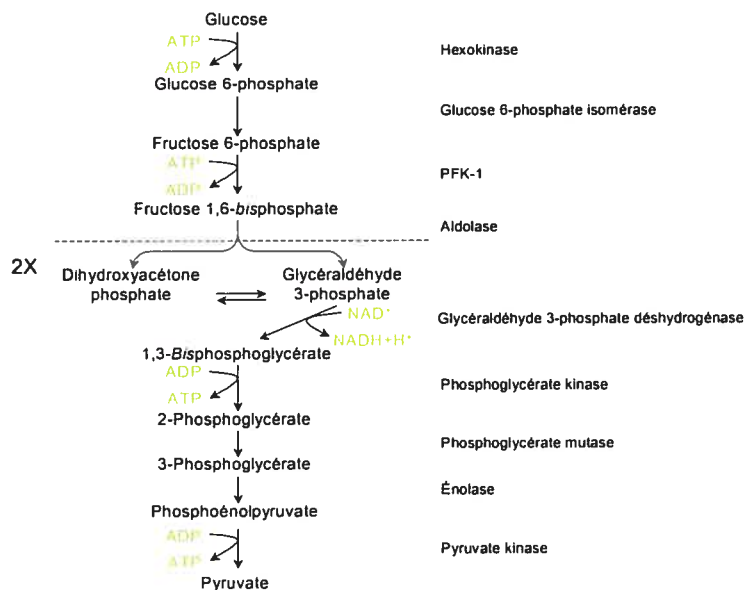


Figure 8 : La glycolyse . Voir la section II. C. 3. pour la discussion.

amont au niveau de l'entrée du glucose et au niveau de l'hexokinase tel que mentionné précédemment (Kashiwaya et coll., 1994), mais la phosphofructokinase (PFK)-1 représente l'enzyme clé dans la régulation de la glycolyse. La première étape réversible de la glycolyse est la synthèse de fructose-6-phosphate à partir du glucose-6-phosphate grâce à la glucose-6-phosphate isomérase. La deuxième réaction enzymatique est irréversible et est ATP-dépendante. Le fructose-6-phosphate est métabolisé en fructose 1,6-bisphosphate par la PFK-1. La PFK-1 est une enzyme clé dans la régulation de la glycolyse et est influencée par plusieurs facteurs (Figure 9). Cette enzyme est inhibée par une diminution du pH intracellulaire afin de prévenir la formation excessive de lactate (Ui, 1966). La PFK-1 est aussi inhibée par l'ATP, le citrate et les acides gras. La PFK-1 est activée par l'ADP, l'AMP et les phosphates inorganiques afin d'accélérer le flux glycolytique lorsque les besoins énergétiques sont grands. Le plus fort activateur de la

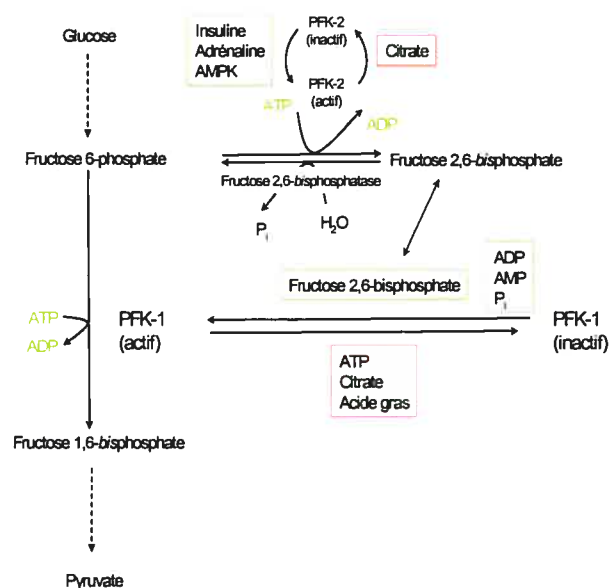


Figure 9 : La régulation de la phosphofruktokinase-1 (PFK-1), une enzyme-clé de la glycolyse. Les encadrés rouges identifient les composés ayant un effet inhibiteur et les encadrés verts identifient les composés ayant un effet stimulant sur l'action de la PFK-1. Voir la section II. C. 3. pour la discussion.

PFK-1 est sans doute le fructose 2,6-*bis*phosphate (Lawson et Uyeda, 1987; Hue et Rider, 1987). Le fructose 2,6-*bis*phosphate active la PFK-1 en augmentant son affinité pour le fructose-6-phosphate et en diminuant l'effet inhibiteur de l'ATP sur la PFK-1 (Stanley et coll., 2005). La PFK-2 est responsable de la formation de la fructose 2,6-*bis*phosphate à partir du fructose-6-phosphate en hydrolysant une molécule d'ATP. La PFK-2 est aussi une enzyme très étroitement régulée. En plus d'inactiver directement la PFK-1, le citrate inhibe également la PFK-2 de façon allostérique. La PFK-2 peut être phosphorylée en réponse à plusieurs hormones qui stimulent la glycolyse telles l'insuline et l'adrénaline. Finalement, l'AMPK a aussi la capacité de phosphoryler la PFK-2 pour accélérer la glycolyse (Marsin et coll., 2000).

Toutes les étapes subséquentes de la glycolyse sont réversibles. Tout d'abord l'aldolase catalyse la conversion du fructose 1,6-*bis*phosphate en deux molécules de

glycéraldéhyde 3-phosphate. Le glycéraldéhyde 3-phosphate peut être utilisé pour la synthèse de glycérol (ou de glycérol-3-phosphate) ou être métabolisé en 1,3-*bis*phosphoglycérate par la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et ainsi poursuivre le processus de la glycolyse. Cette dernière réaction permet la synthèse d'une molécule de NADH par molécule de glycéraldéhyde 3-phosphate. La GAPDH est l'autre enzyme de la glycolyse qui est hautement contrôlée (Mochizuki et Neely, 1979). Une accumulation de NADH et de 1,3-*bis*phosphoglycérate inhibe de la GAPDH, alors qu'une accumulation de NAD^+ favorise son activation. La régulation de la glycolyse en période d'ischémie cardiaque passe principalement par la régulation de la GAPDH (Rovetto et coll., 1975). Les deux molécules de 1,3-*bis*phosphoglycérate sont par la suite transformées en 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate kinase ce qui permet la synthèse de deux molécules d'ATP. La phosphoglycérate mutase et l'énolase se succèdent afin de convertir les molécules de 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate puis en phosphoénolpyruvate. Finalement, les deux molécules de phosphoénolpyruvate sont converties en pyruvate par la pyruvate kinase, produisant ainsi deux molécules d'ATP. Le pyruvate représente le produit final de la glycolyse.

4. *Le pyruvate*

Le pyruvate formé par la glycolyse peut être utilisé de différentes façons selon le statut énergétique de la cellule. En période anaérobique ou lors d'un exercice intense, la phosphorylation oxydative mitochondriale est inhibée par manque d'oxygène. Ceci provoque une accumulation de NADH qui inhibe le cycle de Krebs. Pour cette raison, le pyruvate est converti en lactate par la lactate déshydrogénase afin de régénérer le NAD^+ .

Le lactate peut être exporté de la cellule ou reconverti en pyruvate au moment où les niveaux d'oxygène sont rétablis (King et Opie, 1998).

Le pyruvate représente un important substrat anaplérotique servant à la synthèse d'alanine et au maintien de certains intermédiaires du cycle de Krebs tels le malate, l'oxaloacétate et l' α -cétoglutarate. Le malate est formé à partir du pyruvate grâce à l'enzyme malique. Bien que peu fréquent dans le cœur, le pyruvate peut être converti en oxaloacétate dans la mitochondrie par la pyruvate carboxylase (Peuhkurinen et Hassinen, 1982). L' α -cétoglutarate est formé par la transamination du pyruvate avec le glutamate (via l'alanine cétoglutarate transaminase) (Thomassen, 1992). Cette réaction permet également la formation d'acide aminé à partir du glucose tel l'alanine.

En période physiologique, le pyruvate est décarboxylé en acétyl CoA par le complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) ce qui induit la synthèse de NADH. Cette réaction irréversible est une étape-clé dans l'oxydation du glucose (Figure 10). La PDH est localisée dans la matrice mitochondriale. Lorsque déphosphorylée par la PDH phosphatase, la PDH est activée (Kerbey et coll., 1976). La PDH phosphatase est activée par une augmentation du Ca^{2+} (McCormack et Denton, 1989) ce qui favorise l'oxydation du pyruvate lors d'une augmentation du travail cardiaque. La PDH kinase (PDK) inhibe la PDH en phosphorylant cette dernière (Kerbey et coll., 1976). La PDK4 est le principal isoforme de PDK exprimé dans le cœur. Son expression est augmentée sous l'effet du jeûne ou du diabète (Bowker-Kinley et coll., 1998; Harris et coll., 2001). La PDK est inhibée par le pyruvate et par une diminution des ratios d'acétyl CoA/CoA et

NADH/NAD⁺ (Kerby et coll., 1976). L'acétyl CoA formé à partir du pyruvate, et par conséquent du glucose, peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs afin de permettre une

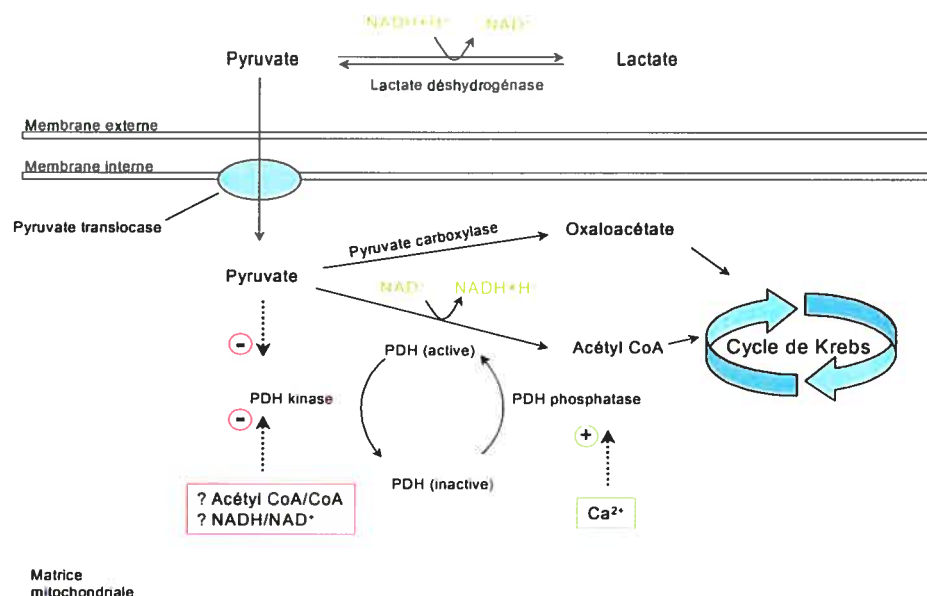


Figure 10 : La régulation du métabolisme du pyruvate. Le pyruvate peut emprunter trois voies distinctes selon le statut énergétique de la cellule. En période anaérobie, il est converti en lactate par la lactate déshydrogénase alors qu'en conditions aérobiques il peut être métabolisé en oxaloacétate, mais surtout en acétyl CoA par la pyruvate carboxylase et la pyruvate déshydrogénase (PDH), respectivement. Les encadrés rouges identifient les composés ayant un effet inhibiteur et les encadrés verts identifient les composés ayant un effet stimulant. Voir la section II. C. 4. pour la discussion. Adapté de Holness, M.J. et coll. *Biochem Soc Trans* 31: 1143-1151, 2003.

plus grande synthèse d'ATP, de NADH et de FADH₂ (voir la section II. A. 5.). Comme pour les acides gras, le NADH et le FADH₂ sont dirigés vers la phosphorylation oxydative mitochondriale afin de produire le maximum d'ATP possible.

D. Les spécificités du métabolisme cardiaque

1. Les interactions entre le métabolisme des acides gras et celui du glucose

Dans le cœur, il existe une étroite relation entre le métabolisme des acides gras et celui du glucose. Quand l'oxydation des acides gras est élevée, on observe une diminution de l'oxydation du glucose et lorsque l'oxydation des acides gras est

faible, celle du glucose augmente. Puisque cette relation glucose-acide gras a été décrite pour la première fois par Philip Randle au cours des années 1960, on lui donne aujourd'hui le nom de cycle de Randle (Randle et coll., 1963). Ainsi, le cycle de Randle ce définit comme la capacité qu'ont ces acides gras à inhiber le transport de glucose, la glycolyse et l'oxydation du pyruvate en augmentant leur propre oxydation (Figure 11).

Le premier mécanisme par lequel les acides gras inhibent l'oxydation du glucose implique la PDH. Une augmentation de l'oxydation des acides gras entraîne une élévation des ratios d'acétyl CoA/CoA et de NADH/NAD⁺. Ceci se traduit par une activation de la PDK. L'activation de la PDK phosphoryle la PDH qui devient alors inactive et bloque la décarboxylation du pyruvate et l'oxydation du glucose par le fait même. Ceci provoque alors par une augmentation de la production de lactate (Rodgers et Vranic, 1998).

L'augmentation de l'oxydation des acides gras élève aussi la production du citrate, le premier intermédiaire du cycle de Krebs. Comme le citrate inhibe à la fois la PFK1 et la PFK2, le glucose-6-phosphate augmente à l'intérieur de la cellule. L'accumulation de glucose-6-phosphate entraîne une diminution de l'activité de l'hexokinase. Cette diminution de l'activité de l'hexokinase génère une accumulation de glucose intracellulaire favorisant alors la baisse du transport de glucose (Rodgers et Vranic, 1998).

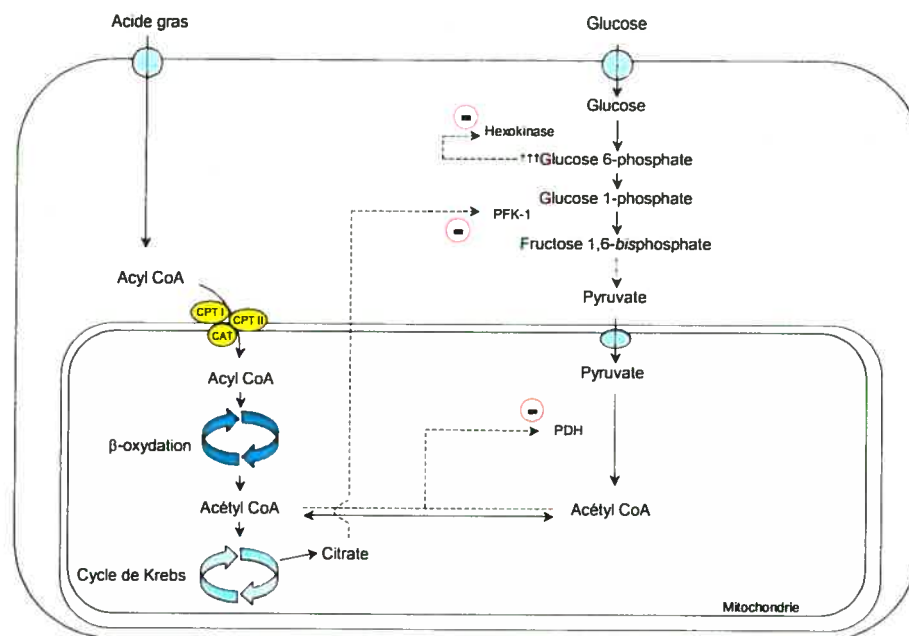


Figure 11 : Le cycle de Randle. Les acides gras régulent le métabolisme du glucose via le cycle de Randle. Voir la section II. D. 1. pour la discussion. Adapté de Jeukendrup, A.E. *Ann N Y Acad Sci* 967 : 217-235, 2002.

Finalement, les acides gras peuvent également jouer sur le métabolisme du glucose en modulant la production hépatique de glucose qui n'est pas un élément du cycle de Randle, mais qui peut avoir des conséquences importantes dans certaines pathologies telles que le diabète. Une concentration élevée et de longue durée d'acides gras circulants entraîne une résistance à l'insuline. Dans ces circonstances, l'insuline ne peut plus exercer de façon appropriée son effet inhibiteur sur la production hépatique de glucose et son effet stimulateur sur la captation de glucose dans les tissus périphériques. Il en résulte une augmentation de la synthèse hépatique de glucose et une diminution de son utilisation entraînant une hyperglycémie prolongée même en présence d'insuline (Baron et coll., 1989; Staehr et coll., 2003).

2. *Les conditions anaérobiques ou de stress métaboliques telles l'hypoxie ou l'ischémie*

Tel que mentionné précédemment, au repos, le cœur métabolise majoritairement les acides gras alors que le glucose contribue plus modestement à la production d'énergie. Par contre, lors de conditions pathologiques telles l'ischémie (Young et coll., 1997) ou l'hypoxie (Abdel-Aleem et coll., 1999), le glucose devient la principale source d'énergie utilisée par le cœur. En conditions anaérobiques, la demande en ATP dépasse rapidement ses réserves. Pour palier au manque d'oxygène essentiel au métabolisme aérobie (phosphorylation oxydative mitochondriale), le cœur accroît son métabolisme anaérobie (glycolyse) (Morgan et coll., 1961). Certaines études ont démontré que l'ATP formée par la glycolyse lors d'un stress métabolique a un rôle beaucoup plus efficace que l'ATP produite par la phosphorylation oxydation mitochondriale (Bricknell et Opie, 1978). Cette différence serait une conséquence de la compartimentation de l'ATP formée (Gudbjarnason et coll., 1970). L'ATP synthétisée en période aérobie servirait à la contraction cardiaque, alors que l'ATP glycolytique servirait au maintien de l'intégrité membranaire (activité électrique transmembranaire et pompes ioniques) ce qui préviendrait l'accumulation des lysophospholipides responsables de la lyse cellulaire (Wilkinson et Robinson, 1974; McDonald et coll., 1971; Fossel et Solomon, 1977). L'augmentation de la glycolyse entraîne une accumulation de produits tels que le lactate. Il est donc crucial pour le cœur d'avoir un équilibre entre la production d'ATP et l'élimination des déchets métaboliques (Apstein et coll., 1983).

III. LA RÉGULATION DU TRANSPORT DE GLUCOSE DANS LE COEUR

Les membranes cellulaires sont imperméables au glucose. Afin de traverser ces membranes, le glucose nécessite l'aide de protéines porteuses ou de transporteurs spécifiques. Il existe deux mécanismes par lesquels le glucose peut passer au travers des membranes : un cotransporteur Na^+ /glucose énergie-dépendant et les transporteurs spécifiques de glucose GLUT. Les cotransporteurs sont localisés principalement dans l'intestin et servent à concentrer le glucose contre son gradient de concentration (Ikeda et coll., 1989). Les GLUTs représentent une grande famille de transporteur composée de 13 membres dont la distribution est tissu-spécifique (Joost et Thorens, 2001). Les GLUTs sont composés de 12 passages transmembranaires qui facilitent le déplacement du glucose (diffusion facilitée) de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et vice-versa en réponse au gradient de glucose de chaque côté de la membrane et à différents agonistes. Dans le cœur, on retrouve plusieurs transporteurs de glucose soit le GLUT1, le GLUT3, le GLUT4, le GLUT11 et le GLUT12 (Mueckler, 1994; Doege et coll., 2001; Grover-McKay et coll., 1999; Wood et Trayhurn, 2003). Les GLUT3, GLUT11 et GLUT12 sont exprimés de façon marginale dans le cœur et leur rôle exact n'a pas encore été élucidé. Le GLUT1 et le GLUT4 représentent approximativement 30 à 40 % et 60 à 70 % des transporteurs de glucose exprimés dans le cœur, respectivement (Fischer et coll., 1997b). Alors que le GLUT1 est principalement responsable du transport de base du glucose puisqu'il est majoritairement localisé à la membrane, le GLUT4 est davantage impliqué dans l'augmentation du transport de glucose en réponse à l'insuline (Stephens et Pilch, 1995), l'exercice (Coven et coll., 2003), l'ischémie (Young et coll., 1997) et l'hypoxie

vers la membrane plasmique des tubules transversaux en réponse à ces différents stimuli (Dombrowski et coll., 1996).

A. Le transport de base

Dans le cœur, comme dans plusieurs autres tissus, le GLUT1 est responsable du transport de base de glucose. Le GLUT1 a une constante de cinétique 26,2 mM ce qui lui permet d'avoir une haute capacité pour le glucose même si son affinité pour ce dernier est 1-2 mM (Nishimura et coll., 1993; Maher et coll., 1996). Les deux principaux facteurs qui influencent le transport de base du glucose dans le cœur sont la concentration extracellulaire du glucose et le niveau d'expression de GLUT1. Une élévation de la concentration plasmatique du glucose entraîne une augmentation du transport de glucose puisque le glucose traverse la membrane plasmique via le GLUT1 selon son gradient de concentration. La quantité de GLUT1 exprimée à la membrane peut également influencer le transport de base du glucose. Dans le cœur, l'expression de GLUT1 est hautement régulée par le statut énergétique et par les niveaux d'insuline. Ainsi, le jeûne entraîne une diminution de GLUT1, alors qu'une hyperinsulinémie provoque une augmentation de son expression (Laybutt et coll., 1997). Il existe aussi des conditions pathologiques où l'expression de GLUT1 peut être altérée comme dans l'hypertrophie cardiaque où l'expression de GLUT1 est augmentée (Montessuit et Thorburn, 1999).

Bien que la majorité des GLUT1 soient exprimés à la membrane (80 %), on en retrouve également une certaine quantité (20 %) dans des vésicules intracellulaires de GLUT4 pouvant être transloquées à la membrane en réponse à l'insuline (Fischer et coll., 1997b; Kraegen et coll., 1993) ou l'ischémie (Young et coll., 1997). La présence de différents pools vésiculaires contenant à la fois du GLUT1 et du GLUT4 représente une

caractéristique spécifique au muscle cardiaque puisque dans le muscle squelettique ces vésicules sont composées exclusivement de GLUT4 (Becker et coll., 2001; Kandror et coll., 1995). Pour simplifier la nomenclature, ces vésicules du muscle cardiaque contenant majoritairement du GLUT4, mais aussi un peu de GLUT1 seront nommées vésicules de GLUT4.

B. Le transport de glucose en réponse à l'insuline

Tel que mentionné précédemment, l'insuline peut activer trois voies de signalisation distinctes (Figure 2). Alors que l'activation de la voie de Ras-MEK-ERK1/2 entraîne une réponse mitogénique caractérisée par la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (voir section I. C.), la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase-dépendante et la voie APS/CAP régulent le transport de glucose en favorisant la translocation des vésicules de GLUT4 en réponse à l'insuline. Ces deux voies de signalisation activent des enzymes qui leur sont propres.

1. La voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase-dépendante

La stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline nécessite l'activation d'une voie de signalisation spécifique dont le résultat entraîne la translocation, du cytoplasme vers la membrane plasmatique, des vésicules de GLUT4 (Becker et coll., 2001) (Figure 12).

La première étape dans le processus de stimulation du transport de glucose par l'insuline est la liaison de cette hormone au récepteur à l'insuline. Le récepteur à l'insuline est un tétramère composé de deux sous-unités α (extracellulaires) liées par des ponts disulfure à deux sous-unités β (transmembranaires). C'est la sous-unité α qui lie

l'insuline. Il existe deux isoformes (A et B) du récepteur à l'insuline. Dans le cœur, l'isoforme A, à haute affinité, est prédominante et représente plus de 95 % des récepteurs à l'insuline (Mosthaf et coll., 1990). Le récepteur à l'insuline est une enzyme allostérique transmembraire dont l'activité tyrosine kinase de la sous-unité β est inhibée par la sous-unité α à l'état de base. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne un changement de conformation qui provoque le relâchement de l'action inhibitrice de la

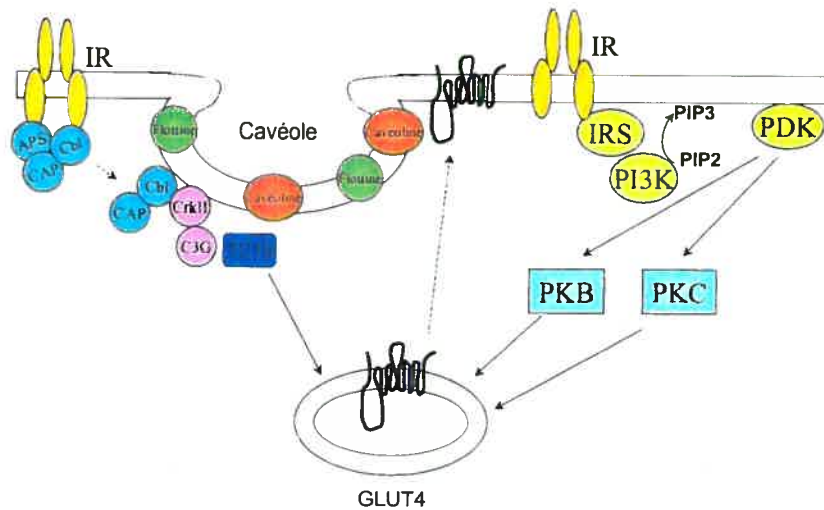


Figure 12 : Les deux voies de signalisation responsables de la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline. L'insuline active une voie de signalisation PI3-K dépendante et la voie de signalisation APS/CAP qui est PI3-K indépendante. Voir les sections III. B. 1. et III. B. 2. pour la discussion. IR, récepteur à l'insuline.

sous-unité α . Ainsi, l'insuline induit une autophosphorylation des résidus tyrosine de la sous-unité β de son récepteur (Cheatham et Kahn, 1995; Lee et Pilch, 1994). La phosphorylation de six à sept résidus tyrosine est essentielle à une bonne activation du récepteur.

La famille des protéines IRS (insulin-receptor substrate) est constituée de quatre membres dont l'IRS-1 qui est le principal substrat du récepteur à l'insuline.

L'IRS-1 possède un domaine PH (pleckstrin homology) et un domaine de liaison aux phospho-tyrosines SH2 (*src* homology 2). Ces deux domaines sont importants pour le recrutement de l'IRS-1 vers la membrane et la liaison de l'IRS-1 à la sous-unité β du récepteur à l'insuline (Sesti et coll., 2001). Une fois activée par phosphorylation des résidus tyrosine, l'IRS-1 sert de protéine d'ancrage à plusieurs molécules contenant un domaine SH2. La présence d'un domaine SH2 est essentielle afin de permettre la liaison de ces molécules aux différents sites phosphorylés en tyrosine. L'IRS-2 est également exprimé dans le cœur, et pourrait jouer un rôle dans l'action de l'insuline, mais son rôle exact est encore mal défini (Velloso et coll., 1998).

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) de classe 1A est une protéine située en aval de l'IRS-1. Cette protéine est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice p85 et la sous-unité catalytique p110. Il existe deux isoformes de p85 (α et β) qui sont exprimées dans le cœur. Les formes tronquées de p85 α (p55 α et p50 α) sont également présentes dans le cœur alors que la forme tronquée p55 γ y est absente (Oudit et coll., 2004). La p85 possède les domaines SH2 nécessaires à la fixation de la PI3K aux sites phosphorylés en tyrosine de l'IRS-1. La p85 agit donc comme adaptateur et permet la liaison de l'IRS-1 à la p110 (Shepherd, 2005). Il existe trois isoformes de p110 (α , β , δ) pouvant se lier à la p85. Dans le cœur, la p110 β n'est retrouvée qu'en très faible quantité et la p110 δ est inexistante. C'est la p110 α qui est la plus abondante (Hu et coll., 1993). L'activation de la PI3K permet la synthèse de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate. En utilisant différentes approches expérimentales, il a été démontré que la PI3K joue un rôle essentiel

dans la stimulation du transport de glucose par l'insuline. Les données démontrent que l'inhibition de la PI3K avec un agent pharmacologique spécifique (Huisamen et coll., 2001) ou un adénovirus dominant-négatif (DN-) (Quon et coll., 1995), bloque complètement la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline. De plus, la surexpression de la PI3K constitutivement active est suffisante pour mimer l'effet stimulateur de l'insuline sur le transport de glucose (Olson et coll., 1995). Ainsi, la PI3K est une enzyme dont le rôle est bien établi dans le transport de glucose en réponse à l'insuline.

Le PIP3 synthétisé par la PI3K agit comme second messenger et orchestre l'activation de plusieurs molécules de signalisation en interagissant avec les domaines PH de ces enzymes telles la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). La PDK1 est l'enzyme responsable de l'activation de deux molécules impliquées dans la translocation des vésicules de GLUT4 : la protéine kinase B (PKB) aussi nommée Akt (Tanti et coll., 1997; Welsh et coll., 2005) et les PKC atypiques (Farese, 2002). La PDK1 active la PKB en phosphorylant les résidus sérine⁴⁷³ et thréonine³⁰⁸ (Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). Il existe trois isoformes de la PKB (α , β et γ). Dans le cœur, on retrouve principalement les isoformes α et β (Dorn et Force, 2005). La PKB α joue un rôle déterminant dans le développement et la différenciation cellulaire puisqu'il a été démontré que les souris « knockout » (KO) pour la PKB α ont un haut taux de mortalité ainsi qu'une diminution du poids corporel à la naissance et une diminution de la vascularisation due à une hypotrophie placentaire (Cho et coll., 2001b; Yang et coll., 2004). Chez la souris KO pour la PKB β , les complications liées à

l'absence de cette enzyme sont totalement différentes de celles observées chez la souris KO pour la PKB α . Cho et coll. ont démontré que la souris KO pour la PKB β ont des caractéristiques semblables à celles rencontrées chez les patients atteints du syndrome métabolique. Ainsi, ces souris ont une augmentation de la glycémie à jeun, une résistance périphérique à l'insuline, une augmentation de la production hépatique de glucose et un accroissement de la taille des îlots du pancréas responsables de la sécrétion de l'insuline (Cho et coll., 2001a). Il a été rapporté que la surexpression de la PKB β , mais pas celle de la PKB α , dans des fibroblastes KO pour la PKB β restaure la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline (Bae et coll., 2003). Ainsi, la PKB β exerce un rôle différent de la PKB α et est impliquée dans la régulation du métabolisme du glucose et dans le transport de glucose en réponse à l'insuline (Cho et coll., 2001a; Garofalo et coll., 2003). Contrairement aux souris KO pour les PKB α et β , la souris KO pour la PKB γ ne présente aucun retard de croissance et possède un métabolisme de glucose normal (Tschopp et coll., 2005). Cette isoforme de la PKB joue plutôt un rôle crucial dans le développement du cerveau post-natal (Tschopp et coll., 2005). Bien que des études aient démontré que l'activation de la PKB soit PI3K-dépendante (Morisco et coll., 2005; Zhang et coll., 2003), plusieurs données suggèrent l'existence d'une dissociation entre l'activité de la PI3K et celle de la PKB (Tremblay et coll., 2005) dans différents modèles de résistance à l'insuline (Kim et coll., 1999; Kruszynska et coll., 2002; Bandyopadhyay et coll., 2005). Il existe trois classes de PKC : les classiques qui sont activées par le DAG et Ca^{+2} -dépendante, les nouvelles qui sont activées par le DAG, mais sont Ca^{+2} -indépendantes et les atypiques qui ne sont pas

activées par le DAG ou le Ca^{+2} (Becker et Hannun, 2005). L'insuline entraîne l'activation de PKC atypiques (ζ et λ/ι) de façon PDK1-dépendante (Egawa et coll., 2002; Bandyopadhyay et coll., 1999). Bien que l'implication des PKC ζ et λ dans la stimulation du transport de glucose par l'insuline ait été démontrée à plusieurs reprises dans le tissu adipeux et le muscle squelettique, leur rôle demeure controversé dans le cœur (Russ et Eckel, 1995).

2. La voie de signalisation APS/CAP

Au cours des dernières années, il a été proposé qu'il existait une autre voie de signalisation PI3K-indépendante activée par l'insuline : la voie APS/CAP (*adaptor protein containing PH and SH2 domains/Cbl-associated protein*) (Figure 12). Les enzymes de cette voie sont compartimentées dans des microdomaines membranaires très spécialisés nommés cavéoles. Les cavéoles sont des invaginations d'amas lipidiques composées de cavéoline et de flotilline (Galbiati et coll., 2001). L'activation de cette voie permet le recrutement et la translocation des vésicules de GLUT4 à des endroits spécifiques de la membrane plasmique (Kanzaki et Pessin, 2003). La stimulation de la voie APS/CAP par l'insuline entraîne la phosphorylation de Cbl par le récepteur à l'insuline et le recrutement de Cbl vers les cavéoles (Baumann et coll., 2000). Ce processus d'activation de Cbl nécessite la contribution de deux protéines : APS et CAP. Tout d'abord, Cbl et CAP forment un hétérodimère qui interagit avec l'APS afin de pouvoir être recruté par le récepteur à l'insuline. C'est l'APS qui facilite la phosphorylation et l'activation de Cbl par le récepteur à l'insuline (Ahmed et coll., 2000; Liu et coll., 2002). Une fois Cbl activé, le complexe Cbl-CAP est dirigé vers les cavéoles

où il recrute la protéine adaptatrice CrkII. CrkII forme alors un complexe hétérodimérique avec C3G, ce qui active TC10, une GTPase de la famille des protéines Rho localisée dans les cavéoles. L'activation de TC10 est essentielle à la stimulation du transport de glucose et la translocation de GLUT4 en réponse à l'insuline, mais aussi en réponse au choc osmotique dans les cellules adipeuses (Watson et coll., 2003; Gual et coll., 2002). TC10 favorise par la suite la formation d'un complexe composé des protéines Exo70, Sec6 et Sec8 qui permet l'attachement et l'encrage des vésicules de GLUT4 à la membrane plasmique afin de permettre l'exocytose des vésicules de GLUT4 (Inoue et coll., 2003; Lipschutz et Mostov, 2002). Bien que la voie APS/CAP et tous les mécanismes de translocation vésiculaire décrits aient surtout été étudiés dans les cellules adipeuses, l'implication de cette voie dans la translocation de GLUT4 semble plus controversée dans le muscle squelettique (JeBailey et coll., 2004). Par contre, il reste possible que de tels mécanismes modulent également la translocation des vésicules de GLUT4 dans le cœur puisque cette voie de signalisation est également activée par l'insuline dans le muscle cardiaque (Gupte et Mora, 2006).

3. *La modulation de l'activité intrinsèque des transporteurs de glucose*

La stimulation de la translocation des vésicules de GLUT4 représente le mécanisme principal par lequel le transport de glucose est augmenté dans les cellules. Par contre, il a récemment été proposé que le transport de glucose peut également être régulé via la modulation de l'activité intrinsèque des GLUTs. Il a été démontré qu'une stimulation β -adrénergique peut diminuer le transport de glucose sans modifier le contenu plasmique en GLUT, mais plutôt en inhibant l'activité intrinsèque de ces

transporteurs en favorisant une phosphorylation en sérine de ces derniers (Kuroda et coll., 1987; Lawrence, Jr. et coll., 1990). Il a également été proposé que l'insuline peut augmenter l'activité intrinsèque des GLUT4 via la p38MAPK (Somwar et coll., 2000; Somwar et coll., 2001). Par contre, l'implication de la p38MAPK dans la régulation de l'activité intrinsèque de GLUT4 en réponse à l'insuline pourrait être tissu-spécifique puisque des résultats contradictoires ont été obtenus dans certains types cellulaires (Antonescu et coll., 2005). Des études plus complètes restent toujours à être réalisées afin de déterminer le rôle exact de la p38MAPK dans la modulation de l'activité intrinsèque des GLUTs et dans le transport de glucose en réponse à l'insuline dans le muscle cardiaque.

4. *La cessation du transport de glucose*

L'arrêt de la stimulation du transport de glucose est également un phénomène bien contrôlé. La diminution ou le rétablissement du transport de glucose vers un niveau basal se traduit par l'endocytose des GLUT4. Dans le cœur, l'internalisation de GLUT4 se fait par invagination de la membrane plasmique tapissée de clathrine (Slot et coll., 1991). Une fois l'invagination réalisée, la dynamine encercle la vésicule en formation afin de permettre la scission de cette dernière avec la membrane (Muhlberg et coll., 1997). L'arrêt de la stimulation du transport de glucose par l'insuline se fait principalement par deux mécanismes : la déphosphorylation du récepteur à l'insuline et de ses substrats et la phosphorylation des résidus sérine du récepteur et de l'IRS-1. Les protéines tyrosine phosphatases sont responsables de la déphosphorylation du récepteur à l'insuline. La PTP1B et SHP-1 représentent deux de ces phosphatases qui sont activées par l'insuline (Dadke et coll., 2001) (Dubois et coll., 2006). L'activation de ces

1987; Lawrence, Jr. et coll., 1990). Il a également été proposé que l'insuline peut augmenter l'activité intrinsèque des GLUT4 via la p38MAPK (Somwar et coll., 2002; Somwar et coll., 2001). Par contre, l'implication de la p38MAPK dans la régulation de l'activité intrinsèque de GLUT4 en réponse à l'insuline pourrait être tissu-spécifique puisque des résultats contradictoires ont été obtenus dans certains types cellulaires (Antonescu et coll., 2005). Des études plus complètes restent toujours à être réalisées afin de déterminer le rôle exact de la p38MAPK dans la modulation de l'activité intrinsèque des GLUTs et dans le transport de glucose en réponse à l'insuline dans le muscle cardiaque.

4. *La cessation du transport de glucose*

L'arrêt de la stimulation du transport de glucose est également un phénomène bien contrôlé. La diminution ou le rétablissement du transport de glucose vers un niveau basal se traduit par l'endocytose des GLUT4. Dans le cœur, l'internalisation de GLUT4 se fait par invagination de la membrane plasmique tapissée de clathrine (Slot et coll., 1991). Une fois l'invagination réalisée, la dynamine encercle la vésicule en formation afin de permettre la scission de cette dernière avec la membrane (Muhlberg et coll., 1997). L'arrêt de la stimulation du transport de glucose par l'insuline se fait principalement par deux mécanismes : la déphosphorylation du récepteur à l'insuline et de ses substrats et la phosphorylation des résidus sérine du récepteur et de l'IRS-1. Les protéines tyrosine phosphatases sont responsables de la déphosphorylation du récepteur à l'insuline. La PTP1B représente une de ces phosphatases qui est activée par l'insuline (Dadke et coll., 2001). L'activation de la PTP1B génère une rétro-action négative sur l'activation du récepteur à l'insuline. Ce phénomène permet de contrôler l'action de

phosphatases génèrent une rétro-action négative sur l'activation du récepteur à l'insuline. Ce phénomène permet de contrôler l'action de l'insuline. Un autre mécanisme provoque aussi l'inhibition du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1, mais cette fois en augmentant la phosphorylation de leurs résidus sérine (Kolter et coll., 1997). Il a été démontré qu'une phosphorylation en sérine du récepteur à l'insuline inhibe l'activation de l'IRS-1 ainsi que le transport de glucose en réponse à l'insuline (White, 2002). Plusieurs enzymes sérine/thréonine kinase peuvent agir sur le récepteur à l'insuline et l'IRS-1 afin de les désactiver telles la PKB (Li et coll., 1999), la PI3K (Freund et coll., 1995), la PKC ζ (Ravichandran et coll., 2001), la GKS-3 (*glycogen synthase kinase-3*) (Eldar-Finkelman et Krebs, 1997), la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*)/p70 S6 kinase (Khamzina et coll., 2005) et l'ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) (De Fea et Roth, 1997). L'activation de toutes ces enzymes est PI3K-dépendante sauf pour la voie mTOR/p70 S6 kinase qui peut aussi être modulée par la présence d'acides aminés (Tremblay et Marette, 2001) ou une diète riche en gras (Khamzina et coll., 2005) et pour l'ERK1/2 qui est PI3K-indépendant. La stimulation de ERK1/2 résulte de l'activation du complexe Ras. L'insuline favorise l'activation de ce complexe en activant Grb2 via l'IRS-1 ou via Shc phosphorylé sur la tyrosine par le récepteur à l'insuline (Brownsey et coll., 1997). Finalement, l'activation du complexe Ras provoque successivement la phosphorylation en sérine/thréonine des enzymes Raf, MEK et ERK1/2. Les mécanismes de contre-régulation de l'insuline sont généralement reconnus et acceptés, mais la démonstration du rôle d'une telle cascade de signalisation n'a pas été démontrée de façon formelle dans le muscle cardiaque (Figure 2).

C. Le transport de glucose en réponse au stress métabolique

1. *Les particularités du stress métabolique*

Bien que le cœur utilise préférentiellement les acides gras afin de combler ses besoins énergétiques, il existe certaines conditions physiopathologiques ou stress métabolique (ischémie ou hypoxie) où le cœur utilise d'autres substrats. Ainsi, en période de stress métabolique, le glucose devient la principale source d'énergie employée par le cœur. Ce changement de substrat est dû au manque d'oxygène qui rend impossible une synthèse suffisante d'ATP au niveau mitochondrial pour combler ses besoins énergétiques. Ainsi, le cœur favorise la production d'ATP via la glycolyse qui ne nécessite pas d'oxygène. Comme le glucose devient un substrat essentiel dans ces conditions, le cœur doit donc augmenter sa captation de glucose afin de subvenir à ses besoins. Dans de telles circonstances, l'augmentation du transport de glucose se fait grâce à l'augmentation de la translocation des vésicules de GLUT4 vers la membrane plasmique (Young et coll., 1997; Zierath et coll., 1998). Par contre, il existe deux différences importantes entre la stimulation du transport de glucose par un stress métabolique et par l'insuline. Tout d'abord, l'insuline et le stress métabolique recrutent des pools vésiculaires de GLUT qui sont différents (Becker et coll., 2001). Cette particularité est également observée dans le muscle squelettique entre l'insuline et l'exercice (Coderre et coll., 1995). Contrairement à l'insuline où les vésicules mobilisées à la membrane contiennent très peu de GLUT1, le stress métabolique entraîne la translocation de vésicules composées à la fois de GLUT1 et de GLUT4 (Young et coll., 1997). En réponse à l'insuline, l'élévation des GLUT4 membranaires résulte d'une augmentation de l'exocytose des vésicules de GLUT4. Par contre, il a été suggéré qu'une

diminution de l'endocytose des GLUT4 serait davantage responsable de l'augmentation des GLUT4 membranaires observée lors d'un stress métabolique dans le cœur (Yang et Holman, 2004). La deuxième différence entre l'insuline et le stress métabolique est au niveau de la voie de signalisation activée par les deux stimuli. L'insuline et le stress métabolique ont des effets additifs sur le transport de glucose et la translocation des vésicules de GLUT4 (Pelletier et coll., 2005; Sun et coll., 1994), ce qui suggère que les deux stimuli activent des voies de signalisation distinctes. Alors que l'insuline active une voie de signalisation PI3K-dépendante essentielle à la stimulation du transport de glucose, le stress métabolique stimule le transport de glucose de façon PI3K-indépendante (Figure 13) (Pelletier et coll., 2005; Egert et coll., 1999; Russell III et coll., 1999). Pour augmenter le transport de glucose dans le muscle squelettique, la contraction

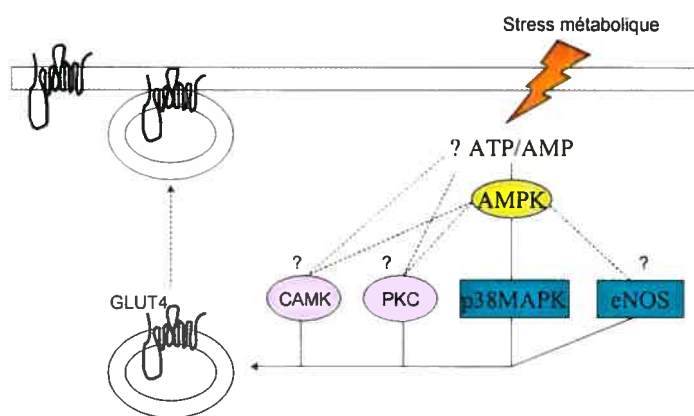


Figure 13 : Les enzymes responsables de la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique. Voir les sections III. C. 2. pour la discussion.

et l'hypoxie stimulent également une voie de signalisation PI3K-indépendante, similaire à celle activée par un stress métabolique dans le cœur (Lund et coll., 1995; Mu et coll., 2001). Par contre, il a été démontré que la contraction cardiaque augmente le transport de glucose via l'activation d'une voie de signalisation PI3K-dépendante (Till et coll., 1997). Ainsi, il semble que la contraction cardiaque active une voie de signalisation

différente de celle stimulée par le stress métabolique pour augmenter le transport de glucose dans le muscle cardiaque.

2. *L'activation d'une voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase-indépendante*

Au cours des dernières années, plusieurs enzymes ont été identifiées comme étant impliquées dans la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique. L'enzyme la plus importante est sans aucun doute l'AMPK. L'AMPK est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ (Carling, 2004). Dans le cœur, il existe deux isoformes de la sous-unité α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) (Stapleton et coll., 1996). L'AMPK est une sérine/thréonine kinase qui agit comme senseur énergétique. L'AMPK est activé par l'AMPKK qui phosphoryle le résidu thréonine¹⁷² ou par une augmentation du ratio de l'AMP/ATP qui active l'enzyme de façon allostérique (Hallows, 2005). L'AMPK est inhibé par une diminution du ratio de l'AMP/ATP et par le NADH (Rafaeloff-Phail et coll., 2004). Comme mentionné précédemment, la contraction cardiaque constitue un stimulus particulier au niveau cardiaque puisqu'il possède des spécificités qui le distingue du stress métabolique. Cela se reflète également au niveau de l'implication de l'AMPK dans la stimulation du transport de glucose en réponse à la contraction cardiaque. Il a été démontré que la contraction cardiaque, contrairement au stress métabolique, n'active pas l'AMPK dans le cœur (Beauloye et coll., 2002), ce qui laisse suggérer que cette enzyme n'est pas impliquée dans l'augmentation du transport de glucose en réponse à la contraction dans le muscle cardiaque. Par contre, cette enzyme est impliquée dans la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique dans le cœur. Il a été démontré que

la suppression de l'activation de l'AMPK, en surexprimant un AMPK ayant une activité kinase altérée sur la sous-unité $\alpha 1$, entraîne une inhibition complète de la stimulation du transport de glucose en réponse à une ischémie partielle (Russell III et coll., 2004). L'utilisation d'un adénovirus DN-AMPK a confirmé le rôle essentiel de cette enzyme dans la stimulation du transport de glucose en réponse à une hypoxie chimique (Pelletier et coll., 2005) et à une ischémie complète (Xing et coll., 2003). Toutefois, dans ces deux conditions, l'inhibition du transport de glucose n'est que partielle. Cela suggère qu'une autre voie de signalisation pourrait participer à ce processus dans le cœur. Ainsi, deux voies de signalisation, une AMPK-dépendante et l'autre AMPK-indépendante, seraient activées en réponse à une hypoxie et une ischémie complète, afin d'augmenter de façon maximale le transport de glucose dans le cœur. La contribution de l'AMPK dans la stimulation du transport de glucose pourrait donc dépendre de la nature et de la sévérité du stimulus détecté dans le muscle cardiaque.

Il est clair que le stress métabolique active une voie de signalisation AMPK-dépendante afin de stimuler le transport de glucose. Par contre, les enzymes localisées en aval de l'AMPK sont encore bien peu connues. Récemment, la p38MAPK a été identifiée comme étant une enzyme impliquée dans le transport de glucose en réponse au stress métabolique et dont l'activation est AMPK-dépendante (Lemieux et coll., 2003; Li et coll., 2005; Pelletier et coll., 2005). La p38MAPK semble être activée via la formation du complexe AMPK/TAB1 (Li et coll., 2005). Une étude a démontré que l'activation de la p38MAPK dans le muscle cardiaque ne serait pas dépendante de l'activation de l'AMPK en réponse à l'exercice physique (Musi et coll., 2005). Cela suggère, une fois

de plus, que la contraction cardiaque stimule le transport de glucose via l'activation d'une voie de signalisation distincte de celle activée lors d'un stress métabolique au niveau du cœur. Le rôle exact de la p38MAPK dans le transport de glucose est controversé. Il a été démontré que l'inhibition de la p38MAPK en réponse au stress métabolique diminue le transport de glucose sans affecter la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique dans les cellules adipeuses (Yamaguchi et coll., 2005). Ainsi, la p38MAPK serait impliquée dans la régulation de l'activité intrinsèque des GLUTs situés à la membrane plasmique plutôt que dans le mécanisme de translocation de ces transporteurs. Dans le cœur, il a été démontré que l'inhibition de la p38MAPK altère la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique (Li et coll., 2005). Ainsi, la p38MAPK pourrait être impliquée dans le processus de translocation des GLUTs dans le cœur, mais d'autres études devront confirmer le rôle de la p38MAPK dans le transport de glucose en réponse au stress métabolique dans le cœur. Ainsi, la divergence des résultats sur le rôle de la p38MAPK dans le transport de glucose suggère que cette enzyme pourrait exercer un effet tissu-spécifique.

3. *Les autres enzymes candidates possibles*

Le eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) permet la synthèse du NO et est activé par l'AMPK dans le cœur (Chen et coll., 1999). Certaines études suggèrent que l'activation de eNOS est impliquée dans la translocation de GLUT4 de façon AMPK-dépendante (Li et coll., 2004), alors que d'autres démontrent que le NO diminue ce processus en réponse à l'ischémie cardiaque (Lei et coll., 2005). Ainsi, l'implication de eNOS dans la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique est encore incertaine.

D'autres enzymes pourraient également contribuer à l'augmentation du transport de glucose en réponse au stress métabolique. Les PKC dites classiques sont activées par le stress métabolique et leur implication dans le transport de glucose semble très probable (Khayat et coll., 1998; Agnetti et coll., 2005). La CAMK (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase) représente une enzyme qui pourrait, elle aussi, être impliquée dans la stimulation du transport de glucose lors du stress métabolique (Wright et coll., 2005). Pour l'instant, très peu d'études ont été réalisées dans le cœur sur la PKC et la CAMK et nous ne savons pas si ces enzymes sont activées de façon AMPK-dépendante ou -indépendante.

D. Régulation du transport de glucose dans le cœur

1. Les agonistes

Il existe différents facteurs pouvant modifier le métabolisme du glucose dans le cœur. Parmi les facteurs qui favorisent un meilleur transport du glucose dans le cœur on retrouve l'entraînement physique. Il a été démontré que l'exercice peut induire une augmentation de l'expression de GLUT4 qui se traduit par une élévation potentielle du métabolisme glycolytique dans le cœur (Chiu et coll., 2005; Hashimoto et coll., 2004). De plus, il a été démontré que l'exercice entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans le cœur. L'exercice provoque une diminution du contenu en glycogène retrouvé dans le cœur. La diminution du contenu en glycogène ainsi que l'exercice physique sont associés à une augmentation de l'activation de la PKB (Lajoie et coll., 2004b; Lajoie et coll., 2004a). La diminution du contenu en glycogène et la suractivation de la PKB pourraient être responsables de l'augmentation de la sensibilité à l'insuline observée après un entraînement physique (Richter et coll., 2001; Katome et coll., 2003).

Le préconditionnement est un phénomène d'adaptation qui permet au cœur d'être plus résistant lors de périodes prolongées d'hypoxie ou d'ischémie. Le préconditionnement est généré en exposant le cœur à plusieurs courtes périodes successives d'ischémie ou d'hypoxie non-léthales. Comme l'exercice, le préconditionnement induit une augmentation de l'expression de GLUT1 et GLUT4 (Jones et Bergeron, 2001; Nishino et coll., 2004) et une diminution du contenu en glycogène dans le cœur (McNulty et coll., 1996). Ces changements permettent d'améliorer le transport de glucose en réponse à l'insuline ou à un stress métabolique et sont associés à une hausse de la sensibilité à l'insuline telle que mentionnée précédemment.

Finalement, il existe des inhibiteurs des protéines tyrosines phosphatases qui miment les effets biologiques de l'insuline (Jackson et coll., 1988). Parmi ces inhibiteurs, on retrouve les composés de vanadate présents dans la plupart des organismes vivants (Mohammad et coll., 2002; Sekar et coll., 1996). En plus d'améliorer la fonction cardiaque, il a été démontré que l'administration de ces composés diminue l'hyperglycémie et améliore l'action de l'insuline chez les rats diabétiques (Heyliger et coll., 1985; Yuen et coll., 1993; Noda et coll., 2003). Les protéines tyrosines phosphatases sont responsables de la contre-régulation de l'action de l'insuline. Ainsi, l'inhibition de ces enzymes par les composés de vanadate entraîne une prolongation de l'effet de l'insuline. Bien que l'inhibition des protéines tyrosines phosphatases représente le principal mécanisme d'action des composés de vanadium, ces derniers exercent également leur effet via l'activation d'autres processus. Il a été démontré que le vanadate stimule la phosphorylation en tyrosine du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 favorisant

ainsi l'augmentation du transport de glucose (Ge et coll., 1999; Tardif et coll., 2003). De plus, l'activation de la PKB et du transport de glucose en réponse au vanadate sont PI3K-dépendantes dans les cardiocytes (Tardif et coll., 2003; Donthi et coll., 2000). La restauration des niveaux d'expression de GLUT4 chez les rats diabétiques en réponse à un traitement au vanadate représente un autre mécanisme d'action pouvant expliquer l'effet bénéfique de ce composé sur l'action de l'insuline (Kopp et coll., 1997). Le vanadate exerce également un effet antioxydant pouvant avoir un effet positif sur le transport de glucose (Matsubara et coll., 1995). Ainsi, le vanadate représente un autre facteur pouvant améliorer le transport de glucose dans le cœur.

2. *Les inhibiteurs*

Bien que certaines conditions physiologiques ou agents chimiques permettent d'améliorer le transport de glucose au niveau cardiaque, il existe également des facteurs qui contribuent à diminuer ce processus. Tout d'abord, une diminution de l'expression des transporteurs GLUT4 peut altérer de façon significative la captation de glucose en réponse à différents stimuli. Le jeûne prolongé ainsi que le diabète (type 1 et 2) représentent deux situations physiologiques et physiopathologiques où les niveaux de GLUT1 et de GLUT4 sont diminués (Van der Lee et coll., 2001; Sugden et Holness, 1993; Camps et coll., 1992; Heled et coll., 2005). Les mécanismes de régulation qui gèrent l'expression des GLUTs dans le cœur ne sont pas connus, mais il a été proposé que l'absence d'insuline durant le jeûne et dans le diabète pourrait influencer l'expression génique de ces transporteurs (Zorzano et coll., 1997).

Les acides gras peuvent également exercer un effet délétère sur le transport de glucose en réponse à l'insuline. Lorsqu'en grande quantité dans le sang, les acides gras

peuvent induire une résistance à l'insuline. L'excès d'acides gras est dirigé entre autre vers le cœur où il est entreposé sous forme de triglycérides (Shah et Shannon, 2003). Bien que les acides gras peuvent inhiber l'utilisation du glucose via le cycle de Randle, ils peuvent aussi altérer le métabolisme du glucose en induisant une résistance à l'insuline via l'activation de trois mécanismes distincts. Tout d'abord, les acides gras peuvent activer des PKC nouvelles (PKC θ) qui stimulent l'I κ B kinase (IKK), une sérine kinase (Russell, 2004). L'IKK peut ensuite phosphoryler l'IRS-1 sur des résidus sérines ce qui inactive l'IRS-1 et empêche le recrutement de la PI3K pour la translocation des vésicules de GLUT4 en réponse à l'insuline (Gao et coll., 2002). L'IKK peut également induire la résistance à l'insuline via la transcription NF- κ B-dépendante de différents gènes tels SOCS (Russell, 2004). Deuxièmement, les acides gras peuvent activer certaines phosphatases telles la PTEN (*phosphatase and tensin homologue detected on chromosome 10*). La PTEN possède la capacité de déphosphoryler PIP3 et, par conséquent, réduit l'activation de la PDK1 ce qui inhibe la PKB qui est impliquée dans la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline (Maehama et Dixon, 1998). Finalement, les acides gras peuvent altérer la voie de signalisation de l'insuline via la génération de sphingolipides tels les céramides. Les céramides inhibent la PKB en bloquant sa translocation et en favorisant sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (Stratford et coll., 2004).

Le stress oxydatif représente un déséquilibre entre la production des ROS et le système de défense antioxydant. La formation des ROS se produit essentiellement au niveau de la mitochondrie (Figure 14). Dans la nature, les molécules d'oxygène peuvent

produire des radicaux libres tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) grâce à la xanthine et/ou la NADH oxydase. La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à partir de deux molécules de $O_2^{\cdot-}$. Le H_2O_2 peut être métabolisé en radical d'hydroxyl ($\cdot OH$) ou en eau par la catalase ou la

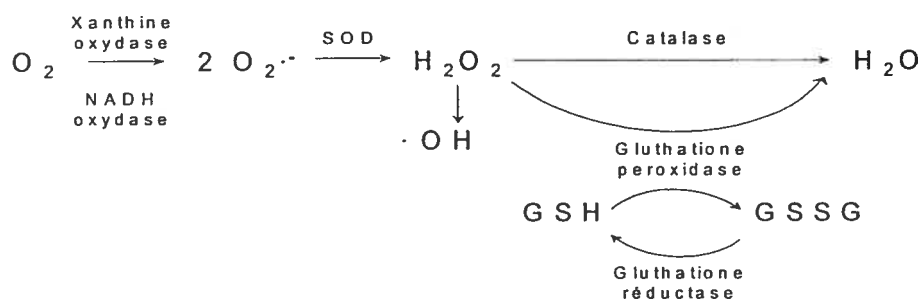


Figure 14 : La régulation de la production et de la dégradation des ROS.
Voir les sections III. D. 2. pour la discussion.

glutathione. La surproduction de ROS peut être stimulée par l'aldostérone (Rude et coll., 2005), l'inflammation (Morena et coll., 2005), la dyslipidémie (Xu et coll., 2005) et l'hyperglycémie (Niedowicz et Daleke, 2005). Bien que la formation des ROS soit essentielle au bon fonctionnement de l'organisme, une surproduction peut avoir des effets délétères. Le stress oxydatif favorise le développement de l'athérosclérose en diminuant la fonction endothéliale tel que mentionné dans la section I. B. De plus, l'accumulation de ROS diminue la sécrétion d'insuline (Zraika et coll., 2006; Poitout et Robertson, 2002) et réduit la sensibilité des tissus périphériques à cette hormone (Evans et coll., 2005; Bloch-Damti et Bashan, 2005; Houstis et coll., 2006). Ainsi, le stress oxydatif pourrait jouer un rôle important dans l'étiologie du diabète. Par contre, les mécanismes activés par les ROS pour induire la résistance à l'insuline sont encore bien peu connus. Il a été suggéré que le stress oxydatif pourrait activer la voie de signalisation $IKK-\beta /NF-\kappa B$

(*nuclear factor kappa B*). L'activation de NF- κ B inhiberait la stimulation de l'IRS-1 par l'insuline et, ainsi, bloquerait l'augmentation du transport de glucose en réponse à cette hormone (Itani et coll., 2002; Ogihara et coll., 2004; Ogihara et coll., 2004). Il a été démontré que le stress oxydatif active également certaines MAPK telles ERK 1/2 (Gaitanaki et coll., 2003) et que l'activation de base de cette enzyme est augmentée chez les patients diabétiques (Carlson et coll., 2003). Comme mentionné dans la section III. B. 4., ERK 1/2 induit une rétroaction négative sur le transport de glucose en réponse à l'insuline et pourrait donc contribuer au développement de la résistance à l'insuline induite par les ROS (Bloch-Damti et Bashan, 2005).

IV. L'IMPLICATION DES CORPS CÉTONIQUES SUR L'ORGANISME

Le métabolisme du glucose peut être modulé par plusieurs substrats énergétiques. Il a été démontré que les acides gras peuvent influencer le métabolisme du glucose : 1) en inhibant son oxydation via le cycle de Randle et, 2) en réduisant son transport en créant une résistance à l'insuline dans les tissus sensibles à cette hormone tel le cœur. Le glucose peut lui-même produire des effets qui se reflètent au niveau de son métabolisme. Ainsi, l'hyperglycémie, via la production de stress oxydatif, peut elle aussi entraîner le développement de la résistance à l'insuline dans le cœur. Tous ces mécanismes de contre-régulation permettent de balancer l'utilisation des différents substrats énergétiques retrouvés dans l'organisme. Bien que le glucose et les acides gras représentent les deux principaux substrats retrouvés dans le cœur, il peut arriver que les corps cétoniques augmentent de façon considérable. Et alors, quel est leur impact sur le métabolisme du glucose ?

A. Les conditions physiologiques et physiopathologiques qui favorisent la céto-genèse

De façon générale, on distingue trois stades cliniques reliés à la concentration plasmatique de corps cétoniques : la condition normale ($< 0,1$ mM), l'hypercétonémie (> 1 mM) et l'acidocétose (> 3 mM) (Owen et coll., 1969; Laffel, 1999). Normalement, les concentrations de corps cétoniques sont inférieures à $50 \mu\text{M}$ après un repas. Il existe différentes circonstances qui peuvent favoriser la production de corps cétoniques chez l'humain. Tout d'abord, l'hypercétonémie peut être induite par certaines situations physiologiques telles l'exercice prolongé (Fukatsu et coll., 1996) et le jeûne (Owen et coll., 1969). L'exercice prolongé peut entraîner une augmentation des corps cétoniques avoisinant 1 à 2 mM (Koeslag et coll., 1980). Suite à un jeûne d'une nuit, ces concentrations peuvent grimper jusqu'à $0,4$ mM et peuvent même atteindre 8 mM après un jeûne prolongé (Fukao et coll., 2004; Owen et Reichard, Jr., 1975). Dans de telles circonstances, les corps cétoniques peuvent contribuer de 30 à 40 % des besoins énergétiques d'un individu (Laffel, 1999). La céto-genèse peut également être augmentée de façon volontaire par la prise d'une diète dite céto-gène. La diète céto-gène peut entraîner une hausse des concentrations plasmatiques des corps cétoniques allant jusqu'à 2 à 3 mM (Huttenlocher, 1976; Musa-Veloso, 2004). Cette diète riche en gras et faible en glucose (ou en hydrates de carbone) ou hypocalorique stimule la production hépatique de corps cétoniques (Cullingford, 2004). Les premières diètes céto-gènes ont été popularisées dans les années 1860 par William Banting parce qu'elles avaient comme bienfait de faire maigrir les gens qui la consommait (Banting, 1863). Cette diète a

ensuite pris un nouvel essor entre les années 1960 et 2000 dans la course à la minceur devant le phénomène d'obésité de plus en plus grandissant (Lean et coll., 1997). Aujourd'hui, elle est également utilisée dans le traitement de l'épilepsie (Freeman et coll., 1998).

Finalement, il existe des situations physiopathologiques associées avec l'hypercétonémie et l'acidocétose. Par exemple, les patients atteints de défaillance cardiaque présentent souvent des niveaux élevés de corps cétoniques dans le sang (Lommi et coll., 1997). Les personnes atteintes de défaillance cardiaque ont un métabolisme énergétique altéré comparativement aux gens sains. Parce que certaines enzymes-clés de l'oxydation des acides gras sont surexprimées dans la défaillance cardiaque, le cœur de ces patients métabolise plus d'acides gras que normalement (Raynolds et coll., 1994; Lommi et coll., 1998). Cette augmentation du métabolisme des acides gras favorise ainsi la formation de corps cétoniques. La pathologie où l'hypercétonémie et l'acidocétose sont le plus souvent observées est probablement le diabète (type 1 et 2) (Newton et Raskin, 2004). Lorsque bien contrôlés, les patients atteints du diabète de type 1 ou de type 2 ont normalement des concentrations de corps cétoniques inférieures à 1 mM (Foster et coll., 1978; Guerci et coll., 2005). L'acidocétose diabétique apparaît plus souvent chez les patients diabétiques de type 1, mais elle peut également se manifester chez les patients diabétiques de type 2. Durant une période d'acidocétose, les concentrations de corps cétoniques peuvent atteindre de 10 à 25 mM (Umpierrez et coll., 1995; White, 2003). L'augmentation des acides gras circulants et la diminution des concentrations ou de l'action de l'insuline retrouvées dans le diabète représentent une situation idéale pour la formation des corps cétoniques dans le

foie, mais aussi marginalement dans le rein. La formation accrue de corps cétoniques module le ratio du β -hydroxybutyrate et de l'acétoacétate. Alors qu'il est normalement de 1:1, il peut augmenter jusqu'à 5:1 lors du diabète (Stephens et coll., 1971). Ceci suggère que le β -hydroxybutyrate est le corps cétonique préférentiellement produit lors du diabète. En plus d'observer une augmentation de la synthèse des corps cétoniques, leur utilisation est réduite de façon significative dans le cœur et les muscles squelettiques des patients diabétiques (Balasse et Fery, 1989; Grinblat et coll., 1986). Cela contribue à garder les niveaux de corps cétoniques élevés. L'acidocétose peut entraîner de multiples complications chez les patients diabétiques telles que le vomissement, la déshydratation, la fatigue et la douleur abdominale (Newton et Raskin, 2004).

B. L'influence des corps cétoniques sur le métabolisme des acides gras et du glucose

1. Au niveau du foie

Bien que les corps cétoniques influencent peu le métabolisme énergétique de l'organisme en temps normal, ils peuvent jouer un rôle plus marqué en période d'hypercétonémie où ils régulent le métabolisme énergétique. Ainsi, une augmentation aiguë des corps cétoniques exerce des effets distincts sur le métabolisme du glucose et des acides gras. Tout d'abord, les corps cétoniques diminuent la glycémie plasmatique en inhibant la production hépatique de glucose. Certaines études suggèrent que les corps cétoniques ont des effets directs sur la production hépatique de glucose (Shaw et Wolfe, 1984; Balasse et coll., 1967; Henry et coll., 1990). Il a également été proposé que la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par une exposition aiguë aux corps

cétoniques est responsable de la diminution de la production hépatique de glucose (Miles et coll., 1981). Cette diminution pourrait également être due à une baisse de la disponibilité de certains précurseurs néoglucogéniques tels l'alanine et le glycérol observée lors d'hypercétonémie (Sherwin et coll., 1975; Senior et Loridan, 1968). De façon aiguë, les corps cétoniques peuvent également influencer le métabolisme des acides gras. Le β -hydroxybutyrate peut inhiber la lipolyse, probablement via l'activation des récepteurs nicotiques (Henry et coll., 1990; Taggart et coll., 2005) . Le mécanisme d'action du β -hydroxybutyrate est encore peu compris, mais il modulerait la régulation de la cétogénèse en limitant la quantité d'acide gras allant vers le foie.

2. *Au niveau du cerveau*

Certains organes sont particulièrement sensibles aux corps cétoniques. Le cerveau est un tissu qui ne peut métaboliser que le glucose et les corps cétoniques puisque les acides gras ne passent pas la barrière hémato-encéphalique. Le cerveau a besoin d'un apport constant en substrat énergétique sans lequel l'humain ne survivrait pas. Ainsi, après une certaine période d'adaptation, l'hypercétonémie entraîne l'augmentation de la captation et de l'oxydation des corps cétoniques au niveau cérébral (Blomqvist et coll., 2002). Dans de telles circonstances, pratiquement tous les besoins énergétiques du cerveau sont comblés par les corps cétoniques plutôt que le glucose (Owen et coll., 1967). Contrairement à l'hyperglycémie chronique qui désensibilise le cerveau au métabolisme du glucose, l'hypercétonémie chronique n'induit aucune résistance du cerveau aux expositions aiguës aux corps cétoniques (McCall et coll., 1986; Blomqvist et coll., 2002). Cela suggère que l'utilisation des corps cétoniques peut

représenter un bon moyen de survie en période de stress prolongé. En plus de servir comme source d'énergie, les corps cétoniques peuvent être utilisés pour la synthèse d'acides aminés ou de lipides dans le cerveau (Pan et coll., 2000).

3. *Au niveau du muscle squelettique*

Le muscle squelettique est un organe qui métabolise principalement les acides gras et le glucose. Lorsque l'apport en corps cétoniques augmente, le muscle utilise préférentiellement ce substrat aux acides gras (Ruderman et coll., 1971). Ainsi, une exposition aiguë aux corps cétoniques cause une légère diminution de la captation et de l'oxydation des acides gras dans le muscle (Little et coll., 1970). Cet effet est probablement dû à une augmentation de la sécrétion d'insuline, à une inhibition de la lipolyse ou à une augmentation des ratios d'acétyl CoA/CoA ou NADH/NAD⁺ produits par les corps cétoniques (Bjorntorp et Schersten, 1967; Kunau et coll., 1995). Par contre, une exposition aiguë aux corps cétoniques n'altère pas la captation du glucose en réponse à l'insuline dans le muscle (Berger et coll., 1976). Les effets à long terme des corps cétoniques sur le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique sont très controversés. Selon certaines études, la diète cétogène n'altère pas le métabolisme du glucose en réponse à l'insuline (Bisschop et coll., 2001; Cutler et coll., 1995). Par contre, il a également été démontré que le jeûne peut induire une résistance à l'insuline et diminuer l'activité de la PDH et, par conséquent, diminuer le métabolisme du glucose dans le muscle (Ashour et Hansford, 1983; Mansell et Macdonald, 1990; Bjorkman et Eriksson, 1985). De plus, l'utilisation des corps cétoniques peut entraîner une augmentation de la synthèse du citrate qui exerce un effet inhibiteur sur la glycolyse via le cycle de Randle (voir section II. D. 1. et Figure 11) (Saha et coll., 1997).

4. *Au niveau du coeur*

Bien que les acides gras et le glucose soient les substrats majeurs utilisés par le coeur, les corps cétoniques sont les premiers substrats énergétiques métabolisés lorsqu'ils sont présents dans l'organisme (Randle et coll., 1963). Quand les corps cétoniques représentent la seule source d'énergie disponible, ils peuvent combler 50 % et 75 % des besoins énergétiques du coeur chez des animaux nourris ou à jeun, respectivement (Sultan, 1988; Sultan, 1990). De façon aiguë, les corps cétoniques affectent la captation ainsi que l'oxydation des acides gras tel qu'observé dans le muscle squelettique (Stanley et coll., 2003; Hasselbaink et coll., 2003). Par contre, l'effet inhibiteur des corps cétoniques est beaucoup plus puissant dans le coeur que dans les muscles squelettiques (Little et coll., 1970). En plus de réduire l'oxydation des acides gras dans le coeur (Hasselbaink et coll., 2003), les corps cétoniques favorisent la lipolyse et la relâche des acides gras du coeur vers la circulation sanguine (Larsen et Severson, 1990). Contrairement au muscle squelettique, une exposition aiguë aux corps cétoniques affecte le métabolisme cardiaque du glucose en inhibant sa captation ainsi que son oxydation (Williamson et Krebs, 1961). De plus, ils favorisent la synthèse de glycogène dans le coeur (Randle et coll., 1964). Il existe trois mécanismes par lesquels les corps cétoniques inhibent l'effet de l'insuline ou le métabolisme du glucose dans le coeur. Tout d'abord, l'augmentation du ratio de NADH/NAD^+ , due à l'oxydation des corps cétoniques, inhibe la PDH (Kerbey et coll., 1976). Ensuite, l'accumulation du citrate par le métabolisme des corps cétoniques désactive la PFK-1. Finalement, l'accumulation de glucose-6-phosphate due à l'inhibition de la PFK-1 entraîne une inhibition de l'hexokinase. L'inhibition de ces trois enzymes, suite au métabolisme des corps

cétoniques, explique leur impact sur le métabolisme du glucose dans le cœur (Randle et coll., 1964). L'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate (le D- β -hydroxybutyrate, mais pas le L- β -hydroxybutyrate) peuvent altérer le métabolisme du glucose de façon aiguë dans le cœur (Tsai et coll., 2005). Les effets d'une exposition chronique aux corps cétoniques n'ont pas été étudiés au niveau du cœur quant à leur impact sur le métabolisme des acides gras. Par contre, une exposition chronique à l'hypercétonémie altère le métabolisme du glucose dans le muscle cardiaque. Il a été démontré qu'à long terme, une exposition aux corps cétoniques entraîne le développement d'une résistance à l'insuline dans le cœur, altérant ainsi le métabolisme du glucose (Tardif et coll., 2001).

Comme nous l'avons constaté, la présence des corps cétoniques peut modifier l'utilisation des différents substrats énergétiques dans plusieurs organes. La production des corps cétoniques s'avère indispensable dans certaines circonstances. Lors d'un jeûne, la principale source d'énergie métabolisée par le cerveau est les corps cétoniques puisque les quantités de glucose sont insuffisantes pour subvenir aux besoins énergétiques du cerveau. Par contre, dans certaines pathologies telles le diabète, la présence des corps cétoniques semblent plutôt exercer un effet délétère sur la sensibilité à l'insuline. Ainsi, il est important de bien définir l'importance relative des corps cétoniques sur le métabolisme énergétique.

C. Les bienfaits et les effets néfastes des corps cétoniques

1. La perte de poids

Les diètes cétogènes sont constituées principalement d'acides gras et contiennent peu d'hydrate de carbone. Comme mentionné précédemment, elles

favorisent la production de corps cétoniques. Bien que les acides gras possèdent une plus grande densité calorique que les hydrates de carbone, cette diète favorise la perte de poids, la diminution de l'indice de masse corporelle et du pourcentage de gras (Helge, 2002; Luscombe et coll., 1999; Parker et coll., 2002). Puisque la prise d'hydrates de carbone est fortement diminuée, cela entraîne une stimulation de la lipolyse et, par conséquent, augmente le catabolisme au niveau du tissu adipeux (Phinney et coll., 1983). Ainsi, la diète cétogène provoque une diminution du poids, tout en favorisant la synthèse des corps cétoniques. Certains facteurs indépendants de la composition de la diète cétogène ont été identifiés pour expliquer les effets bénéfiques d'une telle diète sur la perte de poids : la restriction calorique, un poids de départ très élevé et la durée de temps de la diète (Bravata et coll., 2003). Cela suggère que la prise de toute diète correspondant à ces critères pourrait être aussi efficace que la diète cétogène. Il semble que cette diète représente tout de même un moyen efficace pour perdre du poids puisqu'elle est bien tolérée et ne présente pas d'effet non désirable majeur (aucun changement du bilan lipidique sanguin, de la glycémie et de l'insulinémie à jeun) (Bravata et coll., 2003).

2. *L'amélioration des fonctions cérébrales*

La diète cétogène est également utilisée dans le traitement de l'épilepsie chez les patients qui ne répondent pas aux traitements conventionnels (Freeman et coll., 1998; Vining et coll., 1998). Le mécanisme d'action de cette diète est encore peu compris. Il semble qu'elle agisse comme anti-convulsant en augmentant le flux énergétique au niveau du cerveau via la stimulation de la β -oxydation (Appleton et DeVivo, 1974; Pan et coll., 1999). La diminution de la concentration sanguine de glucose observée lors de la

prise de la diète cétoène aurait également un effet sur l'atténuation des crises d'épilepsie (Greene et coll., 2001). La diète cétoène pourrait finalement exercer un effet anti-épileptique en agissant sur certaines enzymes impliquées dans la synthèse de neurotransmetteurs (Kish et coll., 1988; Yudkoff et coll., 2001b; Yudkoff et coll., 2001a; Yudkoff et coll., 1997; Erecinska et coll., 1996).

Les corps cétoniques exercent beaucoup d'autres effets au niveau cérébral. Ils peuvent être utilisés par le cerveau pour la synthèse de lipides particulièrement importants dans la restauration de la myélinisation (Swiatek et coll., 1984). La présence de corps cétoniques permet d'augmenter la biosynthèse du cholestérol dans le cerveau, ce qui exerce des effets bénéfiques dans le traitement de la maladie d'Alzheimer (Kashiwaya et coll., 2000; Ohgami et coll., 2003). La production d'ATP par les corps cétoniques joue également un rôle important dans le traitement du Parkinson (Tieu et coll., 2003). Finalement, la présence des corps cétoniques exerce un rôle essentiel dans le maintien des réserves énergétiques du cerveau lors d'un jeûne prolongé (Owen et coll., 1967).

Bien que l'utilisation de la diète cétoène entraîne plusieurs effets bénéfiques sur la fonction cérébrale, il faut savoir qu'elle comporte aussi son lot d'inconvénients. Sur une longue période de temps, la diète cétoène entraîne un retard de croissance physique et cognitif. Les enfants ayant été traités avec une telle diète ont une taille et un poids corporel inférieurs à la moyenne des enfants du même âge (Peterson et coll., 2005) et ont un retard de croissance au niveau cérébral (Nordli, 2002; Thiele, 2003). Les études faites sur des rats démontrent que la diète cétoène induit des dommages au niveau du développement cognitif et au niveau de la mémoire visuelle et spatiale (Zhao et coll.,

2004; Su et coll., 2000). Comme cette diète est souvent très restreinte au niveau de son contenu en protéines, vitamines et minéraux, il se pourrait que le manque de protéines, plutôt que l'élévation des concentrations de corps cétoniques, soit à l'origine des différents retards observés. Plusieurs études seront nécessaires afin de clarifier l'effet à long terme des corps cétoniques sur le développement physique et cérébral.

3. *L'effet délétère sur l'action de l'insuline*

Les corps cétoniques exercent plusieurs effets reliés à l'insuline. Tout d'abord, l'exposition des îlots pancréatiques aux corps cétoniques modifie la sécrétion d'insuline. Bien qu'une exposition de courte durée au β -hydroxybutyrate stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Storino et Engel, 1978; Goberna et coll., 1974), une exposition chronique l'inhibe (Takehiro et coll., 2005). En bloquant la formation de NADH par le glucose, les corps cétoniques diminuent la production d'ATP provenant de la glycolyse. Cette baisse d'ATP dans les îlots est responsable de la diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Takehiro et coll., 2005).

En plus d'altérer la sécrétion d'insuline, les corps cétoniques sont également impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline. Dans les cellules chromaffines, il a été démontré qu'une exposition chronique aux corps cétoniques entraîne une diminution du niveau d'expression des récepteurs à l'insuline et, par conséquent, une diminution de la réponse à l'insuline (Yokoo et coll., 2003). En plus de moduler l'expression des protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, les corps cétoniques peuvent contribuer au développement de la résistance à l'insuline de plusieurs façons. Tel que mentionné auparavant, les corps cétoniques ont la capacité de

moduler le métabolisme des acides gras. Ils peuvent inhiber le transport et l'oxydation des acides gras (Stanley et coll., 2003). Lorsque les cardiocytes sont exposés aux corps cétoniques de façon aiguë, il en résulte une accumulation de palmitate non-estérifié et de triglycérides. La présence excessive d'acides gras pourrait exercer des effets cytotoxiques et altérer la voie de signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation de l'IRS-1 en sérine dans le cœur (Petersen et Shulman, 2002). Une exposition chronique au β -hydroxybutyrate provoque également une diminution du transport de glucose en réponse à l'insuline via l'inhibition de la PKB (Tardif et coll., 2001). Il a été démontré que l'hypercétonémie augmente la production de ROS chez les patients diabétiques (Jain et McVie, 1999; Jain et coll., 1999; Jain et coll., 2002). Cette élévation des ROS pourrait contribuer au développement de la résistance à l'insuline (Bloch-Damti et Bashan, 2005; Evans et coll., 2005). Les corps cétoniques peuvent aussi diminuer l'oxydation du glucose en augmentant l'activation de la PDK ce qui entraîne une réduction du transport de glucose (Sugden et coll., 1995). Finalement, il a été proposé qu'une augmentation des corps cétoniques est liée à la dysfonction mitochondriale, phénomène pouvant conduire au développement de la résistance à l'insuline (An et coll., 2004). Ainsi, la présence de corps cétonique, de façon aiguë ou chronique, pourrait diminuer la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique de même que celle du muscle cardiaque.

4. *L'implication dans le développement des maladies cardiovasculaires*

Il a été démontré que le β -hydroxybutyrate avait la capacité d'augmenter l'efficacité du travail cardiaque lorsqu'il est métabolisé (Kashiwaya et coll., 1997; Sato et

coll., 1995). L'acétoacétate peut également augmenter la performance contractile du cœur par son pouvoir antioxydant (Sun, 2001; Squires et coll., 2003). En période de jeûne prolongé, l'administration de corps cétoniques diminue l'apoptose ainsi que la taille de l'infarctus normalement observées suite à une occlusion coronarienne (Zou et coll., 2002). Deux mécanismes pourraient être impliqués dans ce processus. En servant de substrat énergétique alternatif, les corps cétoniques empêchent la chute radicale d'ATP dans le cœur lors de l'ischémie. De plus, ils bloquent la lipolyse, ce qui diminue la demande en oxygène et réduit l'étendue des dommages cellulaires. Par contre, il faut mentionné que les corps cétoniques exercent un effet protecteur sur le cœur seulement lorsqu'ils représentent le seul substrat énergétique disponible. Il a été démontré que les corps cétoniques ne protègent, ni n'accentuent, les dommages cardiaques survenant après une ischémie partielle lorsque le cœur n'est pas à jeun (King et coll., 2001), et que l'acétoacétate peut même entraîner une inhibition de la contraction cardiaque (Zimmerman et coll., 1962). Ainsi, les corps cétoniques exerceraient un effet favorable sur le cœur lors d'ischémie complète et pourrait diminuer le risque de développer des MCV dans certaines conditions particulières où l'apport énergétique ne proviendrait que de ce substrat.

Une diminution des triglycérides et du cholestérol total ainsi qu'une augmentation des HDL sont des caractéristiques observées lors de la prise prolongée de la diète cétogène (Sharman et coll., 2002; Dashti et coll., 2003). Ainsi, cette diète semble modifier de façon favorable les facteurs de risque reliés aux maladies cardiovasculaires. Bien que certaines études démontrent que l'administration à long terme de la diète cétogène peut avoir des effets bénéfiques sur le profil lipidique (Sharman et coll., 2002;

Dashti et coll., 2003), d'autres ont obtenu des résultats opposés. Ainsi, une augmentation nette des taux sanguins de cholestérol, de LDL, de triglycérides et d'acides gras ont été détectés chez des patients ayant pris une telle diète pendant une longue période de temps (Dekaban, 1966; Chyrek-Borowska et coll., 1992). L'augmentation des ratios de LDL/HDL observés chez ces patients est associée à une élévation du risque de maladies coronariennes (Kwiterovich, Jr., 2002), d'athérosclérose (Berenson et coll., 1998) et d'infarctus du myocarde (Srinivasan et Berenson, 1995). De plus, le développement de cardiomyopathies constitue une complication reliée à la prise de la diète cétonique (Best et coll., 2000; Kang et coll., 2004). Il est donc difficile de déterminer si les corps cétoniques formés suite à la prise de la diète cétonique exercent un effet bénéfique ou néfaste sur le développement des maladies cardiovasculaires puisque les résultats varient selon la composition en acide gras de ce type de diète.

Par contre, plusieurs évidences lient la présence des corps cétoniques aux maladies cardiovasculaires. Tout d'abord, les concentrations de corps cétoniques sont très souvent élevées lors de défaillance cardiaque chronique (Lommi et coll., 1997; Lommi et coll., 1998). De plus, il existe une forte corrélation entre les concentrations plasmatiques de corps cétoniques et le profil athérogène des patients diabétiques (Jain et coll., 1998; Jain et coll., 2002). Il a d'ailleurs été démontré que les corps cétoniques favorisent la formation de plaques d'athérosclérose en agissant comme noyau pour l'accumulation de lipides, de protéines, de cellules, de sels et autres (Seebach et coll., 1994). Les corps cétoniques ont la capacité de s'incorporer dans les membranes cellulaires et de changer la viscosité de ces dernières réduisant, par le fait même, l'intégrité et la performance de ces membranes (Reusch et coll., 2003; Candiloros et coll.,

1995). L'augmentation du nombre de ces plaques est associée au développement des maladies cardiovasculaires (Massie, 2002; Bergman et Van der, 2005; Walton et coll., 2004). En plus d'affecter le profil athérogène, les corps cétoniques diminuent le taux de survie des cardiocytes exposés à un stress (Pelletier et coll., 2002). L'augmentation de la mortalité pourrait être causée par une accumulation d'acides gras en réponse à la forte présence des corps cétoniques. Cette accumulation d'acides gras ayant un effet lipotoxique déclencherait la voie de signalisation de l'apoptose en plus d'induire des dysfonctions mécaniques cardiaques (Hasselbaink et coll., 2003). L'augmentation du stress oxydatif induit par les corps cétoniques pourrait également fragiliser les cellules cardiaques (Tieu et coll., 2003; Jain et McVie, 1999; Jain et coll., 1999) et augmenter le risque relatif de complications cardiaques. Toutes ces données suggèrent donc que l'exposition aux corps cétoniques contribue à l'augmentation des MCV tant en agissant au niveau vasculaire (athérosclérose) qu'au niveau cardiaque (apoptose).

V. LA RATIONNELLE

Les maladies cardiovasculaires représentent une complication majeure reliée au diabète de type 1 et de type 2. Plusieurs patients atteints du diabète développent une cardiomyopathie diabétique secondaire aux nombreuses anomalies rencontrées dans cette pathologie. Parmi tous ces facteurs, la diminution de la captation du glucose constitue un élément important qui pourrait réguler le développement des maladies cardiovasculaires puisque ce substrat énergétique est essentiel au maintien des fonctions cardiaques. Les acides gras, dont les concentrations plasmatiques sont élevées dans le diabète, ont été identifiés comme étant responsables du développement de la résistance à l'insuline. Par

contre, l'augmentation des concentrations de corps cétoniques représente un autre paramètre métabolique pouvant être élevé chez les patients atteints du diabète. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'impact que pourrait occasionner une exposition aux corps cétoniques, et plus particulièrement au β -hydroxybutyrate, sur le transport de glucose en réponse à l'insuline. Nos résultats démontrent qu'une exposition chronique (16 h) au β -hydroxybutyrate rend les cardiocytes insulino-résistants. De plus, ce traitement inhibe le transport de glucose en réponse à une stimulation aiguë au pervanadate, un inhibiteur des protéines tyrosines phosphatases.

Par la suite, nous avons tenté de contrecarrer le développement de la résistance à l'insuline induit par une exposition chronique aux corps cétoniques. Pour ce faire, nous avons utilisé le vanadate, un agent insulino-mimétique qui stimule le transport de glucose dans les cardiocytes et qui permet de restaurer la fonction cardiaque des animaux diabétiques. Afin d'identifier d'éventuelles pistes thérapeutiques, nous avons étudié l'effet chronique du vanadate sur le transport de glucose et l'activation des molécules impliquées dans ce processus dans les cardiocytes rendus insulino-résistants suite à une exposition chronique au β -hydroxybutyrate.

Puisque le glucose représente le principal substrat énergétique utilisé par le cœur en période de stress métabolique (hypoxie, ischémie), une diminution de son transport en de telles circonstances pourrait également avoir de lourdes répercussions sur le développement des maladies cardiovasculaires. Au cours des dernières décennies plusieurs études portant sur la caractérisation de la voie de signalisation de l'insuline ont été réalisées dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et un peu moins dans le muscle

cardiaque, mais peu de groupes de recherche se sont intéressés à la régulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique. Les données recueillies sur ce sujet dans le muscle squelettique ont souvent été transposées au muscle cardiaque. Depuis, plusieurs évidences suggèrent que le muscle cardiaque constitue un tissu bien distinct du muscle squelettique. Pour ces raisons, nous avons tout d'abord étudié l'effet du 2,4-dinitrophénol (DNP), un découpleur de la phosphorylation oxydative mitochondriale qui mime l'hypoxie, sur la stimulation du transport de glucose afin d'identifier les enzymes qui régulent ce processus en réponse au stress métabolique dans les cardiocytes.

Aucune étude n'a évalué la modulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique dans un modèle de résistance à l'insuline au niveau du muscle cardiaque. Ainsi, nous avons finalement examiné l'effet d'une exposition chronique au β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP dans les cardiocytes adultes.

CHAPITRE 2

Résultats

Chronic exposure to β -hydroxybutyrate impairs insulin-stimulated glucose uptake and PKB activation in cardiomyocytes

Annie Tardif¹, Nathalie Julien¹, Amélie Pelletier¹, Gaétan Thibault², Ashok K. Srivastava¹, Jean-Louis Chiasson¹ and Lise Coderre^{1†}

Publié dans : American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2001 281; E1205-E1212

Running title: Ketone bodies induce insulin resistance in cardiomyocytes

¹From the Research Center, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, H2W 1T8, Canada and ²Clinical Research Institute of Montreal, Department of Medicine, University of Montreal, Montreal, H2W 1R7, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed:

Lise Coderre, Ph.D.
Research Center-CHUM
Hôtel-Dieu-CHUM
3850 St. Urbain
Montréal (Québec) H2W 1T8, Canada
Tel.: (514) 890-8000 x 15092
Fax: (514) 412-7208
[REDACTED]

Chronic exposure to β -hydroxybutyrate impairs insulin-stimulated glucose uptake and PKB activation in cardiomyocytes

Annie Tardif^d, Nathalie Julien¹, Amélie Pelletier¹, Gaétan Thibault², Ashok K. Srivastava¹,
Jean-Louis Chiasson¹ and Lise Coderre^{1†}

Publié dans : American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2001 281;
E1205-E1212

Contribution des co-auteurs:

A.T. et **N.J.** ont réalisé la plupart des expériences portant sur l'effet du temps d'exposition aux corps cétoniques et sur l'effet de la concentration des corps cétoniques sur le transport de glucose en réponse à l'insuline. Elles ont également réalisé la plupart des expériences portant sur l'effet du PMA et du pervanadate sur le transport de glucose dans les cardiocytes incubés avec le β -hydroxybutyrate.

A.P. a réalisé quelques expériences portant sur l'effet du temps d'exposition aux corps cétoniques et sur l'effet de la concentration des corps cétoniques sur le transport de glucose en réponse à l'insuline. Elle a réalisé toutes les expériences portant sur l'expression de Glut1 et Glut4 et toutes celles portant sur la phosphorylation de la PKB en réponse à l'insuline et au pervanadate. Elle a finalement participé à l'écriture du papier.

G.T. a appris à notre groupe de recherche comment isoler les cardiocytes de rat adulte.

A.K.S. a fourni le pervanadate et a également collaboré dans la rédaction du manuscrit.

Abstract

Type 1 and type 2 diabetic patients often show elevated plasma ketone body concentrations. Because ketone bodies compete with other energetic substrates and reduce their utilization, they could participate in the development of insulin resistance in the heart. We have examined the effect of elevated levels of ketone bodies on insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. Cardiomyocytes were cultured with the ketone body, β -hydroxybutyrate (HOB) for 4 or 16 h and insulin-stimulated glucose uptake was evaluated. While short-term exposure to ketone bodies was not associated with any change in insulin action, our data demonstrated that preincubation with HOB for 16 h markedly reduced insulin-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. This effect is concentration-dependent and persists for at least 6 h after the removal of HOB from the media. Ketone bodies also decreased the stimulatory effect of PMA and pervanadate on glucose uptake. This diminution could not be explained by a change in either GLUT1 or GLUT4 protein content in cardiomyocytes. Chronic exposure to HOB was associated with impaired PKB activation in response to insulin and pervanadate. These results indicate that prolonged exposure to ketone bodies altered insulin action in cardiomyocytes and suggest that this substrate could play a role in the development of insulin resistance in the heart.

Key words: insulin resistance, ketone bodies, glucose uptake, protein kinase B, heart.

Introduction

Diabetic subjects have an increased morbidity and mortality from cardiac disease. In men and women, diabetes raises the risk of developing heart disease by 2.4 and 3.5 times respectively (40). Recent studies suggest that abnormal regulation of glucose uptake in the heart plays a role in cardiac dysfunction. In humans, a reduction in cardiac glucose uptake has been observed in obese and type 2 diabetic subjects (3). Diminished glucose utilization and contractile dysfunction have been also observed in the heart of the db/db mice, a model of type 2 diabetes (2). These abnormalities were normalized by selective overexpression of a glucose transporter (GLUT4) in the heart (2).

In addition to glucose, the heart also uses ketone bodies as an energy source. Studies have shown that acetoacetate reduces the oxidation of both fatty acids and lactate in the heart (27). Potentially, ketone bodies could modulate glucose utilization and insulin action in the heart. Various pathophysiological situations such as diabetes and starvation are associated with hyperketonemia (25). Significant increases in ketone body concentration are also observed in chronic heart failure (27,28) and after a high fat diet (25). Interestingly, perfusion of the rat heart with ketone bodies as the sole substrate provoked a severe decline in contractile function, a condition that was normalized with the inclusion of glucose in the perfusate (41). In congestive heart failure, the increase in plasma ketone body concentration correlates with the severity of the cardiac dysfunction (28).

The major glucose transporters expressed in the heart are GLUT1 and GLUT4. In this tissue, more than 80% of GLUT1 resides at the plasma membrane and it has been suggested that this transporter is primarily responsible for basal glucose uptake (13). In contrast, GLUT4 is found primarily in intracellular vesicles (4,13). Insulin stimulation of glucose uptake is accomplished by recruiting GLUT4 and to a lesser extent GLUT1 from their intracellular sites to the plasma membrane (10,13,36,46,48).

Our understanding of the insulin-signaling cascade has increased dramatically in recent years and many additional proteins involved in insulin action have been identified. One of these proteins is the serine/threonine kinase PKB or Akt. Overexpression of a constitutively active PKB increases GLUT4 translocation both in muscle cells (15,45)

and adipocytes (22,45). In addition, microinjection of either a PKB substrate peptide or PKB antibody reduces GLUT4 in response to insulin by 50% (18). On the other hand, transfection with dominant negative PKB mutants has yielded contradictory results (45). Recent studies have demonstrated, however, that in mice lacking the gene for PKB β , the ability of insulin to reduce plasma glucose concentration is reduced (6). Thus, the bulk of the data suggests that PKB plays a role in insulin-mediated glucose transport.

Because of the potential role of ketone bodies in the regulation of substrate utilization, we determined whether elevated concentrations of this substrate induce insulin resistance in the heart. To address this question, we have examined the effect of ketone bodies on insulin-stimulated glucose uptake and PKB activation in primary cultures of adult cardiomyocytes.

Experimental procedures

Chemicals

All cell culture solutions, supplements and DNase I were from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Collagenase was obtained from Worthington Biochemical Corp (Lakewood, NJ). Human insulin (HumulinTM R) was from Eli Lilly Canada Inc. (Toronto, ON, Canada). Anti-GLUT1 and GLUT4 antibodies were from Research Diagnostics Inc., (Flanders, NJ) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) respectively. Polyclonal antibodies for phospho-PKB (ser 473) and α PKB were purchased from New England Biolabs Inc. (Beverly, MA). [³H]2-deoxyglucose (DOG) was purchased from NEN Research Products (Boston, MA). The enhanced chemiluminescence detection system was from Amersham Pharmacia Biotech. (Baie d'Urfée, Québec, Canada). The bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit was purchased from Pierce (Rockford, IL). All electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada). Potassium diperoxovanadate was synthesized according to Ravishankar et al. (34).

Isolation of adult rat cardiomyocytes

All experiments conformed to guidelines of the Canadian Council of Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Male Sprague Dawley rats weighting 175-200 g were injected with heparin sulfate (500 U intraperitoneal) 15 min prior to anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneal). The heart was excised and calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method (retrograde perfusion) as described previously (43). During the whole procedure, the cells were maintained at 37°C. Briefly, the hearts were rinsed (4 ml/min) for 5 min in Krebs-Ringer (KR) buffer containing 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 11 mM dextrose and 25 mM HEPES, pH 7.4. The heart was then perfused with a calcium-free KR solution for 5 min to stop spontaneous cardiac contractions. This was followed by perfusion with KR buffer supplemented with 0.05% collagenase and 15 mM 2-3 butanedione monoxime for 20 min after which the ventricles were separated from the atria. Ventricles were minced in KR supplemented with 0.05% collagenase,

15 mM 2-3 butanedione monoxime and 0.2 mg/ml DNase I. The resulting cell suspension was filtered through a nylon mesh and centrifuged at 1000 g for 45 sec. The cells were then diluted and allowed to sediment in the washed solution twice. Freshly isolated cells were diluted in culture medium 199 (5.5 mM glucose) supplemented with 0.2% bovine serum albumin (fatty acid free), 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 5 mM taurine, 10^{-7} M insulin, 0.1 M ascorbic acid, 100 IU/ml penicillin, 25 μ g/ml gentamicin and 100 μ g/mL streptomycin. Cell viability was determined by the percentage of rod-shaped cells and averaged 90-95%. Cardiomyocytes (1×10^5 cells/ml) were plated onto laminin-coated dishes. After 4 h, the cells were washed in order to remove damaged cells and debris. The cells were then incubated with media containing 5.5 mM glucose alone or supplemented with 5 mM β -hydroxybutyrate (HOB) for 16 h or as stated in the figure legends.

Glucose uptake in primary cultures of cardiomyocytes

The day of the study, the cells were washed twice with 2 ml of KR buffer to remove insulin, glucose and HOB. The cells were then incubated in 1 ml of fresh KR buffer containing no glucose, insulin or HOB for 30 min to restore basal glucose uptake. We then added 0.5 μ Ci/ml DOG and 10^{-8} M insulin and glucose uptake was measured over a period of 30 min as described previously (7). The cells were also stimulated with 100 or 500 nM of the phorbol ester PMA or 100 μ M pervanadate. Under these conditions, DOG uptake was linear over 45 min. The uptake was terminated by 2 rapid washes with 2 ml of ice-cold KR buffer. Cells were disrupted with 1 ml of 0.05 M NaOH (60 min at 37°C) and cell associated radioactivity was determined by scintillation counting. Glucose uptake was expressed as Bq/mg of protein. Protein concentration was quantified using the BCA assay with bovine serum albumin as a standard.

Protein kinase B activation

Cells were pretreated with 5 mM HOB for 16 h. The day of the study the cells were washed twice with 4 ml of media containing no insulin or HOB. The cells were then incubated in 2 ml of media containing no insulin or HOB for 1 h. They were then treated with saline, 10^{-8} M insulin or 100 μ M pervanadate for 5 min. The reaction was stopped by 2 rapid washes with ice-cold KR buffer. Cells were lysed in buffer containing

25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 10 µg/ml aprotinin, 0.5 µg/ml leupeptine, 1% Triton X-100 and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The lysate was then centrifuged for 10 min at 12,000 g at 4°C to remove insoluble material and the resulting supernatant was used for immunoblotting.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Samples were electrophoresed on a 10% SDS polyacrylamide gel, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) for Western blotting. The membranes were blocked for 1 h in 5% (wt/vol) nonfat dry milk in PBS. They were then incubated with an appropriate primary antibody. For the PKB experiments, the blots were first probed with anti-phosphorylated (ser473) PKB (p-PKB) antibody and then reprobbed with anti-αPKB. This was followed by a second incubation with the appropriate secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase and the antigen-antibody complex was detected with the enhanced chemiluminescence method. Quantitative analysis was performed using a scanning densitometer.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons. This was followed by a Tukey post hoc test. All data are reported as means ± SEM. Glucose uptake data are means of at least 5 independent experiments. For the PKB experiments, densitometric analysis was performed on 3 independent experiments. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Induction of insulin resistance by ketone bodies

Because ketone bodies are increased under various pathophysiological situations we examined whether an elevation in their concentration would decrease glucose uptake and create a state of insulin resistance in the heart. To address this question, primary cultures of adult cardiomyocytes were incubated with the ketone body, β -hydroxybutyrate (HOB) for either 4 or 16 h and insulin-stimulated glucose uptake was evaluated. We chose HOB because it is the primary ketone body produced during hyperketonemia (25). Addition of 10^{-8} M insulin increased glucose uptake from 7.2 to 15.2 Bq/mg of protein in cardiomyocytes ($p < 0.05$) (Fig. 1A). The strength of this effect was comparable to previous reports in the literature for these cells (9). While exposure for 4 h to 5 mM HOB did not affect basal or insulin-mediated glucose uptake, our results demonstrated incubation with HOB for 16 h inhibited the stimulatory effect of insulin on glucose uptake in cardiomyocytes ($p < 0.05$) (Fig. 1B).

The development of insulin resistance induced by ketone bodies is dose-dependent

Plasma ketone body concentrations vary greatly depending on the nutritional or pathophysiological state of the animal. In healthy individuals, ketone body concentrations are usually ≤ 0.2 mM. During hyperketonemia, however, these levels can increase up to 1 mM while during ketoacidosis they reach levels between 3-20 mM. (25). Similarly, in the rat, diabetes and starvation are associated with concentrations of HOB over 1 mM (19). We determined the concentration of ketone body required to induce insulin resistance in cardiomyocytes. Cardiomyocytes were incubated with increasing concentrations of HOB for 16 h and glucose uptake was evaluated (Fig. 2). Exposure to either 1 or 5 mM HOB inhibited insulin action in these cells ($p < 0.05$). Though not significant, a 20% decrease in the maximal insulin effect was observed at 0.5 mM HOB. Pretreatment with 0.2 mM HOB has no effect on insulin action. In addition, incubation with increasing concentrations of HOB was associated with a progressive reduction in basal glucose transport. While never significant, this effect was seen in most of the experiments (see Figs. 3 and 5). Thus, the decreased response to insulin after pretreatment with ketone bodies was dose-dependent and occurred at concentrations that

are associated with physiological and pathological states *in vivo*. All subsequent experiments were done at 5 mM HOB.

Role of insulin in the reduction of glucose uptake induced by ketone bodies

Our preparations of adult cardiomyocytes were cultured in the presence of 10^{-7} M insulin to maintain cell survival. Desensitization of the glucose uptake process by high insulin concentrations has been observed both in adipocytes (14,42) and skeletal muscle (16) and could play a role in the development of ketone body-induced insulin resistance. Thus, the reduction in insulin-stimulated glucose uptake that we observed with ketone body could potentially result from a combinatorial effect of elevated concentrations of insulin and HOB. Adult cardiomyocytes were cultured with either 10^{-11} M or 10^{-7} M insulin in the presence or absence of ketone bodies for 16 h and insulin-mediated glucose transport was examined. We chose these concentrations because complete removal of the hormone from the media for long periods of time decreased insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes (data not shown and ref. (9)). As shown in Fig. 3, reducing the concentration of insulin in the media from 10^{-7} to 10^{-11} M caused a slight increase in the effect of insulin on cardiomyocytes. This protocol did not, however, prevent the development of insulin resistance, and the effect of the hormone was reduced by 50% both at 10^{-7} M and 10^{-11} M insulin ($p < 0.05$).

Resensitization of insulin-mediated glucose uptake after ketone body exposure

To better understand the mechanism underlying the development of insulin resistance by ketone bodies, we next investigated the time course necessary to reestablish insulin action in insulin resistant cells after removal of ketone bodies. Cardiomyocytes were exposed to 5 mM HOB for 16 h as described above. The cells were washed twice with media containing no HOB and then incubated for a period of 4, 6 or 8 h before evaluation of glucose uptake. Our results demonstrated that removal of HOB for either 4 or 6 h did not improve insulin action in these cells. A period of 8 h was required to restore insulin responsiveness in HOB pretreated cardiomyocytes (Fig. 4). These results indicate that insulin resistance persists for an extended period of time even after the removal of HOB from the media.

Effect of ketone bodies on the activation of glucose uptake by PMA and pervanadate

We next examined whether ketone bodies alter the response to other glucose transport agonists. It has been shown that in skeletal muscle, phorbol esters mediate glucose uptake by a mechanism distinct from insulin (17). Phorbol esters are functional analogs of DAG that are able to activate classical and novel PKCs present in ventricular myocytes. Acute activation of PKC was achieved with the phorbol ester PMA. As shown in Fig. 5A, exposure to 100 nM and 500 nM PMA increased glucose uptake from 12.3 to 17.5 and 20.7 Bq/mg of protein respectively. In adult cardiomyocytes, the effect of insulin and PMA on glucose uptake was not additive. Pretreatment with HOB for 16 h reduced the effect of 100 nM and 500 nM PMA on glucose uptake by 55% and 64% respectively ($p < 0.05$).

Pervanadate is a powerful tyrosine phosphatase inhibitor that mimics insulin action in a variety of cells. It has been shown that pervanadate can bypass a defect in insulin signaling and stimulate glycogen synthesis in insulin-resistant skeletal muscle (26). Thus, we examined whether this compound could stimulate glucose uptake in ketone body-treated cardiomyocytes. As shown in Fig. 5B, pervanadate increased glucose uptake from 21.2 to 31.6 Bq/mg of proteins. The maximal effect of pervanadate was reduced by 53% in HOB-treated cardiomyocytes ($p < 0.05$).

Effect of ketone bodies on GLUT1 and GLUT4 expression

The reduction in insulin-stimulated glucose uptake by ketone bodies could result from changes in the expression of the glucose transporter in cardiomyocytes. To address this possibility, we evaluated both GLUT1 and GLUT4 content in control and HOB-treated cardiomyocytes. As shown in Fig. 6, ketone bodies did not modify either GLUT1 or GLUT4 protein content in these cells.

Impairment in PKB activation in response to ketone bodies in adult cardiomyocytes

PKB is a serine/threonine kinase that has been implicated in insulin action. Studies by Tsiani et al. (44) have shown that pervanadate is a powerful activator of PKB. Since PKB activation also plays a key role in insulin action we were interested in determining whether the activation of this enzyme by either insulin or pervanadate was

altered in HOB-pretreated cardiomyocytes. To address this question, cardiomyocytes were pretreated with ketone bodies for 16 h after which PKB activation in response to either insulin or pervanadate was evaluated. To ensure that these differences were not due to unequal PKB expression, the relative levels of PKB were determined by immunoblotting. Ketone bodies did not affect PKB expression in cardiomyocytes (Fig. 7B). In control cells, insulin and pervanadate induce a 4-6-fold increase in PKB phosphorylation (Fig. 7A). Ketone body pretreatment decreases PKB phosphorylation in response to insulin and pervanadate by 84% and 69% respectively (Fig. 7C). In addition to its effect on insulin and pervanadate action, HOB-treated cardiomyocytes show a tendency toward lower basal PKB phosphorylation.

Discussion

Diabetic ketoacidosis is a major complication of type 1 diabetes. Less well known however, is that plasma ketone body concentrations are also increased in poorly controlled type 2 diabetic patients, particularly in African Americans (1,25). Higher ketone body levels have also been observed during chronic heart failure and after consumption of a high fat diet (25,27,28). Therefore, there exists a number of physiological as well as pathological situations where plasma ketone body concentrations are augmented. Because ketone bodies compete with various metabolic substrates such as fatty acids, lactate or glucose for utilization by the heart (31,37,47), their contribution to the energy supply of the myocardium will increase significantly during hyperketonemia. Our results support a role for ketone bodies in the regulation of substrate utilization and demonstrate for the first time that chronic exposure to HOB induces insulin resistance in primary cultures of adult cardiomyocytes. We have demonstrated that 1) prolonged exposure to HOB decreases insulin responsiveness as evaluated by glucose transport and PKB activation, 2) the development of insulin resistance by HOB is concentration dependant and, 3) in ketone body-treated cardiomyocytes, impaired glucose uptake in response to insulin persists for at least 6 h after the removal of HOB. Together, these data suggest that ketone bodies can play an important role in the regulation of glucose uptake in cardiomyocytes.

Plasma ketone body concentrations can rise dramatically during diabetes, reaching levels up to 20 mM (25). Our results demonstrated that a diminution in insulin-mediated glucose transport occurs after prolonged exposure to ketone bodies (16 h) at concentrations of 1 mM and greater. This could have clinical significance because it has been shown that during diabetic ketoacidosis, plasma levels of ketone bodies usually remain elevated for more than 12 h after the beginning of treatment to reduce their levels (25). Thus, the reduction in insulin responsiveness observed in HOB-pretreated cardiomyocytes *in vitro* occurs at concentrations and within a time frame that is consistent with a role for this substrate in the regulation of glucose transport during the etiology of diabetic complications. Since our measurements were done at supraphysiological insulin concentrations we do not know whether ketone bodies also

alter insulin sensitivity in these cells. Studies by Fischer et al. (12) have demonstrated that the inhibitory effect of various cardiac substrates on glucose transport are more pronounced at submaximal than at maximal insulin concentration. It would thus be very interesting to determine whether prolonged exposure to ketone bodies also alters insulin sensitivity in addition to its effect on insulin responsiveness.

Our results show that short-term exposure to HOB (4 h) does not modify insulin action in cardiomyocytes. Therefore, the inhibition of insulin-stimulated glucose uptake observed in these cells is not consistent with a direct competition between glucose and HOB as energy sources. However, the regulation of glucose uptake could potentially result from the intracellular metabolism of HOB. It has been shown that ketone bodies modulate the production of a number of metabolites in the heart. Perfusion of the isolated heart with the ketone body acetoacetate increases the concentration of acetyl-CoA, acetoacetyl-CoA and citrate (31-33,37). Randle and coworkers have proposed that an increase in citrate and acetoacetyl-CoA levels could inhibit phosphofructokinase and pyruvate dehydrogenase activity respectively (33). This would lead to an increase in glucose-6-phosphate concentrations that could then inhibit hexokinase activity and reduce glucose uptake in the heart. An increase in glucose-6-phosphate has been observed in heart perfused with acetoacetate and could play a role in the decreased glucose uptake seen in HOB-treated cardiomyocytes (37). A second possibility is that ketone bodies increase glycogen and/or triglyceride content in cardiomyocytes and could reduce glucose transport by a feedback mechanism. An increase in glycogen accumulation could be caused either by the stimulation of glycogen synthase activity by glucose-6-phosphate or an increase in HOB utilization during hyperketonemia which could divert some of the glucose taken up by the cardiomyocytes towards either glycogen or lipid synthesis. This would also explain the 8 h period that is necessary to restore insulin action in HOB-treated cardiomyocytes. In skeletal muscle, an increase in glycogen or triglycerides levels has been associated with reduced insulin-stimulated glucose uptake (16,20,21,35). Similar mechanisms could also operate in the heart and induce insulin resistance in this tissue. We are currently examining these various possibilities.

In addition to its effect on insulin action, HOB induces a non-significant decrease in basal glucose uptake compared to control cells. Because HOB induces a similar decrease in basal glucose transport both at 10^{-7} M and 10^{-11} M insulin, we believe that this reduction is not due to incomplete removal of the hormone during the washes. Reductions in basal and insulin-stimulated glucose uptake have been observed in cardiomyocytes exposed to extracellular ATP due to a redistribution of glucose transporters from the plasma membrane to their intracellular site (11). Potentially, ketone bodies could promote a similar internalization of these transporters and thus lower basal glucose transport in these cells.

Our results demonstrated that neither GLUT4 nor GLUT1 protein content was altered by ketone body treatment. Thus, a change in glucose transporter expression cannot explain the reduction in agonist-stimulated glucose uptake observed in cardiomyocytes. In the heart, glucose uptake results from glucose transport into the cells and its subsequent phosphorylation by the enzyme hexokinase. It has been shown that during insulin stimulation, the rate-limiting step for this process switches from glucose transport to glucose phosphorylation (29). Recent studies suggest that in the presence of HOB, glucose transport may not be the rate-limiting step for glucose uptake (5). Thus, ketone body-induced insulin resistance could be due to a decrease in GLUT4 translocation, a decrease in hexokinase activity or a combination of both. Ketone bodies could also impair glucose transporter trafficking or their fusion/insertion into the plasma membrane independently of the insulin-signaling cascade. A defect at either of these steps would diminish the effect of glucose transport agonists in HOB-pretreated cardiomyocytes.

Our results show that, in addition to insulin, ketone bodies also impair the activation of glucose uptake in response to both phorbol esters and pervanadate. This suggests that more than one signaling pathway is affected by ketone body treatment or alternatively that they regulate a common step of the three glucose uptake agonists or a combination of both. Recent data support a role for PKB in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. Impaired PKB activation in response to insulin has been observed in skeletal muscle from type 2 diabetic subjects (24) and diabetic Goto-Kakizaki

rats (39). Furthermore, improvement in glucose uptake in these rats was associated with normalization of PKB activation in response to insulin treatment (23). For these reasons we investigated the effect of HOB on both insulin and pervanadate activation of PKB. Our results demonstrated that HOB impairs PKB phosphorylation by both agonists in adult cardiomyocytes. It has been shown that PKB lies downstream of the insulin receptor-IRSs-PI 3-kinase signaling pathway. The induction of insulin resistance caused by ketone bodies could therefore arise from impaired activation of this signaling cascade resulting in decreased PKB activation. Alternatively, the block in insulin action following ketone body treatment could directly target PKB. In skeletal muscle, both mechanisms have been implicated in the development of insulin resistance by different fatty acids. Infusion of a mixture of fatty acids reduced both IRS-1 tyrosine phosphorylation and PI 3-kinase activity in human skeletal muscle (8). On the other hand, Schmitz-Pieffer et al (38) have shown that the fatty acid palmitate inhibits PKB activation by insulin without altering IRS-1 phosphorylation and PI 3-kinase activation in response to the hormone. While we have established that ketone bodies act at the level of PKB, it remains to be determined whether this effect involves alteration in PI 3-kinase activation and/or direct inhibition of PKB. Potentially, ketone bodies could activate a phosphatase resulting in enhanced PKB dephosphorylation and thus inactivation of the enzyme. Selective dephosphorylation and inhibition of PKB by the phosphatase PP2A has been observed following an osmotic shock (30). Interestingly, hyperosmotic stress also prevents PKB activation in response to pervanadate (30). It is therefore possible that ketone bodies antagonize both insulin and pervanadate action in cardiomyocytes by promoting PKB dephosphorylation.

In conclusion, our results demonstrate that chronic exposure to ketone bodies inhibits insulin-stimulated glucose uptake in primary cultures of adult cardiomyocytes. This effect is both time and concentration dependent. Ketone bodies also alter the ability of both phorbol esters and pervanadate to stimulate glucose uptake in these cells. Our data also indicate that ketone bodies pretreatment is associated with impaired PKB activation in response to insulin and pervanadate.

Acknowledgements

The authors thank Marie-Claude Guertin for statistical analysis and Dr. T. Ramasarma from the Indian Institute of Science, India for the generous gift of potassium diperoxovanadate. The Canadian Diabetes Association and Association Diabète Québec supported this work. LC is a scholar of the Canadian Diabetes Association.

Abbreviations

The abbreviations used are: PI 3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; BSA, bovine serum albumin; FFA, free fatty acid; PKB, protein kinase B; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; DAG, diacylglycerol; Bq, Becquerel.

References

1. Avogaro A, Crepaldi C, Miola M, Maran A, Pengo V, Tiengo A, and Del Prato S. High blood ketone body concentration in type 2 non-insulin dependent diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 19: 99-105, 1996.
2. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, and Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1104-E1113, 2000.
3. Bell DSH. Diabetic cardiomyopathy. A unique entity or a complication of coronary artery disease? *Diabetes Care* 18: 708-714, 1995.
4. Bell GI, Burant CF, Takeda J, and Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268: 19161-19164, 1993.
5. Botker HE, Goodwin GW, Holden JE, Doenst T, Gjedde A, and Taegtmeyer H. Myocardial glucose uptake measured with fluorodeoxyglucose: a proposed method to account for variable lumped constants. *J Nucl Med* 40: 1186-1196, 1999.
6. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, and Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292: 1728-1731, 2001.
7. Coderre L, Monfar MM, Chen KS, Heydrick SJ, Kurowski TG, Ruderman NB, and Pilch PF. Alteration in the expression of GLUT-1 and GLUT-4 protein and messenger RNA levels in denervated rat muscles. *Endocrinology* 131: 1821-1825, 1992.
8. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF, and Shulman GI. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103: 253-259, 1999.
9. Eckel J, Asskamp B, and Reinauer H. Induction of insulin resistance in primary cultured adult cardiac myocytes. *Endocrinology* 129: 345-352, 1991.
10. Ferri C, Carlomagno A, Coassin S, Baldoncini R, Cassone Faldetta MR, Laurenti O, Properzi G, Santucci A, and De Mattia G. Circulating endothelin-1 levels increase during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM men. *Diabetes Care* 18: 226-233, 1995.
11. Fischer Y, Becker C, and Löken C. Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 274: 755-761, 1999.
12. Fischer Y, Bottcher U, Eblenkamp M, Thomas J, Jungling E, Rosen P, and Kammermeier H. Glucose transport and glucose transporter GLUT4 are regulated by product(s) of intermediary metabolism in cardiomyocytes. *Biochem J* 321 (Pt 3): 629-638, 1997.
13. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Kammermeier H, and Zorzano A. Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 272: 7085-7092, 1997.
14. Garvey WT, Olefsky JM, Matthaei S, and Marshall S. Glucose and insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. A new mechanism of insulin resistance. *J Biol Chem* 262: 189-197, 1987.

15. Hajdуч E, Alessi DR, Hemmings BA, and Hundal RS. Constitutive activation of protein kinase B α by membrane targeting promotes glucose and system A amino acid transport, protein synthesis, and inactivation of glycogen synthase kinase 3 in L6 muscle cells. *Diabetes* 47: 1006-1013, 1998.
16. Hansen BF, Hansen SA, Ploug T, Bak JF, and Richter EA. Effects of glucose and insulin on development of impaired insulin action in muscle. *Am J Physiol* 262: E440-E446, 1992.
17. Hansen PA, Corbett JA, and Holloszy JO. Phorbol esters stimulate muscle glucose transport by a mechanism distinct from the insulin and hypoxia pathways. *Am J Physiol* 273: E28-E36, 1997.
18. Hill MM, Clark SF, Tucker DF, Birnbaum MJ, James DE, and Macaulay L. A role for protein kinase B β /Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol Cell Biol* 19: 7771-7781, 1999.
19. Ikeda T, Ohtani I, Fujiyama K, Hoshino T, Tanaka Y, Takeuchi T, and Mashiba H. Uptake of beta-hydroxybutyrate in perfused hindquarter of starved and diabetic rats. *Metabolism* 40: 1287-1291, 1991.
20. Jenkins AB, Storlien LH, Chisholm DJ, and Kraegen EW. Effects of nonesterified fatty acid availability on tissue-specific glucose utilization in rats in vivo. *J Clin Invest* 82: 293-299, 1998.
21. Jensen J, Aslesen R, Ivy JL, and Brors O. Role of glycogen concentration and epinephrine on glucose uptake in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 272: E649-E655, 1997.
22. Kohn AD, Summers SC, Birnbaum MJ, and Roth RA. Expression of a constitutively active Akt ser/thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271: 31372-31378, 1996.
23. Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, and Zierath JR. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated Akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic Goto-Kakizaki rats. *Diabetes* 46: 2110-2114, 1997.
24. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, and Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47: 1281-1286, 1998.
25. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-426, 1999.
26. Leighton B, Cooper GJ, DaCosta C, and Foot EA. Peroxovanadates have full insulin-like effects on glycogen synthesis in normal and insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J* 276 (Pt 2): 289-292, 1991.
27. Lommi J, Koskinen P, Naveri H, Harkonen M, and Kupari M. Heart failure ketosis. *J Intern Med* 242: 231-238, 1997.
28. Lommi J, Kupari M, Koskinen P, Naveri H, Leinonen H, Pulkki K, and Harkonen M. Blood ketone bodies in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 665-672, 1996.

29. Manchester J, Kong X, Nerbonne J, Lowry OH, and Lawrence JC, Jr. Glucose transport and phosphorylation in single cardiac myocytes: rate-limiting steps in glucose metabolism. *Am J Physiol* 266: E326-E333, 1994.
30. Meier R, Thelen M, and Hemmings BA. Inactivation and dephosphorylation of protein kinase Balpha (PKBalpha) promoted by hyperosmotic stress. *EMBO J* 17: 7294-7303, 1998.
31. Menahan LA, Hron WT. Regulation of acetoacetyl-CoA in isolated perfused rat hearts. *Eur J Biochem* 119: 295-299, 1981.
32. Murthy VK, Shipp JC. Accumulation of myocardial triglycerides ketotic diabetes; evidence for increased biosynthesis. *Diabetes* 26: 222-229, 1977.
33. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, and Newsholm EA. The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789, 1963.
34. Ravishankar NH, Chaudhuri MK, and Ramasarma T. Oxygen-exchange reactions accompanying oxidation of vanadyl sulfate by diperoxovanadate. *Inorg Chem* 33: 3788-3793, 1994.
35. Richter EA, Hansen SA, and Hansen BF. Mechanisms limiting glycogen storage in muscle during prolonged insulin stimulation. *Am J Physiol* 255: E621-E628, 1988.
36. Russell RR, Yin R, Caplan MJ, Hu X, Ren J, Shulman GI, Sinusas AJ, and Young LH. Additive effects of hyperinsulinemia and ischemia on myocardial GLUT1 and GLUT4 translocation in vivo. *Circulation* 98: 2180-2186, 1998.
37. Russell RR, III, Cline GW, Guthrie PH, Goodwin GW, Shulman GI, and Taegtmeyer H. Regulation of exogenous and endogenous glucose metabolism by insulin and acetoacetate in the isolated working rat heart. A three tracer study of glycolysis, glycogen metabolism, and glucose oxidation. *J Clin Invest* 100: 2892-2899, 1997.
38. Schmitz-Peiffer C, Craig DL, and Biden TJ. Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274: 24202-24210, 1999.
39. Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, and Zierath JR. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes* 48: 664-670, 1999.
40. Sowers JR, Lester MA. Diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 22 (Suppl. 3): C14-C20, 1999.
41. Taegtmeyer H. On the inability of ketone bodies to serve as the only energy providing substrate for rat heart at physiological work load. *Basic Res Cardiol* 78: 435-450, 1983.
42. Thomson MJ, Williams MG, and Frost SC. Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 272: 7759-7764, 1997.
43. Touyz RM, Fareh J, Thibault G, and Schiffrin EL. Intracellular Ca²⁺ modulation by angiotensin II and endothelin-1 in cardiomyocytes and fibroblasts from hypertrophied hearts of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 28: 797-805, 1996.
44. Tsiani E, Bogdanovic E, Sorisky A, Nagy L, and Fantus IG. Tyrosine phosphatase inhibitors, vanadate and pervanadate, stimulate glucose transport and GLUT

- translocation in muscle cells by a mechanism independent of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C. *Diabetes* 47: 1676-1686, 1998.
45. Ueki K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Yamauchi T, Tobe K, Burgering BM, Coffey PJ, Komuro I, Akanuma Y, Yazaki Y, and Kadowaki T. Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis. *J Biol Chem* 273: 5315-5322, 1999.
 46. Wheeler TJ, Fell RD, and Hauck MA. Translocation of two glucose transporters in heart: effects of rotenone, uncouplers, workload, palmitate, insulin and anoxia. *Biochim Biophys Acta* 1196: 191-200, 1994.
 47. Wiener R, Spitzer JJ. Substrate utilization by myocardium and skeletal muscle in alloxan- diabetic dogs. *Am J Physiol* 225: 1288-1294, 1973.
 48. Zorzano A, Sevilla L, Camps M, Becker C, Meyer J, Kammermeier H, Munoz P, Gumà A, Testar X, Palacin M, Blasi J, and Fischer Y. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: Studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol* 80: 65A-76A, 1997.

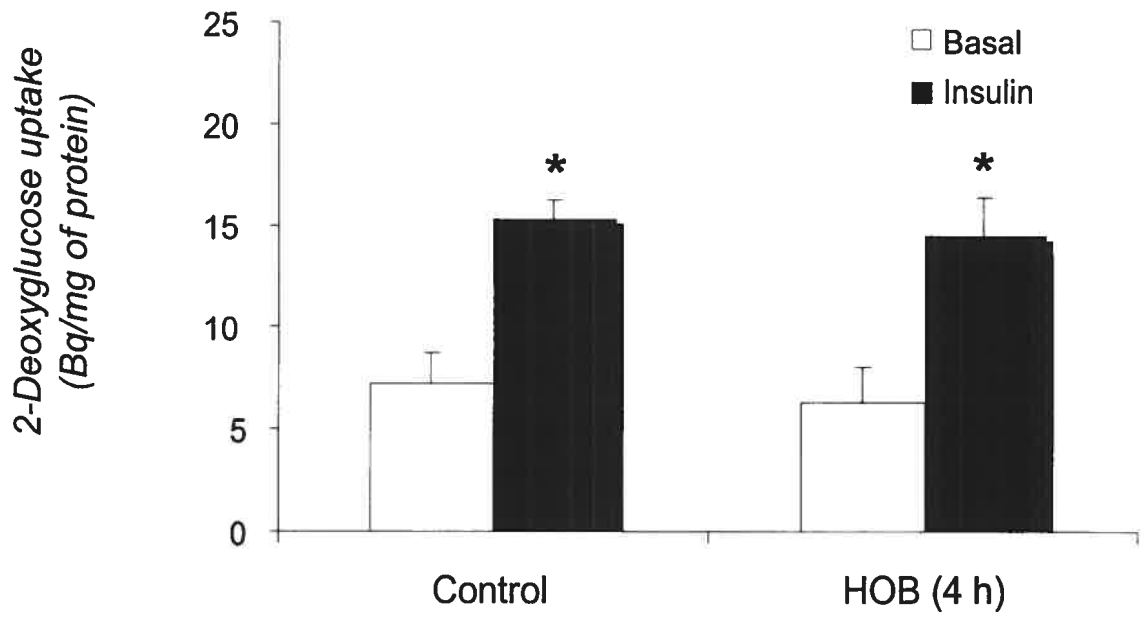
Figure legends

- Figure 1:** Incubation of cardiomyocytes with the ketone body, β -hydroxybutyrate (HOB), for 4 (A) or 16 h (B) before glucose uptake. Data shown in A and B are from 5 and 10 independent experiments respectively. $*p < 0.05$ basal versus insulin-treated cells, $\dagger p < 0.05$ different then insulin-stimulated control.
- Figure 2:** Incubation of cardiomyocytes with increasing concentrations of HOB for 16 h before glucose uptake. Data shown are from 7 independent experiments. $*p < 0.05$ basal versus insulin-treated cells; $\dagger p < 0.05$ different then insulin-stimulated control (0 mM HOB).
- Figure 3:** Incubation of control and HOB-treated cardiomyocytes with media containing either 10^{-7} or 10^{-11} M insulin for 16 h before glucose uptake. Data shown are from 5 independent experiments. $*p < 0.05$ basal versus insulin-treated cells; $\dagger p < 0.05$ different then insulin-stimulated control.
- Figure 4:** Removal of ketone bodies for 4, 6 or 8 h. Cardiomyocytes were pretreated with HOB for 16 h before the removal ketone bodies for 4, 6 or 8 h before glucose uptake. Data shown are from 5 independent experiments. $*p < 0.05$ basal versus insulin-treated cells.
- Figure 5:** Effect of ketone body-pretreatment on the activation of glucose uptake by the phorbol ester PMA (A) and by pervanadate (B). Data shown are from 5 independent experiments $*p < 0.05$ basal versus insulin-treated cells; $**$ basal versus PMA-treated cells; $\dagger p < 0.05$ different then insulin-stimulated control cells; $\# p < 0.05$ basal versus pervanadate-treated cells; $\# \# p < 0.05$ different then pervanadate-stimulated control cells

Figure 6: Total GLUT4 (A) and GLUT1 (B) immunoreactive protein in control and HOB-treated cardiomyocytes.

Figure 7: PKB activation by insulin and pervanadate (PV) in control and HOB-treated cardiomyocytes. A: representative immunoblot of phospho-PKB. **B:** representative immunoblot of total α PKB. **C:** The ratio of signal derived from scanning phosphorylated PKB over signal derived from total PKB was calculated.

A



B

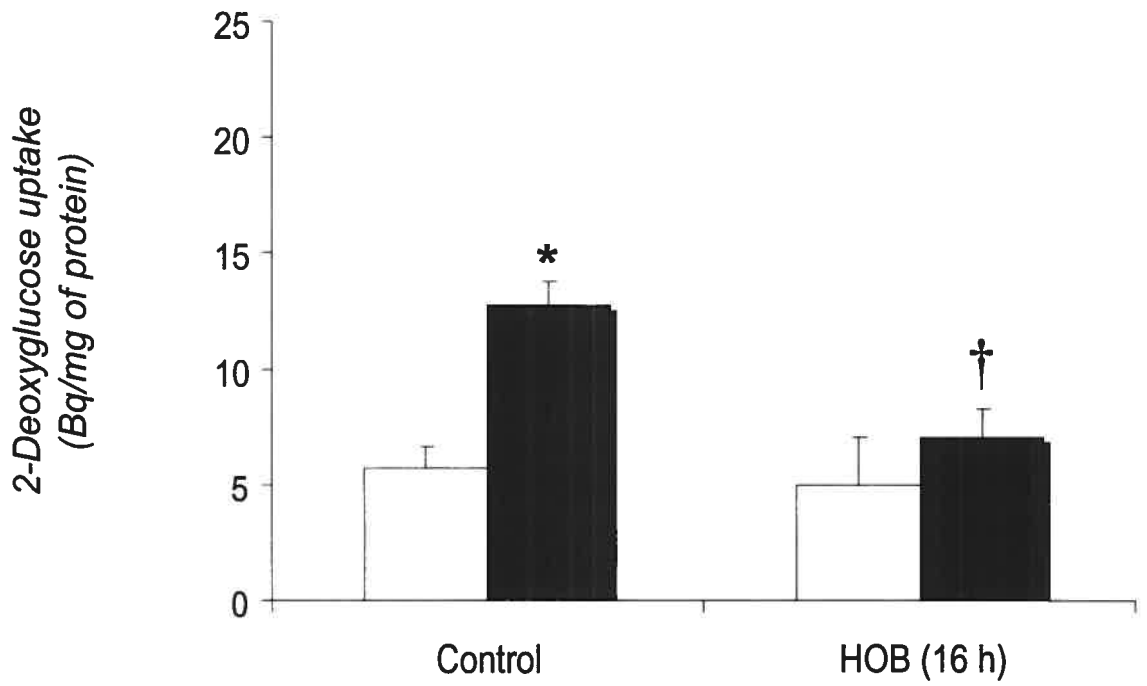


Figure 1

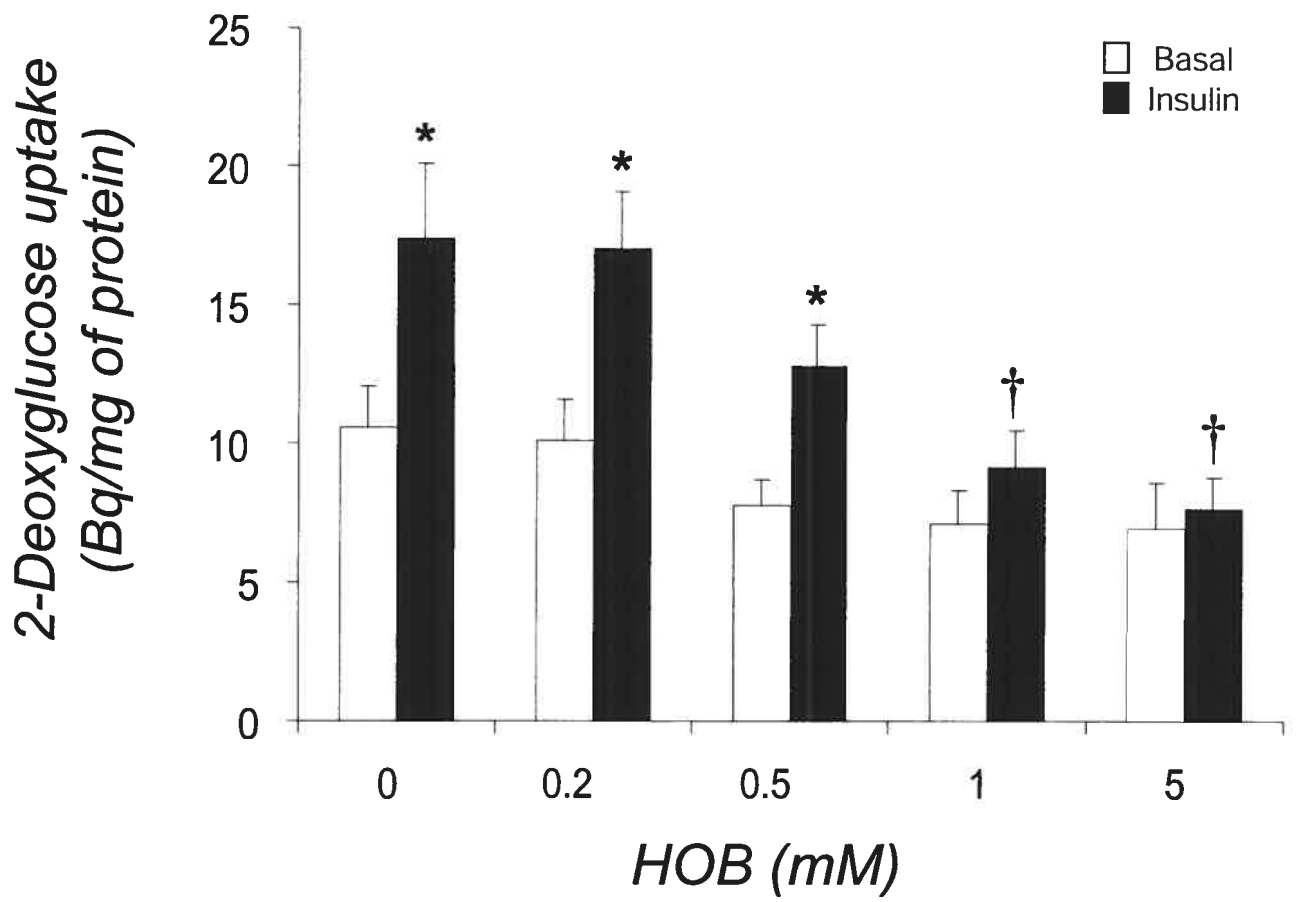


Figure 2

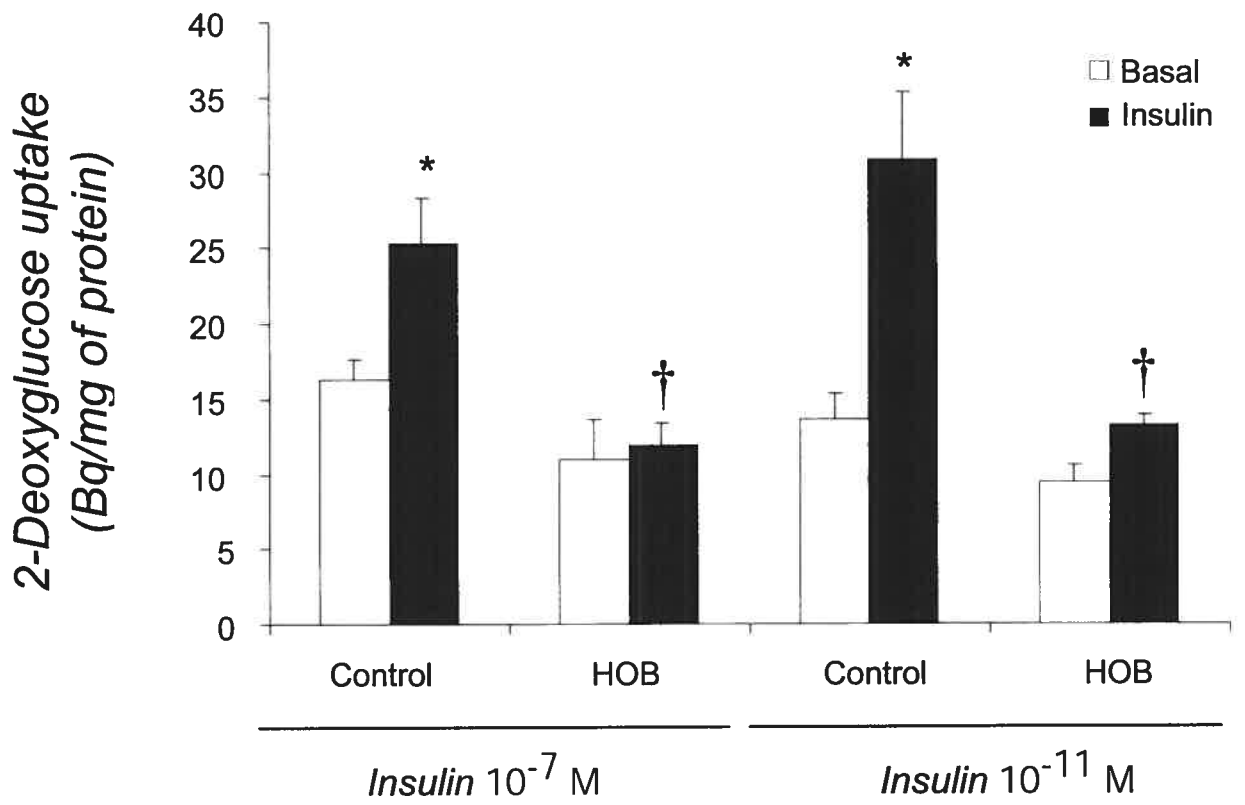


Figure 3

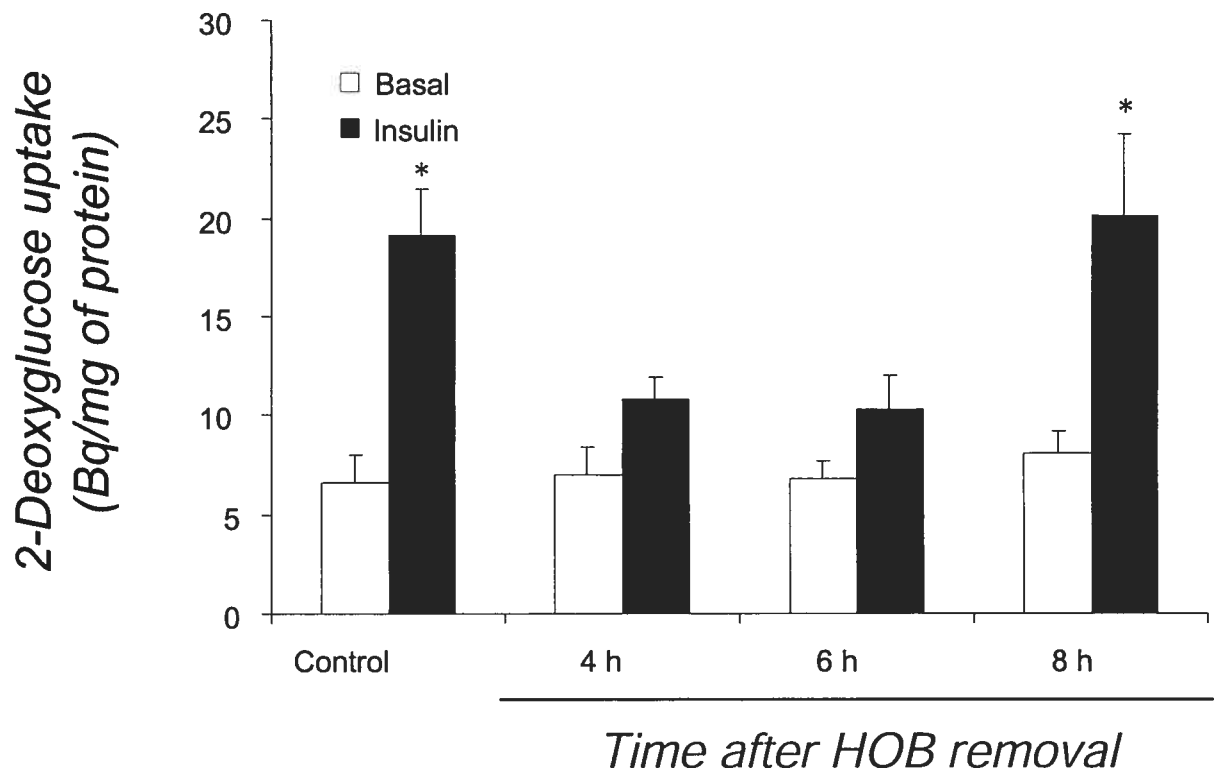


Figure 4

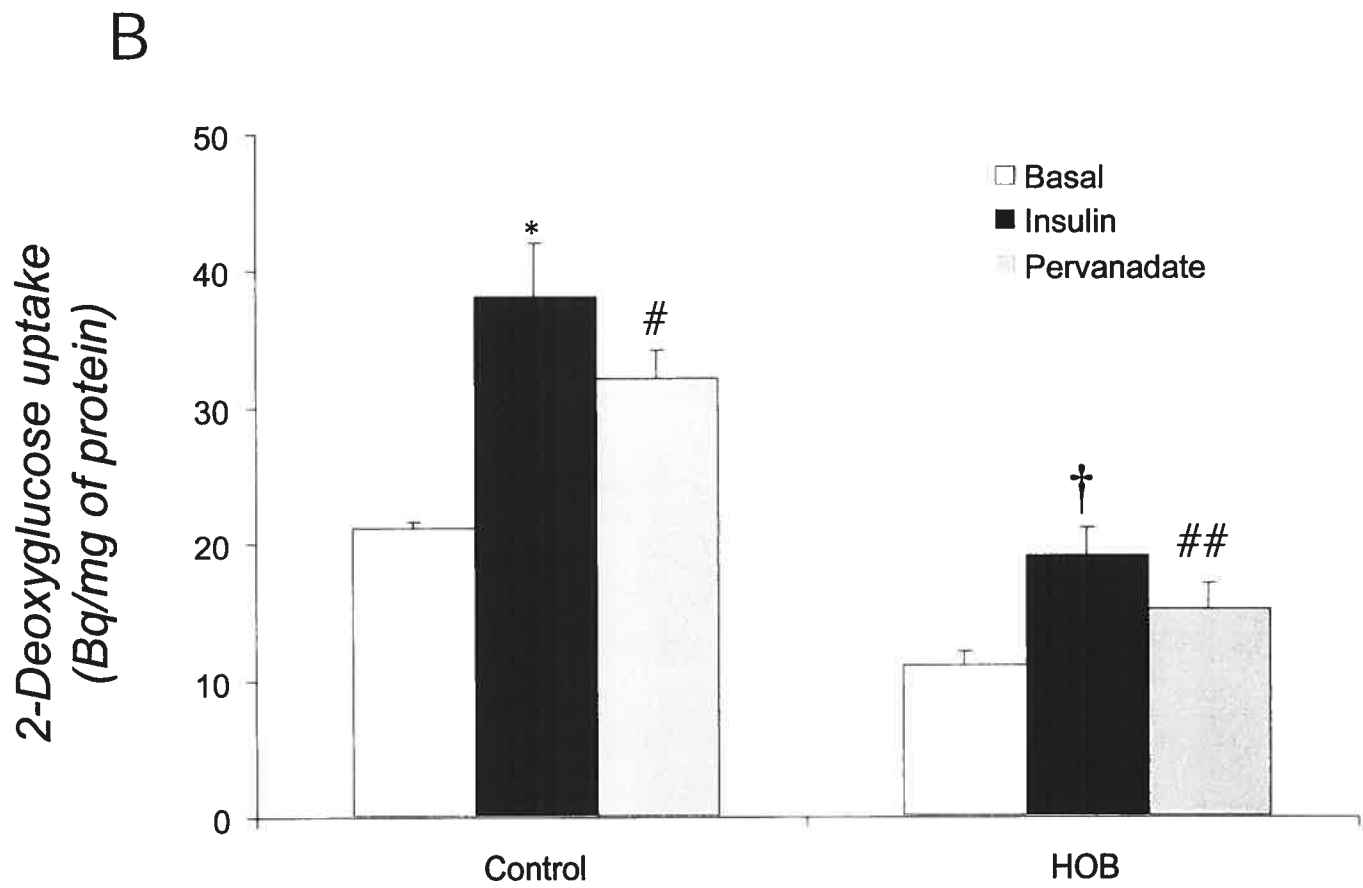
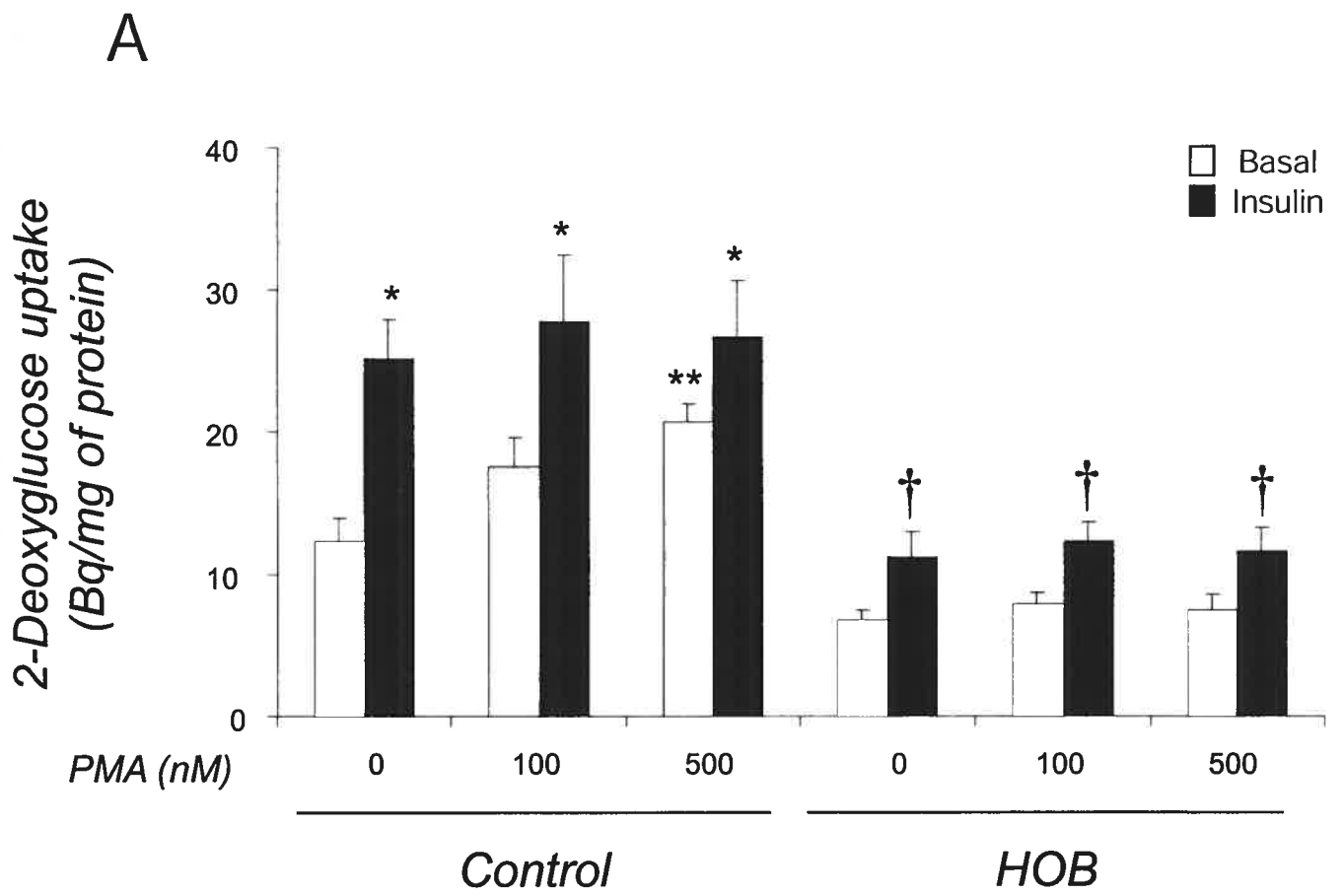


Figure 5

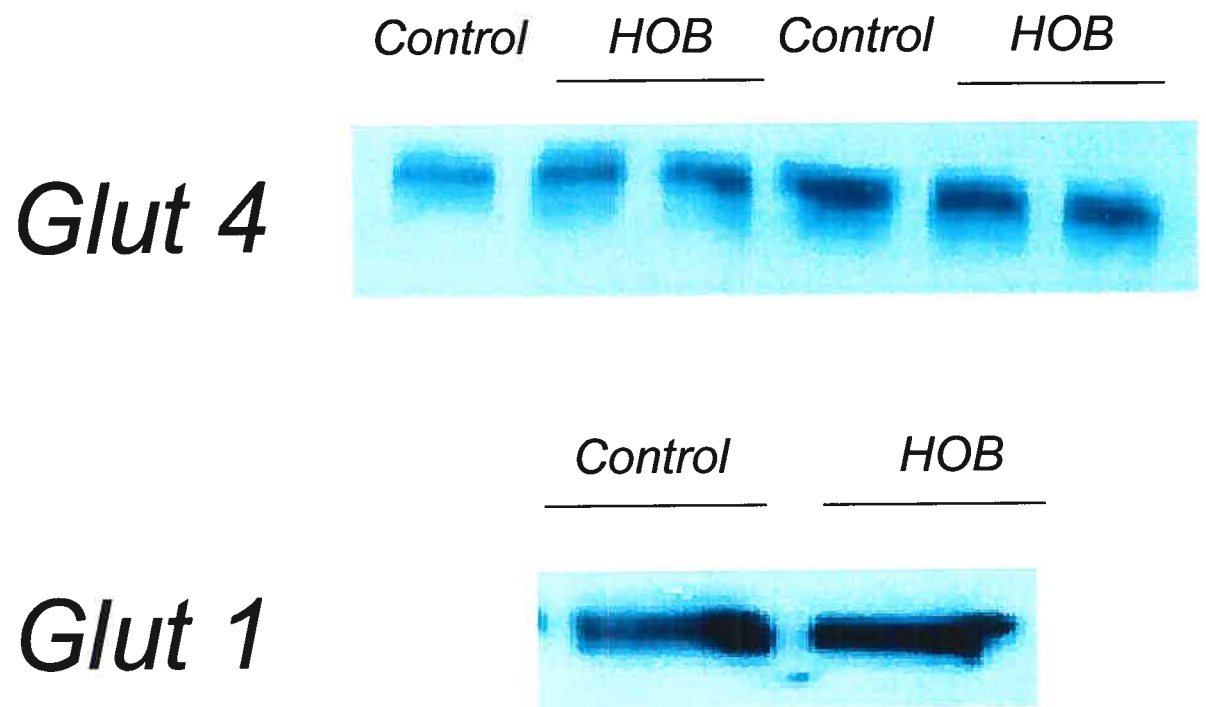


Figure 6

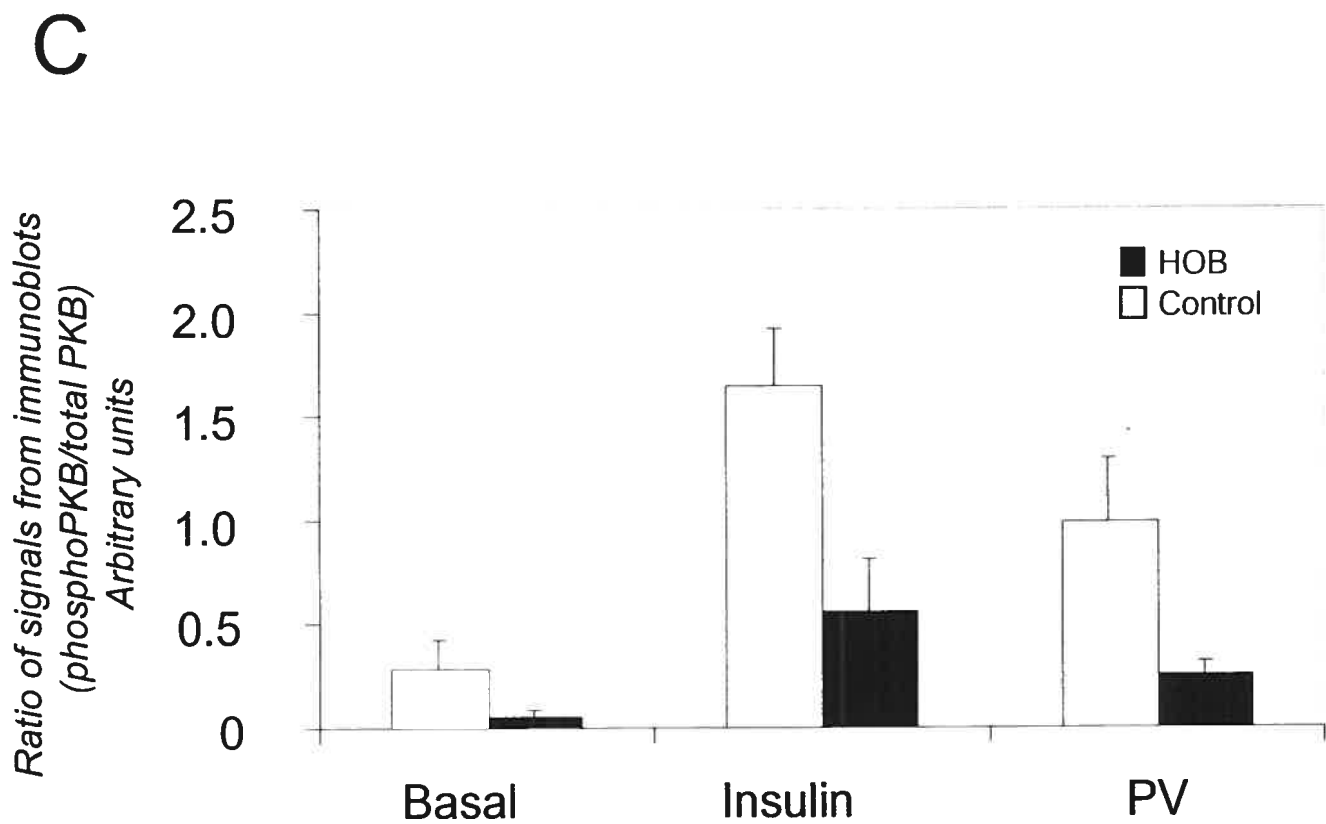
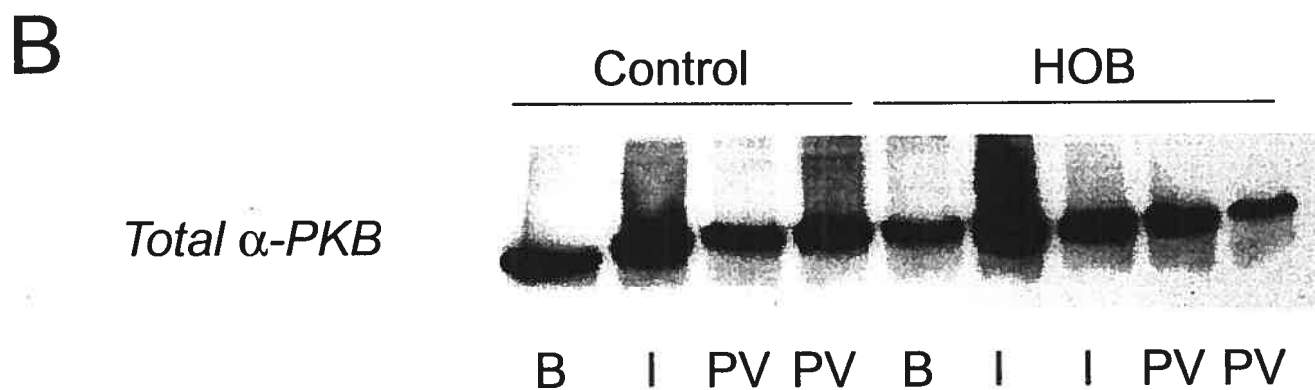
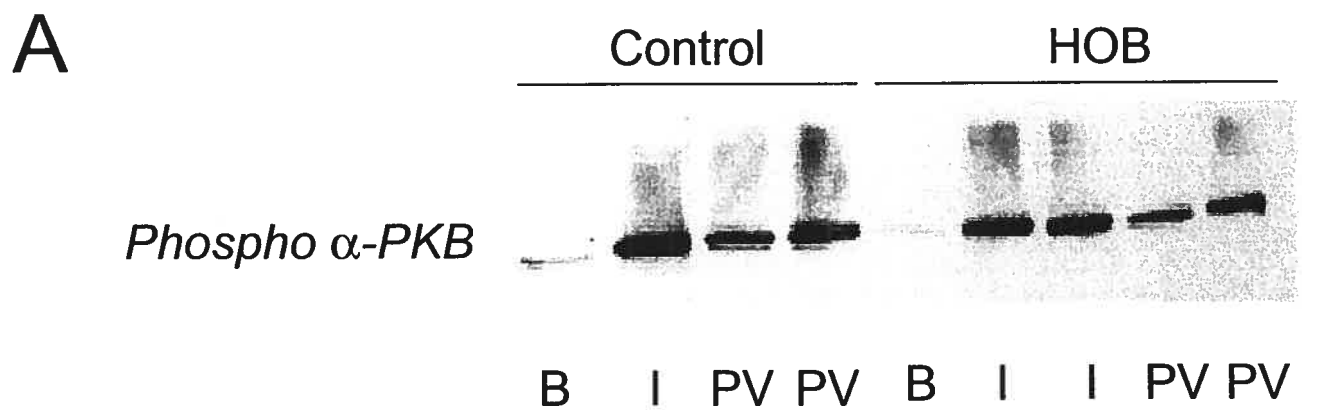


Figure 7

Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K

Amélie Pelletier, Annie Tardif, Marie-Hélène Gingras,

Jean-Louis Chiasson and Lise Coderre[†]

Publié dans: Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, sous presse
with kind permission of Springer Science and Business Media

Running title: Ketone bodies impair insulin signaling in cardiomyocytes

From the Montreal Diabetes Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu, and the Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed:

Lise Coderre, Ph.D.

Research Centre


CHUM-Hôtel-Dieu

3850 St. Urbain

Montréal (Québec) Canada H2W 1T7

Tel.: (514) 890-8000 ext 15092

Fax: (514) 412-7208



Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3K

Amélie Pelletier, Annie Tardif, Marie-Hélène Gingras,

Jean-Louis Chiasson and Lise Coderre[†]

Publié dans: Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, sous presse

Contribution des co-auteurs :

A.P. a participé à la conceptualisation des expériences, à la réalisation des expériences sur l'effet du β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse au vanadate et à celles portant sur l'activation des différentes enzymes et récepteur. Elle a analysé tous les résultats et écrit le papier.

A.T. a réalisé la plupart des expériences portant sur l'effet du β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse au vanadate. Elle a également réalisé certaines expériences portant sur l'activation du récepteur à l'insuline, de l'IRS-1, la p85 et de la PKB en réponse à l'insuline et au vanadate dans les cardiocytes incubés avec le β -hydroxybutyrate.

M.-H.G. a réalisé quelques expériences portant sur l'effet du β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse au vanadate. Elle a également mesuré l'effet du β -hydroxybutyrate et du vanadate sur l'expression de l'IRS-1.

Abstract

There is a strong positive correlation between insulin resistance and cardiac diseases. We have already shown that chronic exposure to the ketone body β -hydroxybutyrate (OHB) decreases insulin-mediated activation of protein kinase B (PKB) and glucose uptake in cardiomyocytes. To gain further insights into the mechanism underlying ketone body-induced insulin resistance, we examined whether OHB alters activation of the insulin-signaling cascade and whether the insulinomimetic agent vanadate could bypass insulin resistance and stimulate glucose uptake in these cells. Cardiomyocytes were incubated with 5 mM OHB, 50 μ M vanadate or both for 16 h before the measurement of glucose uptake or the activation of insulin-signaling molecules. While chronic exposure to OHB did not alter insulin- or vanadate-mediated activation of the insulin receptor, it suppressed IRS-1 tyrosine phosphorylation in response to both agonists. Furthermore, this treatment decreased by 54% and 36% the phosphorylation of the p85 regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and PKB in response to insulin whereas it did not alter vanadate-mediated activation of these enzymes. Although insulin did not significantly stimulate p38MAPK phosphorylation, vanadate increased it by 3.8-fold. Furthermore, chronic exposure to OHB potentiated vanadate's action, resulting in a 250% increase in enzyme activation compared to control cells. Though OHB induced a 2.1-fold increase of basal ERK1/2 phosphorylation, inhibition of this enzyme with the MEK inhibitor PD98059 demonstrated that ERK1/2 did not participate in OHB-induced insulin resistance. In conclusion, ketone bodies promote insulin resistance probably through decreased activation of the PI3-K/PKB signaling cascade. Furthermore, vanadate can bypass insulin resistance and stimulate glucose uptake in OHB-treated cardiomyocytes.

Key words: glucose transport, insulin resistance, beta-hydroxybutyrate, vanadium, heart

Introduction

Non-obese, insulin-resistant patients have a significantly higher incidence of heart disease than healthy, insulin-sensitive subjects, and it has been postulated that myocardial insulin resistance may be one of the causal factors in the development of heart disease (1;2). Prospective studies have suggested that reduction of insulin-mediated glucose uptake is an independent prognostic factor for the development of heart failure (3). In the heart, a decrease in insulin-stimulated glucose uptake has been observed in type 1 and type 2 diabetic patients (2;4;5) as well as in Zucker fatty rats (6), a model of obesity-induced insulin resistance. Interestingly, in obese Zucker rats, administration of rosiglitazone, an insulin sensitizer, improves cardiac glucose uptake and protects the myocardium against ischemic injury (6). Furthermore, overexpression of GLUT-4 in the heart increases glucose uptake and improves cardiac function of db/db diabetic mice (7).

The insulin receptor (IR) is a tyrosine kinase that undergoes autophosphorylation and activation upon insulin binding. Once activated, it phosphorylates insulin receptor substrate-1 (IRS-1) on tyrosine residues (8;9). The phosphorylated IRS-1 then binds to the SH2 domain of p85, the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) which, in turn, activates its p110 catalytic subunit and the production of phosphoinositides (10). Numerous studies have demonstrated that PI3-K activation is required for insulin-stimulated glucose uptake (9;11). One of the downstream effectors of PI3-K is protein kinase B (PKB) (12). It has been reported that overexpression of constitutively-active PKB increases glucose uptake in cardiomyocytes (13). In addition to the PI3-K-dependent signaling cascade, insulin also activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, including ERK1/2 and p38MAPK. While ERK1/2 activation has been involved in the mitogenic action of insulin (14), p38MAPK activation has been implicated in the regulation of glucose uptake through the modulation of GLUT-4 intrinsic activity (15).

Vanadium compounds are inhibitors of protein tyrosine phosphatases that can mimic insulin's action (16). Administration of these compounds to diabetic animals (17;18) and humans (19) improves insulin sensitivity and decreases plasma glucose levels. In the heart, studies have also demonstrated that vanadate administration improves insulin-induced glucose uptake (20) and the cardiac function (21) of diabetic

animals. We have shown recently that chronic exposure to vanadate activates the insulin-signaling pathway in a concentration-dependent manner in adult cardiomyocytes (22). Similar to insulin, vanadate-enhanced glucose uptake requires PI3-K activation in cardiomyocytes (22). Furthermore, we have demonstrated that p38MAPK is also implicated in vanadate-induced glucose uptake in a PI3-K-independent manner (22).

Elevated circulatory levels of ketone bodies are observed in various physiological and pathophysiological situations such as type 1 and type 2 diabetes (23), starvation (23), and chronic heart failure (24). Cardiomyopathy has also been identified as a ketogenic diet-related complication (25;26). In congestive heart failure, the concentration of circulating ketone bodies correlates with the severity of cardiac dysfunction (27). Interestingly, diabetic patients with episodes of ketosis have an increased risk of cardiovascular mortality (28). We have already shown that chronic exposure to the ketone body β -hydroxybutyrate (OHB) inhibits insulin-mediated PKB phosphorylation and glucose uptake in cardiomyocytes (29). This alteration of insulin-mediated glucose uptake cannot be explained by diminished GLUT-1 or GLUT-4 protein content.

The aim of our study was to provide further insight into the underlying molecular mechanism involved in OHB-induced insulin resistance. To address this question, we examined the signaling molecules activated in response to insulin in OHB-treated cardiomyocytes, and determined whether chronic exposure to vanadate can prevent OHB-induced insulin resistance.

Experimental procedures

Chemicals

All cell culture solutions, fatty acid-free bovine serum albumin (FAF BSA), water, supplements, vanadyl sulfate (VS), OHB and DNase I were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Collagenase was obtained from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). Human insulin (Humulin™ R) was procured from Eli Lilly Canada Inc. (Toronto, ON, Canada). Phospho-PKB (ser 473), PKB, phospho-p38MAPK (Thr 180/Tyr 182) and p38MAPK antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) while anti-phosphotyrosine was from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). IR β , IRS-1, p85 α (p85), phospho-ERK1/2 and ERK1/2 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Protein A sepharose was purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). Perkin Elmer (Woodbridge, ON, Canada) supplied [³H] 2-deoxyglucose (DG). Polyvinylidene difluoride membranes were purchased from Immobilon Millipore (Bedford, MA). The enhanced chemiluminescence detection system was bought from Amersham Pharmacia Biotech. PD98059 was from Calbiochem (La Jolla, CA). The Bradford protein assay kit was from Bio-Rad (Hercules, CA). All electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada).

Isolation of adult rat cardiomyocytes

All experiments conformed to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Male Sprague-Dawley rats weighing 175-200 g were injected intraperitoneally with 500 U heparin sulfate 15 min prior to anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, intraperitoneally). The heart was excised, and calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method as described (29). During the whole procedure, the cells were maintained at 37°C. Briefly, all hearts were rinsed (4 ml/min) in Krebs-Ringer (KR) buffer containing (in mM) 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11 dextrose and 25 HEPES, pH 7.4, and supplemented with 1.25 CaCl₂. After 5 min, the perfusate was switched to calcium-free KR for 5 min to stop spontaneous cardiac contractions. This was followed by perfusion with KR buffer

supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM 2-3 butanedione monoxime and 0.1% FAF BSA for 15 min. For the last 5 min of perfusion, KR buffer was supplemented with 0.05 mM CaCl₂. The ventricles were then separated from the atria and minced in KR buffer supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM 2-3 butanedione monoxime, 0.2 mg/ml DNase I, 0.1 mM CaCl₂ and 0.1% FAF BSA. The resulting cell suspension was filtered through a nylon mesh and centrifuged at 1,000 g for 45 sec. The cells were washed twice and diluted in medium 199 supplemented with 11 mM glucose, 0.2% FAF BSA, 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 5 mM taurine, 10⁻⁷ M insulin, 0.1 M ascorbic acid, 100 IU/ml penicillin, 25 µg/ml gentamicin and 100 mg/ml streptomycin, then plated onto laminin-coated dishes. Cell viability was determined by the percentage of rod-shaped cells and averaged 90-95%. After 4 h, they were washed to remove damaged cells and debris. The remaining cells were incubated at 37°C for 16 h in media containing 10⁻¹¹ M insulin and 5.5 mM glucose supplemented or not with 50 µM vanadate, 5 mM OHB, or a combination of both. We have previously shown that 50 µM vanadate induced 4.1-fold stimulation of glucose uptake whereas acute insulin stimulation augmented this process by 2.4-fold. Furthermore, the concentration of insulin present in media during the 16-h incubation did not alter insulin or vanadate actions on glucose uptake, nor did it affect OHB-induced insulin resistance in cardiomyocytes (22;29) In some experiments, 5 mM OHB, 10 µM PD98059, an inhibitor of MEK, or a combination of both was added at this step, as indicated in the figure legends.

Glucose uptake in primary cultures of cardiomyocytes

The cells were washed twice with 1 ml of KR buffer to remove insulin, OHB and vanadate. They were then incubated for 30 min in 1 ml of KR buffer containing 5 mM glucose and 0.2% FAF BSA. The glucose uptake assay was started by the addition of 1 $\mu\text{Ci/ml}$ DG and KR buffer (basal) or 10^{-7} M insulin, and measured as described previously (29). Glucose uptake measurement was terminated by 3 rapid washes with 1 ml of ice-cold KR buffer. The cells were disrupted with 0.5 ml of 0.5 M NaOH for 60 min at 37°C , and cell-associated radioactivity was quantified by scintillation counting. Glucose uptake was normalized to total protein, as measured by Bio-Rad assay, and expressed as Bq/mg of protein.

Cardiomyocyte lysates

The cells were washed twice with media containing no insulin, OHB or vanadate. They were then incubated for 1 h in media containing no OHB, vanadate or insulin before stimulation with KR buffer (basal) or 10^{-7} M insulin for 5 min except for the determination of p38MAPK phosphorylation, where the cells were incubated with the hormone for 10 min. The reaction was stopped by 3 rapid washes with ice-cold KR buffer. The cells were then lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1% Triton X-100 and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The lysate was centrifuged for 5 min at 12,000 g at 4°C to remove insoluble material, and the resulting supernatant was taken for immunoprecipitation and immunoblotting.

Immunoprecipitation

Cell lysates (1 mg of protein) were incubated overnight with either IR β or anti-phosphotyrosine antibodies at 4°C . Antigen-antibody complexes were immunoprecipitated with protein A sepharose beads for 2 h at 4°C . The immunoprecipitate was then washed 3 times in lysis buffer before solubilization in Laemmli buffer.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Equal amounts of protein, measured by Bio-Rad assay, were electrophoresed on 7.5% or 10% SDS-polyacrylamide gels, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes for Western blotting. The membranes were blocked for 1 h with 5% (wt/vol) milk in PBST, pH 7.4, containing 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20 and 0.02% sodium azide. They were then incubated with the primary antibody, followed by incubation with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Antigen-antibody complexes were detected by the enhanced chemiluminescence method. Quantitative analysis was performed with a scanning densitometer.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied for multiple comparisons, followed by the Bonferroni/Dunn *post hoc* test. A 2-tailed Student's *t* test was performed when 2 groups were compared. All data are reported as means \pm SE. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results

Chronic exposure to OHB impairs the stimulation of glucose uptake by insulin but not by vanadate

We have demonstrated previously that chronic exposure to 5 mM OHB maximally inhibits insulin-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes (29). We have also shown that chronic exposure to 50 μ M vanadate increases glucose uptake in cardiomyocytes (22). It has been reported that vanadate can stimulate glucose uptake in insulin-resistant cells (30). The present study, thus, examined whether chronic exposure to vanadate could bypass OHB-induced insulin resistance in cardiomyocytes. Cells were exposed to 5 mM OHB, 50 μ M vanadate, or both for 16 h before measurement of glucose uptake. As illustrated in Figure 1, in control cells, acute stimulation with insulin increased glucose uptake by 2.1-fold ($P<0.04$) whereas chronic exposure to vanadate enhanced this process by 3.9-fold ($P<0.001$). Chronic exposure to OHB provoked a 40% decrease in basal glucose uptake ($P<0.03$). This treatment also inhibited insulin-mediated glucose uptake by 45% in cardiomyocytes ($P<0.007$) (Figure 1A), resulting in a 49% decrease in the net effect of insulin on glucose uptake ($P<0.02$) (Figure 1B). In contrast to insulin, OHB did not impair vanadate's action, and a 8.4-fold increase in glucose uptake was observed in these cells ($P<0.001$).

Chronic exposure to OHB does not alter IR phosphorylation in response to insulin and vanadate

To gain insights into the molecular mechanisms by which ketone bodies induce insulin resistance and to better understand vanadate's action, we evaluated activation of the insulin-signaling cascade in OHB-treated cardiomyocytes in response to either acute insulin stimulation or chronic exposure to vanadate (16 h). We first examined IR concentration and activation by insulin or vanadate in these cells. As shown in Figure 2A, OHB did not affect the IR concentration in cardiomyocytes. Insulin and vanadate induced 32- ($P<0.002$) and 5.3-fold ($P<0.04$) increases in IR tyrosine phosphorylation, respectively, and this response was not altered by OHB. To further characterize the OHB action, we calculated the net stimulatory effect of insulin and vanadate over basal phosphorylation in control and OHB-treated cells. Chronic exposure to OHB did not

affect the net stimulatory effect of insulin and vanadate on IR phosphorylation in these cells (Figure 2B).

Chronic exposure to OHB inhibits IRS-1 tyrosine phosphorylation in response to insulin and vanadate

We then tested the effect of OHB on IRS-1 tyrosine phosphorylation in response to insulin and vanadate. Similarly to what we observed for the IR, chronic exposure to OHB did not alter IRS-1 protein content in cardiomyocytes (Figure 3A). Stimulation with either insulin or vanadate increased IRS-1 tyrosine phosphorylation by 15-fold ($P<0.01$) (Figure 3A), an effect that was abolished by ketone body treatment. Thus, chronic exposure to OHB completely suppressed the net stimulatory effect of insulin and vanadate on IRS-1 tyrosine phosphorylation in cardiomyocytes ($P<0.05$) (Figure 3B).

Chronic exposure to OHB inhibits p85 tyrosine phosphorylation by insulin but not by vanadate

PI3-K activation is required for the stimulation of glucose uptake in response to both insulin and vanadate (22;31-33). We used p85 phosphorylation as a marker of PI3-K activity (22;31;32;34). As shown in Figure 4A, chronic exposure to OHB did not alter p85 protein content in these cells. Insulin and vanadate provoked 3.8- ($P<0.001$) and 2.6-fold ($P<0.05$) increases of p85 tyrosine phosphorylation in cardiomyocytes, respectively. OHB altered insulin-mediated p85 phosphorylation without significantly inhibiting vanadate's effect. Thus, chronic exposure to OHB resulted in a 54% reduction of the net stimulatory effect of insulin on p85 phosphorylation (Figure 4B, $P<0.05$), whereas this treatment did not significantly alter vanadate's action in these cells.

Chronic exposure to OHB decreases PKB activation in response to insulin but not vanadate

We next determined the effect of OHB on PKB activation by insulin and vanadate in cardiomyocytes. As shown in Figure 5A, OHB did not affect the concentration of this enzyme in cardiomyocytes. Insulin and vanadate induced 24- ($P<0.001$) and 5.6-fold ($P<0.005$) increases of PKB phosphorylation, respectively. As illustrated in Figure 5B,

chronic exposure to OHB diminished insulin-stimulated net PKB activation by 36% ($P<0.02$) while this treatment did not alter its activation in response to vanadate.

Chronic exposure to OHB increases p38MAPK phosphorylation in response to vanadate

Studies have shown that p38MAPK activation is required for maximal stimulation of glucose uptake in response to various stimuli such as 2,4-dinitrophenol (15;33) and vanadate (22). We, thus, evaluated the effect of OHB on insulin- and vanadate-mediated p38MAPK activation in cardiomyocytes. As shown in Figure 6A, chronic exposure to OHB did not affect the concentration of p38MAPK in cardiomyocytes. Insulin is a weak activator of p38MAPK, and stimulation with the hormone provoked only a 1.5-fold increase in enzyme phosphorylation, which was completely inhibited by OHB. As demonstrated before (22), vanadate is a powerful p38MAPK activator, and 3.8- ($P<0.01$) and 9.8- ($P<0.001$) fold increase of enzyme phosphorylation was observed in response to vanadate in control and OHB-treated cells, respectively. Interestingly, and in contrast to other signaling molecules, OHB induced a 250% increase of vanadate-mediated net p38MAPK phosphorylation in cardiomyocytes ($P<0.001$) (Figure 6B).

Chronic exposure to OHB increases ERK1/2 phosphorylation

In addition to the IRS-1/PI3-K signaling pathway, insulin also activates the mitogenic Ras/MEK/ERK1/2 cascade. As shown in Figure 7, OHB did not affect ERK1/2 protein content in cardiomyocytes. Stimulation with insulin or vanadate induced 2.5- ($P<0.05$) and 4.6-fold increases ($P<0.001$) of ERK1/2 phosphorylation, respectively. Chronic exposure to OHB increased basal ERK1/2 phosphorylation by 2.1-fold ($P<0.001$) compared to control cells, and acute stimulation with insulin did not further activate the enzyme. On the other hand, vanadate increased ERK1/2 phosphorylation by 1.7-fold ($P<0.05$).

Chronic inhibition of ERK1/2 does not restore insulin-stimulated glucose uptake in OHB-treated cells

Studies have shown that ERK1/2 can phosphorylate IRS-1 on serine residues, subsequently diminishing its tyrosine phosphorylation in response to insulin (35). To

determine whether OHB-mediated ERK1/2 activation could explain ketone body-induced insulin resistance, cardiomyocytes were incubated concomitantly with OHB and 10 μ M PD98059, a pharmacological inhibitor of MEK which is an upstream activator of ERK1/2. Inhibition of MEK completely abolished ERK1/2 phosphorylation induced by OHB (data not shown). However, it did not restore the stimulatory effect of insulin on glucose uptake in OHB-treated cardiomyocytes (Figure 8).

Discussion

We have shown previously that chronic exposure to OHB induced insulin resistance, resulting in diminished glucose uptake in cardiomyocytes (29). Here, we demonstrated that this decrease is associated with reduced activation of the PI3-K/PKB signaling cascade in response to insulin. Furthermore, our study revealed that chronic exposure to vanadate, an insulinomimetic agent, can bypass OHB-induced insulin resistance and stimulate glucose uptake in cardiomyocytes. This latter effect may be due, at least in part, to the ability of vanadate to activate PI3-K and p38MAPK in OHB-treated cardiomyocytes.

Hyperketonemia is an important complication not only of type 1 diabetes but also of poorly-controlled type 2 diabetes (23;36). The concentration of circulatory ketone bodies is usually less than 0.2 mM in healthy individuals, but can reach 1 to 3 mM in poorly-controlled diabetics and 5 to 20 mM during severe ketoacidosis (23). Elevated plasma ketone bodies are also observed in congestive heart failure and in subjects on a ketogenic diet (27;37). Therefore, there are a number of physiological and pathophysiological situations where plasma ketone body concentrations are augmented. Interestingly, frequent ketoacidosis and/or high concentration of ketone bodies correlate with increased cardiac dysfunction, morbidity and mortality (28;37).

Our results show that chronic exposure to ketone bodies provoked a 45% decrease of insulin-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes and that vanadate bypassed OHB's effect and stimulated glucose uptake in these cells. The observed difference between insulin and vanadate effects on glucose uptake after exposure to OHB can not be explained by changes in glucose transporter numbers since neither ketone bodies nor vanadate altered GLUT-4 and GLUT-1 concentrations in cardiomyocytes (22;29). Potentially, vanadate-enhanced glucose uptake may be due to increased basal glucose uptake, a process that may not be altered by OHB. Alternatively, ketone body-induced insulin resistance may result from decreased GLUT-4 translocation in response to insulin but not to vanadate.

We have recently demonstrated that chronic exposure to vanadate activates the insulin-signaling cascade in a concentration-dependent manner, leading to the stimulation

of glucose uptake in cardiomyocytes (22). Since vanadate can overcome OHB-induced insulin resistance in cardiomyocytes, and because protein tyrosine phosphatase inhibition is its primary mechanism of action, we hypothesized that ketone bodies could mediate their action through alterations of protein tyrosine phosphorylation.

Our results demonstrated a discrepancy between the stimulation of glucose uptake by insulin and vanadate and the degree of IR tyrosine phosphorylation. Studies have shown significant differences in vanadate potency toward various tyrosine phosphatases (16;22). Our results revealed that while vanadate is almost as potent as insulin in enhancing IRS-1 and p85 phosphorylation, it is a weak activator of the IR. Potentially, the discrepancy in tyrosine phosphorylation of IR and glucose uptake may be due to selective inhibition of IRS-1 and/or PI3-K tyrosine phosphatases by vanadate, resulting in more effective activation of these enzymes and thus glucose uptake. Similar conclusions were drawn by Pandey et al. (38), who demonstrated that vanadate stimulates glycogen synthesis independently of IR tyrosine phosphorylation. Together, these results suggest that IR activation is not always required for vanadate's action.

Multiple studies have shown that the impaired tyrosine phosphorylation of insulin-signaling effectors, including the IR, IRS-1 and PI3-K, leads to insulin resistance in the heart and skeletal muscles of rodents and humans (9;39-41). Our results showed that OHB did not alter IR tyrosine phosphorylation by insulin or vanadate in cardiomyocytes. However, chronic exposure to OHB completely suppressed the IRS-1 tyrosine phosphorylation induced by both agonists. Thus, OHB had similar effects on insulin- and vanadate-induced IR and IRS-1 tyrosine phosphorylation. Similar results have been reported by Kahn's group where IRS-1 but not IR phosphorylation in response to insulin was altered in diabetic skeletal muscles (41). Defects in IRS-1 tyrosine phosphorylation have also been observed in lipid-induced insulin resistance, obesity and diabetes (42;43). Thus, a reduction of IRS-1 tyrosine phosphorylation may be one mechanism by which OHB alters insulin's action.

Our results demonstrated that insulin partially lost (54%) its ability to stimulate PI3-K in cardiomyocytes exposed to ketone bodies, which correlated with the 36% reduction in PKB activation in OHB-treated cells in response to insulin. However, and unlike

insulin, vanadate-induced p85 and PKB phosphorylation was unaltered by OHB. Since PKB is located downstream of p85, this observation further supports the fact that vanadate-induced PI3-K activation is unchanged in cardiomyocytes chronically exposed to ketone bodies. Our results demonstrated that OHB significantly decreased both the net phosphorylation of p85 (Figure 4B) and glucose uptake in response to insulin without altering vanadate's action in these cells. However, the absolute level of p85 phosphorylation was similar between insulin and vanadate in OHB-treated cells (Figure 4A). Together, these data suggest that there is a discrepancy between the absolute level of p85 tyrosine phosphorylation and glucose uptake stimulation in cardiomyocytes. It has been demonstrated that binding of both SH2 domains of p85 to IRS-1 is necessary to fully activate the enzyme and that binding of only one SH2 domain results in partial PI3-K activation (44). Potentially, vanadate may be a more effective activator of PI3-K than insulin and, consequently, glucose uptake. Another possibility is that PI3-K localization is different in response to insulin and vanadate. It has been suggested that only p85 located in low-density microsomes (LDM) participates in the glucose uptake process (45;46). Thus, p85 activation and translocation to the LDM may be more sensitive to vanadate than insulin.

Numerous studies have demonstrated that activation of the PI3-K/PKB signaling pathway is required for insulin- and vanadate-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes (22;31;33;47). Impaired activation of the PI3-K/PKB signaling cascade in response to insulin has been observed in many models of insulin resistance, such as lipid-induced insulin resistance, and in skeletal muscles from type 2 diabetics (40;42;48;49). Our results demonstrated that ketone bodies exert similar effects on PI3-K, PKB and glucose uptake regarding the amplitude of their inhibition in response to both insulin and vanadate. Thus, contrary to the complete inhibition of IRS-1, we observed 36-54% inhibition of the insulin-stimulated PI3-K/PKB signaling pathway, which is consistent with the 45% decrease of glucose uptake measured in response to insulin in OHB-treated cells. In contrast, OHB did not alter vanadate-mediated PI3-K/PKB activation and glucose uptake despite complete IRS-1 inhibition. These results suggest that IRS-1 phosphorylation may not be required for vanadate action potentially because vanadate stimulates glucose uptake downstream of IRS-1. One mechanism of

action by which OHB could inhibit insulin's action is through increased activity and/or expression of specific protein tyrosine phosphatases, such as PTP-1B, which could then lead to diminished PI3-K phosphorylation (50). Studies have demonstrated that high-energy supply enhances PTP-1B expression in diabetic *Psammomys obesus*, an animal model of diet-induced insulin resistance (51). Potentially, vanadate may selectively inhibit a PI3-K tyrosine phosphatase, resulting in PI3-K activation.

The PI3-K/PKB signaling pathway may represent the key component modulating glucose uptake in response to insulin and vanadate. Furthermore, our study suggests that OHB-induced insulin resistance is due to impaired activation of the PI3-K/PKB signaling cascade rather than inhibition of IRS-1 activation. However, though OHB totally inhibits IRS-1 tyrosine phosphorylation in response to insulin, this treatment only partially reduces activation of the PI3-K/PKB signaling cascade. Two possibilities may explain the discrepancy between IRS-1 and activation of the PI3-K/PKB signaling cascade. First, it is possible that minimal IRS-1 activation is sufficient to stimulate PI3-K. It has been demonstrated that less than 50% of IRS-1 activation is required for the maximal effect of insulin on PI3-K and glucose uptake (52-54). On the other hand, these results suggest that IRS-1 is not essential for insulin-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. The latter hypothesis is supported by the studies of Kahn et al. (55) and Aizawa et al. (56) in IRS-1 knockout mice. They have shown that these mice have only minor defects in insulin's action despite their lack of IRS-1. Similar results have been obtained in adipocytes infected with an adenovirus overexpressing an IRS-1 unable to interact with the IR (57). Furthermore, our own data showed that impaired IRS-1 activation by vanadate was not correlated with either PI3-K activation or glucose uptake. Together, these studies demonstrated that IRS-1 inhibition has a relatively small impact on insulin-stimulated glucose uptake.

Our results suggest that in addition to IRS-1, other enzymes may modulate p85 activation in cardiomyocytes. IRS-1 is part of the IRS family composed of 4 members: IRS-1, IRS-2, IRS-3 and IRS-4. In addition to IRS-1, the heart expresses 2 other isoforms: IRS-2 and IRS-4 (58). While the exact role of IRS-4 in insulin-mediated glucose uptake is still under investigation, IRS-2 has been implicated in insulin's action. In IRS-1 knockout mice, it has been reported that IRS-2 activation by insulin can

compensate for the lack of IRS-1 in the liver but also in skeletal muscles (59). In cardiomyocytes, Till et al. have demonstrated that insulin stimulates the association between IRS-2 and p85 and may thus, participate in insulin-mediated glucose uptake (60). However, we were unable to detect IRS-2 in isolated cardiomyocytes (data not shown). It is possible that IRS-2 is more expressed in non-cardiac cells of the rat heart or that this protein may be lost in cultured cardiomyocytes after a certain period of time.

Alternatively, insulin could activate PI3-K in an IRS-1-independent manner (57;61). Supporting this hypothesis, it has been demonstrated that while p85 is involved in glucose uptake in response to insulin, it does not bind IRS-1 and/or IRS-2 in the heart (34). Different mechanisms could explain how insulin activates PI3-K independently of IRS. The IR has the ability to directly bind and activate PI3-K (62;63), and this may be sufficient to activate p85, at least partially, resulting in increased glucose uptake in response to insulin. Another possibility is the existence of docking molecules, such as Gab1, which plays a similar role as IRS-1 and can transduce a signal from the IR to PI3-K (64). In the heart, a 200-kDa phosphoprotein has also been reported to associate with PI3-K and may serve as a docking protein between the IR and PI3-K (65). Further studies will have to be performed to clarify the exact relationship between the IR, IRS-1 and PI3-K in response to insulin and vanadate in the heart.

Our results demonstrated that while insulin is a weak activator of p38MAPK, vanadate strongly stimulates the enzyme's phosphorylation. Furthermore, and in contrast to other enzymes, chronic exposure to OHB potentiates vanadate-mediated p38MAPK activation. We have demonstrated previously that vanadate-enhanced glucose uptake requires p38MAPK phosphorylation for maximal activation of this process in cardiomyocytes (22). Furthermore, p38MAPK activation is independent of the PI3-K/PKB signaling cascade since wortmannin does not inhibit vanadate-mediated activation of this enzyme (22). Thus, p38MAPK activation may contribute to the ability of vanadate to bypass insulin resistance and stimulate glucose uptake in OHB-treated cardiomyocytes. Further studies will be necessary to better define the role of p38MAPK in vanadate-mediated glucose uptake in cardiomyocytes.

In the present study, chronic exposure to OHB was associated with increased basal ERK1/2 phosphorylation in cardiomyocytes. ERK1/2 has already been identified as a potent stimulator of IRS-1 serine phosphorylation (35) resulting in decreased IRS-1 tyrosine phosphorylation and thus, insulin action (66;67). Our data, however, demonstrated that inhibition of the MEK/ERK1/2-signaling pathway with PD98059 did not prevent OHB-induced insulin resistance. These findings do not exclude the possibility that OHB increases IRS-1 serine phosphorylation via activation of other kinases. Further experiments will be required to better understand the molecular mechanism underlying ketone body-induced insulin resistance in adult cardiomyocytes.

In conclusion, the present study demonstrated that OHB inhibits insulin-stimulated glucose uptake by altering activation of the PI3-K/PKB signaling cascade. It also revealed that vanadate prevents OHB-induced insulin resistance and stimulates glucose uptake in this model. Vanadate-stimulated glucose uptake may be due to its ability to maintain PI3-K and p38MAPK activation in ketone body-treated cardiomyocytes.

Acknowledgements

The editorial assistance of Mr. Ovid Da Silva, Editor, Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. A.P. is the recipient of a Canadian Diabetes Association/Canadian Institutes of Health Research Doctoral Student Research Award. M.-H.G. was the recipient of a University of Montreal summer studentship award (COPSE). We thank Miguel Chagnon for his advice on statistical analysis.

References

1. Bonora Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Cacciatori V, Santi L, Targher G, Bonadonna R, Muggeo M: HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care* 25: 1135-1141, 2002
2. Iozzo P, Chareonthaitawee P, Dutka D, Betteridge DJ, Ferrannini E, Camici PG: Independent association of type 2 diabetes and coronary artery disease with myocardial insulin resistance. *Diabetes* 51: 3020-3024, 2002
3. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T: The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol* 14: 49-57, 1989
4. Meyer C, Schwaiger M: Myocardial blood flow and glucose metabolism in diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 80: 94A-101A, 1997
5. Voipio-Pulkki LM, Nuutila P, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Teras M, Wegelius U, Koivisto VA: Heart and skeletal muscle glucose disposal in type 2 diabetic patients as determined by positron emission tomography. *J Nucl Med* 34: 2064-2067, 1993
6. Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, Desrois M, Buckingham RE, Clarke K: Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker fatty rat heart. *Diabetes* 51: 1110-1117, 2002
7. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL: Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol* 279: E1104-E1113, 2000
8. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF: Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352: 73-77, 1991
9. Kaburagi Y, Yamauchi T, Yamamoto-Honda R, Ueki K, Tobe K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kadowaki T: The mechanism of insulin-induced signal transduction mediated by the insulin receptor substrate family. *Endocr J* 46 Suppl: S25-S34, 1999
10. Backer JM, Myers MCJ, Shoelson SE, Chin DJ, Sun XJ, Miralpeix M, Hu P, Margolis B, Skolnik EY, Schlessinger J, White MF: Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J* 11: 3469-3479, 1992
11. Khan AH, Pessin JE: Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475-1483, 2002
12. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA: Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541-6551, 1996

13. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A: Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104: 330-335, 2001
14. Ceresa BP, Pessin JE: Insulin regulation of the Ras activation/inactivation cycle. *Mol Cell Biochem* 182: 23-29, 1998
15. Somwar R, Koterski S, Sweeney G, Sciotti R, Djuric S, Berg C, Trevillyan J, Scherer PE, Rondinone CM, Klip A: A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 277: 50386-50395, 2002
16. Bevan AP, Drake PG, Yale J-F, Shaver A, Posner BI: Peroxovanadium compounds: biological actions and mechanism of insulin-mimesis. *Mol Cell Biochem* 153: 49-58, 1995
17. Ramachandran B, Kandaswamy M, Narayanan V, Subramanian S: Insulin mimetic effects of macrocyclic binuclear oxovanadium complexes on streptozotocin-induced experimental diabetes in rats. *Diabetes Obes Metab* 5: 455-461, 2003
18. Semiz S, McNeill JH: Oral treatment with vanadium of Zucker fatty rats activates muscle glycogen synthesis and insulin-stimulated protein phosphatase-1 activity. *Mol Cell Biochem* 236: 123-131, 2002
19. Boden G, Chen X, Ruiz J, van Rossum GD, Turco S: Effects of vanadyl sulfate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45: 1130-1135, 1996
20. Donthi RV, Huisamen B, Lochner A: Effect of vanadate and insulin on glucose transport in isolated adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Drugs Ther* 14: 463-470, 2000
21. Noda C, Masuda T, Sato K, Ikeda K, Shimohama T, Matsuyama N, Izumi T: Vanadate improves cardiac function and myocardial energy metabolism in diabetic rat hearts. *Jpn Heart J* 44: 745-757, 2003
22. Tardif A, Julien N, Chiasson JL, Coderre L: Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment in cardiomyocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAPK activation. *Am J Physiol* 284: E1055-E1064, 2003
23. Laffel L: Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-426, 1999
24. Lommi J, Koskinen P, Naveri H, Harkonen M, Kupari M: Heart failure ketosis. *J Intern Med* 242: 231-238, 1997
25. Kang HC, Chung DE, Kim DW, Kim HD: Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* 45: 1116-1123, 2004
26. Best TH, Franz DN, Gilbert DL, Nelson DP, Epstein MR: Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet. *Neurology* 54: 2328-2330, 2000
27. Lommi J, Kupari M, Koskinen P, Naveri H, Leinonen H, Pulkki K, Harkonen M: Blood ketone bodies in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 665-672, 1996
28. White NH: Diabetic ketoacidosis in children. *Endocrinol Metab Clin North Am* 29: 657-682, 2000

29. Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L: Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 281: E1205-E1212, 2001
30. Guerci B, Floriot M, Bohme P, Durain D, Benichou M, Jellimann S, Drouin P: Clinical performance of CGMS in type 1 diabetic patients treated by continuous subcutaneous insulin infusion using insulin analogs. *Diabetes Care* 26: 582-589, 2003
31. Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M: Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor Wortmannin. *J Biol Chem* 269: 3568-3573, 1994
32. Sharma PM, Egawa K, Huang Y, Martin JL, Huvar I, Boss GR, Olefsky JM: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J Biol Chem* 273: 18528-18537, 1998
33. Pelletier A, Joly E, Prentki M, Coderre L: Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 146: 2285-2294, 2005
34. Kessler A, Uphues I, Ouwens DM, Till M, Eckel J: Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol* 280: E65-E74, 2001
35. Andreozzi F, Laratta E, Sciacqua A, Perticone F, Sesti G: Angiotensin II impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide by inducing phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser312 and Ser616 in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 94: 1211-1218, 2004
36. Newton CA, Raskin P: Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch Intern Med* 164: 1925-1931, 2004
37. Kupari M, Lommi J, Ventila M, Karjalainen U: Breath acetone in congestive heart failure. *Am J Cardiol* 76: 1076-1078, 1995
38. Pandey SK, Anand-Srivastava MB, Srivastava AK: Vanadyl sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3-K) and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation. *Biochemistry* 37: 7006-7014, 1998
39. Maegawa H, Shigeta Y, Egawa K, Kobayashi M: Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscles in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes* 40: 815-819, 1991
40. Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG Jr, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR: Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49: 284-292, 2000
41. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ: Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105: 311-320, 2000

42. Petersen KF, Shulman GI: Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90: 11G-18G, 2002
43. Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R: Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15: 2099-2111, 2001
44. Rordorf-Nikolic T, Van Horn DJ, Chen D, White MF, Backer JM: Regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase by tyrosyl phosphoproteins. Full activation requires occupancy of both SH2 domains in the 85-kDa regulatory subunit. *J Biol Chem* 270: 3662-3666, 1995
45. Kriauciunas KM, Myers MG Jr, Kahn CR: Cellular compartmentalization in insulin action: altered signaling by a lipid-modified IRS-1. *Mol Cell Biol* 20: 6849-6859, 2000
46. Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, Sakoda H, Onishi Y, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T: Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS)-3 from those of IRS-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 273: 29686-29692, 1998
47. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR: Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14: 4902-4911, 1994
48. Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR: Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46: 524-527, 1997
49. Kruszynska YT, Worrall DS, Ofrecio J, Frias JP, Macaraeg G, Olefsky JM: Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 226-234, 2002
50. Shepherd PR: Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* 183: 3-12, 2005
51. Ikeda Y, Ziv E, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L: Protein tyrosine phosphatase 1B is impaired in skeletal muscle of diabetic *Psammomys obesus*. *Int J Exp Diabetes Res* 3: 205-212, 2002
52. Morris AJ, Martin SS, Haruta T, Nelson JG, Vollenweider P, Gustafson TA, Mueckler M, Rose DW, Olefsky JM: Evidence for an insulin receptor substrate 1 independent insulin signaling pathway that mediates insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8401-8406, 1996
53. Staubs PA, Nelson JG, Reichart DR, Olefsky JM: Platelet-derived growth factor inhibits insulin stimulation of insulin receptor substrate-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes without affecting glucose transport. *J Biol Chem* 273: 25139-25147, 1998
54. Venable CL, Frevert EU, Kim YB, Fischer BM, Kamatkar S, Neel BG, Kahn BB: Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem* 275: 18318-18326, 2000

55. Araki E, Lipes MY, Patti ME, Bruning JC, Hagg HB, Johnson RS, Kahn CR: Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372: 186-189, 1994
56. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S: Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372: 182-186, 1994
57. Sharma PM, Egawa K, Gustafson TA, Martin JL, Olefsky JM: Adenovirus-mediated overexpression of IRS-1 interacting domains abolishes insulin-stimulated mitogenesis without affecting glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 17: 7386-7397, 1997
58. Schreyer S, Ledwig D, Rakatzi I, Kloting I, Eckel J: Insulin receptor substrate-4 is expressed in muscle tissue without acting as a substrate for the insulin receptor. *Endocrinology* 144: 1211-1218, 2003
59. Patti ME, Sun XJ, Bruening JC, Araki E, Lipes MA, White MF, Kahn CR: 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J Biol Chem* 270: 24670-24673, 1995
60. Till M, Kolter T, Eckel J: Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes. *Am J Cardiol* 4 (3A): 85A-89A, 1997
61. Sharma PM, Egawa K, Huang Y, Martin JL, Huvar I, Boss GR, Olefsky JM: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J Biol Chem* 273: 18528-18537, 1998
62. Van Horn DJ, Myers MG Jr, Backer JM: Direct activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase by the insulin receptor. *J Biol Chem* 269: 29-32, 1994
63. Rajala RV, McClellan ME, Chan MD, Tsiokas L, Anderson RE: Interaction of the retinal insulin receptor beta-subunit with the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochemistry* 43: 5637-5650, 2004
64. Holgado-Madruga M, Emllet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ: A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379: 560-564, 1996
65. Till M, Ouwens DM, Kessler A, Eckel J: Molecular mechanisms of contraction-regulated cardiac glucose transport. *Biochem J* 346: 841-847, 2000
66. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF: Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277: 1531-1537, 2002
67. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MR, Spiegelman BM: IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271: 665-668, 1996

Figure Legends

- Figure 1: Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes.** A: Cardiomyocytes were incubated in media containing 5.5 mM glucose alone (Control) or supplemented with 5 mM OHB, 50 μ M VS, or a combination of both for 16 h. Glucose uptake was then measured as described in Experimental Procedures. B: Net insulin- and vanadate-stimulated glucose uptake from panel A. Means \pm SE of 8 independent experiments. * P <0.04, different from basal controls; *** P <0.001, different from basal control and basal OHB-treated cells; $^{\dagger}P$ <0.03, different from basal control cells or different from insulin-stimulated control cells; $^{\dagger\dagger}P$ <0.007, different from insulin control cells.
- Figure 2: Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-mediated IR tyrosine phosphorylation in cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were stimulated with vehicle or 10^{-7} M insulin for 5 min. Lysates were immunoprecipitated with IR antibody. A: *Top*: Representative immunoblot of phosphotyrosine and total IR. *Bottom*: Densitometric analysis of immunoblots. B: Net insulin- and vanadate-stimulated IR phosphorylation from panel A. Means \pm SE of 3 independent experiments. ** P <0.002, different from basal; * P <0.04, different from basal.
- Figure 3: Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-mediated IRS-1 tyrosine phosphorylation in cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were stimulated with vehicle or 10^{-7} M insulin for 5 min. Lysates were immunoprecipitated with phosphotyrosine antibody. A: *Top*: Representative immunoblot of phosphorylated tyrosine and total IRS-1. *Bottom*: Densitometric analysis of immunoblots. B: Net insulin- and vanadate-stimulated IRS-1 phosphorylation from panel A. Means \pm SE of

3 independent experiments. $**P<0.01$, different from basal controls; $^{\dagger}P<0.05$, different from insulin- or vanadate- stimulated control cells.

Figure 4: **Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-mediated tyrosine phosphorylation of the p85 subunit of PI3-K in cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were stimulated with vehicle or 10^{-7} M insulin for 5 min. Lysates were immunoprecipitated with phosphotyrosine antibody. **A:** *Top:* Representative immunoblot of tyrosine phosphorylated and total p85. *Bottom:* Densitometric analysis of immunoblots. **B:** Net insulin- and vanadate-stimulated p85 phosphorylation from panel A. Means \pm SE of 5 independent experiments. $***P<0.001$, different from basal controls; $*P<0.05$, different from basal controls; $^{\dagger}P<0.05$, different from insulin-stimulated control cells.

Figure 5: **Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-mediated activation of PKB in cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were then stimulated with vehicle (basal) or 10^{-7} M insulin for 5 min. **A:** *Top:* Representative immunoblot of phosphorylated and total PKB. *Bottom:* Densitometric analysis of immunoblots. **B:** Net insulin- and vanadate-stimulated PKB phosphorylation from panel A. Means \pm SE of 7 independent experiments. $***P<0.001$, different from basal; $**P<0.005$, different from basal; $^{\dagger}P<0.02$, different from insulin-stimulated controls.

Figure 6: **Effect of chronic exposure to OHB on insulin- and vanadate (VS)-mediated activation of p38MAPK in cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were then stimulated with vehicle (basal) or 10^{-7} M insulin for 10 min. **A:** *Top:* Representative immunoblot of phosphorylated and total p38MAPK. *Bottom:* Densitometric analysis of immunoblots. **B:** Net insulin- and vanadate-stimulated p38MAPK phosphorylation from panel A. Means \pm SE of 5

independent experiments. $**P<0.01$, different from basal control cells; $***P<0.001$, different from basal OHB-treated cells; $^{\dagger\dagger}P<0.001$, different from vanadate-stimulated controls.

Figure 7: **Effect of chronic exposure to OHB on basal, insulin- and vanadate (VS) activation of ERK1/2.** Cardiomyocytes were incubated as described in Figure 1. The cells were then stimulated with vehicle (basal) or 10^{-7} M insulin for 5 min. *Top:* Representative immunoblot of phosphorylated and total ERK1/2. *Bottom:* Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 6 independent experiments. $*P<0.05$, different from basal; $***P<0.001$, different from basal control cells; $^{\dagger\dagger}P<0.001$, different from basal control cells.

Figure 8: **Effect of ERK1/2 inhibition on insulin-mediated glucose uptake in OHB-treated cardiomyocytes.** Cardiomyocytes were incubated in media containing 5.5 mM glucose alone or supplemented with 5 mM OHB, 10 μ M PD98059 or a combination of both for 16 h. Glucose uptake measurements were performed as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 10 independent experiments. $***P<0.001$, compared to basal; $^{\dagger\dagger}P<0.01$, different from insulin-stimulated control or PD98059-treated cells.

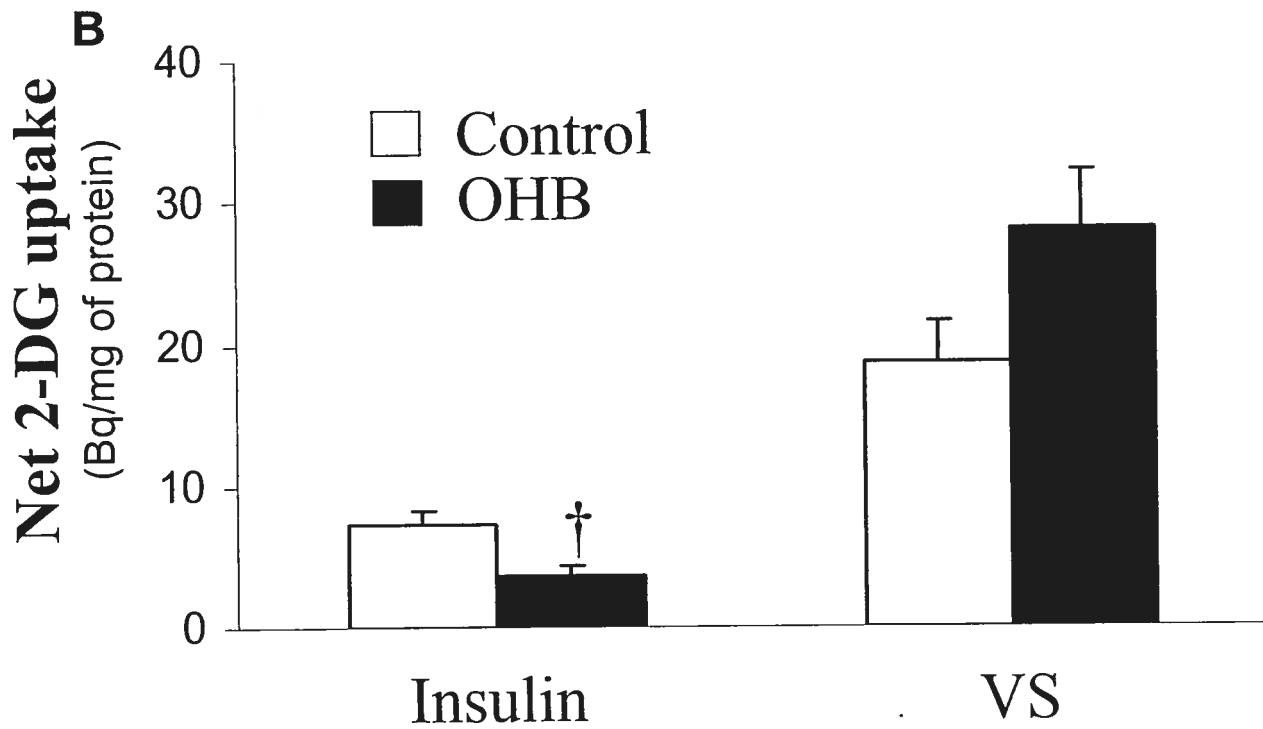
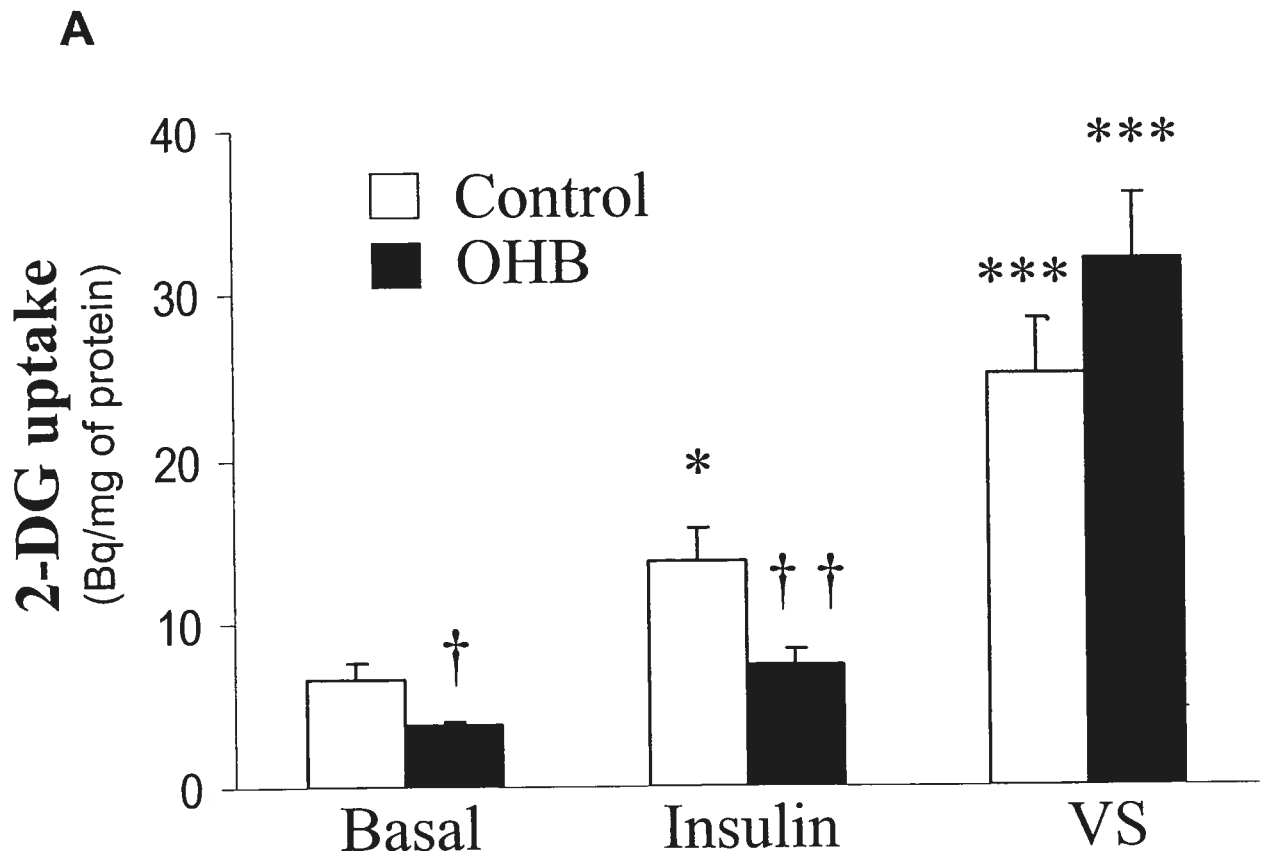


Figure 1

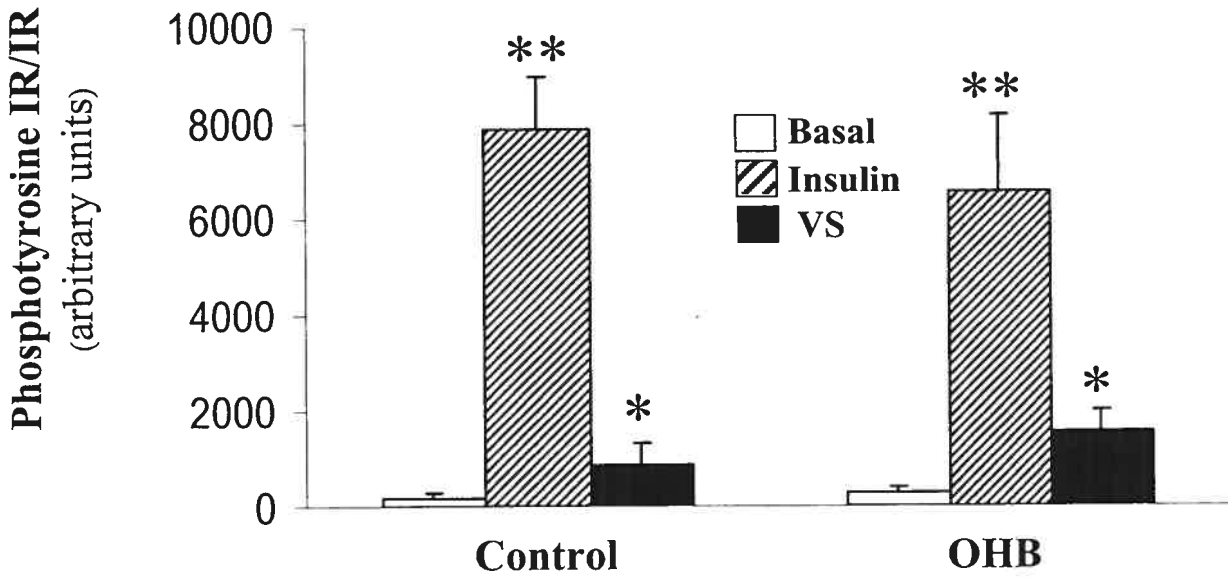
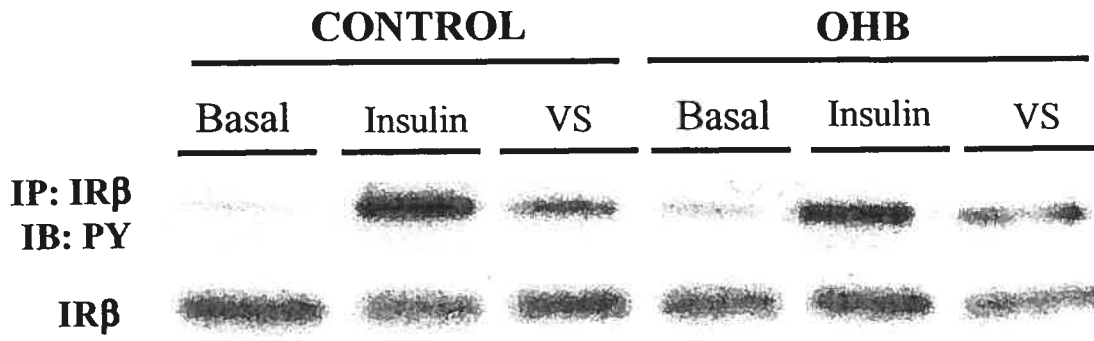
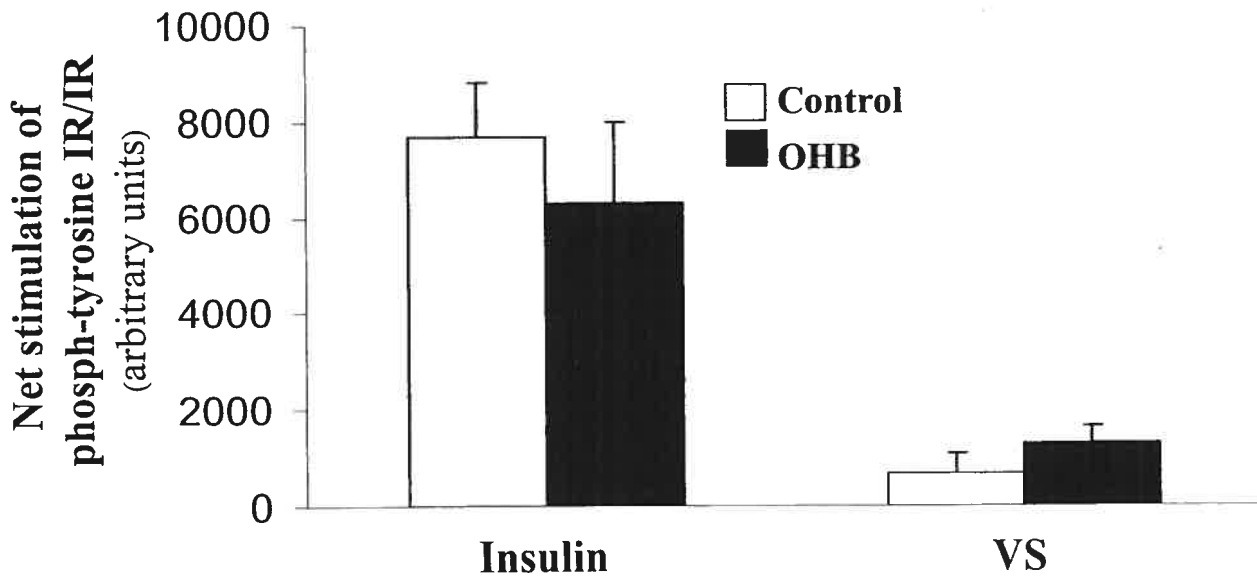
A**B**

Figure 2

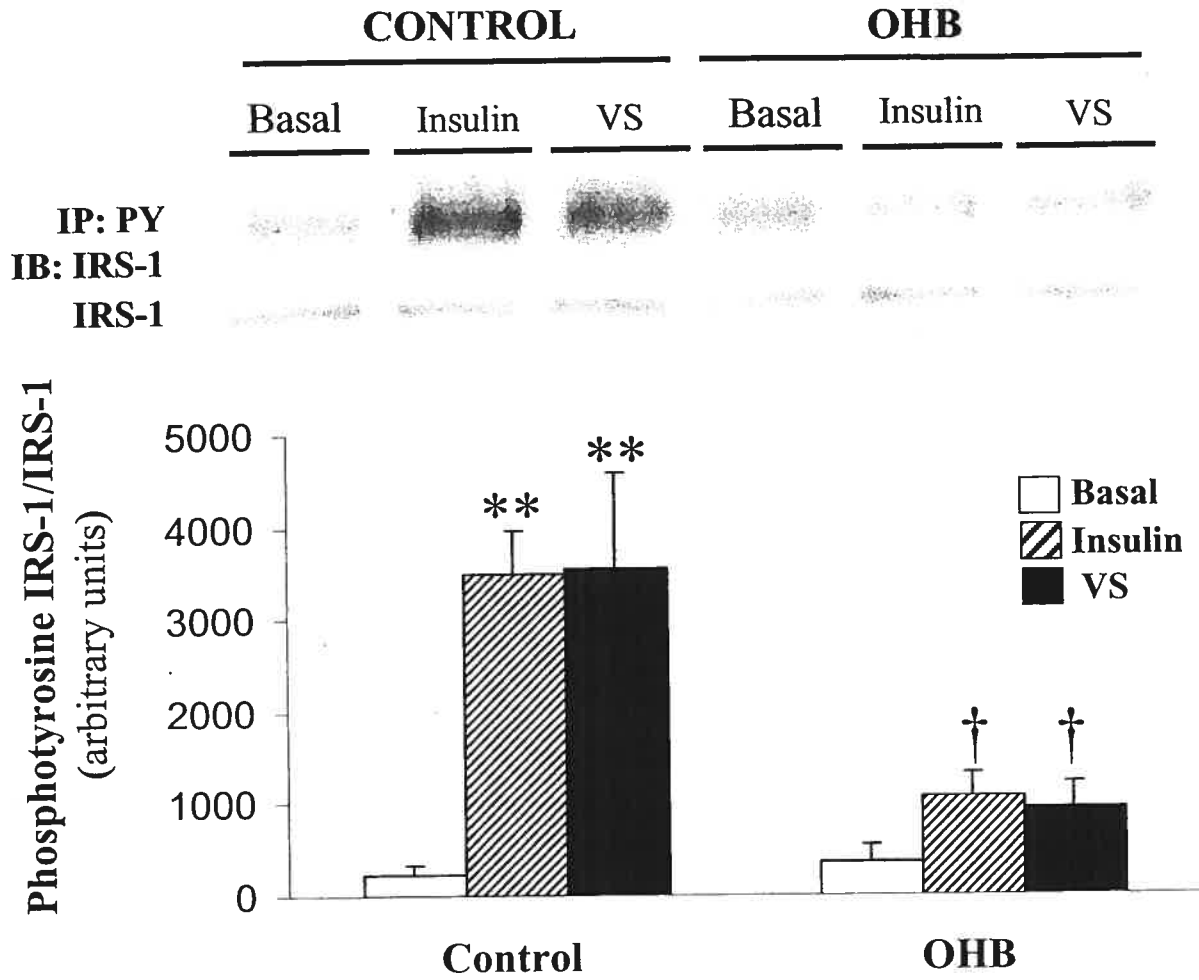
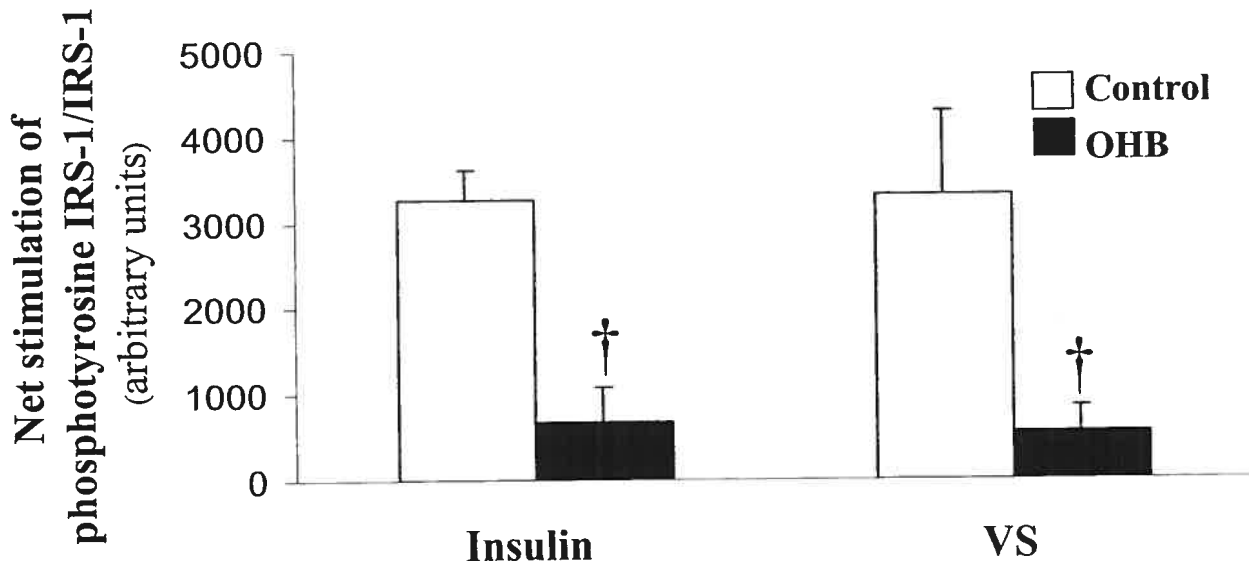
A**B**

Figure 3

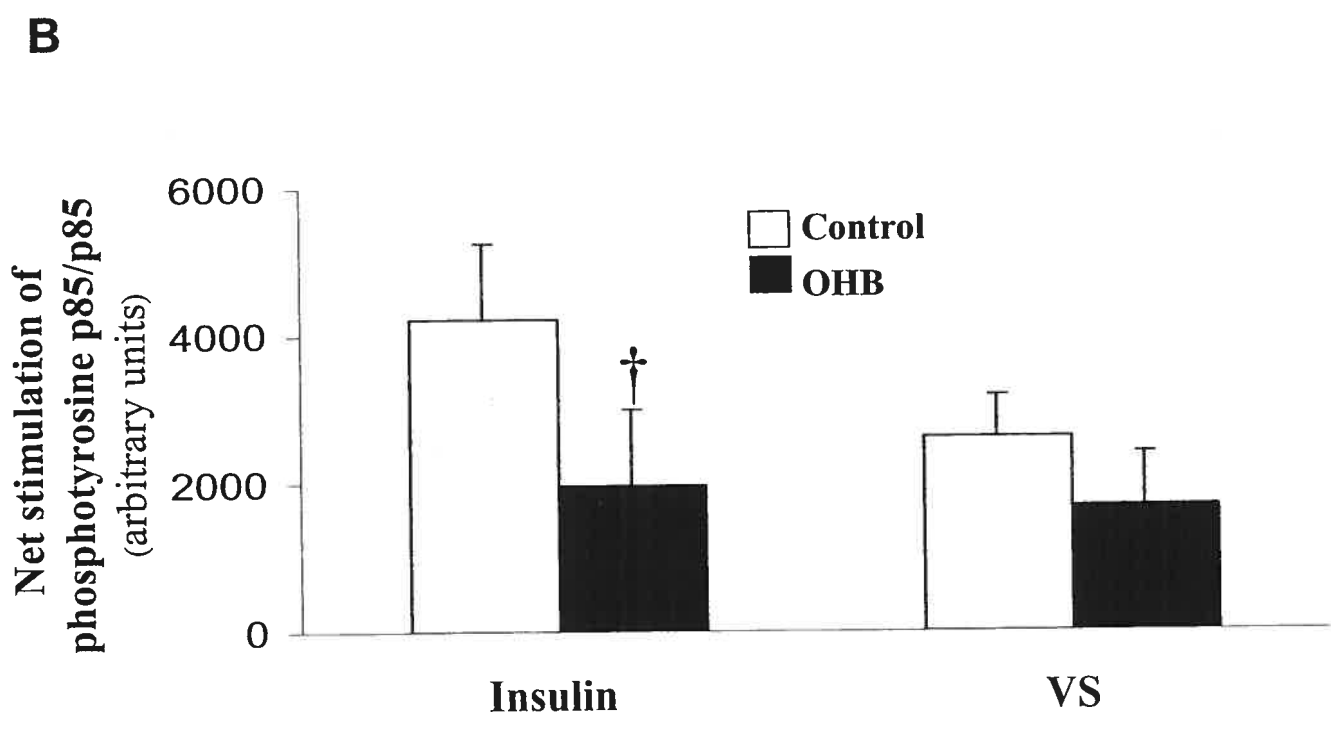
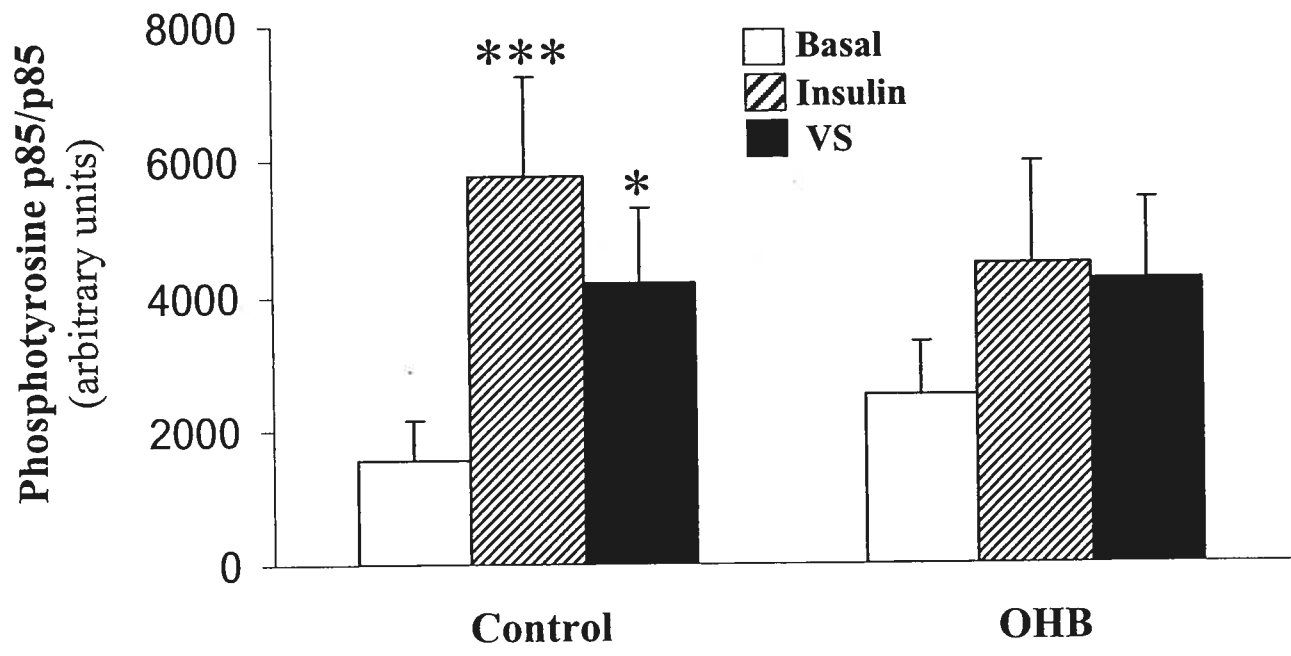
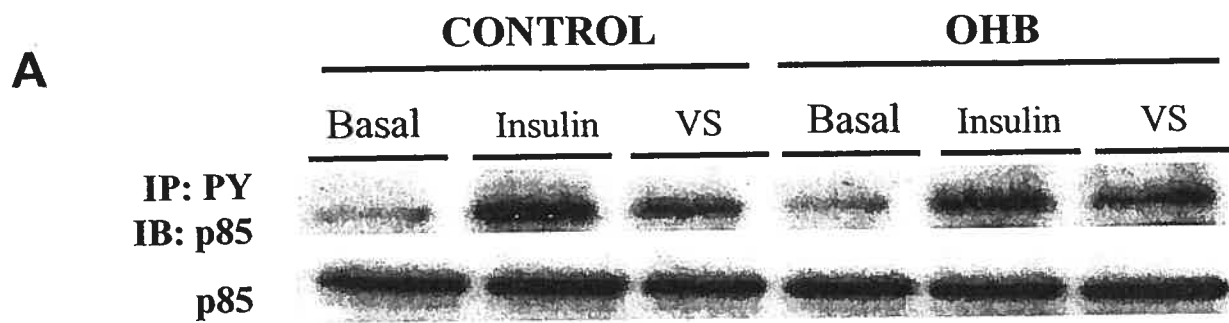


Figure 4

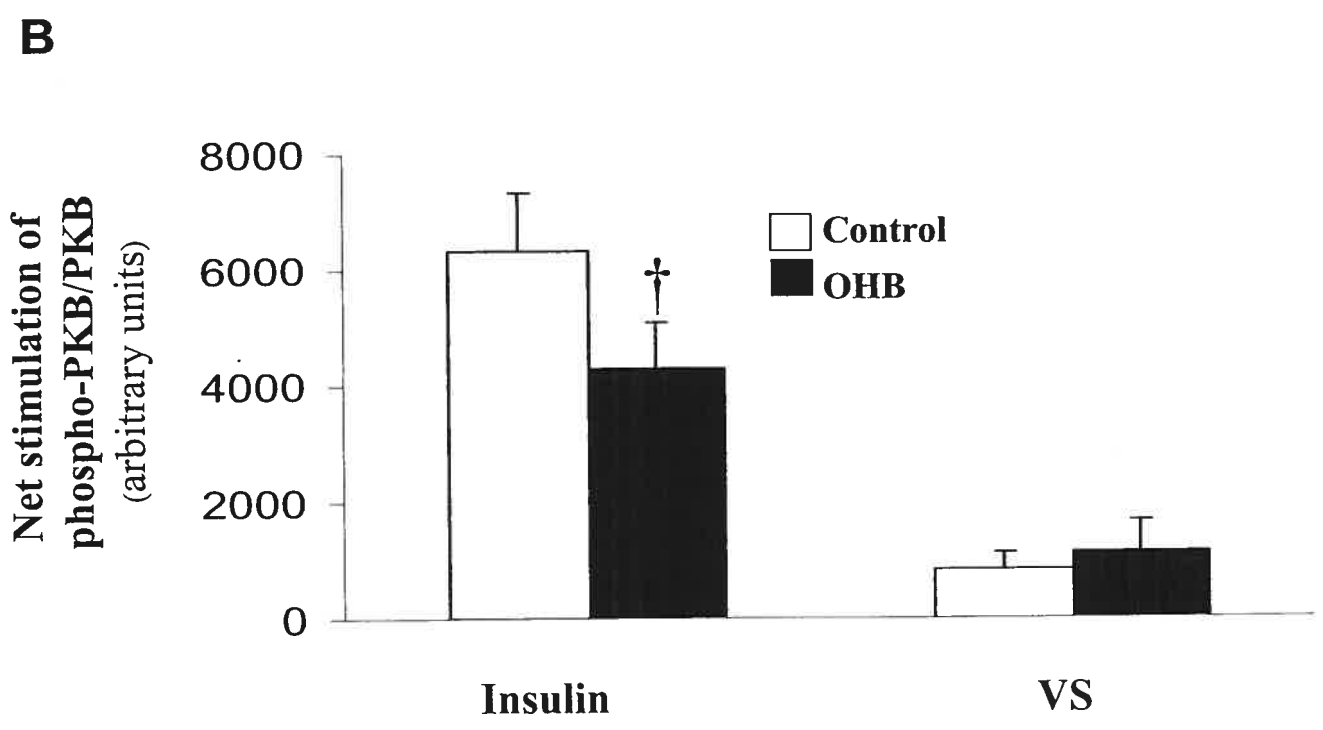
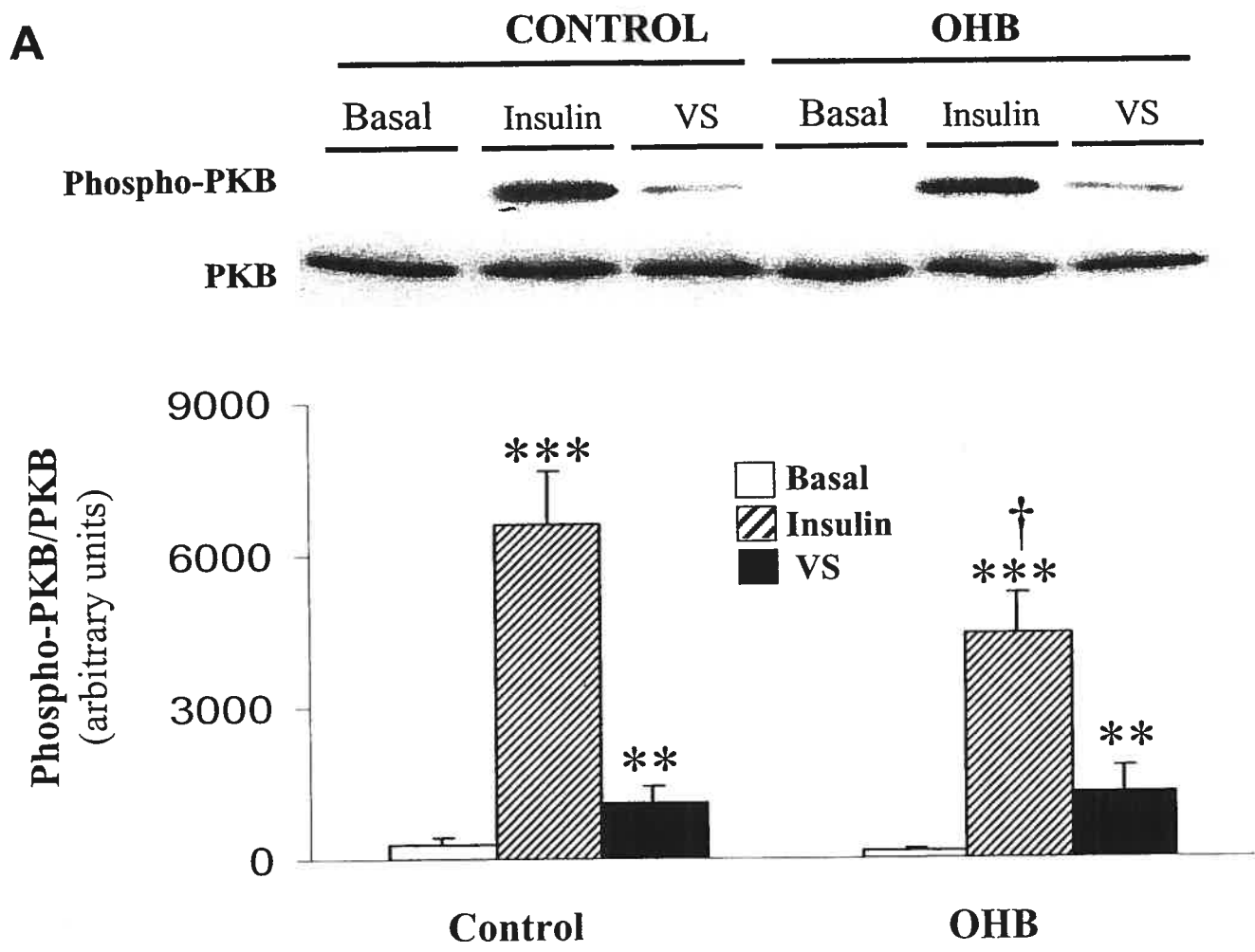


Figure 5

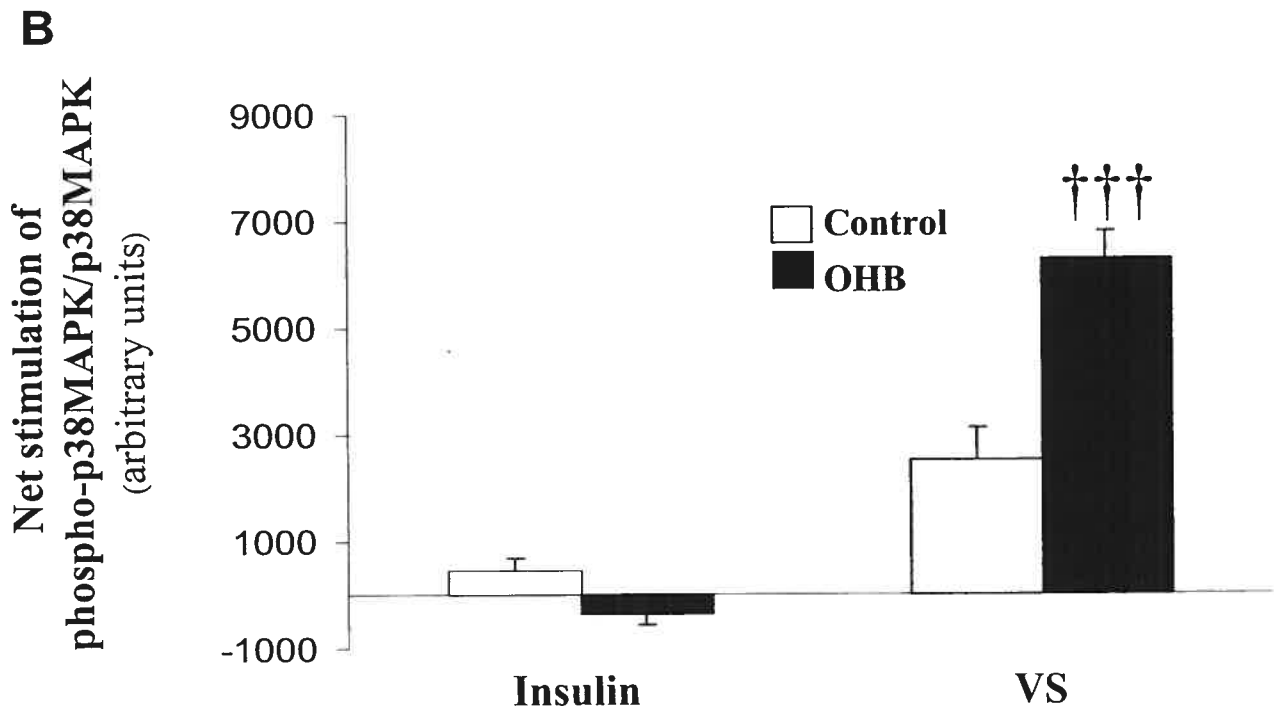
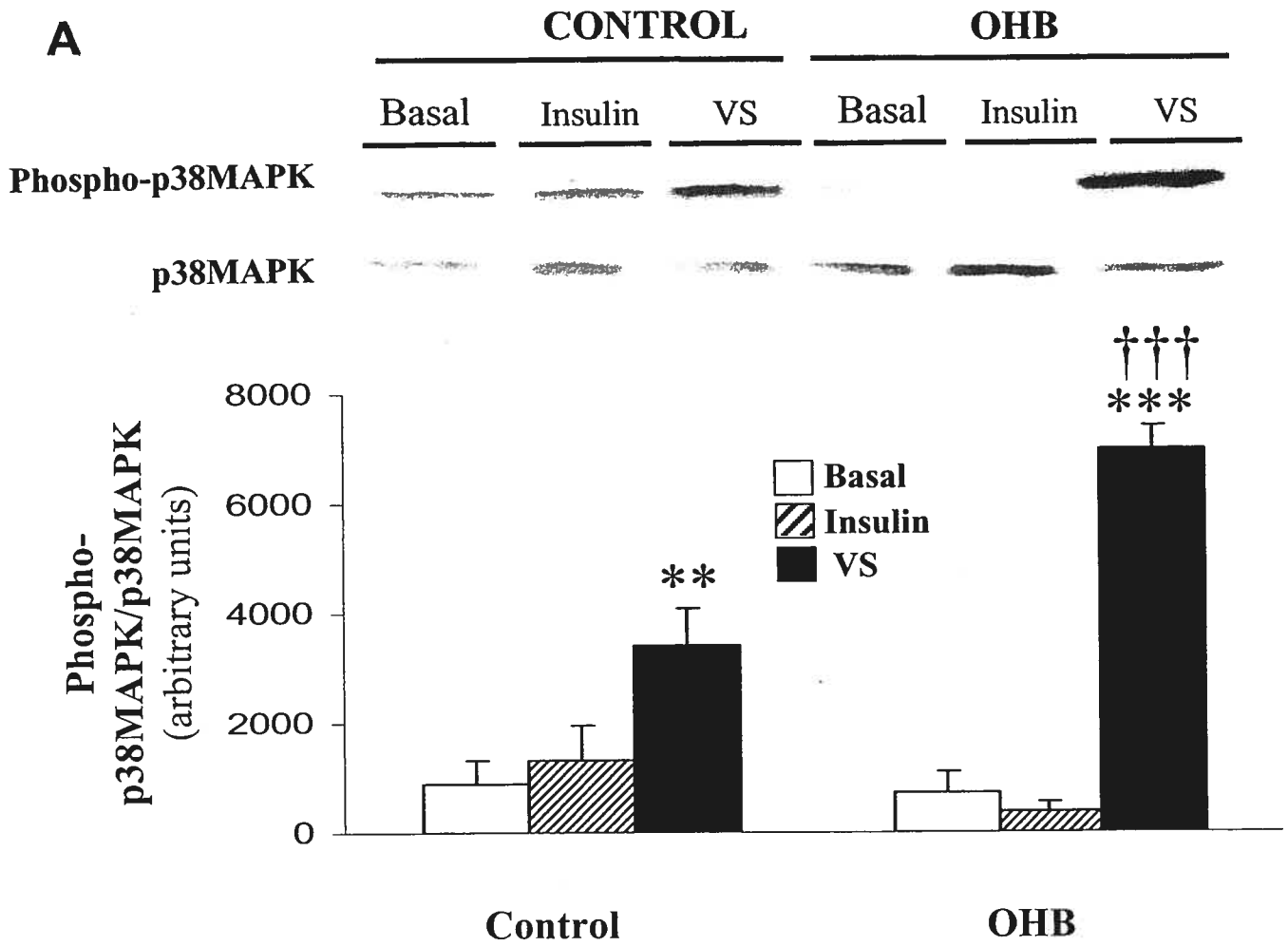


Figure 6

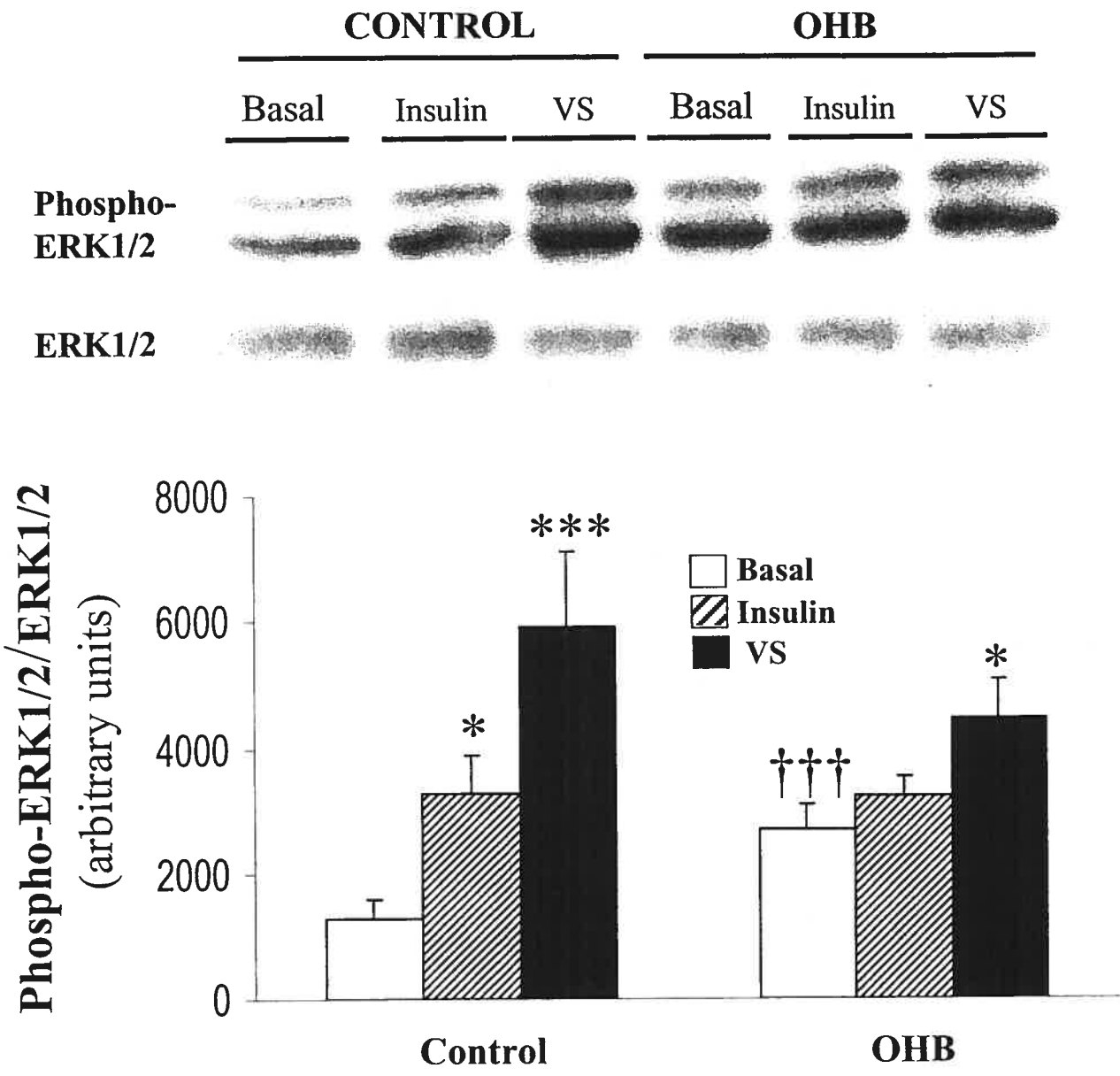


Figure 7

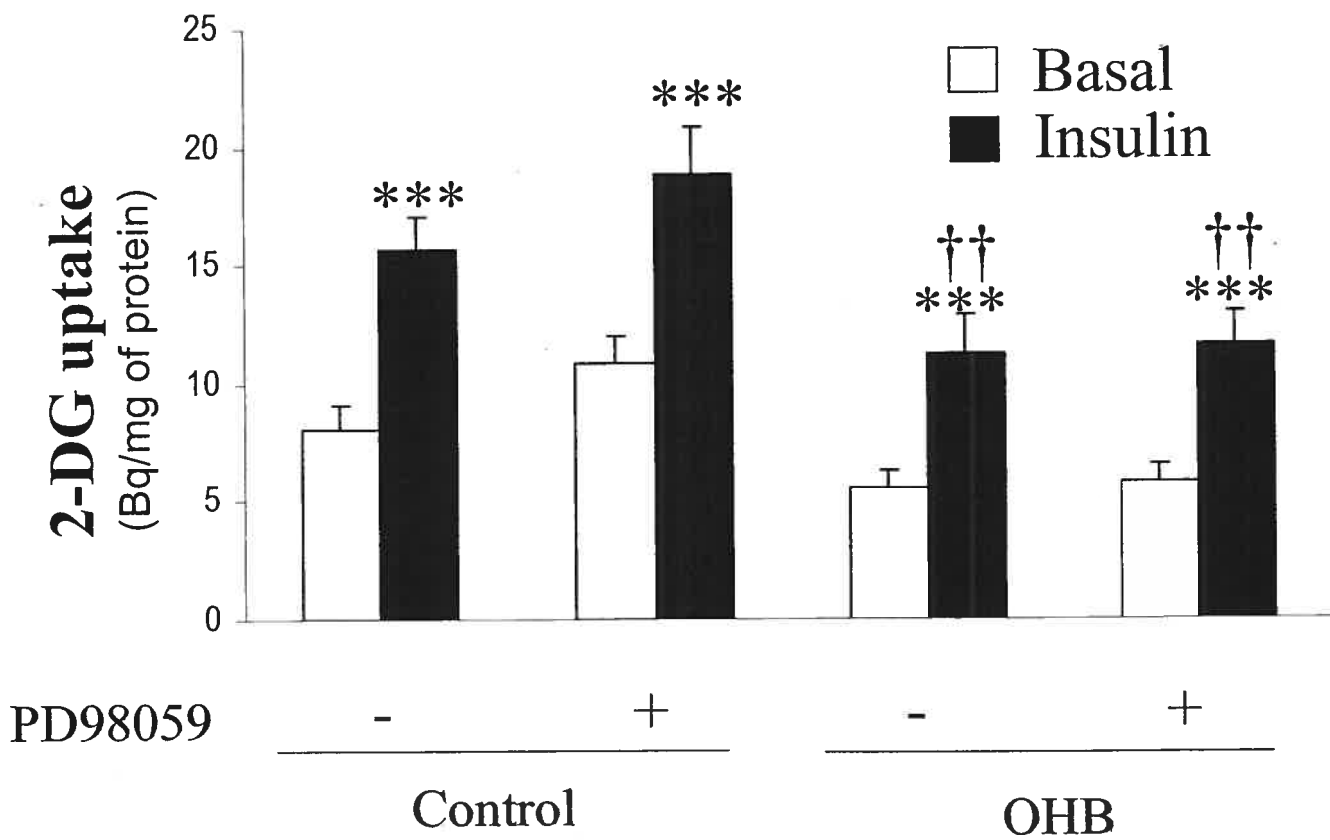


Figure 8

AMPK and p38MAPK participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes

Amélie Pelletier¹, Érik Joly², Marc Prentki² and Lise Coderre^{1†}

Publié dans : *Endocrinology* 2005 *146*(5), 2285-2294

Abbreviated title : AMPK and p38MAPK are required for DNP action

From the Montreal Diabetes Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) and the Departments of Medicine¹ and Nutrition²,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed:

Lise Coderre, Ph.D.
Research Centre
CHUM-Hôtel-Dieu
3850 rue Saint-Urbain
Montréal (Québec) Canada H2W 1T7
Tel.: (514) 526-3150
Fax: (514) 412-7208
[REDACTED]

Key words: Glucose transport, heart, AMPK, hypoxia, metabolic stress

Grant Support: L.C. is a chercheur-boursier supported by the Fonds de la recherche en santé du Québec. A.P. is the recipient of a Canadian Diabetes Association/Canadian Institutes of Health Research Doctoral Student Research Award.

AMPK and p38MAPK participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes

Amélie Pelletier¹, Érik Joly², Marc Prentki² and Lise Coderre^{1†}

Publié dans : *Endocrinology* 2005 *146*(5), 2285-2294

Contribution des co-auteurs :

A.P. a réalisé la totalité des expériences faites dans ce papier. Elle a également analysé tous les résultats et écrit le papier.

E.J. et **M.P.** ont fourni le dominant-négatif AMPK et ont aidé au développement du protocole d'infection des cardiocytes avec les adénovirus. Ils ont également collaboré dans la rédaction du manuscrit.

Abstract

During metabolic stress, such as ischemia or hypoxia, glucose becomes the principal energy source for the heart. It has been shown that increased cardiac glucose uptake during metabolic stress has a protective effect on cell survival and heart function. Despite its physiological importance, only limited data are available on the molecular mechanisms regulating glucose uptake under these conditions. We used 2,4-dinitrophenol (DNP), an uncoupler of oxidative phosphorylation, as a model to mimic hypoxia and to gain insight into the signaling pathway underlying metabolic stress-induced glucose uptake in primary cultures of rat adult cardiomyocytes. The results demonstrate that 0.1 mM DNP induces 2.2- and 9-fold increases in AMPK and p38MAPK phosphorylation, respectively. This is associated with a 2.3-fold increase in glucose uptake in these cells. To further delineate the role of AMPK in the regulation of glucose uptake, we used two complementary approaches: pharmacological inhibition of the enzyme with adenine 9- β -D arabinofuranoside (AraA) and adenoviral infection with a dominant-negative AMPK (DN-AMPK) mutant. Our results show that overexpression of DN-AMPK completely suppressed DNP-mediated phosphorylation of acetyl CoA carboxylase, a downstream target of AMPK. Inhibition of AMPK with either AraA or DN-AMPK also abolished DNP-mediated p38MAPK phosphorylation. Importantly, AMPK inhibition only partially decreased DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. Inhibition of p38MAPK with the pharmacological agent PD169316 also partially reduced (70%) glucose uptake in response to DNP. In conclusion, our results indicate that p38MAPK acts downstream of AMPK in cardiomyocytes and that activation of the AMPK/p38MAPK signaling cascade is essential for maximal stimulation of glucose uptake in response to DNP in adult cardiomyocytes.

Introduction

The heart utilizes a variety of substrates, such as fatty acids, ketone bodies and glucose for ATP production. Although fatty acids account for 60 to 70% of total energy production during aerobic conditions (1), carbohydrates become the major substrate during anaerobic periods and metabolic stress (2-4). It is well-established that metabolic stressors, such as contractions (5), ischemia (6), and hypoxia (7), stimulate cardiac glucose uptake. It has been demonstrated that the ability of the heart to increase glucose uptake during ischemia is essential in preserving contractile function (3). Conversely, a decrease in glucose uptake and failure to maintain ATP levels during hypoxia increase cardiomyocyte death (8). Thus, the ability of the heart to upregulate glucose uptake during metabolic stress is crucial for the maintenance of cardiac energy homeostasis and function.

Several laboratories have reported that AMP-activated protein kinase (AMPK) plays a major role in the regulation of metabolic stress-induced glucose uptake. AMPK is activated by increased AMP/ATP or creatine/phosphocreatine ratios (9;10) and by Thr172 phosphorylation by one or more upstream AMPK kinases (11-13). In skeletal muscle, activation of AMPK is observed in response to the adenosine analog 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) (14-16) as well as various metabolic stimuli, such as muscle contractions (17), hypoxia (18;19) and 2,4-dinitrophenol (DNP) (18;20). Adenovirus-mediated expression of a constitutively-active AMPK mutant (21) or activation of this enzyme by AICAR (22) increases glucose uptake in skeletal muscles. Conversely, overexpression of a dominant-negative AMPK (DN-AMPK) mutant in skeletal muscle cells or a kinase-dead AMPK α 2 (KD-AMPK) isoform in mice skeletal muscle completely suppresses both hypoxia- and AICAR-stimulated glucose uptake (19;23). In contrast, expression of the KD-AMPK mutant only partially reduces contraction-mediated glucose uptake, suggesting that activation of an additional signaling pathway is required for this stimulus.

AMPK activation has been associated with the activation of numerous kinases, including p38MAPK (24-26). As with AMPK, p38MAPK activation is observed in response to ischemia (27), hypoxia (28) and DNP (29). It has been suggested that, in

skeletal muscle, p38MAPK activation is essential for maximal stimulation of glucose uptake in response to insulin (30) and contractions (31). Furthermore, it has been shown that in liver-derived Clone 9 cells, p38MAPK is downstream of AMPK (32), and inhibition of p38MAPK suppresses AICAR-stimulated glucose uptake in these cells.

Most of the studies cited above were performed in skeletal muscle. However, it is unclear whether the signaling pathway identified in skeletal muscle also operates in the heart. In skeletal muscle, stimulation of glucose uptake by exercise is independent of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K). In contrast, inhibition of this enzyme diminishes glucose uptake in contracting cardiomyocytes (33;34). Furthermore, hypoxia-induced glucose uptake is completely abolished in skeletal muscle overexpressing a KD-AMPK mutant (19), while ischemia-induced glucose uptake is only partially suppressed in transgenic mice overexpressing a DN-AMPK α 2 mutant in the heart (6). Together, these results suggest that significant differences exist in the regulation of glucose uptake between skeletal and cardiac muscles.

The aim of this project was to examine the signaling cascade activated in response to metabolic stress that leads to increased glucose uptake in primary cultures of adult cardiomyocytes. We have used DNP, a weak base that dissipates the H⁺ gradient, uncoupling the mitochondrial oxidative chain, as a model to mimic hypoxia in cardiomyocytes and to study the molecular effectors that participate in the regulation of glucose uptake under these conditions. We chose to examine the contribution of AMPK and p38MAPK, two enzymes involved in metabolic stress-mediated glucose uptake in skeletal muscle but whose role has not been clearly defined in the heart. Our results indicate that, in adult cardiomyocytes, p38MAPK acts downstream of AMPK. Furthermore, and in contrast to skeletal muscle, inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway only partially abolishes the stimulation of glucose uptake in response to DNP.

Experimental procedures

Chemicals

All cell culture solutions, fatty acid-free bovine serum albumin (FAF BSA), water, supplements, Wortmannin, DNP, adenine 9- β -D arabinofuranoside (AraA), potassium ferricyanide, potassium ferrocyanide, and DNase I were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada), and X-gal was from Roche (Laval, QC, Canada). Collagenase was obtained from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). Human insulin (Humulin R TM) was procured from Eli Lilly Canada Inc. (Toronto, ON, Canada). Phospho-p38MAPK (Thr 180/Tyr 182), p38MAPK, phospho-AMPK (Thr 172) and AMPK polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) while phospho-acetyl CoA carboxylase (Ser 79) (ACC) was from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). DuPont NEN Research Products (Boston, MA) supplied [³H] 2-deoxyglucose (DG). Polyvinylidene difluoride membranes were purchased from Immobilon Millipore (Bedford, MA). The enhanced chemiluminescence detection system was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). PD169316 was from Calbiochem (La Jolla, CA). The Bradford protein assay kit was from Bio-Rad (Hercules, CA). All electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada).

Isolation of adult rat cardiomyocytes

All experiments conformed to guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Male Sprague-Dawley rats weighing 175-200 g were injected ip with 500 U heparin sulfate 15 min prior to anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, ip). The heart was excised, and calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method as described previously (35). During the whole procedure, the cells were maintained at 37°C. Briefly, all hearts were rinsed (4 ml/min) for 5 min in Krebs-Ringer (KR) buffer containing (in mM) 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.25 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11 dextrose and 25 HEPES, pH 7.4. They were then perfused with a calcium-free KR solution for 5 min to stop spontaneous cardiac contractions. This was followed by perfusion with KR buffer supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM

2-3 butanedione monoxime and 0.1% FAF BSA for 15 min. For the last 5 min of perfusion, the KR buffer was supplemented with 0.05 mM CaCl₂, after which the ventricles were separated from the atria. The ventricles were minced in KR supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM 2-3 butanedione monoxime, 0.2 mg/ml DNase I, 0.1 mM CaCl₂ and 0.1% FAF BSA. The resulting cell suspension was filtered through a nylon mesh and centrifuged at 1,000 g for 45 sec. The cells were washed twice and diluted in medium 199 supplemented with 11 mM glucose, 0.2% FAF BSA, 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 5 mM taurine, 10⁻⁷ M insulin, 0.1 M ascorbic acid, 100 IU/ml penicillin, 25 µg/ml gentamicin and 100 mg/ml streptomycin, then plated onto laminin-coated dishes. After 4 h, they were washed to remove damaged cells and debris before incubation at 37°C for 16 h in media containing 10⁻¹¹ M insulin and 5.5 mM glucose.

Cardiomyocyte infection

The adenovirus Ad5/CMV/NLS-LacZ, which encodes the simian virus 40 large T-antigen nuclear-localization signal fused to the *Escherichia coli* lacZ reporter gene (36), served as a control to assess the percentage of infected cardiomyocytes at different multiplicities of infection (MOI). Dr. Lee A. Witters (Dartmouth Medical School, Dartmouth, MA) kindly provided the adenovirus containing the DN-AMPK mutant under the CMV promoter. This construct has a point mutation of the phosphorylation site (Thr 172) within the AMPKα1 subunit and inhibits both AMPKα1 and α2 heterotrimers (Dr. Lee A. Witters, personal communication). Isolated cardiomyocytes were infected with 100, 200 or 500 MOI of either Ad5/CMV/NLS-LacZ or DN-AMPK in media containing 50 µg/ml of laminin. After 16 h, they were washed and incubated for an additional 8 h before glucose uptake measurements or enzyme activation studies.

In situ β-galactosidase staining with X-Gal

Cells were washed twice with KR buffer and fixed with ice-cold methanol for 10 min at -20°C. They were rewashed with KR buffer before β-galactosidase staining was performed (37). Briefly, the cells were incubated for 2 h at 37°C with stain solution which contained 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂ and 1 mg/ml X-gal. The cells were then rinsed twice with KR buffer and fixed

with 10% formalin for 10 min at room temperature. β -galactosidase-positive cells with blue nuclei were then counted.

Glucose uptake in primary cultures of cardiomyocytes

The cells were washed twice with 1 ml of KR buffer. They were then incubated for 30 min in 1 ml of KR buffer containing 5 mM glucose and 0.2% FAF BSA. For the adenovirus experiments, glucose assays were conducted in media containing 10^{-11} M insulin to prevent DNP-associated cell death in DN-AMPK-infected cardiomyocytes. Inhibitors of PI3-K (100 nM Wortmannin), AMPK (0.1, 0.5 and 1 mM AraA) and p38MAPK (0.1, 0.2 and 0.5 μ M PD169316) were added during the preincubation step as indicated in the figure legends. The glucose uptake assay was started by the addition of 1 μ Ci/ml DG. Vehicle (basal), DNP and insulin were also added at this step as indicated in the figure legends, and measured as described previously (35).. Glucose uptake measurement was terminated by 3 rapid washes with 1 ml of ice-cold KR buffer. The cells were disrupted with 0.5 ml of 0.5 M NaOH for 60 min at 37°C, and cell-associated radioactivity was quantified by scintillation counting. Glucose uptake was normalized to total protein, as measured by Bio-Rad assay.

AMPK, ACC and p38MAPK activation

The cells were washed twice with media containing no insulin and incubated for 1 h before stimulation with 0.1 mM DNP for 5 or 10 min. Inhibitors of AMPK and p38MAPK were added 30 min prior to stimulation with DNP. As in the transport experiments, 10^{-11} M insulin was added to the media when the cardiomyocytes were infected with adenovirus. The reaction was stopped by 3 rapid washes with ice-cold KR buffer. The cells were then lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 10 μ g/ml aprotinin, 0.5 μ g/ml leupeptin, 1% Triton X-100 and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The lysate was centrifuged for 5 min at 12,000 g at 4°C to remove insoluble material, and the resulting supernatant was taken for immunoblotting.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Samples were electrophoresed on 6% or 10% SDS-polyacrylamide gel, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes for Western blotting. The membranes were blocked for 1 h with 5% (wt/vol) milk in PBST, pH 7.4, containing 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20 and 0.02% sodium azide. They were then incubated with the primary antibody, followed by incubation with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Antigen-antibody complexes were detected by the enhanced chemiluminescence method. Quantitative analysis was performed with a scanning densitometer.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied for multiple comparisons, followed by the Fisher *post hoc* test. All data are reported as means \pm SE. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

Results

DNP and insulin stimulate glucose uptake through the activation of distinct signaling pathways in cardiomyocytes

In skeletal muscle, exercise and hypoxia stimulate glucose uptake in a PI3-K-independent manner. However, in the heart, PI3-K is activated during contraction, ischemia/reperfusion and preconditioning (34;38;39). Thus, we investigated the role of PI3-K in DNP-mediated activation of glucose uptake in adult cardiomyocytes. We first established the concentration of DNP necessary to stimulate glucose uptake in these cells. The addition of 0.05 mM and 0.1 mM DNP increased cardiac glucose uptake by 1.4- and 2.3-fold, respectively ($P < 0.02$). At concentrations of 0.2 mM and above, we noted that a subset of cells lost their characteristic rod-shaped form, suggesting a cytotoxic effect of DNP at higher concentrations (data not shown). Therefore, all subsequent experiments were performed at 0.1 mM DNP. We next examined whether PI3-K played a role in DNP-mediated glucose uptake in adult cardiomyocytes. Our results showed that, in adult cardiomyocytes, the stimulatory effect of insulin and DNP on glucose uptake was additive ($P < 0.02$), indicating that the two stimuli utilized distinct signaling cascades (Figure 1A). Inhibition of PI3-K by 100 nM Wortmannin completely suppressed the increase of glucose uptake induced by insulin ($P < 0.02$) (Figure 1B). In contrast, the inhibitor was without any effect on DNP-mediated glucose uptake, suggesting that PI3-K does not play a role in this process. Thus, in isolated adult cardiomyocytes, DNP and insulin stimulated glucose uptake through the activation of distinct signaling cascades.

Pharmacological inhibition of AMPK reduces DNP-mediated p38MAPK activation and glucose uptake in cardiomyocytes

AMPK plays a major role in stress-induced glucose uptake in skeletal muscle (25). The primary site responsible for AMPK activation is Thr 172, and phosphorylation of this site increases enzyme activity by 50- to 100-fold (40). As a first step to delineate the contribution of AMPK to DNP-mediated glucose uptake, we inhibited the enzyme with the pharmacological agent, AraA. Adult cardiomyocytes were pretreated with increasing concentrations of AraA (0.1, 0.5 and 1 mM) for 30 min, after which the cells were stimulated with DNP before measurement of AMPK activation with an antibody

that recognizes its phosphorylated form. As shown in Figure 2A, DNP induced a 1.8-fold increase in AMPK phosphorylation ($P < 0.007$). Incubation of cardiomyocytes with increasing concentrations of AraA provoked a dose-dependent decrease of DNP-mediated AMPK phosphorylation, resulting in 60% ($P < 0.02$) and 80% ($P < 0.007$) reductions of DNP-induced enzyme phosphorylation at 0.5 and 1 mM AraA, respectively. Since AraA primarily inhibits the AMPK α 2 isoform (17), the residual AMPK activity observed in cardiomyocytes is probably due to the AMPK α 1 isoform.

Xi *et al.* (32) have demonstrated that p38MAPK is localized downstream of the AMPK signaling cascade in liver-derived Clone 9 cells. We, therefore, examined whether AMPK inhibition suppresses DNP-mediated p38MAPK activation in cardiomyocytes. p38MAPK activation was assessed with an antibody that recognizes the active and phosphorylated form of the enzyme. Maximal activation of this enzyme was achieved after 10 min of stimulation (data not shown). This time point was used in subsequent experiments. As shown in Figure 2B, DNP is a powerful activator of p38MAPK, inducing a 9.4-fold increase of enzyme phosphorylation in control cardiomyocytes ($P < 0.002$). Inhibition of AMPK with 1 mM AraA was associated with a 62% reduction of p38MAPK phosphorylation in response to DNP ($P < 0.05$).

We next studied the contribution of AMPK to DNP-stimulated glucose uptake in adult cardiomyocytes. As illustrated in Figure 3, DNP increased glucose uptake by 2.4-fold in adult cardiomyocytes ($P < 0.001$). Incubation with increasing concentrations of AraA inhibited DNP action in a dose-dependent manner in these cells. At 0.5 mM and 1 mM AraA, we observed 41% ($P < 0.02$) and 51% ($P < 0.002$) reductions of glucose uptake in response to DNP. Incubation with a higher concentration of AraA (2 mM) did not further inhibit DNP-mediated glucose uptake in cardiomyocytes (data not shown).

DN-AMPK inhibits AMPK, ACC and p38MAPK phosphorylation and reduces glucose uptake in response to DNP

Pharmacological inhibitors are useful tools to examine the role of an enzyme in signaling pathways. However, most inhibitors also demonstrated non specific effects towards other enzymes. To further ascertain the role of AMPK in p38MAPK activation

and glucose uptake, we overexpressed a DN-AMPK mutant by adenoviral infection. Cardiomyocytes express very low levels of coxsakievirus and adenovirus receptors, and show low infectivity compared to other cells (41). We, therefore, used a nuclear-engineered β -galactosidase reporter gene to titer virus infectivity in cardiomyocytes. Infection with 100, 200 and 500 MOI resulted in 68%, 72% and 81% nuclear staining, respectively (data not shown). Based on these results, we infected cardiomyocytes with 500 MOI of DN-AMPK adenovirus in subsequent experiments. We monitored DN-AMPK expression by Western blotting with an anti-AMPK antibody. As shown in Figure 4A, infection with 500 MOI of DN-AMPK increased AMPK content by 9.5-fold ($P < 0.003$). We next determined whether DN-AMPK could inhibit endogenous AMPK and prevent DNP-mediated phosphorylation of AMPK. As shown in Figure 4A, stimulation with DNP produced a 2.2-fold increase in AMPK phosphorylation ($P < 0.005$). Overexpression of 500 MOI of DN-AMPK completely suppressed DNP-mediated phosphorylation of AMPK α 1 and α 2 isoforms ($P < 0.005$). These results suggest that DN-AMPK acts as a dominant negative inhibitor of endogenous AMPK.

To further ascertain AMPK inhibition by DN-AMPK, we examined the phosphorylation of a downstream target of AMPK, ACC, in response to DNP. Phosphorylation of ACC on ser79 reflects AMPK activation by phosphorylation and by allosteric effectors. As illustrated in Figure 4B, DNP induced a 3-fold-increase of ACC phosphorylation in control cells ($P < 0.001$) which was completely abolished upon infection with DN-AMPK ($P < 0.001$). The parallel reduction in phosphorylated AMPK and ACC demonstrated that overexpression of DN-AMPK inhibited the activation of the endogenous enzyme in response to DNP.

We next established the effect of DN-AMPK on p38MAPK activation in cardiomyocytes. As shown in Figure 4C, infection with DN-AMPK did not affect the concentration of p38MAPK. Stimulation with DNP provoked a 2-fold increase in p38MAPK activation in cardiomyocytes ($P < 0.001$). Infection with 500 MOI of DN-AMPK completely inhibited p38MAPK phosphorylation in response to DNP ($P < 0.004$). These results confirmed the role of AMPK in DNP-mediated activation of p38MAPK.

To examine the contribution of AMPK to DNP-stimulated glucose uptake in adult cardiomyocytes, we infected cardiomyocytes with 500 MOI of DN-AMPK adenovirus. Stimulation with DNP produced 1.6-fold stimulation of glucose uptake in cardiomyocytes ($P < 0.05$). In concordance with what was observed with AraA, DN-AMPK overexpression only partially reduced (39%) the increase of glucose uptake following DNP stimulation (Figure 5A). In contrast, insulin-stimulated glucose uptake ($P < 0.05$) was not affected by DN-AMPK overexpression, and a 2.1- to 2.5-fold increase in glucose uptake was obtained in control and DN-AMPK-infected cells, respectively (Figure 5B).

DN-AMPK does not modulate GLUT1 and GLUT4 content in cardiomyocytes

GLUT1 and GLUT4 are the primary glucose transporters expressed in the heart. Because an alteration in the concentration of either GLUT1 and GLUT4 levels could modulate DNP-stimulated glucose uptake, we evaluated their protein content by Western blotting in adenoviral infected cardiomyocytes. Infection with 500 MOI DN-AMPK did not affect the concentration of either GLUT1 or GLUT4 proteins in cardiomyocytes (data not shown).

PD169316 inhibits DNP-induced p38MAPK phosphorylation and glucose uptake in cardiomyocytes

Our results suggested that AMPK participates in DNP-induced glucose uptake and that p38MAPK acts downstream of AMPK in this signaling pathway. To determine the contribution of p38MAPK to DNP-mediated glucose uptake, we inhibited the enzyme with PD169316. This pharmacological compound binds to the ATP-binding pocket of the enzyme and inhibits p38MAPK activity with an IC_{50} of 0.89 nM. Inactivation of p38MAPK is associated with a reduction in Tyr-182 and/or Thr-180 phosphorylation, which is detectable by Western blotting. Cardiomyocytes were pretreated with increasing concentration of PD169316 for 30 min before evaluation of DNP-mediated glucose uptake in these cells. As shown in Figure 6A, PD169316 inhibited DNP-stimulated glucose uptake in a dose-dependent manner in cardiomyocytes. At 0.5 μ M, PD169316 provoked a 69% decrease in DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes ($P < 0.003$). Pretreatment with 1 μ M PD169316 did not further inhibit DNP-mediated

glucose uptake (73% reduction; data not shown). Together, these results suggested that maximal inhibition of glucose uptake is achieved at 0.5 μ M PD169316. We next evaluated the ability of this compound to inhibit p38MAPK activation in cardiomyocytes. As shown in Figure 6B, DNP increased p38MAPK phosphorylation by 4.5-fold in control cells ($P < 0.004$), and preincubation with 0.5 μ M PD169316 caused a 40% reduction of DNP-mediated p38MAPK phosphorylation in cardiomyocytes ($P < 0.04$).

Discussion

DNP was used as a model to mimic hypoxia in cardiomyocytes and to study the molecular mechanisms underlying the stimulation of glucose uptake in response to stress in these cells. Our data demonstrated that PI3-K activation is not required for DNP-mediated glucose uptake in cardiomyocytes. Our results also show that AMPK inhibition suppressed p38MAPK activation in response to DNP in adult cardiomyocytes. More importantly, inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling cascade only partially abolished DNP-stimulated glucose uptake in these cells. Collectively, these findings demonstrated that p38MAPK is downstream of the AMPK signaling cascade in cardiomyocytes and that activation of AMPK and p38MAPK is required for maximal stimulation of glucose uptake during metabolic stress.

In skeletal muscle, insulin and contractions stimulate glucose uptake through activation of distinct signaling cascades, as demonstrated by the additive effect of these stimuli on this process. Furthermore, while activation of PI3-K is required for insulin action, the enzyme does not participate in the regulation of glucose uptake by contractions. In comparison, in isolated adult cardiomyocytes, the effects of insulin and contractions on glucose uptake are not additive (34). In addition, in cardiomyocytes, contractions activate PI3-K, and inhibition of the enzyme reduces contraction-mediated glucose uptake in these cells (34). These results suggest that PI3-K participates in the regulation of cardiac glucose uptake during contractions. In contrast to what has been observed for contractions, the effects of DNP and insulin are additive in cardiomyocytes. Furthermore, inhibition of PI3-K by Wortmannin does not alter DNP-mediated glucose uptake while it completely suppresses insulin's stimulation of this process. Together, these results demonstrated that PI3-K does not contribute to DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. This is in agreement with what has been reported for ischemia and preconditioning, both of which activate glucose uptake in a PI3-K-independent manner (39;42). It should be noted that in skeletal muscle, the contribution of AMPK to the stimulation of glucose uptake differs between hypoxia and contractions (19). Potentially similar differences in the signaling pathway activated in response to contractions and DNP may also exist in the myocardium.

Several enzymes have been identified as potent mediators of glucose uptake in response to metabolic stress (25). AMPK, which regulates both glycolysis and fatty oxidation, is considered an important metabolic fuel gauge. The pharmacological activation of AMPK by AICAR stimulates glucose uptake in cardiac papillary (43) and skeletal muscles (44). However, stimulation with AICAR did not increase glucose uptake in cardiomyocytes (unpublished data). Studies have demonstrated that AICAR does not activate AMPK in these cells (45;46;47) probably because they lack adenylate cyclase, the enzyme responsible for its conversion to ZMP (47). In skeletal muscles, there is a good correlation between AMPK activation and enhanced glucose uptake in response to various metabolic stressors (25;48). On the other hand, the role of AMPK in the regulation of cardiac glucose uptake has been largely unexplored. Therefore, our objective was to delineate the contribution of AMPK to p38MAPK activation and the stimulation of glucose uptake in response to DNP in adult cardiomyocytes. The role of AMPK was examined using two complementary approaches: pharmacological inhibition of the enzyme with AraA, and adenoviral-mediated infection of cardiomyocytes with a DN-AMPK mutant. Our results showed that inhibition with AraA reduced DNP-mediated AMPK phosphorylation in a dose-dependent manner in adult cardiomyocytes. Overexpression of the DN-AMPK mutant also prevented AMPK and ACC phosphorylation in response to DNP. Inhibition of DNP-mediated ACC phosphorylation by DN-AMPK suggests that the mutant acts as a dominant negative of endogenous enzyme.

Activation of p38MAPK has been observed in response to various stimuli including hyperosmolarity, hypoxia, ischemia, preconditioning and DNP, stimuli that are also associated with increased AMPK activity (49). Furthermore, in skeletal muscles, pharmacological activation of AMPK by AICAR stimulated p38MAPK (24). Our results show that stimulation with DNP also activates AMPK and p38MAPK. Importantly, inhibition of AMPK with AraA greatly decreased DNP-mediated p38MAPK phosphorylation in cardiomyocytes. Furthermore, overexpression of DN-AMPK completely inhibited DNP-mediated p38MAPK phosphorylation in cardiomyocytes. While we can not exclude that DN-AMPK action is mediated by its binding to a

component of the p38MAPK signaling cascade, the fact that we observed a reduction of p38MAPK phosphorylation following AMPK inhibition by a pharmacological agent or by the molecular approach strongly suggests that p38MAPK is a downstream target of AMPK. Similar findings were also reported by Xi et al. who demonstrated that overexpressing a DN-AMPK abolished p38MAPK activation in liver-derived Clone 9 cells (32). In contrast, in 3T3-L1 adipocytes, activation of AMPK impaired insulin-mediated glucose uptake (50) whereas activation of p38MAPK participates in the stimulatory effect of insulin on glucose uptake through modulation of GLUT4 intrinsic activity (30). This latter result suggests that the coupling between AMPK and p38MAPK may be tissue-specific. Our results demonstrated that, in the heart, p38MAPK is downstream of AMPK. Additional work will be needed to further define the relationship between AMPK and p38MAPK in different tissues.

Studies have suggested that activation of AMPK is required for AICAR- and hypoxia-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. However, whether this enzyme plays a similar role in the heart is still not resolved. We thus examined AMPK's contribution to the regulation of glucose uptake in adult cardiomyocytes. Inhibition of AMPK by AraA or DN-AMPK reduces the stimulatory effect of DNP on glucose uptake by 51% and 39%, respectively. Thus, in adult cardiomyocytes, inhibition of AMPK provokes only a partial reduction of glucose uptake in response to DNP. Xing et al. (6) also reported similar results in which no-flow ischemia-induced glucose uptake was inhibited by 62% in transgenic mice hearts overexpressing a DN-AMPK α_2 mutant. On the other hand, overexpression of a KD-AMPK mutant completely abolished the stimulation of cardiac glucose uptake during low-flow ischemia (51). These differences, in the contribution of AMPK to glucose uptake may be related to the severity of the metabolic stress generated. Alternatively, they may be compensatory mechanisms activated in response to inhibition of both α_1 and α_2 AMPK isoforms in the heart. Our studies suggest that in cardiomyocytes, inhibition of AMPK only partially decreased glucose uptake in response to DNP. Studies have demonstrated that glucose is an important substrate during metabolic stresses such as ischemia or hypoxia. Thus, the partial reduction of glucose uptake in response to AMPK inhibition may be a protective

mechanism to prevent complete suppression of cardiac glucose uptake, which could be detrimental for the heart. Thus, the contribution of multiple pathways to the stimulation of glucose uptake during metabolic stress may allow for the maintenance of glucose supply and thus cardiac function. Further studies exploring the role of AMPK in various models of ischemia will be needed to clarify the contribution of this enzyme to the stimulation of glucose uptake in the heart.

AMPK also phosphorylates and activates phosphofructokinase-2 (PFK-2) in the heart. PFK-2 is the enzyme responsible for the synthesis of fructose 2, 6-phosphate, a powerful activator of the glycolytic pathway (46). Thus, inhibition of AMPK should be paralleled by a concomitant reduction of PFK-2 activity, glycolysis and potentially glucose uptake. Studies have shown, however, that stimulation of glycolysis by increased cardiac workload does not require AMPK activation (52). Furthermore, in transgenic mice overexpressing DN-AMPK or KD-AMPK, cardiac glycogen breakdown occurs normally, suggesting that glycolysis was not impaired in these animals (6;51). In addition to AMPK, PFK-2 can be phosphorylated and activated by other kinases, including protein kinase A. Cardiac glycolysis is also regulated by local factors such as adenine nucleotide concentration and intracellular pH (53;54). Thus, the regulation of PFK-2 activity involves multiple and overlapping mechanisms, reflecting the importance of glycolysis in maintaining energy supplies during stressful conditions. Whether inhibition of AMPK impairs glycolysis in DNP-stimulated cardiomyocytes remains to be investigated.

Several studies have demonstrated that p38MAPK participates in the regulation of glucose uptake in response to various stimuli probably through the modulation of GLUT1 (55) or GLUT4 intrinsic activity (30;56). We have shown that p38MAPK is downstream of the AMPK signaling cascade and that inhibition of AMPK decreases glucose uptake in cardiomyocytes. We thus sought to determine whether inhibition of p38MAPK would also diminish glucose uptake in response to DNP in these cells. Pharmacological inhibition of p38MAPK with PD169316 only partially decreased DNP-mediated glucose uptake in cardiomyocytes. While we can not rule out that the decrease in glucose uptake by PD169316 is independent of p38MAPK inhibition, this result is consistent with the partial reduction of glucose uptake observed in response to AMPK

inhibition in cardiomyocytes. On the other hand, these data contrast with the study of Xi et al., in which they reported that inhibition of p38MAPK completely suppresses AICAR-mediated glucose uptake in Clone 9 cells. Similar results were also obtained for skeletal muscle, in which pharmacological inhibition of p38MAPK completely suppressed AICAR-mediated glucose uptake (24). On the other hand, inhibition of the enzyme decreased only partially contraction-mediated glucose uptake (31). As mentioned above, the contribution of the AMPK/p38MAPK signaling pathway to glucose uptake is both tissue- and stimuli-specific. Our data in adult cardiomyocytes strongly suggest that in this tissue, activation of an additional pathway is required for the maximal stimulation of glucose uptake in response to DNP.

In skeletal muscle, overexpression of KD-AMPK mutant or selective ablation of AMPK α 2 completely blocked the stimulatory effect of either AICAR or hypoxia in this tissue (57). Similar results have been reported by Fryer et al. (21) who demonstrated that AICAR-induced glucose uptake was completely inhibited by DN-AMPK overexpression in H-2K muscle cells. Thus, in skeletal muscle, activation of AMPK is required for both AICAR- and hypoxia-stimulated glucose uptake. On the other hand, inhibition of AMPK with AraA or DN-AMPK provokes only a partial reduction of DNP-mediated glucose uptake. This latter result suggests that the contribution of AMPK to the regulation of glucose uptake is tissue-specific. Other differences between cardiac and skeletal muscles have also been reported. Eckel's group (34) demonstrated that stimulation of glucose uptake by contraction required PI3-K activation in cardiomyocytes. Furthermore, in the heart, AMPK phosphorylates and activates PFK-2, leading to enhanced glycolysis while this does not occur in muscle because in this tissue the PFK-2 isoform does not contain an AMPK phosphorylation site (58). Together, these studies indicate that important mechanistic differences may exist between the heart and skeletal muscle regarding the regulation of glucose metabolism. Because the concentrations and activities of signaling molecules can be modulated, primary cultures of adult cardiomyocytes may represent a good model to explore the activation of signaling pathways in the heart.

What could be the additional signaling pathway contributing to increased glucose uptake in cardiomyocytes? Stimulation with DNP increases intracellular Ca²⁺

concentration in adipocytes (59) and cardiomyocytes (60). In L6 myotubes, calcium chelation decreases glucose uptake in response to DNP, suggesting that Ca^{2+} contributes to this process (61). Other potential candidates include calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK) and classical protein kinase C, both of which can be activated by calcium and are involved in glucose uptake in skeletal muscles (61-63). Interestingly, pharmacological inhibition of CAMK reduces the stimulatory effect of hypoxia on glucose uptake in skeletal muscles (62;63) and in the heart (Pelletier, A., and L. Coderre, unpublished data), suggesting that the enzyme plays an important role in this process. However, confirmation of its role in the regulation of glucose uptake in the heart awaits further investigation.

In conclusion, our results demonstrate that p38MAPK acts downstream of AMPK in adult cardiomyocytes. Importantly, inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling cascade decreased DNP-mediated glucose uptake, suggesting that activation of these enzymes is required for maximal stimulation of glucose uptake in cardiomyocytes.

Acknowledgements

We thank Dr. Pierre Paradis for providing the Ad5/CMV/NLS-LacZ adenovirus and for helpful discussions. We also thank Dr. James C. Engert for helpful discussions. The editorial assistance of Mr. Ovid Da Silva, Editor, Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged.

References

1. Van Der Vusse GJ, Glatz JF, Stam HC, Reneman RS 1992 Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev* 72:881-940
2. Sowers JR, Lester MA 1999 Diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 22 (Suppl. 3):C14-C20
3. Depre C, Vanoverschelde J-LJ, Taegtmeyer H 1999 Glucose for the heart. *Circulation* 99:578-588
4. Carvajal K, Moreno-Sanchez R 2003 Heart metabolic disturbances in cardiovascular diseases. *Arch Med Res* 34:89-99
5. Luiken JJ, Coort SL, Willems J, Coumans WA, Bonen A, Van Der Vusse GJ, Glatz JF 2003 Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 52:1627-1634
6. Xing Y, Musi N, Fujii N, Zou L, Luptak I, Hirshman MF, Goodyear LJ, Tian R 2003 Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 278:28372-28377
7. Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M, Brosius FC, III 1994 Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* 89:793-798
8. Abdel-Aleem S, St Louis JD, Hughes GC, Lowe JE 1999 Metabolic changes in the normal and hypoxic neonatal myocardium. *Ann N Y Acad Sci* 874:254-261
9. Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG 1995 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377:421-425
10. Frederich M, Balschi JA 2002 The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart. *J Biol Chem* 277:1928-1932
11. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D 2000 The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3:437-443
12. Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG 1995 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* 270:27186-27191
13. Winder WW, Hardie DG 1996 Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270:E299-E304

14. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG 1995 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229:558-565
15. Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI, Young LH 1999 Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 277:H643-H649
16. Winder WW, Hardie DG 1999 AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277:E1-E10
17. Musi N, Hayashi T, Fujii N, Hirshman MF, Witters LA, Goodyear LJ 2001 AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E677-E684
18. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA, Goodyear LJ 2000 Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49:527-531
19. Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ 2001 A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7:1085-1094
20. Patel N, Khayat ZA, Ruderman NB, Klip A 2001 Dissociation of 5' AMP-activated protein kinase activation and glucose uptake stimulation by mitochondrial uncoupling and hyperosmolar stress: differential sensitivities to intracellular Ca²⁺ and protein kinase C inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 285:1066-1070
21. Fryer LG, Fougelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A, Carling D 2002 Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochemical Journal* 363:167-174
22. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW 1999 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48:1667-1671
23. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Fujishiro M, Ono H, Onishi Y, Katagiri H, Abe M, Fukushima Y, Shojima N, Inukai K, Kikuchi M, Oka Y, Asano T 2002 Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol* 282:E1239-E1244
24. Lemieux K, Konrad D, Klip A, Marette A 2003 The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J* 17:1658-1665
25. Musi N, Goodyear LJ 2003 AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand* 178:337-345
26. Jakobsen SN, Hardie DG, Morrice N, Tornqvist HE 2001 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in

- response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem* 276:46912-46916
27. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH 1996 Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79:162-173
 28. Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z, Schumacker PT 2002 Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L1324-L1329
 29. Taha C, Tsakiridis T, McCall A, Klip A 1997 Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *Am J Physiol* 273:E68-E76
 30. Somwar R, Koterski S, Sweeney G, Sciotti R, Djuric S, Berg C, Trevillyan J, Scherer PE, Rondinone CM, Klip A 2002 A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 277:50386-50395
 31. Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Cote CH, Klip A, Marette A 2000 Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes* 49:1794-1800
 32. Xi X, Han J, Zhang JZ 2001 Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276:41029-41034
 33. Yeh JI, Gulve EA, Rameh L, Birnbaum MJ 1995 The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. *J Biol Chem* 270:2107-2111
 34. Till M, Ouwens DM, Kessler A, Eckel J 2000 Molecular mechanisms of contraction-regulated cardiac glucose transport. *Biochem J* 346 Pt 3:841-847
 35. Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L 2001 Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 281:E1205-E1212
 36. French BA, Mazur W, Ali NM, Geske RS, Finnigan JP, Rodgers GP, Roberts R, Raizner AE 1994 Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. *Circulation* 90:2402-2413
 37. Sanes JR, Rubenstein JL, Nicolas JF 1986 Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5:3133-3142

38. Armstrong SC 2004 Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 61:427-436
39. Tong H, Chen W, London RE, Murphy E, Steenbergen C 2000 Preconditioning enhanced glucose uptake is mediated by p38 MAP kinase not by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:11981-11986
40. Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH 2003 Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278:28434-28442
41. Communal C, Huq F, Lebeche D, Mestel C, Gwathmey JK, Hajjar RJ 2003 Decreased efficiency of adenovirus-mediated gene transfer in aging cardiomyocytes. *Circulation* 107:1170-1175
42. Egert S, Nguyen N, Brosius FC, III, Schwaiger M 1997 Effects of wortmannin on insulin- and ischemia-induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res* 35:283-293
43. Li J, Selvakumar P, Russell III RR, Cushman SW, Holman GD, Young LH. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. 2004 *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E834-E841.
44. Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ 1998 Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes* 47:1369-1373
45. Yang J, Holman GD 2004 Insulin and contraction stimulate exocytosis but increased AMPK activity resulting from oxidative-metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* (In press)
46. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den BG, Carling D, Hue L 2000 Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10:1247-1255
47. Javaux F, Vincent MF, Wagner DR, Van den BG 1995 Cell-type specificity of inhibition of glycolysis by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside. Lack of effect in rabbit cardiomyocytes and human erythrocytes, and inhibition in FTO-2B rat hepatoma cells. *Biochem J* 305 (Pt 3):913-919
48. Toyoda T, Hayashi T, Miyamoto L, Yonemitsu S, Nakano M, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Inoue G, Otaka A, Sato K, Fushiki T, Nakao K 2004 Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287:E166-E173
49. Michelle FL, Poon V, Klip A 2003 GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand* 178:287-296

50. Salt IP, Connell JM, Gould GW 2000 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49:1649-1656
51. Russell RR, III, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH 2004 AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114:495-503
52. Beauloye C, Marsin AS, Bertrand L, Vanoverschelde JL, Rider MH, Hue L 2002 The stimulation of heart glycolysis by increased workload does not require AMP-activated protein kinase but a wortmannin-sensitive mechanism. *FEBS Lett* 531:324-328
53. Opie LH. *The Heart: Physiology, From Cell to Circulation*, 3rd Ed. 295-342. 1998. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
54. Uyeda K 1979 Phosphofructokinase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 48:193-244
55. Abbud W, Habinowski S, Zhang JZ, Kendrew J, Elkairi FS, Kemp BE, Witters LA, Ismail-Beigi F 2000 Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport. *Arch Biochem Biophys* 380:347-352
56. Kumar N, Dey CS 2002 Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol* 137:329-336
57. Jorgensen SB, Viollet B, Andreelli F, Frosig C, Birk JB, Schjerling P, Vaulont S, Richter EA, Wojtaszewski JF 2004 Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J Biol Chem* 279:1070-1079
58. Hue L, Rider MH 1987 Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem J* 245:313-324
59. Sun X, Zemel MB 2003 Effects of mitochondrial uncoupling on adipocyte intracellular Ca(2+) and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 14:219-226
60. Hudman D, Rainbow RD, Lawrence CL, Standen NB 2002 The origin of calcium overload in rat cardiac myocytes following metabolic inhibition with 2,4-dinitrophenol. *J Mol Cell Cardiol* 34:859-871
61. Khayat ZA, Tsakiridis T, Ueyama A, Somwar R, Ebina Y, Klip A 1998 Rapid stimulation of glucose transport by mitochondrial uncoupling depends in part on cytosolic Ca²⁺ and cPKC. *Am J Physiol* 275:C1487-C1497
62. Brozinick JT, Jr., Reynolds TH, Dean D, Cartee G, Cushman SW 1999 1-[N, O-bis-(5-isoquinolinesulphonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine (KN-62), an inhibitor of calcium-dependent calmodulin protein kinase II, inhibits both

insulin- and hypoxia-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Biochem J* 339 (Pt 3):533-540

63. Wright DC, Hucker KA, Holloszy JO, Han DH 2004 Ca²⁺ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* 53:330-335

Figure legends

Figure 1: Insulin and DNP induce glucose uptake through activation of independent signaling pathways in cardiomyocytes. **A:** Cardiomyocytes were stimulated with 10^{-8} M insulin, 0.1 mM DNP or a combination of both agents before measurement of glucose uptake as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 3 independent experiments. $*P < 0.05$ compared to basal; $\dagger P < 0.02$ different from DNP- and insulin-stimulated controls. **B:** Cardiomyocytes were preincubated for 30 min with 100 nM Wortmannin prior to insulin or DNP stimulation. Means \pm SE of 4 independent experiments. $*P < 0.006$ vs basal control; $**P < 0.009$ vs basal Wortmannin; $\dagger P < 0.02$ different from insulin-stimulated controls.

Figure 2: AraA inhibits the activation of AMPK, p38MAPK and glucose uptake in response to DNP. Cardiomyocytes were preincubated for 30 min with 0.1, 0.5 or 1 mM AraA prior to stimulation with 0.1 mM DNP for either 5 min (**A**) or 10 min (**B**). **A:** Top: Representative immunoblot of phospho-AMPK, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 3 independent experiments. $*P < 0.005$ basal control vs DNP-treated cells; $\dagger P < 0.02$ different from DNP-stimulated controls; $\dagger\dagger P < 0.007$ different from DNP-stimulated controls. **B:** Top: Representative immunoblot of phospho-p38MAPK, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 4 independent experiments. $*P < 0.002$ basal control vs DNP-treated cells; $\dagger P < 0.05$ different from DNP-stimulated controls.

Figure 3: AraA inhibits glucose uptake in response to DNP in a dose-dependent manner. Cardiomyocytes were preincubated for 30 min with 0.1, 0.5 or 1 mM AraA prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min. Glucose uptake was evaluated as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 3 independent experiments. $*P < 0.006$ basal control vs DNP-treated cells; $\dagger P < 0.01$ basal vs DNP-treated cells (0.5 mM AraA) and different from DNP-stimulated controls; $\dagger\dagger P < 0.03$ basal vs DNP-treated cells (1 mM AraA) and different from DNP-stimulated controls.

Figure 4: Overexpression of DN-AMPK inhibits DNP-induced AMPK, ACC and p38MAPK phosphorylation and activation of glucose uptake in cardiomyocytes. Cells were exposed for 24 h to 500 MOI of control or DN-AMPK adenovirus as described in Experimental Procedures prior to stimulation with 0.1 mM DNP for either 5 min (A, B) or 10 min (C). **A:** Top: Representative immunoblot of phospho-AMPK, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 4 independent experiments. * $P < 0.005$ basal control vs DNP-treated cells; † $P < 0.01$ different from DNP-stimulated controls. **B:** Top: Representative immunoblot of phospho-ACC, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 4 independent experiments. * $P < 0.03$ basal control vs DNP-treated cells; † $P < 0.04$ different from DNP-stimulated controls. **C:** Top: Representative immunoblot of phospho-p38MAPK, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 4 independent experiments. * $P < 0.001$ basal control vs DNP-treated cells; † $P < 0.004$ different from DNP-stimulated controls.

Figure 5: Overexpression of DN-AMPK inhibits DNP-induced glucose uptake in cardiomyocytes. Cells were exposed for 24 h to 500 MOI of control or DN-AMPK adenovirus as described in Experimental Procedures prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min (A) or with 10^{-7} M insulin for 30 min (B). Glucose uptake was measured as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 4 independent experiments. * $P < 0.05$ basal control vs DNP- and insulin-treated cells; † $P < 0.03$ different from DNP-stimulated controls.

Figure 6: PD169316 partially inhibits glucose uptake and the activation of p38MAPK in response to DNP in cardiomyocytes. A: Cells were preincubated for 30 min with 0.1, 0.2 or 0.5 μ M PD169316 prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min. Glucose uptake was measured as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 5 independent experiments. * $P < 0.003$ basal vs DNP-treated cells; ** $P < 0.02$ basal vs

DNP-treated cells; $^{\dagger}P < 0.003$, different from DNP-stimulated controls. **B:** Cells were preincubated for 30 min with 0.5 μ M PD169316 prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 10 min. Top: Representative immunoblot of phospho-p38MAPK, Bottom: Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 3 independent experiments. $*P < 0.004$ basal vs DNP-treated cells; $^{\dagger}P < 0.04$, different from DNP-stimulated controls.

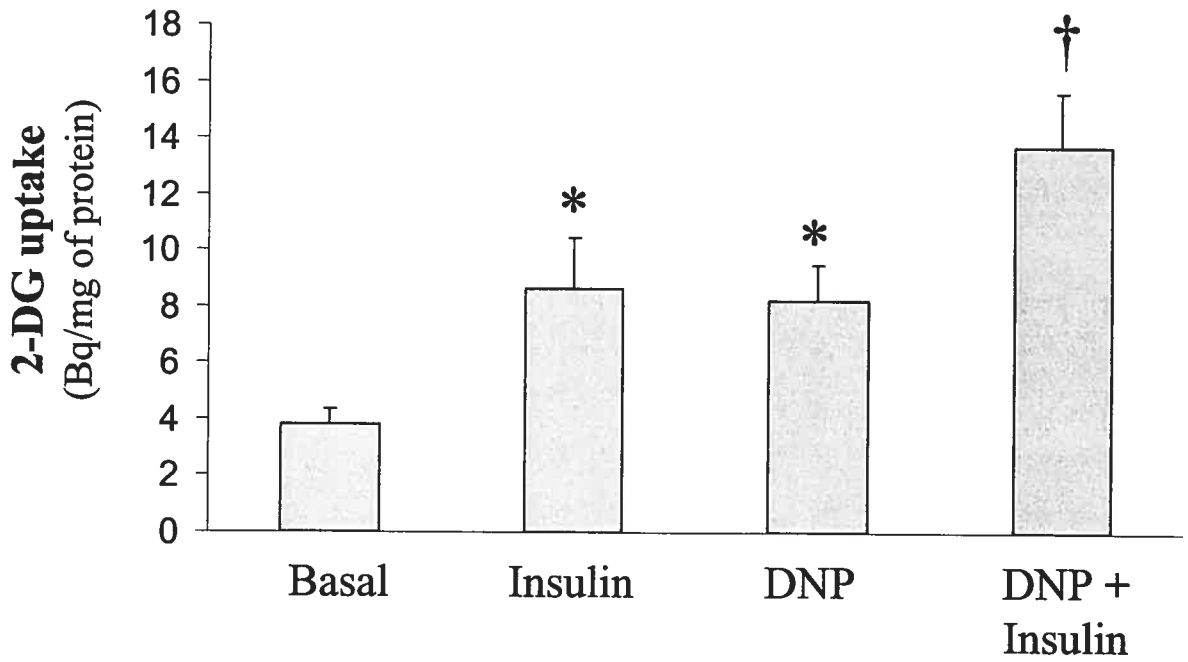
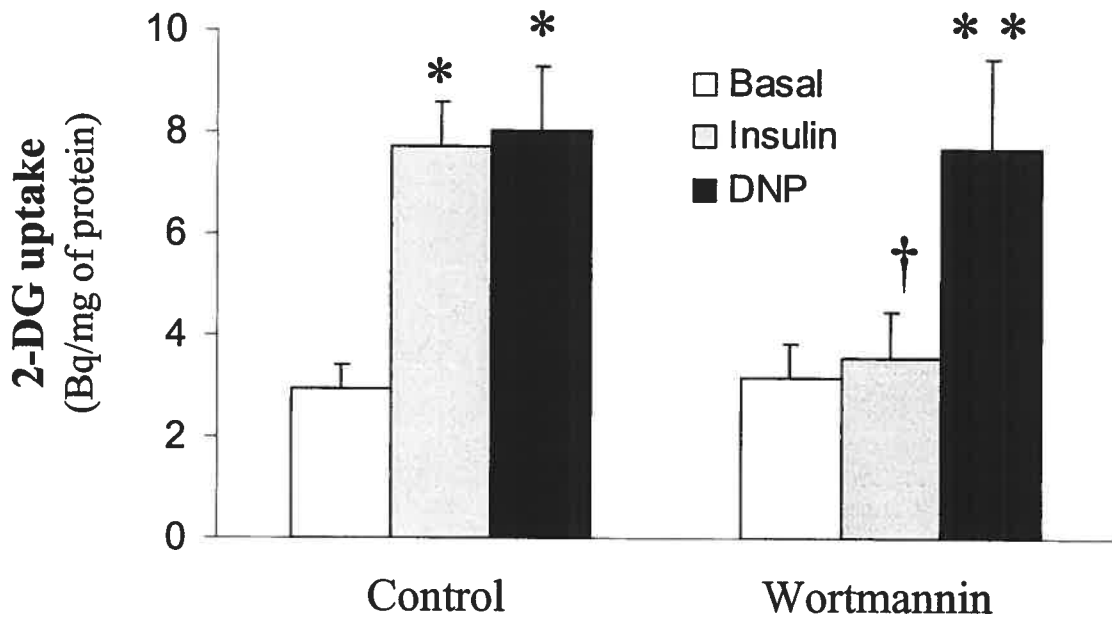
A**B**

Figure 1

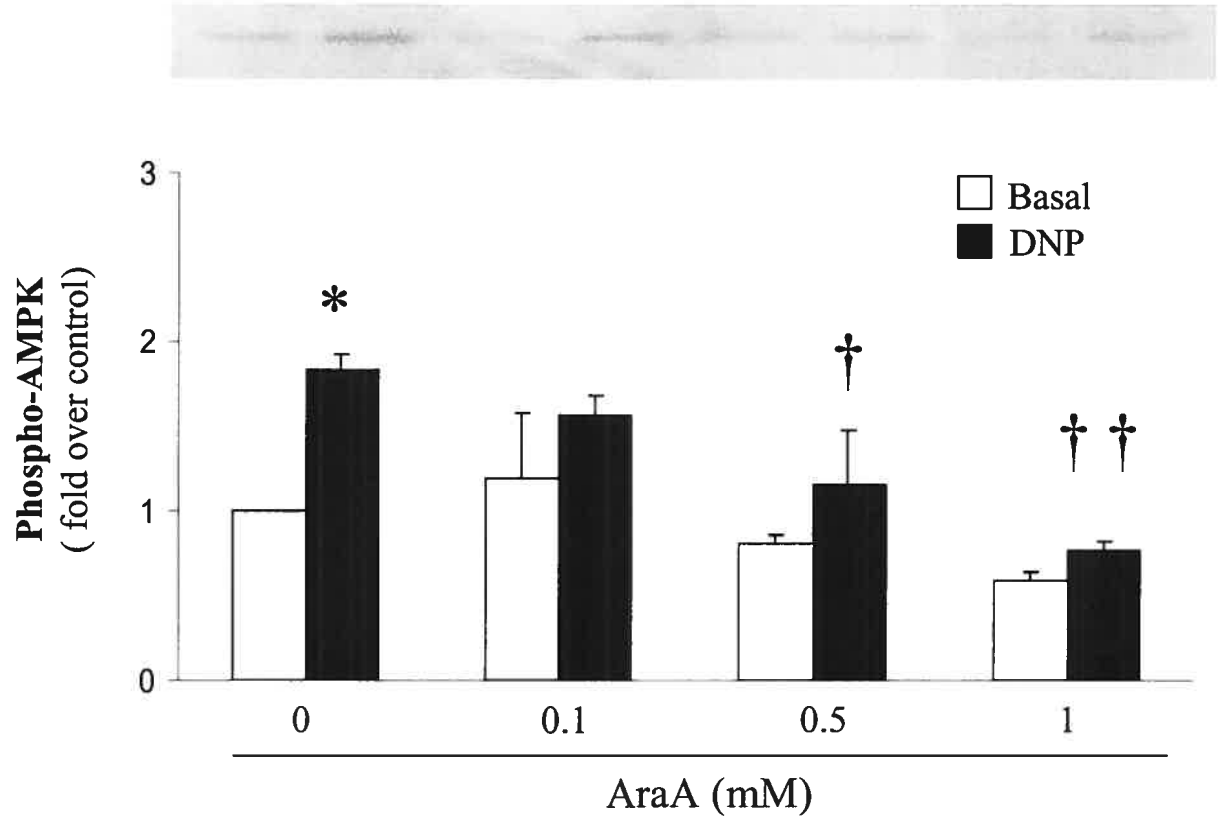
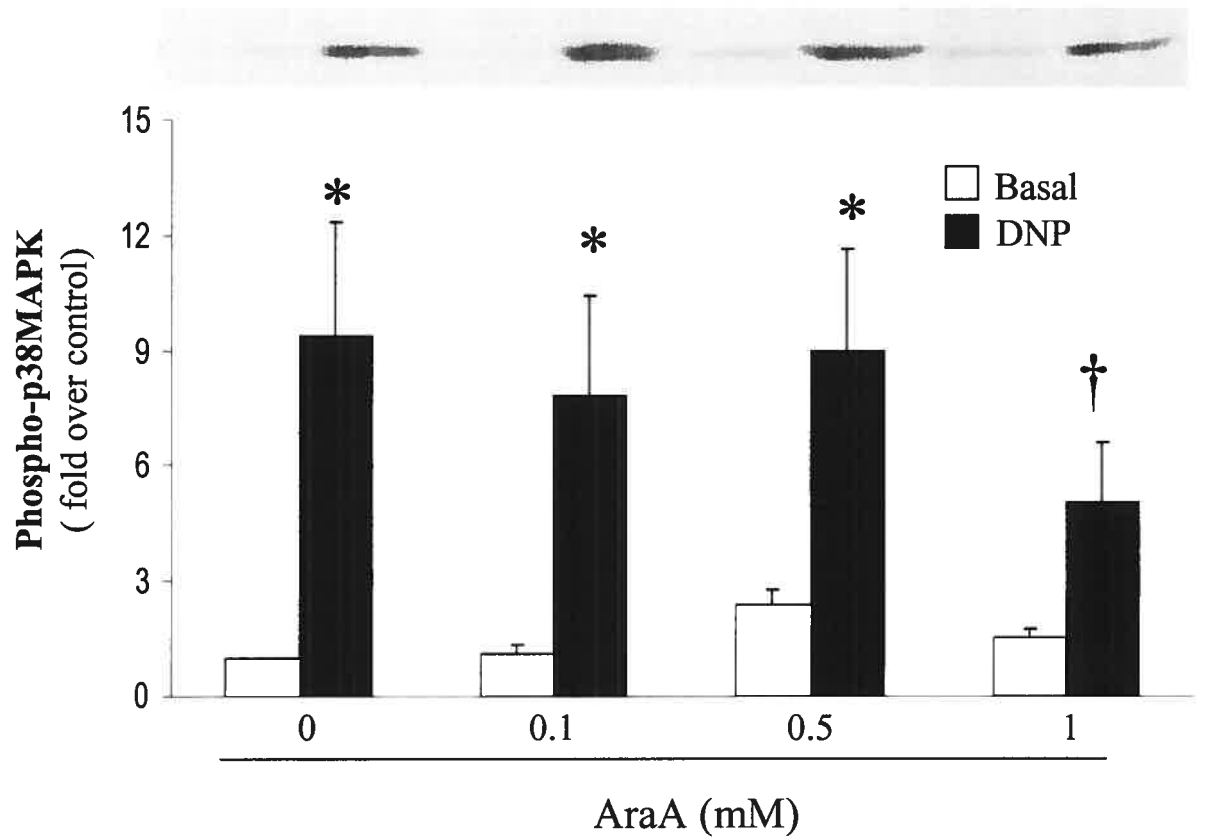
A**B**

Figure 2

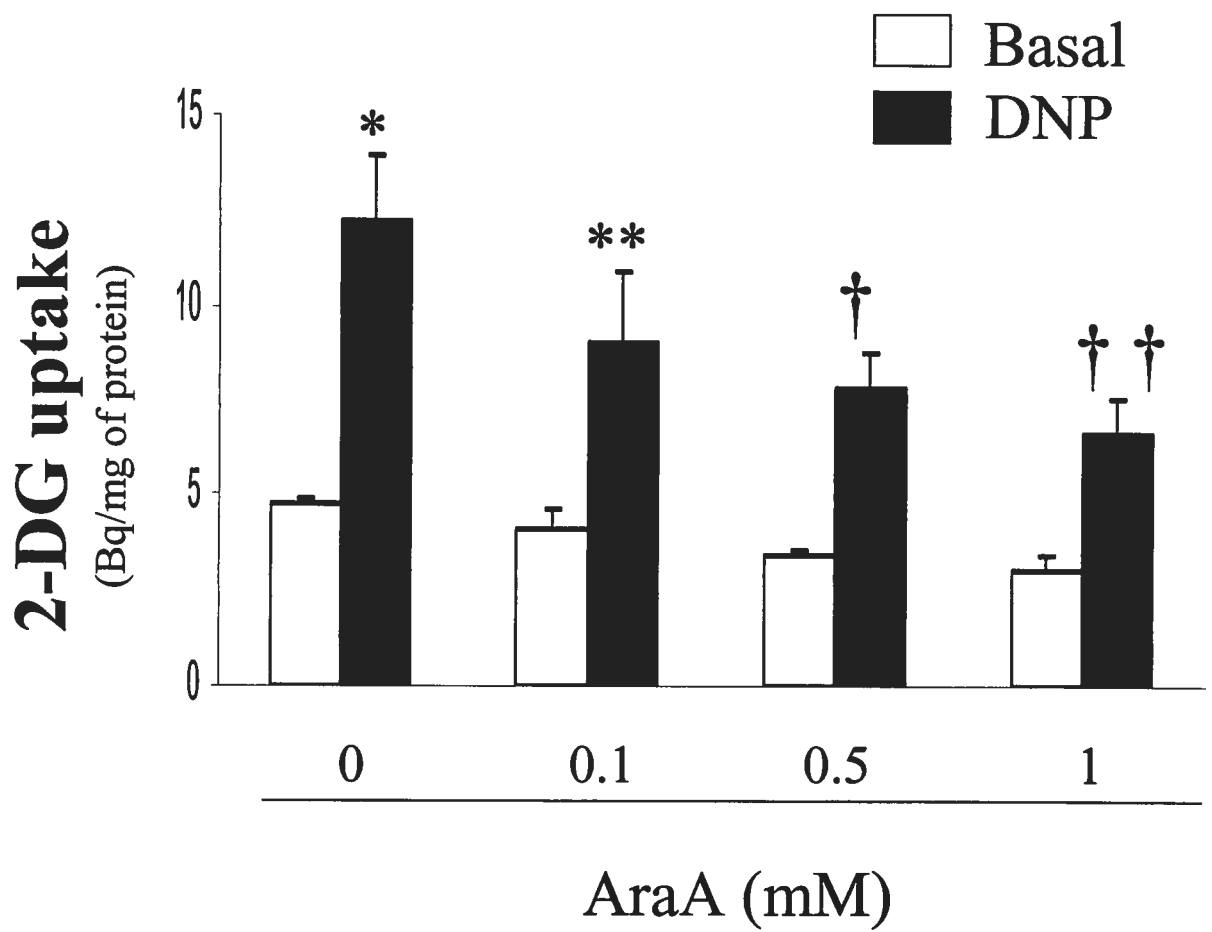


Figure 3

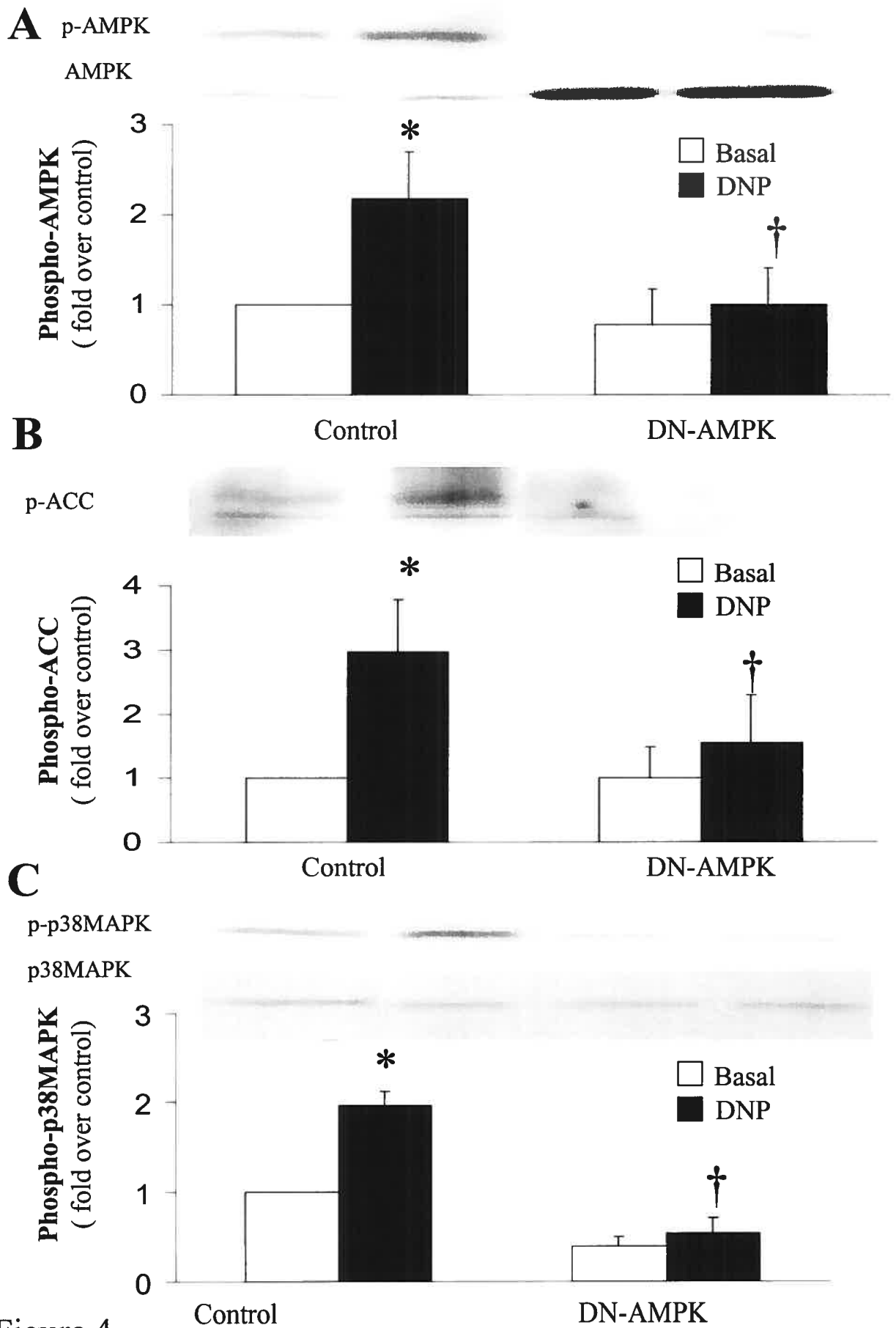


Figure 4

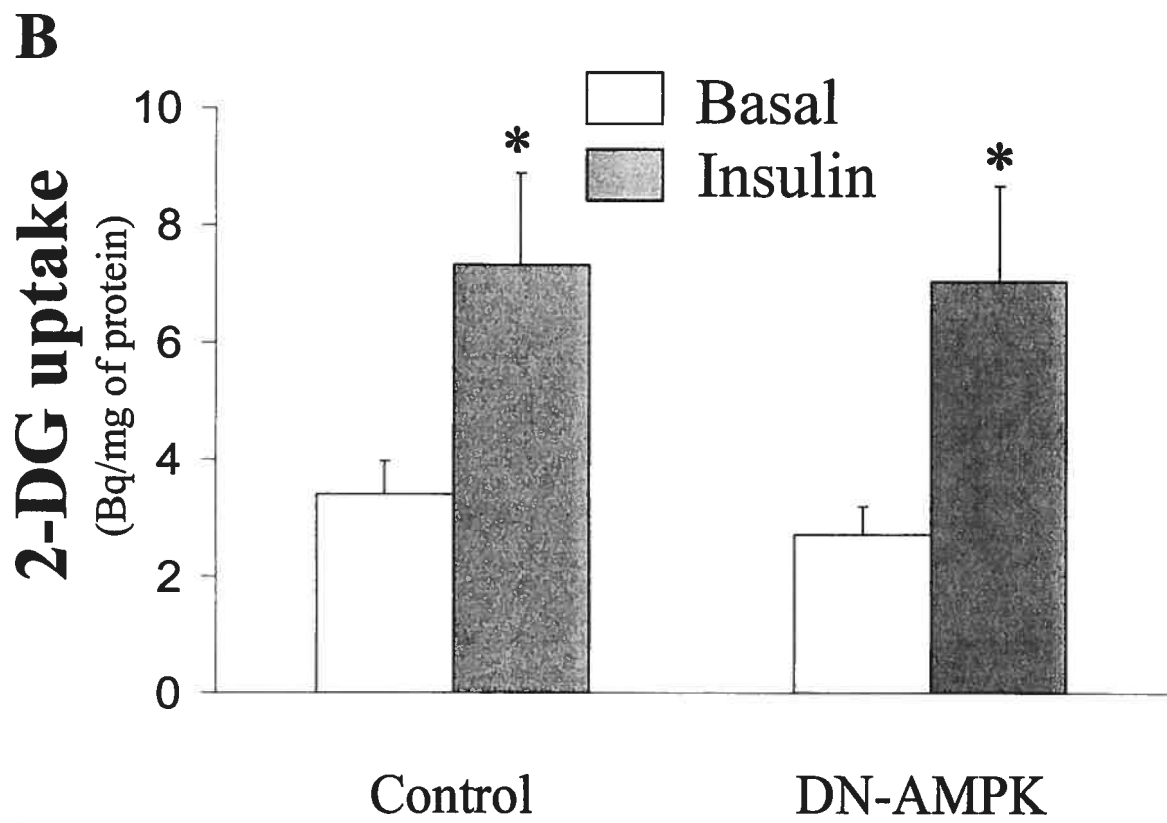
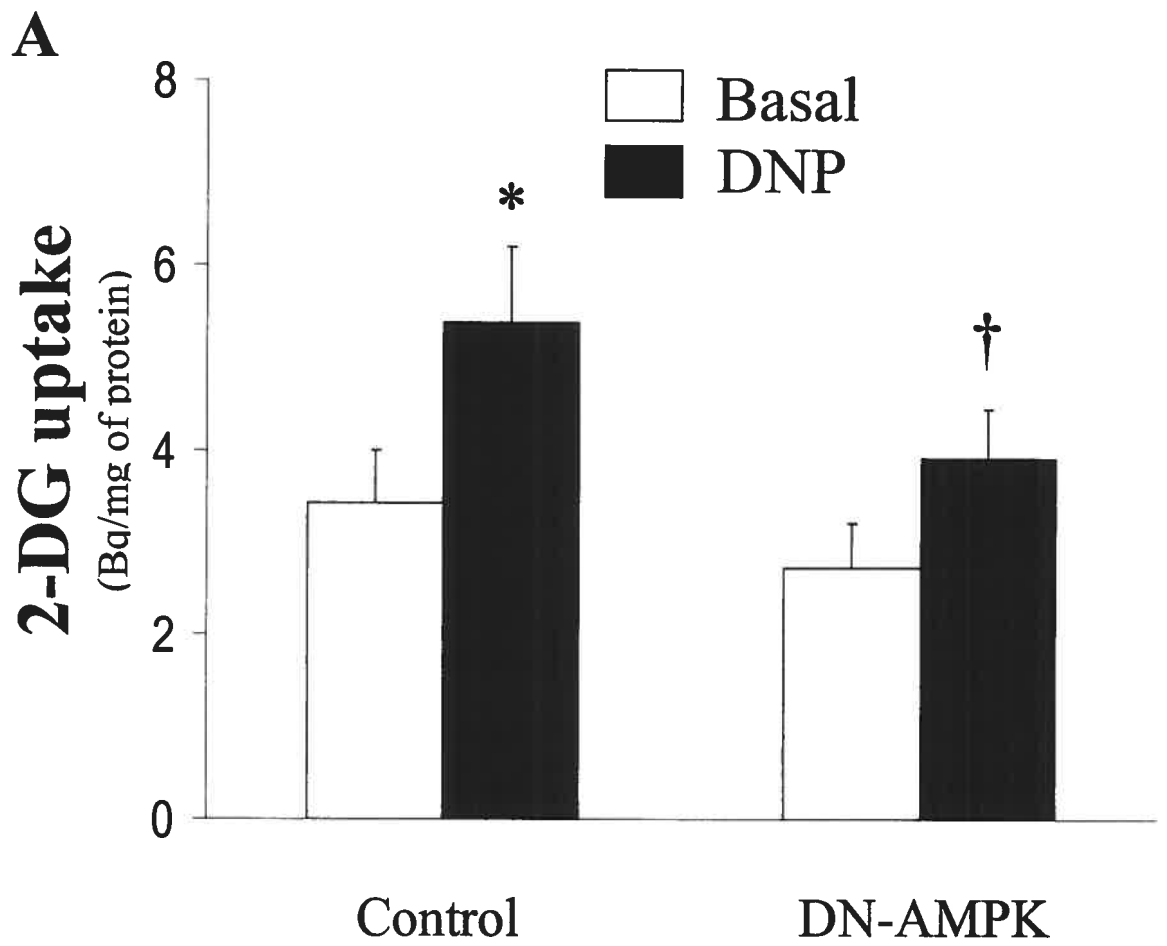


Figure 5

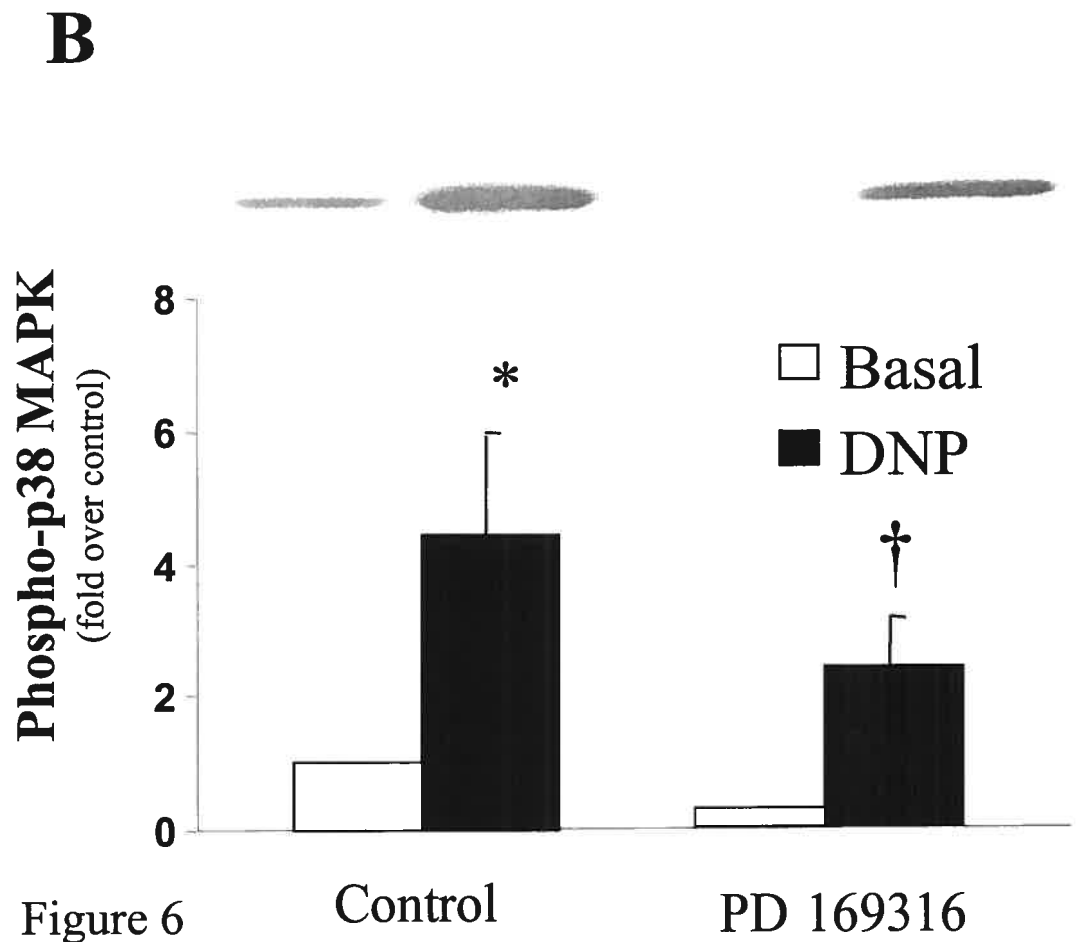
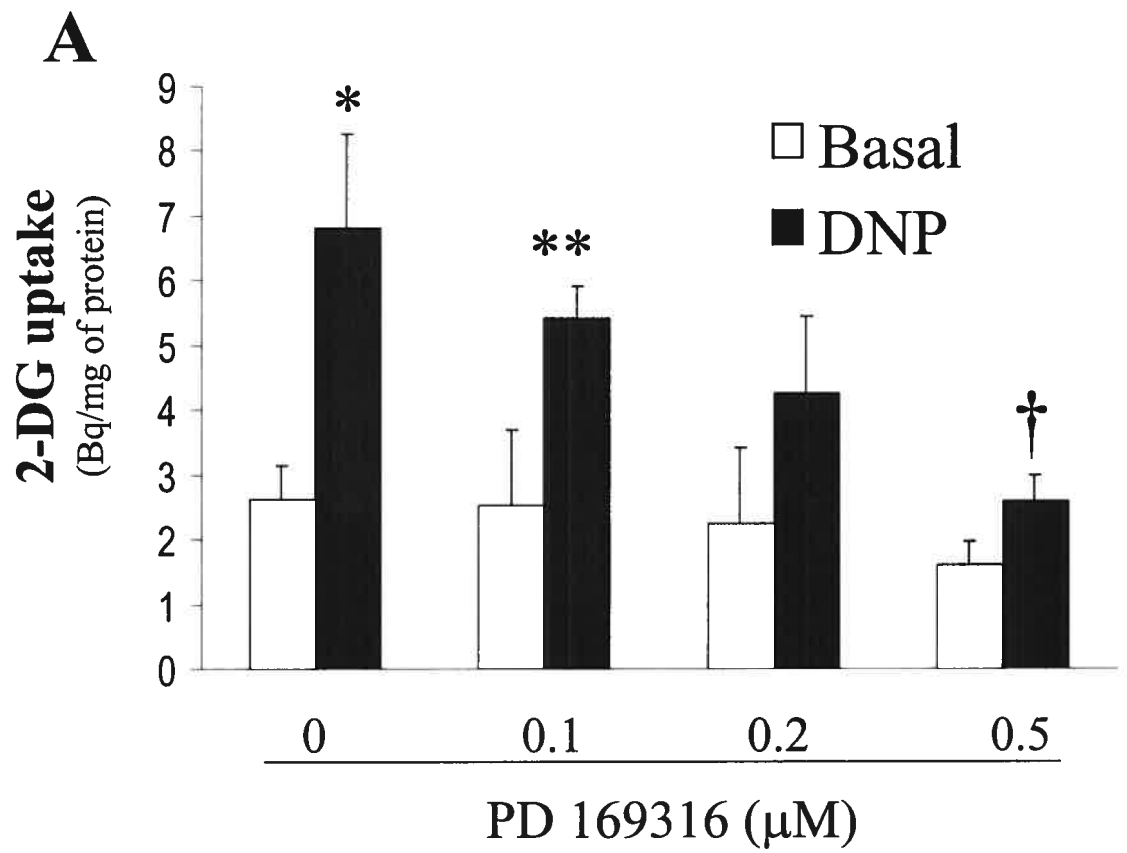


Figure 6

**Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake
through AMPK inhibition and oxidative stress generation
in adult cardiomyocytes**

Amélie Pelletier and Lise Coderre[†]

Soumis dans : American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism

Abbreviated title : Ketone Bodies Inhibit DNP Action in the Heart

From the Montreal Diabetes Research Centre, Centre hospitalier de l'Université de
Montréal (CHUM) and the Department of Medicine,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

[†]To whom correspondence should be addressed:

Lise Coderre, Ph.D.
Research Centre
CHUM-Hôtel-Dieu
3850 rue Saint-Urbain
Montréal (Québec) Canada H2W 1T7
Tel.: (514) 890-8000 ext 14797
Fax: (514) 412-7208
[REDACTED]

Key words: Glucose Transport, Heart, Oxidative Stress, Hypoxia, AMPK

Grant Support: L.C. is a chercheur-boursier supported by the Fonds de la recherche en santé du Québec. A.P. is the recipient of a Canadian Diabetes Association/Canadian Institutes of Health Research Doctoral Student Research Award.

**Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through
AMPK inhibition and oxidative stress generation
in adult cardiomyocytes**

Amélie Pelletier and Lise Coderre[†]

Soumis dans : American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism

Contribution des co-auteurs :

A.P. a réalisé la totalité des expériences faites dans ce papier. Elle a également analysé tous les résultats et écrit le papier.

Abstract

In aerobic conditions, the heart preferentially oxidizes fatty acids. However, during metabolic stress glucose becomes the major energy source and enhanced glucose uptake has a protective effect on heart function and cardiomyocyte survival. Thus, abnormal regulation of glucose uptake may participate in the development of cardiac disease in diabetics. Ketone bodies are often elevated in poorly-controlled diabetics and are associated with increased cellular oxidative stress. Thus, we sought to determine the effect of the ketone body β -hydroxybutyrate on cardiac glucose uptake during metabolic stress. We used 2,4-dinitrophenol (DNP), an uncoupler of the mitochondrial oxidative chain, to mimic hypoxia in cardiomyocytes. Our data demonstrated that chronic exposure to β -hydroxybutyrate provoked a concentration-dependent decrease of DNP action, resulting in 56% inhibition of DNP-mediated glucose uptake at 5 mM β -hydroxybutyrate. This was paralleled by a diminution of DNP-mediated AMPK and p38MAPK phosphorylation in these cells. Chronic exposure to β -hydroxybutyrate also increased reactive oxygen species (ROS) production by 2.8-fold compared to control cells. To further understand the role of ROS in β -hydroxybutyrate's action, cardiomyocytes were incubated with H_2O_2 . Our results demonstrated that chronic exposure to H_2O_2 diminished DNP-induced glucose uptake without altering activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway. Incubation with the antioxidant N-acetylcysteine partially restored DNP-mediated glucose but not AMPK/p38MAPK activation. In conclusion, these results suggest that ketone bodies, through inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway and ROS overproduction, regulate DNP action and thus cardiac glucose uptake. Altered glucose uptake in hyperketonemic states during metabolic stress may participate in diabetic cardiomyopathy.

Introduction

Cardiovascular disease is a well known complication of diabetes. Diabetes increases the risk of mortality from heart disease by 4.0- to 6.6-fold and 6.2- to 17.1-fold in men and women, respectively (38). It also significantly worsens the prognosis after heart failure, despite the fact that infarct size is often smaller in diabetics (28;61). Poorly-controlled type 1 diabetic patients often have elevated concentrations of ketone bodies that can reach levels as high as 10 mM during severe ketosis (7;39). Increased ketone body levels have also been observed in type 2 diabetes (3) and in congestive heart failure (43;44). Furthermore, in the latter condition, increased plasma ketone body concentrations correlate with the severity of cardiac dysfunction (44).

Glucose is the primary energy source for the heart during metabolic stress, such as ischemia or hypoxia (14;58). Studies have shown that increased glucose uptake, by providing an energy source for ATP synthesis, has a beneficial effect on contractile function and coronary flow during ischemia (14). Conversely, failure to upregulate glucose uptake and to maintain ATP levels during hypoxia is associated with increased cardiomyocyte death (1;45;66). Diminished glucose utilization and contractile dysfunction have been reported in the heart of db/db mice, a model of type 2 diabetes (5). These abnormalities were corrected by selective overexpression of GLUT4 in the heart, the major glucose transporter expressed in this tissue (5). Importantly, more than 64% of type 1 and 34% of type 2 diabetic patients have inadequate cardiac glucose uptake (47;67) and it has been suggested that alteration of this process contributes to the development of diabetic cardiomyopathy (46).

Recently, the signaling cascade involved in the stimulation of glucose uptake by metabolic stress has started to be unravelled, and the predominant role of 5'AMP-activated protein kinase (AMPK) in this process highlighted. AMPK, a sensor of fuel and energy status, is activated in response to an increase in the ratios of AMP/ATP or creatine/phosphocreatine (11;21;26) or by phosphorylation of threonine residue by AMPK kinase (60;68). AMPK is stimulated in response to the adenosine analog 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) (9;55;69), ischemia (56),

hypoxia (26;48) and 2,4 dinitrophenol (DNP) (26;49;50). Overexpression of a constitutively-active AMPK or stimulation with AICAR enhance glucose uptake in skeletal muscle (22) and in the heart (41;55). Conversely, overexpression of a dominant-negative (DN) AMPK mutant (73) or a kinase-dead (KD) AMPK α 2 isoform (41) partially blocks ischemia- and hypoxia-mediated glucose uptake in the heart. Using a DN-AMPK mutant, we recently demonstrated that AMPK activation is essential for maximal stimulation of glucose uptake in response to DNP in cardiomyocytes (50). Thus, AMPK plays a central role in the regulation of glucose uptake during metabolic stress.

p38MAPK, a member of the MAPK family of serine/threonine protein kinases, is also activated in response to DNP (62), hypoxia (35) and ischemia (6). Recent studies in Clone 9 hepatocytes (72), skeletal muscle (40), cardiomyocytes (50) and the heart (41) suggest that p38MAPK is a downstream effector of AMPK and may participate in regulation of the glucose uptake process.

Studies have reported that hyperketonemic type 1 diabetic patients present increased plasma lipid peroxidation and low levels of cellular glutathione compared to normoketonemic patients (31;32). These results suggest that high levels of ketone bodies increase cellular oxidative stress which may participate in the development of cardiac insulin resistance in diabetes (13). We have demonstrated that prolonged exposure to β -hydroxybutyrate, the main ketone body produced during hyperketonemia (37), induces insulin resistance in cardiomyocytes (64). Because of the importance of glucose during metabolic stress, we determined whether ketone bodies also alter the stimulation of glucose uptake under this condition, and whether increased oxidative stress plays a role in β -hydroxybutyrate's action in cardiomyocytes. We used DNP, a weak base that dissipates the H^+ gradient and uncouples the mitochondrial oxidative chain, as a chemical model to mimic hypoxia in these cells. Our results demonstrated that chronic exposure to β -hydroxybutyrate diminished DNP-mediated glucose uptake and that both inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway and reactive oxygen species (ROS) overproduction probably contributed to this effect.

Experimental procedures

Chemicals

All cell culture solutions, fatty acid-free bovine serum albumin (FAF BSA), water, supplements, DNP, β -hydroxybutyrate, N-acetyl-L-cysteine (NAC), hydrogen peroxide (H_2O_2), lucigenin, trypsin, trypsin inhibitor and DNase I were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Collagenase was obtained from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ). Human insulin (Humulin RTM) was procured from Eli Lilly Canada Inc. (Toronto, ON, Canada). Phospho-p38MAPK (Thr 180/Tyr 182), p38MAPK, phospho-AMPK (Thr 172) and AMPK polyclonal antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) while phospho-acetyl CoA carboxylase (Ser 79) (ACC) was from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). DuPont NEN Research Products (Boston, MA) supplied [³H] 2-deoxyglucose (DG). Polyvinylidene difluoride membranes were purchased from Immobilon Millipore (Bedford, MA). The enhanced chemiluminescence detection system was bought from Amersham Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). The Bradford protein assay kit was from Bio-Rad (Hercules, CA). All electrophoresis reagents were obtained from Boehringer Mannheim (Laval, QC, Canada).

Isolation of adult rat cardiomyocytes

All experiments conformed to guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal. Male Sprague-Dawley rats weighing 175-200 g were injected ip with 500 U heparin sulfate 15 min prior to anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg). The hearts were excised, and calcium-tolerant cardiomyocytes were isolated by the Langendorff method as described previously (64). During the entire procedure, the cells were maintained at 37°C. Briefly, all hearts were rinsed (4 ml/min) for 5 min in Krebs-Ringer (KR) buffer containing (in mM) 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.25 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 1.2 KH₂PO₄, 11 dextrose and 25 HEPES, pH 7.4. They were then perfused with a calcium-free KR solution for 5 min to stop spontaneous cardiac contractions. This was followed by perfusion with KR buffer supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM

2-3 butanedione monoxime and 0.1% FAF BSA for 15 min. For the last 5 min of perfusion, the KR buffer was supplemented with 0.05 mM CaCl₂, after which the ventricles were separated from the atria. The ventricles were minced in KR supplemented with 0.05% collagenase, 15 mM 2-3 butanedione monoxime, 0.2 mg/ml DNase I, 0.1 mM CaCl₂ and 0.1% FAF BSA. The resulting cell suspension was filtered through a nylon mesh and centrifuged at 1,000 g for 45 sec. The cells were washed twice and diluted in medium 199 supplemented with 11 mM glucose, 0.2% FAF BSA, 5 mM creatine, 2 mM L-carnitine, 5 mM taurine, 10⁻⁷ M insulin, 0.1 M ascorbic acid, 100 IU/ml penicillin, 25 µg/ml gentamicin and 100 mg/ml streptomycin, then plated onto laminin-coated dishes. Cell viability was determined by the percentage of rod-shaped cells and averaged 90-95%. After 4 h, they were washed to remove damaged cells and debris. The remaining cells were immediately utilized for experimentations and were incubated at 37°C for 16 h in media containing 5 mM glucose and 10⁻¹¹ M insulin.

Cardiomyocyte treatments

The cells were incubated with increasing concentrations of β-hydroxybutyrate (0 to 5 mM) for 16 h or with 5 mM β-hydroxybutyrate for either 1, 4 or 16 h as indicated in the figure legends. In certain experiments, cardiomyocytes were treated with 5 mM β-hydroxybutyrate alone or in combination with 75 µM NAC for 16 h as described in the figure legends. To mimic the effect of ROS, cardiomyocytes were also incubated with increasing concentrations of H₂O₂ (0 to 25 µM) for 16 h. Glucose uptake, ROS production and enzyme activation were assessed after these treatments.

Glucose uptake in primary cultures of cardiomyocytes

On the day of the study, the cells were washed twice with 1 ml of KR buffer to remove insulin, β-hydroxybutyrate, NAC and H₂O₂. They were then incubated for 30 min in 1 ml of KR buffer containing 5 mM glucose and 0.2% FAF BSA. Glucose uptake assay was started by addition of the vehicle (basal) or 0.1 mM DNP and 1 µCi/ml DG as described previously (64). After 20 min, glucose uptake measurement was terminated by 3 rapid washes with 1 ml of ice-cold KR buffer. The cells were disrupted with 0.5 ml of

0.5 M NaOH for 60 min at 37°C, and cell-associated radioactivity was quantified by scintillation counting. Glucose uptake was normalized to total protein, as measured by Bio-Rad assay.

Measurement of ROS production

ROS production was quantified by the lucigenin method (16;24;29) with the following modifications. Cardiomyocytes were incubated for 16 h with or without 5 mM β -hydroxybutyrate. The cells were washed twice with medium containing 10-11 M insulin and 5.5 mM glucose to remove β -hydroxybutyrate. They were then incubated for 30 min with medium containing 1 mg/ml of trypsin, after which trypsin inhibitor (2 mg/ml) was added and the cells collected. The cardiomyocytes were then centrifuged at 1,000 g for 45 sec, and the pellet was washed in modified Hanks buffer containing (in mM) NaCl (137), KCl (5), MgSO₄ (0.6), CaCl₂ (1.3), Na₂HPO₄ (0.3), KH₂PO₄ (0.4), glucose (5.5) and NaHCO₃ (4.2), pH 7.4. The cells were resuspended in 1 ml Hanks buffer. To measure ROS production, 900 μ l of cell suspension were transferred to glass tubes and assessed in a luminometer. Measurement was started by the addition of 100 μ l lucigenin (0.5 mM, final concentration). Photon emission was counted every 2.5 to 5 min for up to 30 min, using Hanks buffer as a blank.

AMPK, ACC and p38MAPK activation

The cells were washed twice with media containing no insulin, β -hydroxybutyrate, NAC or H₂O₂, and incubated for 1 h before stimulation with 0.1 mM DNP for 5 or 10 min. The reaction was stopped by 3 rapid washes with ice-cold KR buffer. The cells were then lysed in buffer containing 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 2 mM benzamidine, 10 μ g/ml aprotinin, 0.5 μ g/ml leupeptin, 1% Triton X-100 and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS). The lysate was centrifuged for 5 min at 12,000 g at 4°C to remove insoluble material, and the resulting supernatant used for immunoblotting.

Gel electrophoresis and immunoblotting

Samples were electrophoresed on 6% or 10% SDS-polyacrylamide gel, and transferred to polyvinylidene difluoride membranes for Western blotting. The membranes were blocked for 1 h with 5% milk (wt/vol) in PBST, pH 7.4, containing 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 0.05% Tween 20 and 0.02% sodium azide. They were then incubated with the primary antibody, followed by incubation with the appropriate secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase. Antigen-antibody complexes were detected by the enhanced chemiluminescence method. Quantitative analysis was performed with a scanning densitometer.

Statistical analysis

Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied for multiple comparisons, followed by the Tukey-Kramer *post hoc* test. Two-tailed Student's t test was performed when 2 groups were compared. All data were reported as means \pm SE. $P < 0.05$ values were considered to be significant.

Results

β -hydroxybutyrate inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a time- and concentration-dependent manner

Poorly-controlled diabetic patients are susceptible to severe ketosis. We have demonstrated previously that hyperketonemia induces insulin resistance in cardiomyocytes (64). Because insulin and DNP stimulate cardiac glucose uptake through the activation of independent signaling pathways (50), we were interested in determining whether ketone bodies also altered DNP action in these cells. To address this question, cells were incubated with 5 mM β -hydroxybutyrate, a concentration known to inhibit insulin-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes (64), for 1, 4, or 16 h before evaluation of DNP-stimulated glucose uptake. As illustrated in Figure 1, stimulation with 0.1 mM DNP induced a 2.3-fold increase of glucose uptake ($P<0.01$) in control cardiomyocytes. Preincubation with β -hydroxybutyrate for 1 or 4 h did not alter DNP action, and 2.6- and 2.9-fold increases in glucose uptake were observed in these cells ($P<0.01$), respectively. However, and similar to its effect on insulin action, chronic exposure to β -hydroxybutyrate (16 h) significantly reduced the maximal stimulation of glucose uptake in response to DNP by 45% ($P<0.05$). We already know that this effect of β -hydroxybutyrate is not due to alteration of GLUT1 and GLUT4 protein concentrations (64). All subsequent experiments were performed after 16 h exposure to β -hydroxybutyrate.

We also established the concentration of β -hydroxybutyrate required to inhibit DNP action in cardiomyocytes (Fig. 2A). Exposure to 0.1 mM β -hydroxybutyrate for 16 h did not alter DNP action significantly, and a 3-fold increase in DNP mediated-glucose uptake was still observed in these cells ($P<0.01$). In contrast, treatment with 0.2, 0.5 or 5 mM β -hydroxybutyrate significantly reduced DNP action in these cells ($P<0.05$). To better characterize this effect, we calculated the net DNP stimulatory effect over basal glucose uptake in these cells. As illustrated in Figure 2B, β -hydroxybutyrate inhibited net DNP-stimulated glucose uptake in a concentration-dependent manner, resulting in 26%, 45%, 45% and 56% reductions of glucose uptake at 0.1, 0.2, 0.5 and 5 mM β -

hydroxybutyrate, respectively ($P<0.05$). Because maximal inhibition of this process occurred at 5 mM β -hydroxybutyrate, all subsequent experiments were performed at this concentration.

β -hydroxybutyrate reduces DNP-stimulated AMPK, ACC and p38MAPK phosphorylation

To understand the molecular mechanisms underlying ketone bodies action, we investigated the effect of chronic exposure to β -hydroxybutyrate on DNP-mediated activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway. AMPK and p38MAPK activities were examined with antibodies that recognize the phosphorylated and active form of these enzymes (71). β -hydroxybutyrate did not significantly modify the expression of AMPK and p38MAPK in these cells. As shown in Figure 3A, DNP induced a 1.7-fold increase of AMPK phosphorylation ($P<0.01$) which was reduced by 45% upon chronic exposure to β -hydroxybutyrate ($P<0.01$). We then evaluated ACC phosphorylation, a well-known downstream target of AMPK. ACC phosphorylation reflects AMPK activation both by allosteric effectors and kinases. In control cells, ACC phosphorylation was enhanced by 3.6-fold in response to DNP ($P<0.05$) (Fig. 3B), and this activation was completely blocked in β -hydroxybutyrate-treated cells ($P<0.01$). We next evaluated p38MAPK phosphorylation in response to DNP. DNP increased p38MAPK phosphorylation by 17-fold in control cells ($P<0.01$), which was completely inhibited by β -hydroxybutyrate ($P<0.01$) (Fig. 3C).

β -hydroxybutyrate increases ROS production in cardiomyocytes

Studies by Jain et al. have demonstrated that lipid peroxidation is increased in hyperketonemic type 1 diabetic patients compared to normoketonemic subjects (32). We therefore examined whether ketone bodies increase oxidative stress. As shown in Figure 4, chronic exposure to β -hydroxybutyrate increased ROS production by 2.8-fold compared to control cells ($P<0.004$).

H₂O₂ inhibits DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes in a concentration-dependent manner

We then determined whether ROS overproduction participates in the inhibitory effect of β -hydroxybutyrate on DNP-stimulated glucose uptake. Thus, cardiomyocytes were incubated with increasing concentrations (5, 10 and 25 μ M) of H₂O₂ for 16 h (Figure 5A). Higher H₂O₂ concentrations were toxic to the cells (data not shown). Exposure to 5 μ M H₂O₂ did not alter DNP action compared to control cells and a 2.6-fold increase of glucose uptake in response to DNP was measured in these cells ($P < 0.05$). On the other hand, incubation with 10 μ M or 25 μ M H₂O₂ reduced DNP-stimulated glucose uptake by 11% and 29%, respectively. We then calculated the net stimulatory effect of DNP on glucose uptake. As illustrated in Figure 5B, chronic exposure to increasing concentrations of H₂O₂ provoked a concentration-dependent decrease in net DNP-stimulated glucose uptake ($P < 0.05$). These changes in glucose uptake could not be explained by alterations in GLUT1 and GLUT4 protein content as both control and H₂O₂-treated cells expressed similar levels of these proteins (data not shown). Because maximal inhibition of DNP action was obtained with 25 μ M H₂O₂, subsequent experiments were done at this concentration.

H₂O₂ does not alter DNP-stimulated AMPK and p38MAPK phosphorylation

To establish the mechanism by which H₂O₂ inhibits DNP-stimulated uptake, we evaluated its effect on activation of the AMPK-dependent signaling pathway. H₂O₂ did not alter AMPK and p38MAPK protein expression in cardiomyocytes. As shown in Figure 6A, chronic exposure to H₂O₂ did not alter AMPK phosphorylation in response to DNP, and we still observed a 2.5-fold increase of AMPK phosphorylation in H₂O₂-treated cells ($P < 0.05$). Consistent with its effect on AMPK phosphorylation, H₂O₂ did not modulate p38MAPK activity, and a 5.9-fold increase of p38MAPK phosphorylation was observed in response to DNP in H₂O₂-treated cells ($P < 0.01$) (Fig. 6B).

NAC improves DNP-stimulated glucose uptake in β -hydroxybutyrate-treated cardiomyocytes

Because oxidative stress alters DNP-stimulated glucose uptake, we investigated whether antioxidant treatment with NAC could prevent β -hydroxybutyrate's action on DNP-stimulated glucose uptake. NAC reacts directly with hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) to inactivate them. It is also a scavenger of superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and H_2O_2 (2). Cardiomyocytes were co-incubated with β -hydroxybutyrate and 75 μM NAC for 16 h. Pretreatment with NAC did not alter DNP action in control cardiomyocytes, and a 2.7-fold increase of DNP-stimulated glucose uptake was observed in these cells ($P < 0.01$) (Fig. 7). Incubation with NAC increased DNP action by 58% in β -hydroxybutyrate-pretreated cardiomyocytes ($P < 0.05$). However, DNP-mediated glucose uptake was still inhibited by 22% in β -hydroxybutyrate-treated cells incubated with NAC compared to NAC-treated control cells.

NAC does not restore DNP-stimulated AMPK and p38MAPK phosphorylation in β -hydroxybutyrate-treated cardiomyocytes

We next examined the effect of NAC on DNP-mediated activation of the AMPK/p38MAPK signaling cascade in β -hydroxybutyrate-pretreated cardiomyocytes. Pretreatment with NAC did not modify AMPK and p38MAPK concentration in cardiomyocytes. NAC did not have any effect on DNP-mediated AMPK and p38MAPK phosphorylation in control cells (Fig. 8A and 8B) and a 1.9- and 4.3-fold increase of AMPK and p38MAPK phosphorylation was observed in these cells, respectively ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). Consistent with what we observed with H_2O_2 , 75 μM NAC did not improve DNP-induced AMPK and p38MAPK activation in the β -hydroxybutyrate-treated group (Fig. 8A and 8B). These enzymes were still totally inhibited by β -hydroxybutyrate compared to control groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

Discussion

Hyperketonemia is observed during physiological and/or pathophysiological situation such as starvation, heart failure and diabetes. We have demonstrated previously that chronic exposure to β -hydroxybutyrate induces insulin resistance in primary cultures of cardiomyocytes (64), resulting in diminished glucose uptake in these cells. Because glucose represents the major energy substrate used by the heart during metabolic stress, we examined the role of ketone bodies in the regulation of glucose uptake in response to DNP in cardiomyocytes. Our results show, for the first time, that prolonged exposure to β -hydroxybutyrate inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a time- and concentration-dependent manner in cardiomyocytes. Our data also suggest that 2 independent mechanisms contribute to diminished glucose uptake in this tissue: impaired activation of the AMPK/p38MAPK signaling cascade in response to DNP, and increased ROS generation.

During diabetic ketoacidosis, ketone body concentrations rise dramatically, reaching plasma levels between 10 to 20 mM (7;37;39). In addition, once increased, they often remain elevated for more than 12 h after the beginning of insulin infusion therapy (37). Our results show that the reduction of DNP-mediated glucose uptake observed in cardiomyocytes occurs within a timeframe and concentration that are compatible with a role for ketone bodies in the regulation of substrate utilization *in vivo*. The inhibitory effect of β -hydroxybutyrate can not be explained by a decrease in glucose transporter expression, since we have previously demonstrated that β -hydroxybutyrate does not alter GLUT1 and GLUT4 concentrations in cardiomyocytes (64).

Recent studies have highlighted the central role of AMPK in the regulation of cardiac glucose uptake. Our results demonstrated that chronic exposure to ketone bodies reduced DNP-mediated AMPK activation in cardiomyocytes. We, and others, have reported that AMPK activation is essential for maximal stimulation of the glucose uptake process in response to ischemia, hypoxia, and DNP (41;50;56;73). Using DN-AMPK overexpression, we have shown recently that p38MAPK is localized downstream of AMPK in cardiomyocytes (50). Similar results, reported by Li et al., demonstrate that

p38MAPK phosphorylation is significantly reduced during low-flow and severe no-flow ischemia in the heart of KD-AMPK α 2 transgenic mice (41). Furthermore, we have demonstrated that p38MAPK inhibition also reduces significantly glucose uptake in response to DNP (50). Consistent with p38MAPK being a downstream target of AMPK, chronic exposure to β -hydroxybutyrate alters both AMPK and p38MAPK phosphorylation in response to DNP. These data provide additional evidence suggesting that AMPK stimulation promotes p38MAPK activation. Together, these results suggest that inhibition of the AMPK/p38MAPK signaling pathway by β -hydroxybutyrate probably mediates the reduction of DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes.

Type 1 diabetic patients have impaired insulin- and exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle (12;51;75). Chronic exposure to ketone bodies also impairs both insulin- (64) and DNP-stimulated glucose uptake in cardiomyocytes. Insulin stimulates glucose uptake through activation of the IRS-PI3K pathway (33), whereas DNP and ischemia activate this process via an AMPK/p38MAPK-dependent signaling pathway (41;50). Alteration of 2 independent signaling cascades by β -hydroxybutyrate suggests that ketone bodies regulate glucose uptake through a common mechanism. In addition, while chronic exposure to ketone bodies diminishes DNP-mediated glucose uptake, acute exposure to β -hydroxybutyrate (1 h and 4 h) does not alter DNP action in cardiomyocytes. This suggests that the ketone body-induced alteration of glucose uptake observed is not due to direct competition between glucose and β -hydroxybutyrate as energy sources for the heart. Potentially, the inhibitory effect of ketone bodies on glucose uptake could be mediated through intracellular β -hydroxybutyrate metabolism.

Hyperglycemia and dyslipidemia are known factors contributing to increase ROS production (74). However, Jain et al. have reported that hyperketonemic patients present higher lipid peroxidation, a marker of oxidative stress, compared to normoketonemic diabetic patients (31;32). Increased protein oxidation has also been observed after β -hydroxybutyrate exposure in fibroblasts (19) and skeletal muscle of a congestive heart failure animal model (10). Our data demonstrate that chronic exposure to β -

hydroxybutyrate provokes a 2.8-fold increase in ROS production in cardiomyocytes. Together, these data suggest that chronic exposure to ketone bodies contributes to increased cellular oxidative stress. It has been reported that oxidative stress induces insulin resistance, resulting in inhibition of glucose uptake in insulin-sensitive tissues (17). Thus, oxidative stress generated upon chronic exposure to ketone bodies may represent the common factor responsible for glucose uptake alteration in response to both insulin and DNP.

We thus sought to determine whether increased ROS production interferes with DNP action in cardiomyocytes. Our results demonstrated that H_2O_2 reduced DNP-stimulated glucose uptake in a concentration-dependent manner, suggesting that oxidative stress modulated DNP action in cardiomyocytes. Most studies investigating the role of H_2O_2 in the regulation of glucose uptake have examined its acute effect. It has been demonstrated that H_2O_2 stimulates glucose uptake and has insulinomimetic effects in skeletal muscle, cardiomyocytes and hepatocytes (20;27;65). On the other hand, studies have demonstrated that it promotes insulin resistance (4;53;54). The discrepancy between these studies may be due to the time of exposure and H_2O_2 concentrations utilized.

To further investigate the involvement of oxidative stress on the inhibitory effect of β -hydroxybutyrate, cells were treated with the antioxidant NAC. This treatment has been used successfully to decrease oxidative stress and thus prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in skeletal muscle (25). Our results showed that NAC significantly improved DNP-mediated glucose uptake in β -hydroxybutyrate-treated cells, resulting in a 33% increase in the maximal effect of DNP on glucose uptake in these cells. This effect is consistent with the 30% decrease in glucose uptake observed upon H_2O_2 exposure. Thus, our data suggest that β -hydroxybutyrate action is mediated, at least in part, via increased ROS production. To our knowledge, this is the first demonstration that ROS participate in the regulation of glucose uptake during metabolic stress.

The current study demonstrated that chronic exposure to β -hydroxybutyrate inhibits the DNP-mediated AMPK/p38MAPK signaling cascade in cardiomyocytes. To further establish the role of oxidative stress in β -hydroxybutyrate action, we investigated the effect of H_2O_2 on the activation of these 2 enzymes. Our data demonstrated that chronic exposure to H_2O_2 did not alter DNP-mediated phosphorylation of AMPK and p38MAPK. Consistent with these results, NAC treatment did not restore AMPK and p38MAPK phosphorylation in response to DNP in β -hydroxybutyrate-treated cells in spite of improved DNP-mediated glucose uptake. It has been demonstrated that high H_2O_2 concentrations could stimulate AMPK phosphorylation in skeletal muscle (65) and adipocytes (8). Studies in cardiomyocytes by Kwon et al. have also reported that chronic exposure to low H_2O_2 concentrations (10 μ M) had no effect on p38MAPK activity whereas 100 μ M H_2O_2 increased enzyme phosphorylation (36). Together, these results suggest that H_2O_2 action depends on its concentration. In our study, cardiomyocytes were exposed chronically to very low H_2O_2 concentration which may not have been sufficient to stimulate the AMPK/p38MAPK signaling pathway. Because chronic exposure to H_2O_2 did not alter DNP-stimulated AMPK and p38MAPK phosphorylation, and NAC was unable to restore their activity, we concluded that impaired AMPK and p38MAPK activation by β -hydroxybutyrate is not mediated by oxidative stress. We, and others, have demonstrated that AMPK inhibition only partially inhibits DNP- and hypoxia-stimulated glucose uptake (41;50) suggesting that an AMPK-independent pathway needs to be activated to maximally stimulate glucose uptake in the heart. Thus, while oxidative stress diminished glucose uptake, this was not paralleled by alteration of the AMPK/p38MAPK signaling pathway. Potentially, β -hydroxybutyrate-generated oxidative stress may interfere with the activation of this alternative AMPK-independent pathway to decrease glucose uptake.

Our results show that β -hydroxybutyrate inhibits activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway in cardiomyocytes and that this effect is probably not mediated by ROS generation. Diminished AMPK activity has also been reported after a high-fat diet, chronic glucose infusion and in obese Zucker rats (18;30;34;42).

While it is well established that AMPK activation is increased by low energy status, these data also suggest that AMPK activity is modulated by excess cellular energy status. Thus, AMPK regulation by high-energy supply may be part of a feedback mechanism to limit further uptake of glucose in times of abundant energy sources. Together, this reinforces AMPK's role as a key modulator of cellular energy balance.

What could be the mechanism modulating β -hydroxybutyrate inhibitory effect on AMPK activation? The first step in ketolysis consists of β -hydroxybutyrate conversion to acetoacetate by β -hydroxybutyrate dehydrogenase (23). This reaction generates NADH. Thus, β -hydroxybutyrate metabolism promotes NAD⁺ consumption and NADH production, leading to an increase of the NADH/NAD⁺ ratio. Studies have shown that both chronic exposure to β -hydroxybutyrate (63) and starvation (57) augment NADH concentration. Interestingly, elevated NADH levels inhibit AMPK activity by blocking either the ATP- or AMP-binding pocket (52). Potentially, ketone body-mediated inhibition of AMPK may involve alteration of the NADH/NAD⁺ ratio. Alternatively, AMPK activity could be modulated by alterations of cardiac glycogen content by β -hydroxybutyrate. In skeletal muscle, elevated glycogen levels have been associated with reduced AMPK activation and glucose uptake (15). A similar mechanism could also operate in the heart. In addition, β -hydroxybutyrate could modulate the activation of specific phosphatases or kinases which may alter activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway. Decreased LKB1 activity and expression, a kinase which can phosphorylate and activate AMPK (70), has been observed in obese Zucker rats (59). Potentially, β -hydroxybutyrate could downregulate LKB1 expression and thus, reduces AMPK activation in cardiomyocytes. Further studies will have to be performed to establish the exact mechanism involved in ketone body action.

In conclusion, our data demonstrate that prolonged exposure to β -hydroxybutyrate inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a concentration- and time-dependent manner in cardiomyocytes. Ketone bodies alter glucose metabolism by inhibiting activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway and the generation of oxidative stress. These

results suggest that hyperketonemia could have a deleterious effect on cardiac glucose metabolism, especially during metabolic stress.

Acknowledgements

The editorial assistance of Mr. Ovid Da Silva, Editor, Research Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. We thank Miguel Chagnon for statistical analysis support.

References

1. Abdel-Aleem S, St Louis JD, Hughes GC and Lowe JE. Metabolic changes in the normal and hypoxic neonatal myocardium. *Ann N Y Acad Sci* 874: 254-261, 1999.
2. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM and Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 6: 593-597, 1989.
3. Avogaro A, Crepaldi C, Miola M, Maran A, Pengo V, Tiengo A and Del Prato S. High blood ketone body concentration in type 2 non-insulin dependent diabetic patients. *J Endocrinol Invest* 19: 99-105, 1996.
4. Begum N. Phenylarsine oxide inhibits insulin-stimulated protein phosphatase 1 activity and GLUT-4 translocation. *Am J Physiol* 267: E14-E23, 1994.
5. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM and Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1104-E1113, 2000.
6. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben Levy R, Ashworth A, Marshall CJ and Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res* 79: 162-173, 1996.
7. Candiloros H, Muller S, Zeghari N, Donner M, Drouin P and Ziegler O. Decreased erythrocyte membrane fluidity in poorly controlled IDDM. Influence of ketone bodies. *Diabetes Care* 18: 549-551, 1995.
8. Choi SL, Kim SJ, Lee KT, Kim J, Mu J, Birnbaum MJ, Soo KS and Ha J. The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 92-97, 2001.
9. Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA and Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem* 229: 558-565, 1995.

10. Dalla LL, Ravara B, Gobbo V, Danieli BD, Germinario E, Angelini A and Vescovo G. Skeletal muscle myofibrillar protein oxidation in heart failure and the protective effect of Carvedilol. *J Mol Cell Cardiol* 38: 803-807, 2005.
11. Davies SP, Helps NR, Cohen PT and Hardie DG. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* 377: 421-425, 1995.
12. DeFronzo RA, Hendler R and Simonson D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 31: 795-801, 1982.
13. Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G and Azay J. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179: 43-49, 2005.
14. Depre C, Vanoverschelde J-LJ and Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation* 99: 578-588, 1999.
15. Derave W, Ai H, Ihlemann J, Witters LA, Kristiansen S, Richter EA and Ploug T. Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* 49: 1281-1287, 2000.
16. Dou Daou G and Srivastava AK. Reactive oxygen species mediate endothelin-1-induced activation of ERK 1/2, PKB, and Pyk2 signaling, as well as protein synthesis, in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biol Med* 37: 208-215, 2004.
17. Evans JL, Maddux BA and Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistances. *Antioxid Redox Signal* 7: 1040-1052, 2005.
18. Fang X, Palanivel R, Zhou X, Liu Y, Xu A, Wang Y and Sweeney G. Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *J Mol Endocrinol* 35: 465-476, 2005.

19. Finn PF and Dice JF. Ketone bodies stimulate chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 280: 25864-25870, 2005.
20. Fischer Y, Rose H, Thomas J, Deuticke B and Kammermeier H. Phenylarsine oxide and hydrogen peroxide stimulate glucose transport via different pathways in isolated cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1153: 97-104, 1993.
21. Frederich M and Balschi JA. The relationship between AMP-activated protein kinase activity and AMP concentration in the isolated perfused rat heart. *J Biol Chem* 277: 1928-1932, 2002.
22. Fryer LG, Fougelle F, Barnes K, Baldwin SA, Woods A and Carling D. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 363: 167-174, 2002.
23. Fukao T, Lopaschuk GD and Mitchell GA. Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: 243-251, 2004.
24. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD and Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
25. Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A and Fantus IG. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E744-E753, 2003.
26. Hayashi T, Hirshman MF, Fujii N, Habinowski SA, Witters LA and Goodyear LJ. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49: 527-531, 2000.
27. Heffetz D, Bushkin I, Dror R and Zick Y. The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem* 265: 2896-2902, 1990.
28. Herlitz J and Malmberg K. How to improve the cardiac prognosis for diabetes. *Diabetes Care* 22 (Supp. 2): B89-B96, 1999.

29. Hsieh TJ, Zhang SL, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR and Chan JS. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143: 2975-2985, 2002.
30. Itani SI, Saha AK, Kurowski TG, Coffin HR, Tornheim K and Ruderman NB. Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 52: 1635-1640, 2003.
31. Jain SK and McVie R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 48: 1850-1855, 1999.
32. Jain SK, McVie R, Jackson R, Levine SN and Lim G. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care* 22: 1171-1175, 1999.
33. Khan AH and Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475-1483, 2002.
34. Kraegen EW, Saha AK, Preston E, Wilks D, Hoy AJ, Cooney GJ and Ruderman NB. Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E471-E479, 2006.
35. Kulisz A, Chen N, Chandel NS, Shao Z and Schumacker PT. Mitochondrial ROS initiate phosphorylation of p38 MAP kinase during hypoxia in cardiomyocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1324-L1329, 2002.
36. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB and Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35: 615-621, 2003.
37. Laffel L. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 15: 412-426, 1999.
38. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, Burden AC, Morris A, Waugh NR, Gatling W, Bingley PJ and Patterson CC. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 46: 760-765, 2003.

39. Lebovitz HE. Diabetic ketoacidosis. *Lancet* 345: 767-772, 1995.
40. Lemieux K, Konrad D, Klip A and Marette A. The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J* 17: 1658-1665, 2003.
41. Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, Russell RR, III and Young LH. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing its recruitment to TAB1 in the ischemic heart. *Circ Res* 97: 872-879, 2005.
42. Liu Y, Wan Q, Guan Q, Gao L and Zhao J. High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 701-707, 2006.
43. Lommi J, Koskinen P, Naveri H, Harkonen M and Kupari M. Heart failure ketosis. *J Intern Med* 242: 231-238, 1997.
44. Lommi J, Kupari M, Koskinen P, Naveri H, Leinonen H, Pulkki K and Harkonen M. Blood ketone bodies in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 28: 665-672, 1996.
45. Malhotra R and Brosius FC, III. Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 274: 12567-12575, 1999.
46. Marwick TH. Diabetic heart disease. *Heart* 92:296-300, 2006.
47. Meyer C and Schwaiger M. Myocardial blood flow and glucose metabolism in diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 80: 94A-101A, 1997.
48. Mu J, Brozinick JT, Jr., Valladares O, Bucan M and Birnbaum MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* 7: 1085-1094, 2001.
49. Patel N, Khayat ZA, Ruderman NB and Klip A. Dissociation of 5' AMP-activated protein kinase activation and glucose uptake stimulation by mitochondrial uncoupling and hyperosmolar stress: differential sensitivities to intracellular Ca²⁺ and protein kinase C inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 1066-1070, 2001.

50. Pelletier A, Joly E, Prentki M and Coderre L. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 146: 2285-2294, 2005.
51. Peltoniemi P, Yki-Jarvinen H, Oikonen V, Oksanen A, Takala TO, Ronnema T, Erkinjuntti M, Knuuti MJ and Nuutila P. Resistance to exercise-induced increase in glucose uptake during hyperinsulinemia in insulin-resistant skeletal muscle of patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 1371-1377, 2001.
52. Rafaeloff-Phail R, Ding L, Conner L, Yeh WK, McClure D, Guo H, Emerson K and Brooks H. Biochemical regulation of mammalian AMP-activated protein kinase activity by NAD and NADH. *J Biol Chem* 279: 52934-52939, 2004.
53. Rudich A, Kozlovsky N, Potashnik R and Bashan N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol* 272: E935-E940, 1997.
54. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H and Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 47: 1562-1569, 1998.
55. Russell RR, III, Bergeron R, Shulman GI and Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol* 277: H643-H649, 1999.
56. Russell RR, III, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ and Young LH. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest* 114: 495-503, 2004.
57. Scotini E, Caparrotta L, Tessari F and Fassina G. Age-related changes in rat adipose tissue in response to fasting: protein, lactate and pyruvate levels. *Life Sci* 32: 2701-2708, 1983.
58. Sowers JR and Lester MA. Diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes Care* 22 (Suppl. 3): C14-C20, 1999.

59. Sriwijitkamol A, Ivy JL, Christ-Roberts C, DeFronzo RA, Mandarino LJ and Musi N. LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E925-E932, 2006.
60. Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD and Carling D. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* 345 Pt 3: 437-443, 2000.
61. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT and Robertson T. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. The MILIS Study Group. *J Am Coll Cardiol* 14: 49-57, 1989.
62. Taha C, Tsakiridis T, McCall A and Klip A. Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *Am J Physiol* 273: E68-E76, 1997.
63. Takehiro M, Fujimoto S, Shimodahira M, Shimono D, Mukai E, Nabe K, Radu RG, Kominato R, Aramaki Y, Seino Y and Yamada Y. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate inhibits glucose-induced insulin release from pancreatic islets by decreasing NADH contents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E372-E380, 2005.
64. Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL and Coderre L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1205-E1212, 2001.
65. Toyoda T, Hayashi T, Miyamoto L, Yonemitsu S, Nakano M, Tanaka S, Ebihara K, Masuzaki H, Hosoda K, Inoue G, Otaka A, Sato K, Fushiki T and Nakao K. Possible involvement of the alpha1 isoform of 5'AMP-activated protein kinase in oxidative stress-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E166-E173, 2004.

66. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della BM, Dona M, Peluso G, Calvani M, Mosconi L and Dalla LL. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C802-C810, 2002.
67. Voipio-Pulkki L-M, Nuutila P, Knuuti MJ, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Teras M, Wegelius U and Koivisto VA. Heart and skeletal muscle glucose disposal in type 2 diabetic patients as determined by positron emission tomography. *J Nucl Med* 34: 2064-2067, 1993.
68. Winder WW and Hardie DG. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270: E299-E304, 1996.
69. Winder WW and Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277: E1-E10, 1999.
70. Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M and Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13: 2004-2008, 2003.
71. Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D and Rider MH. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 278: 28434-28442, 2003.
72. Xi X, Han J and Zhang JZ. Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276: 41029-41034, 2001.
73. Xing Y, Musi N, Fujii N, Zou L, Luptak I, Hirshman MF, Goodyear LJ and Tian R. Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 278: 28372-28377, 2003.
74. Xu Y, He Z and King GL. Introduction of hyperglycemia and dyslipidemia in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Curr Diab Rep* 5: 91-97, 2005.

75. Yki-Jarvinen H and Koivisto VA. Insulin sensitivity in newly diagnosed type 1 diabetics after ketoacidosis and after three months of insulin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 371-378, 1984.

Figure legends

- Figure 1: Exposure to β -hydroxybutyrate (OHB) inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a time-dependent manner.** Cardiomyocytes were preincubated for 0, 1, 4 or 16 h with 5 mM OHB prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min, as described in Experimental Procedures. Glucose uptake was measured as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 6 independent experiments. ** P <0.01 different then basal; † P <0.05 different from DNP-stimulated controls.
- Figure 2: Exposure to β -hydroxybutyrate (OHB) inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a concentration-dependent manner.** **A:** Cardiomyocytes were preincubated for 16 h with 0, 0.1, 0.2, 0.5 or 5 mM OHB prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min before the measurement of glucose uptake. Means \pm SE of 6 independent experiments. ** P <0.01 different then basal; † P <0.05 different from DNP-stimulated controls; †† P <0.01 different from DNP-stimulated controls. **B:** Net DNP-stimulated glucose uptake calculated from panel A. **Inset:** Linear regression from net DNP-stimulated glucose uptake. P <0.05; $R^2=0.3734$
- Figure 3: β -hydroxybutyrate (OHB) inhibits the DNP-stimulated AMPK/p38MAPK signaling pathway.** Cardiomyocytes were preincubated for 16 h without or with 5 mM OHB prior to stimulation with 0.1 mM DNP for either 5 min (**A** and **B**) or 10 min (**C**). **A: Top:** Representative immunoblot of phospho-AMPK and total AMPK. **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 9 independent experiments. ** P <0.01 different then basal; †† P <0.01 different from DNP-stimulated controls. **B: Top:** Representative immunoblot of phospho-ACC, **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 5 independent experiments. * P <0.05 different then basal; †† P <0.01 different from DNP-stimulated controls. **C: Top:** Representative immunoblot of phospho-p38MAPK and total p38MAPK. **Bottom:** Densitometric analysis of

immunoblots. Means \pm SE of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$ different then basal; $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ different from DNP-stimulated controls.

Figure 4: β -hydroxybutyrate (OHB) increases ROS production. Cardiomyocytes were preincubated for 16 h without or with 5 mM OHB prior to measurement of ROS production by lucigenin assay as described in Experimental Procedures. The area under the curve of the time course of ROS production was measured after the addition of lucigenin. Means \pm SE of 5 independent experiments. * $P < 0.004$ control vs OHB-treated cells.

Figure 5: H_2O_2 inhibits DNP-stimulated glucose uptake in a dose-dependent manner. **A:** Cardiomyocytes were preincubated for 16 h with 0, 5, 10 or 25 μ M H_2O_2 prior to stimulation with 0.1 mM DNP for 20 min, as described in Experimental Procedures. Glucose uptake was measured as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 5 independent experiments. * $P < 0.05$ different then basal; ** $P < 0.01$ different then basal. **B:** Net DNP-stimulated glucose uptake calculated from panel A. **Inset:** Linear regression from net DNP-stimulated glucose uptake. $P < 0.05$; $R^2 = 0.9903$

Figure 6: H_2O_2 does not inhibit activation of the AMPK/p38MAPK signaling pathway in response to DNP. Cardiomyocytes were preincubated for 16 h without or with 25 μ M H_2O_2 prior to stimulation with 0.1 mM DNP for either 5 min (**A**) or 10 min (**B**). **A: Top:** Representative immunoblot of phospho-AMPK and total AMPK. **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. * $P < 0.05$ DNP vs basal. **B: Top:** Representative immunoblot of phospho-p38MAPK and total p38MAPK. **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 3 independent experiments. ** $P < 0.01$ DNP vs basal.

Figure 7: NAC restores DNP-stimulated glucose uptake in β -hydroxybutyrate (OHB)-treated cells. Cardiomyocytes were preincubated for 16 h with either vehicle (control), 5 mM OHB, 75 μ M NAC or a combination of OHB+NAC as described in Experimental Procedures. The cells were then stimulated with

0.1 mM DNP for 20 min. Glucose uptake was measured as described in Experimental Procedures. Means \pm SE of 5 independent experiments. ** P <0.01 different then basal; †† P <0.01 different from DNP-stimulated controls.

Figure 8: NAC does not restore the DNP-mediated AMPK/p38MAPK signaling pathway in β -hydroxybutyrate (OHB)-treated cells. Cardiomyocytes were preincubated for 16 h with either vehicle (control), 5 mM OHB, 75 μ M NAC or a combinaison of OHB+NAC described in Experimental Procedures. The cells were then stimulated with 0.1 mM DNP for either 5 min (A) or 10 min (B). **A: Top:** Representative immunoblot of phospho-AMPK and total AMPK. **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. * P <0.05 DNP vs basal; † P <0.05 different from DNP-stimulated controls (with or without NAC). **B: Top:** Representative immunoblot of phospho-p38MAPK and total p38MAPK. **Bottom:** Densitometric analysis of immunoblots. Means \pm SE of 3 independent experiments. ** P <0.01 DNP vs basal; †† P <0.01 different from DNP-stimulated controls (with or without NAC).

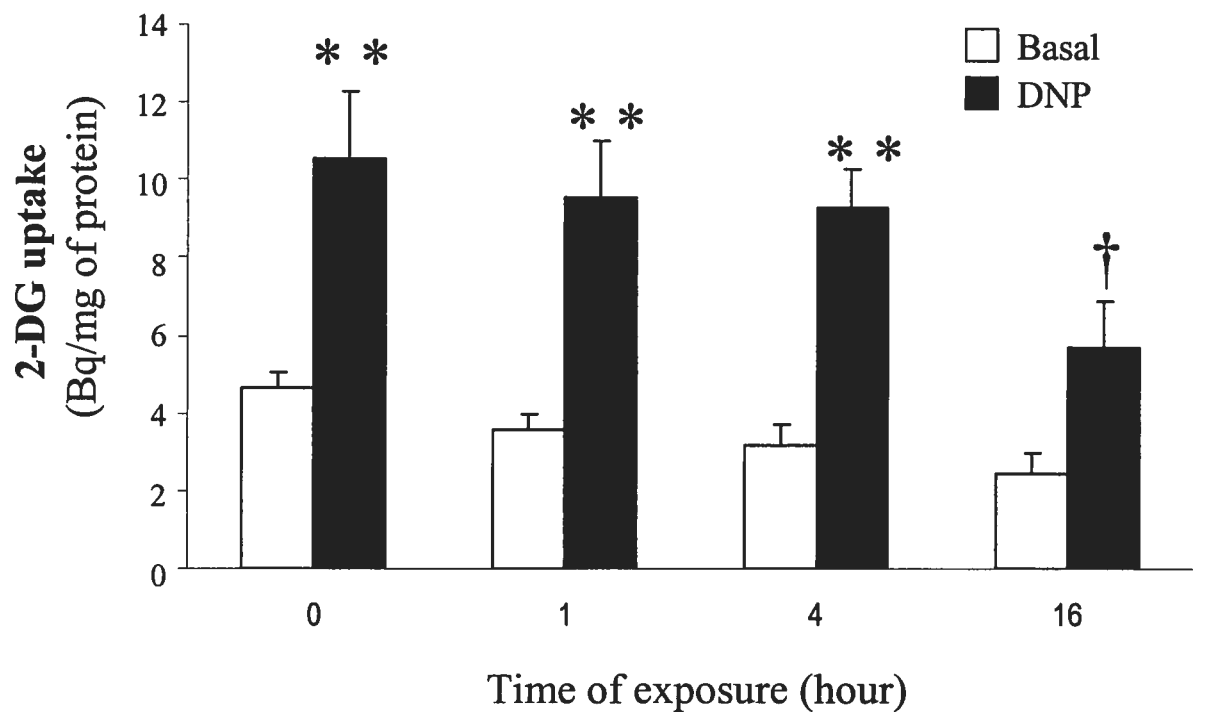


Figure 1

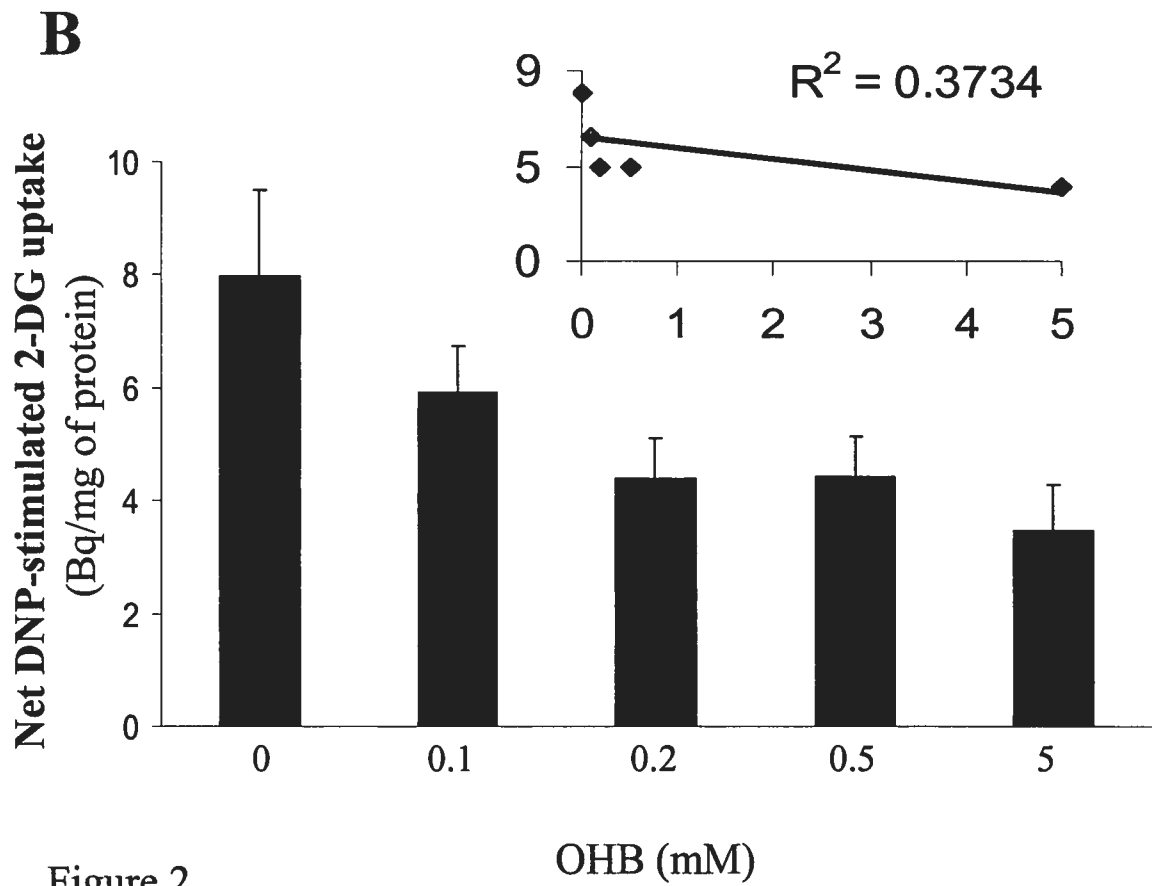
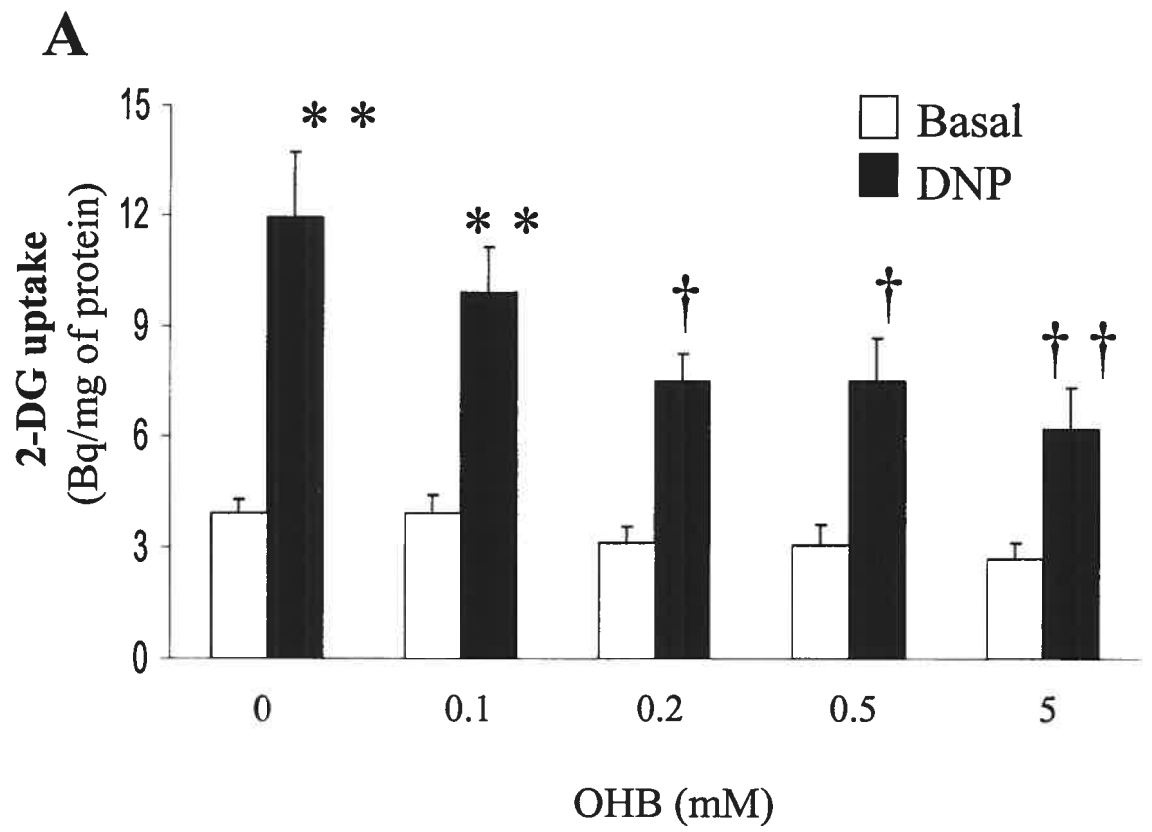


Figure 2

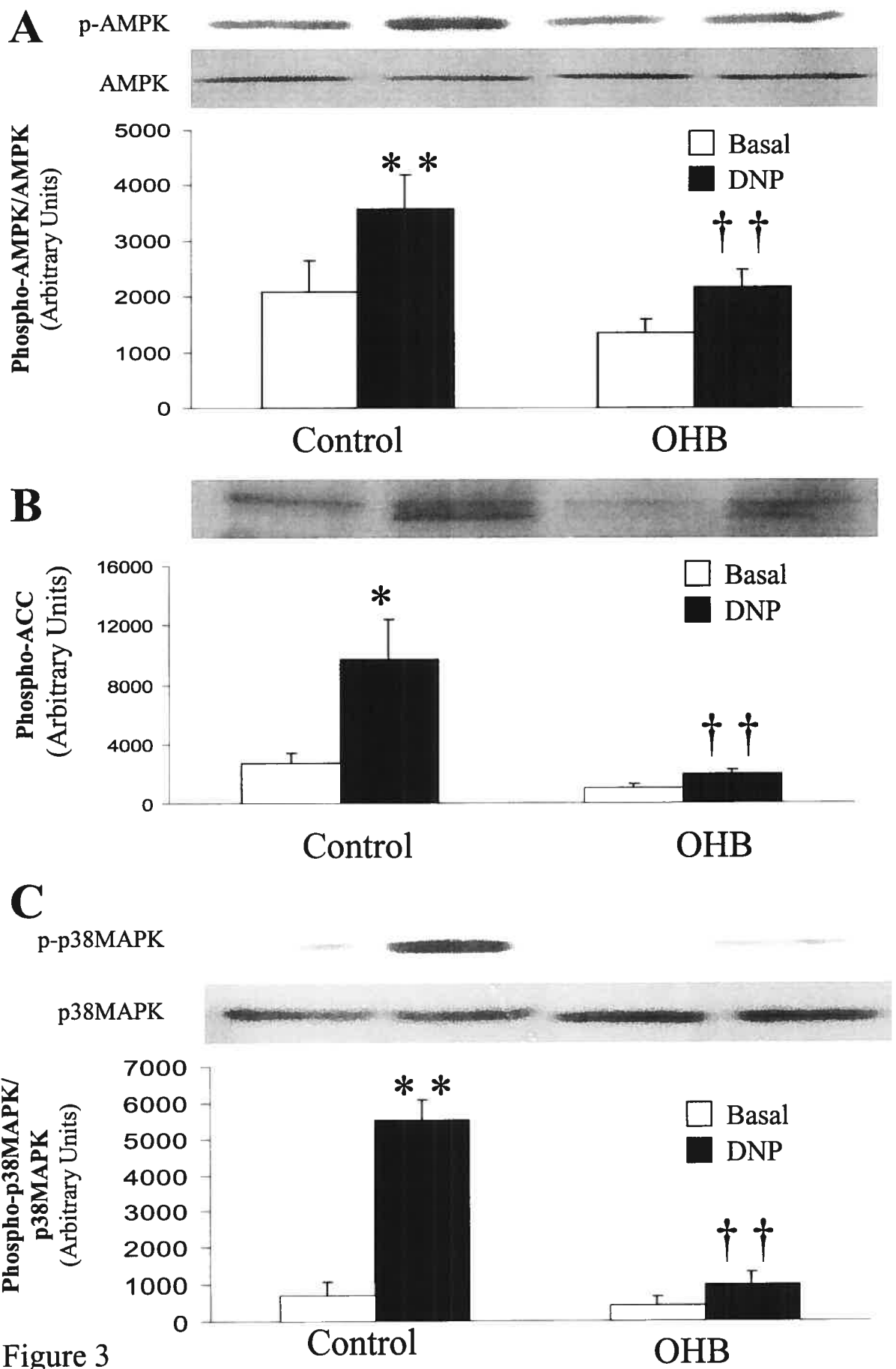


Figure 3

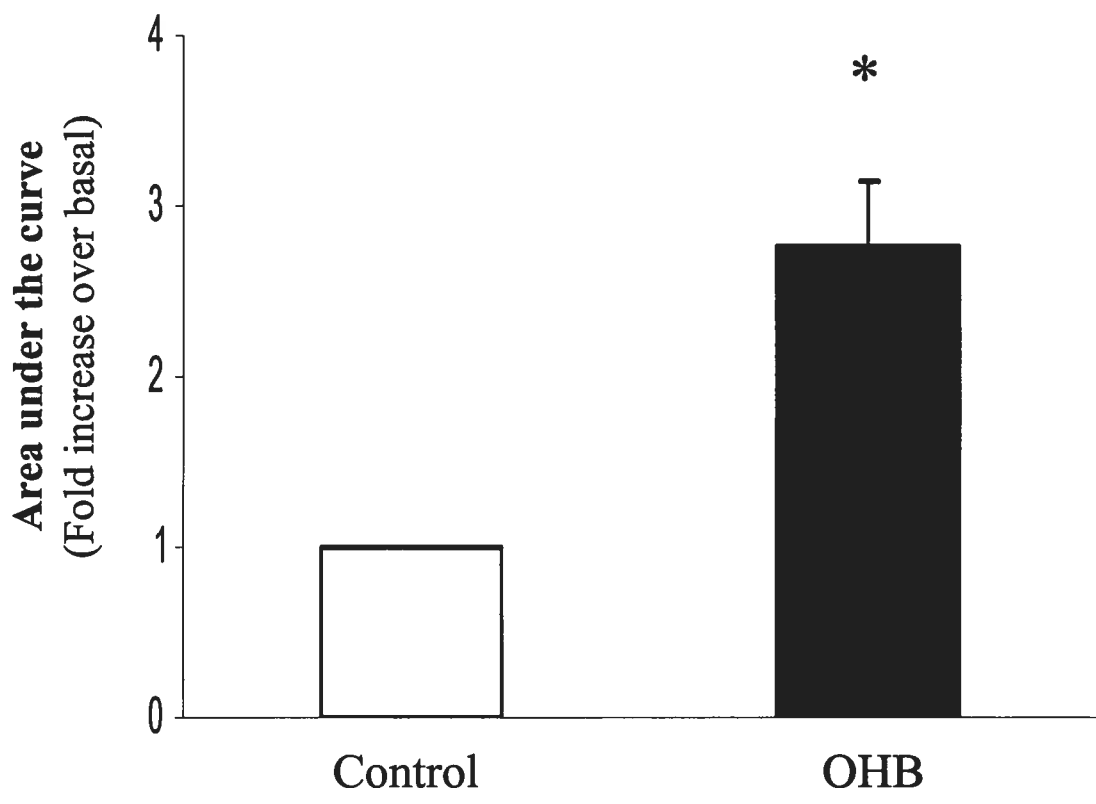


Figure 4

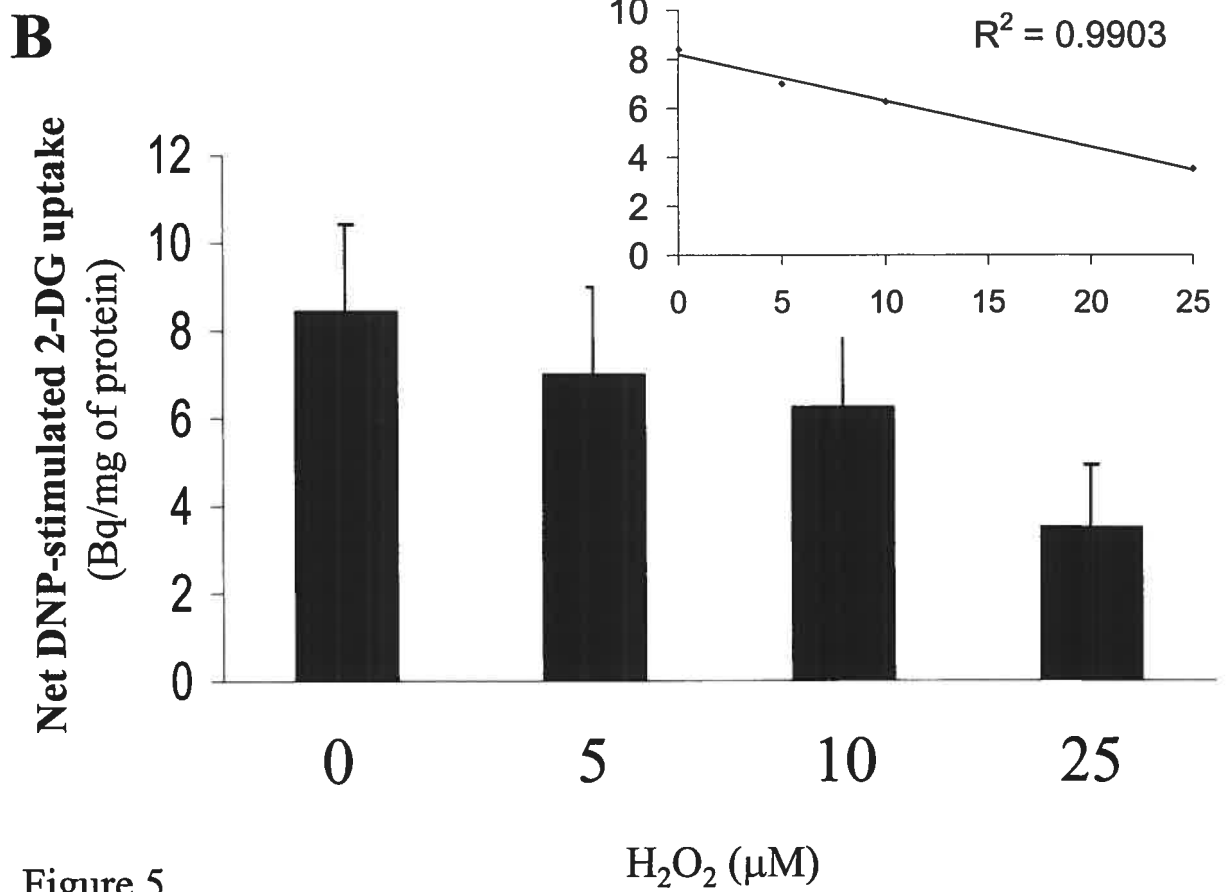
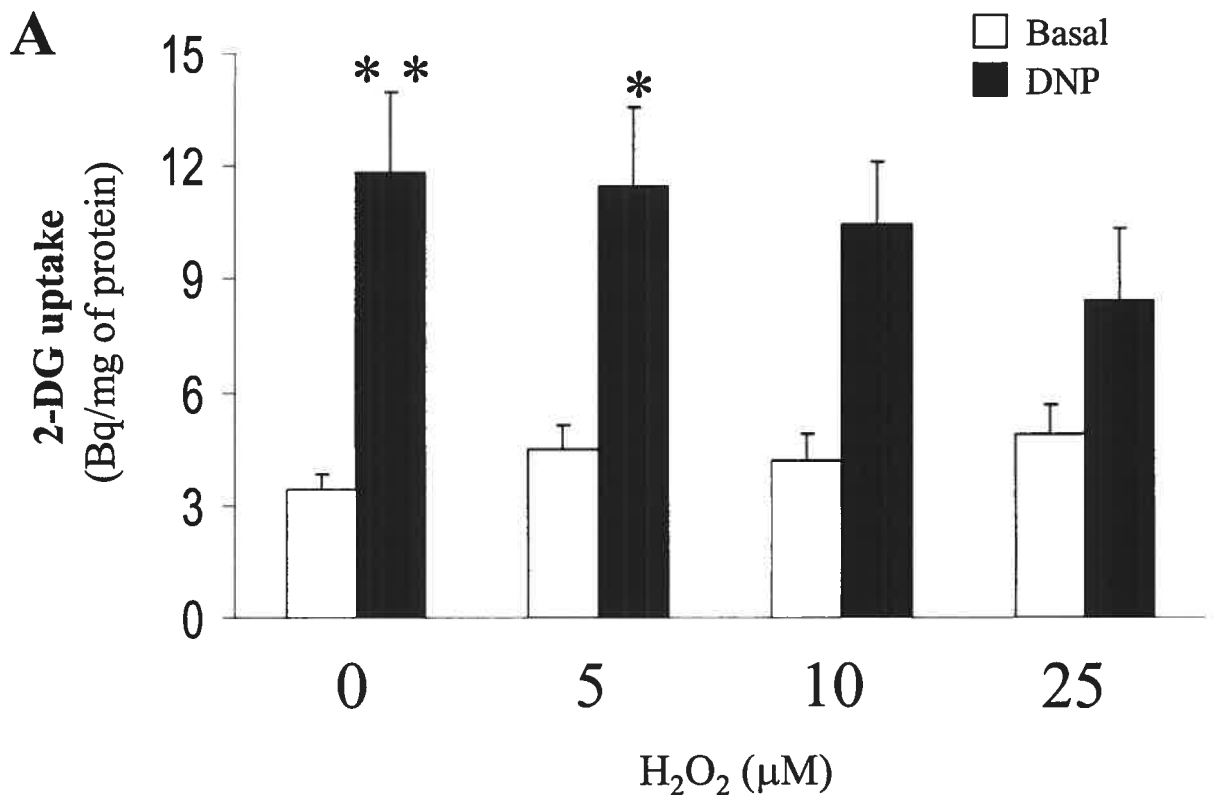


Figure 5

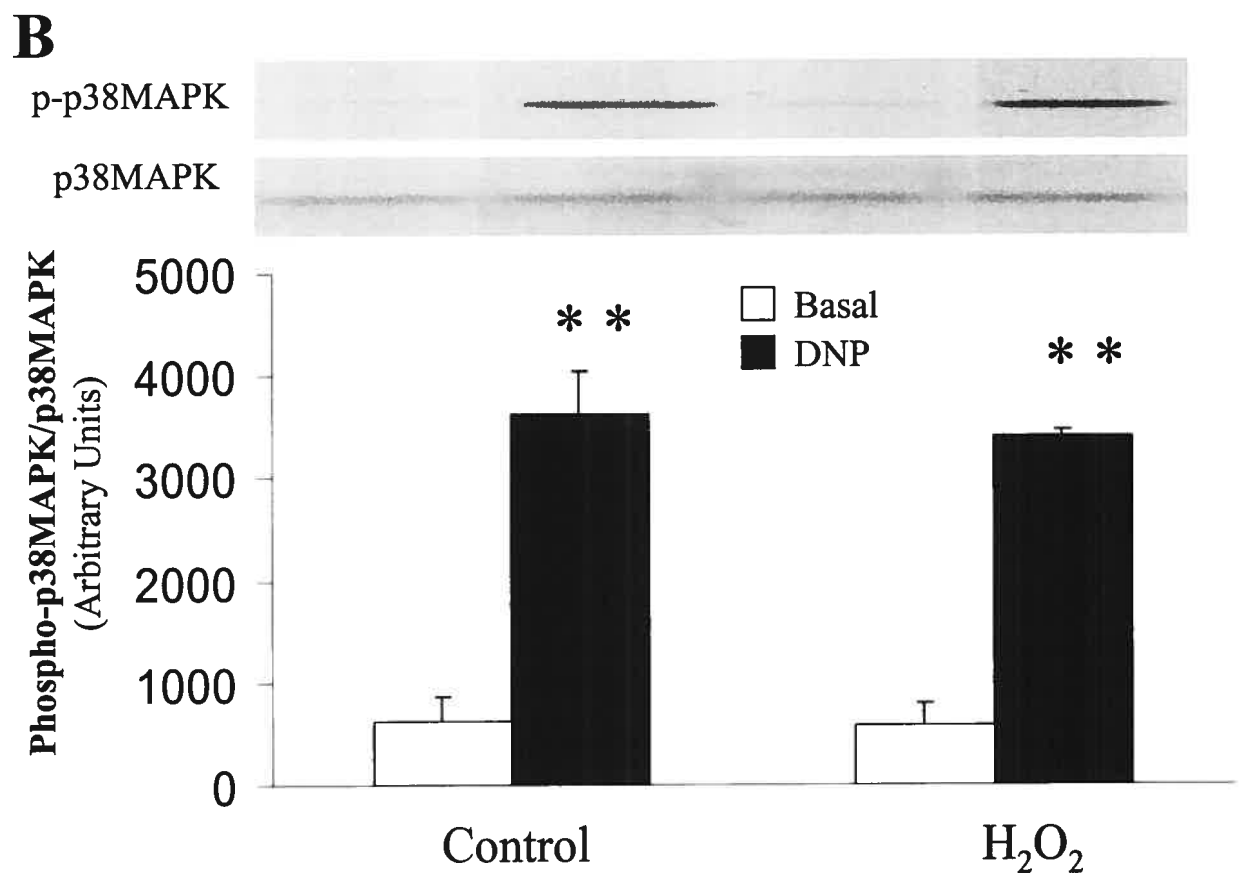
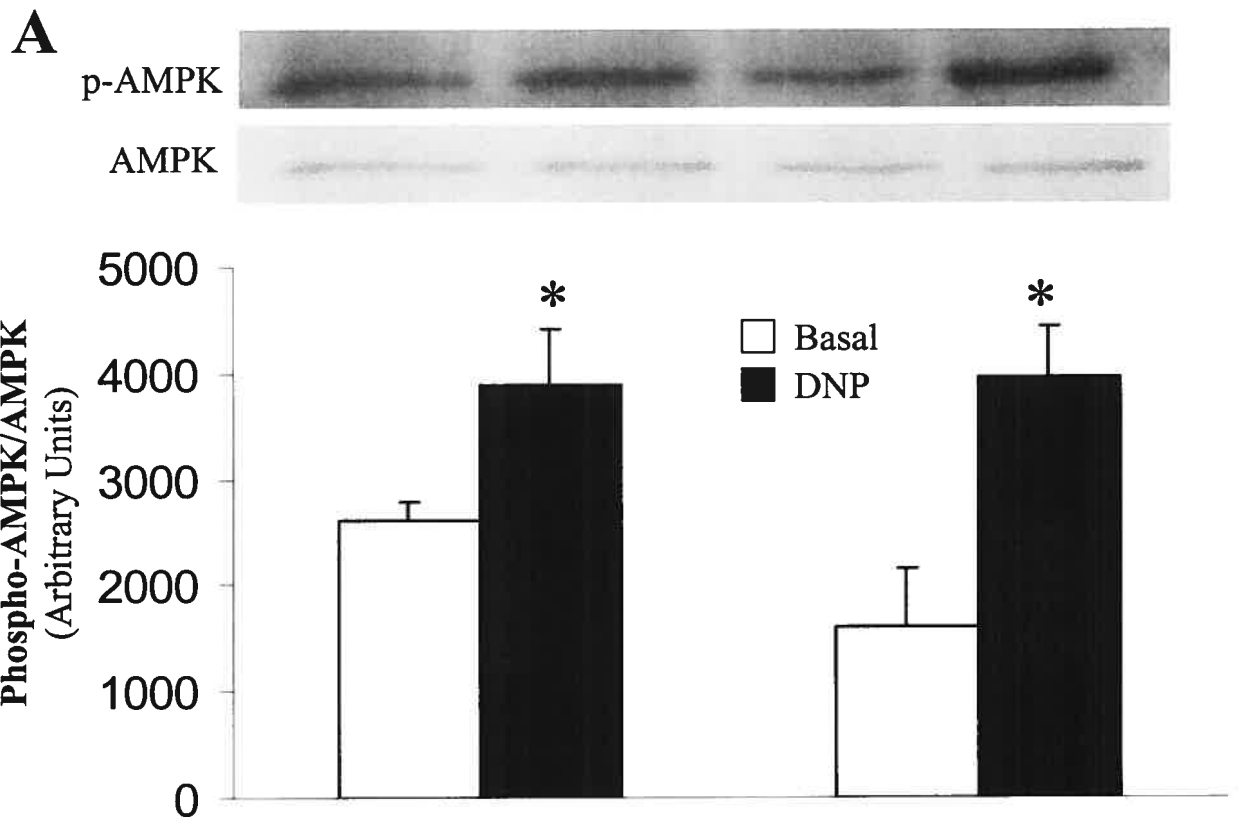


Figure 6

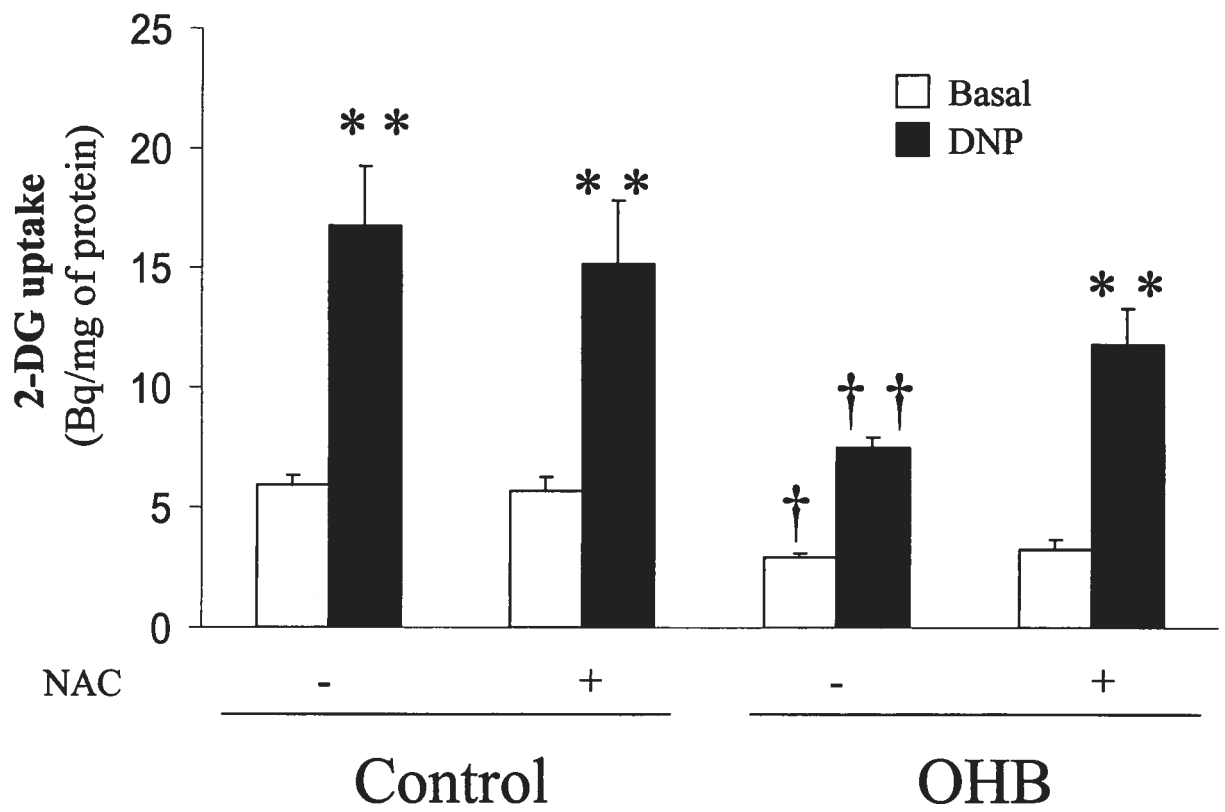


Figure 7

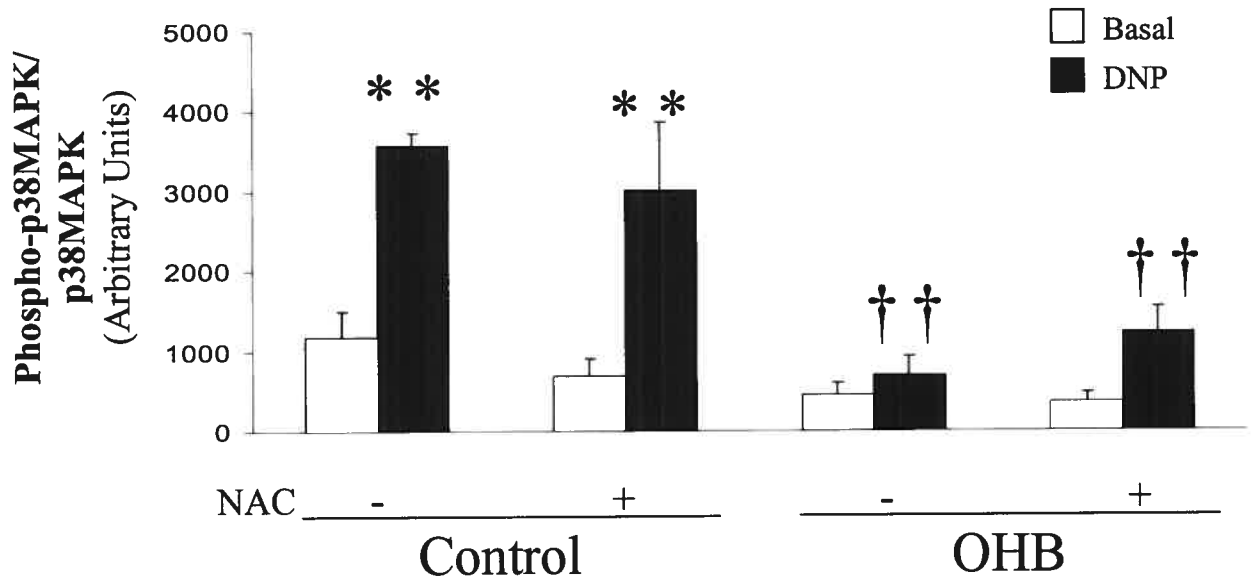
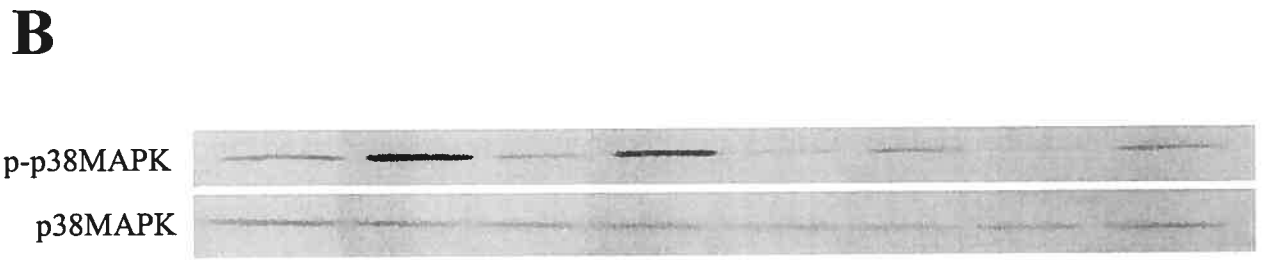
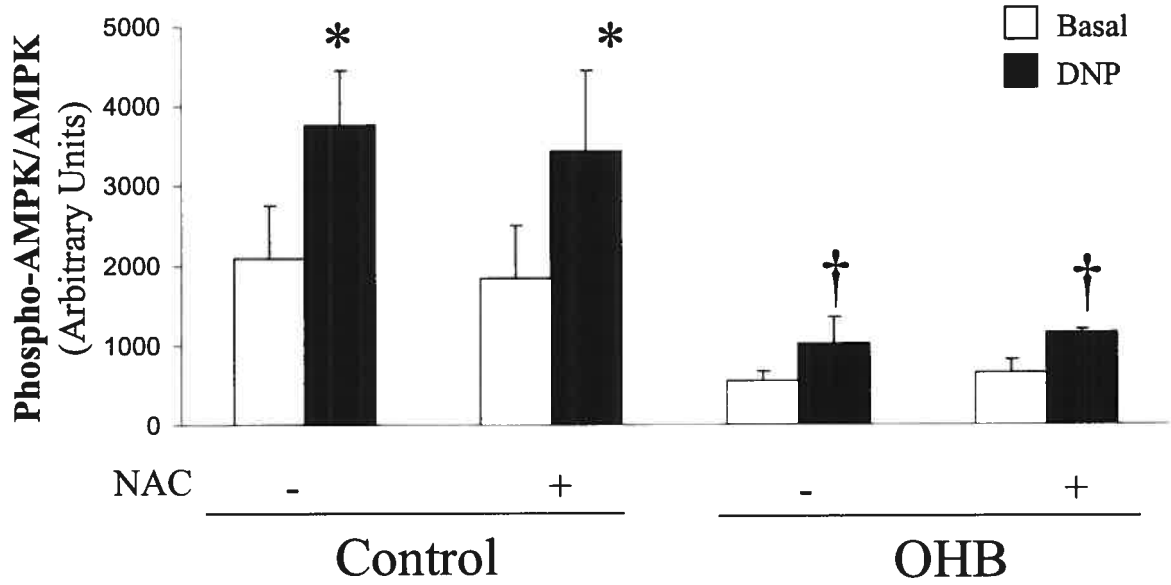
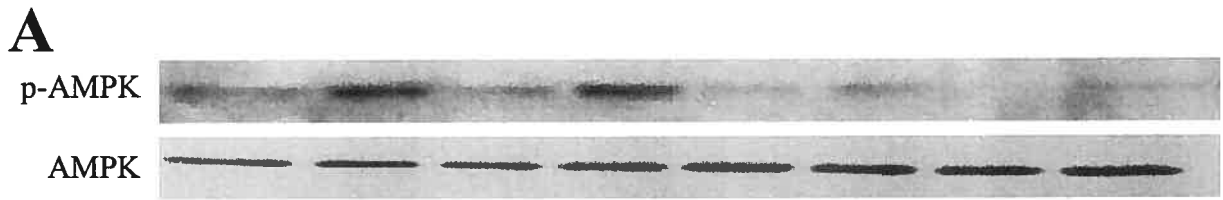


Figure 8

CHAPITRE 3

Discussion

Le glucose joue un rôle primordial dans le maintien des fonctions cardiaques. Par conséquent, une altération de la captation du glucose dans le coeur pourrait avoir des répercussions majeures sur le développement des MCV. Nous avons donc étudié l'impact du β -hydroxybutyrate sur le transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cultures primaires de cardiocytes adultes. De plus, nous avons évalué l'effet aigu et chronique de composés de vanadate sur ce processus dans les cardiocytes devenus insulino-résistants suite à une exposition au β -hydroxybutyrate. Finalement, nous avons examiné si le β -hydroxybutyrate exerçait également des effets néfastes sur la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique induit par le DNP dans les cardiocytes. Pour ce faire, nous avons tout d'abord caractérisé une voie de signalisation activée par le DNP, qui module l'augmentation du transport de glucose, puisque la contribution des enzymes impliquées dans cette cascade de signalisation était controversée. Dans cette section, les résultats obtenus seront mis en perspective avec les données de la littérature.

I. EFFET AIGU VERSUS CHRONIQUE DU β -HYDROXYBUTYRATE SUR LE TRANSPORT DE GLUCOSE

Bien que l'insuline et le DNP augmentent le transport de glucose dans les cardiocytes en activant des voies de signalisation différentes, le β -hydroxybutyrate inhibe l'action de ces deux agonistes de façon dépendante de la concentration et du temps d'exposition aux corps cétoniques. Nos résultats démontrent qu'une exposition de courte durée (≤ 4 h) au β -hydroxybutyrate n'altère pas la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP. Seule une exposition prolongée (16 h) aux corps cétoniques a un effet inhibiteur sur le transport de glucose stimulé par les deux agonistes

dans les cardiocytes. De plus, l'effet maximal du β -hydroxybutyrate sur l'inhibition du transport de glucose stimulé par l'insuline et le DNP est atteint avec une concentration de 5 mM dans les deux cas. Puisque le β -hydroxybutyrate exerce un effet similaire sur l'action de l'insuline et du DNP, cela suggère qu'il existe un mécanisme commun qui participe à l'inhibition du transport de glucose en réponse à ces deux agonistes. De plus, puisqu'au moment d'une acidocétose les concentrations de corps cétoniques (>3 mM) restent élevées jusqu'à 12 heures après le début des traitements (Laffel, 1999), les données recueillies dans cette thèse pourraient avoir une importance clinique.

Nous avons démontré qu'une exposition de courte durée à des concentrations élevées (5 mM) de β -hydroxybutyrate n'a aucun impact sur la stimulation du transport de glucose par l'insuline et le DNP. Par contre, Fisher et coll. (Fischer et coll., 1997a) ont observé que le transport de glucose en réponse à l'insuline est inhibé par une exposition aiguë des cardiocytes au β -hydroxybutyrate. De même, une exposition aiguë aux corps cétoniques provoquent une diminution de l'utilisation du glucose dans le cœur (Williamson et Krebs, 1961; Tsai et coll., 2005). Dans nos études, le β -hydroxybutyrate était retiré du milieu avant la mesure du transport de glucose contrairement à ces études où les corps cétoniques faisaient directement compétition avec le glucose. Étant donné que les corps cétoniques ne font pas directement concurrence au glucose comme substrat énergétique dans notre modèle, cela pourrait expliquer la différence avec nos résultats. Nos données démontrent que seule une exposition chronique (16 h) au β -hydroxybutyrate entraîne un effet délétère sur le transport de glucose en réponse à ces deux agonistes. Par ailleurs, l'effet des corps cétoniques persiste jusqu'à six heures après leur retrait du milieu. Tous ces résultats suggèrent que les corps cétoniques pourraient exercer un effet

inhibiteur via la production de métabolites générés par le catabolisme du β -hydroxybutyrate.

Nous avons également démontré qu'une exposition chronique au β -hydroxybutyrate est associée à une augmentation de la production de ROS dans les cardiocytes et, par conséquent, une augmentation du stress oxydatif au niveau cellulaire. Ces données concordent avec les observations faites chez des patients diabétiques hypercétonémiques qui présentent une augmentation de la peroxydation des lipides, un marqueur du stress oxydatif, comparativement aux patients diabétiques normocétonémiques (Jain et coll., 1999; Jain et McVie, 1999). L'hyperglycémie et la dyslipidémie représentent deux autres facteurs qui contribuent à augmenter le stress oxydatif au niveau cellulaire (Xu et coll., 2005), alors que la restriction calorique le diminue (Sohal et Weindruch, 1996; Lee et Yu, 1990). Cela suggère que les surplus énergétiques induiraient une augmentation du stress oxydatif. De plus, une baisse de la production de ROS pourrait contribuer au prolongement de la vie observée en réponse à la restriction calorique (Heilbronn et Ravussin, 2003). Nous n'avons pas identifié comment le β -hydroxybutyrate augmente la production de ROS, mais l'augmentation du stress oxydatif induit par l'hypercétonémie pourrait être due à une hausse de la production de NADH ou de FADH₂ lors de l'oxydation des corps cétoniques. Il a été démontré que l'activité de la NADH oxydase est augmentée dans certains modèles animaux d'obésité et de diabète (Sonta et coll., 2004; Ellis et coll., 1998). Ainsi, cette augmentation de NADH ou de FADH₂ entraînerait une élévation du flux d'électron dans la chaîne de transport d'électron et résulterait ultimement en une augmentation de la réduction de l'oxygène pour produire des anions superoxyde (Rolo et Palmeira, 2006).

Dans notre modèle, le H_2O_2 inhibe le transport de glucose en réponse au DNP et un traitement avec l'antioxydant NAC restaure partiellement l'effet néfaste du β -hydroxybutyrate sur la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP dans les cardiocytes. Ces résultats suggèrent donc que le stress oxydatif altère le transport de glucose en réponse au stress métabolique. De plus, il a été démontré que le stress oxydatif peut aussi induire la résistance à l'insuline et réduire le transport de glucose dans les tissus insulino-sensibles (Evans et coll., 2005). L'utilisation du NAC, afin de réduire le stress oxydatif, prévient également la résistance à l'insuline induite par l'hyperglycémie dans le muscle squelettique (Haber et coll., 2003). Ainsi, le stress oxydatif généré par une exposition chronique aux corps cétoniques pourrait représenter le facteur responsable de la diminution du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP. Il a été démontré que le H_2O_2 module l'expression de plusieurs centaines de gènes (Fratelli et coll., 2005; Jaramillo et Olivier, 2002; Griendling et coll., 2000). Le stress oxydatif, induit par les corps cétoniques, pourrait altérer l'expression de protéines importantes pour la stimulation du transport de glucose. Finalement, il a été démontré que les corps cétoniques et le stress oxydatif peuvent affecter la fluidité membranaire (Candiloros et coll., 1995; Atsumi et coll., 2005). En modifiant les propriétés membranaires des cellules cardiaques, la génération de ROS par le β -hydroxybutyrate pourrait altérer la translocation ou la fusion/insertion des vésicules de GLUT4 et ainsi réduire la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP. Puisqu'aucune étude, à notre connaissance, n'a encore identifié par quel mécanisme le stress oxydatif inhibe la stimulation du transport de glucose en réponse au stress métabolique, ce domaine de recherche demeure à être exploré. Étant donné que

l'utilisation de l'antioxydant NAC ne restaure que partiellement la stimulation du transport de glucose induite par le DNP dans les cardiocytes incubés avec le β -hydroxybutyrate, cela suggère que le stress oxydatif n'est pas le seul mécanisme par lequel les corps cétoniques inhibent ce processus. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'antioxydants sur la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cardiocytes exposés au β -hydroxybutyrate afin de déterminer si la surproduction de ROS est le seul moyen par lequel les corps cétoniques induisent la résistance à l'insuline dans les cardiocytes.

Puisque le NAC ne restaure que partiellement le transport de glucose stimulé par le DNP, cela suggère que le β -hydroxybutyrate interfère sur ce processus par des mécanismes autres que le stress oxydatif. Il a été démontré que l'oxydation des corps cétoniques provoque une augmentation des concentrations de citrate dans le coeur (Russell III et coll., 1997). Étant donné que le citrate a la capacité d'inhiber la PFK-1 (Garland et coll., 1963), cela entraînerait l'accumulation de glucose-6-phosphate qui inhiberait l'hexokinase et, par conséquent, diminuerait le transport de glucose tel qu'illustré dans le cycle de Randle (Figure 11). Ainsi, l'accumulation de citrate pourrait être impliquée dans l'effet des corps cétoniques sur la diminution du transport de glucose. Le NADH et l'acétyl CoA représentent d'autres métabolites qui pourraient être responsable de l'inhibition du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP dans les cellules exposées au β -hydroxybutyrate. Le métabolisme du β -hydroxybutyrate par la β -hydroxybutyrate déshydrogénase génère du NADH et son oxydation produit également de l'acétyl CoA (section II. B. 2.) (Fukao et coll., 2004). Il a été démontré qu'une élévation du ratio de NADH/NAD^+ et des concentrations d'acétyl CoA peuvent bloquer

la conversion du pyruvate en acétyl CoA en inhibant la PDH (Odland et coll., 2000; Jeukendrup, 2002). Ainsi, l'accumulation de ces métabolites inhiberait la glycolyse et, éventuellement, le transport de glucose.

II. EFFET DU β -HYDROXYBUTYRATE SUR LA VOIE DE SIGNALISATION ACTIVÉE PAR L'INSULINE

En plus de diminuer la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP, les corps cétoniques induisent une résistance à l'insuline dans les cardiocytes adultes. Nos résultats démontrent que la diminution du transport de glucose n'est pas due à une altération de l'activation du récepteur à l'insuline par le β -hydroxybutyrate, mais plutôt à une réduction de l'activation de l'IRS-1, de la PI3K et de la PKB. Kim et coll. ont également observé une dissociation entre l'activation du récepteur à l'insuline et de l'IRS-1 par l'insuline dans les muscles squelettiques de patients diabétiques (Kim et coll., 2003). Une diminution de l'activation de l'IRS-1, de la PI3K et de la PKB en réponse à l'insuline a également été observée dans différents modèles de résistance à l'insuline tels que l'obésité et le diabète (Petersen et Shulman, 2002; Sesti et coll., 2001; Kim et coll., 2003; Krook et coll., 2000; Bjornholm et coll., 1997; Kruszynska et coll., 2002). Alors que le β -hydroxybutyrate bloque complètement l'activation de l'IRS-1 en réponse à l'insuline, il exerce seulement une inhibition partielle sur l'activation de la PI3K (54 %), de la PKB (36 %) et du transport de glucose (45 %). Cela suggère qu'il existe une dissociation entre l'activité de l'IRS-1 et celle de la voie de signalisation PI3K/PKB et que cette dernière module la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cardiocytes.

Comment pourrait-on expliquer une telle dissociation entre l'IRS-1 et la PI3K ? Tout d'abord, il a été démontré qu'une stimulation de moins de 50 % de l'IRS-1 est suffisante pour induire une activation maximale de la PI3K et du transport de glucose en réponse à l'insuline (Morris et coll., 1996; Staubs et coll., 1998; Venable et coll., 2000). Ainsi, une activation minimale de l'IRS-1 par l'insuline serait suffisante pour activer la PI3K dans notre modèle. D'autre part, il se pourrait que l'IRS-1 ne joue pas un rôle essentiel dans la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cardiocytes. Cette hypothèse est appuyée sur l'observation que des souris KO pour le gène de l'IRS-1 ne présentent que des défauts mineurs de l'action de l'insuline malgré l'absence de l'IRS-1 (Araki et coll., 1994; Tamemoto et coll., 1994). De même, l'utilisation d'adipocytes transfectés avec un ARN anti-sens contre l'IRS-1 ou surexprimant un adenovirus DN-IRS-1 puisque l'inhibition de l'IRS-1 avait peu d'impact sur la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline (Quon et coll., 1994; Sharma et coll., 1997).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la dissociation entre l'IRS-1 et la PI3K. Il faut tout d'abord considérer que l'IRS-1 fait partie de la famille des IRS qui est composée de quatre membres : IRS-1, IRS-2, IRS-3 et IRS-4 dont seul l'IRS-3 n'est pas exprimé dans le cœur (Schreyer et coll., 2003). Le rôle exact de l'IRS-4 est encore très peu connu. Par contre l'IRS-2 représente un bon candidat puisqu'il a été démontré qu'il peut compenser pour l'absence de l'IRS-1 dans les souris KO pour cette protéine (Patti et coll., 1995) et que l'insuline peut stimuler l'association entre l'IRS-2 et la PI3K dans le cœur (Till et coll., 1997). Bien que l'IRS-2 semble représenter un bon candidat pour expliquer l'activation de la PI3K par le récepteur à l'insuline, nous ne croyons pas que

cette protéine joue un rôle important dans notre système puisque nous avons été incapable de détecter sa présence dans nos cardiocytes isolés. La discordance au niveau de l'expression de l'IRS-2 pourrait être expliquée de plusieurs façons. L'IRS-2 pourrait être davantage exprimé dans les cellules non-cardiaques du coeur de rat ou, après une certaine période de temps en culture, les cardiocytes pourraient perdre l'expression de cette protéine.

Il a également été proposé que l'insuline pouvait activer la PI3K d'une façon IRS-indépendante (Sharma et coll., 1998; Sharma et coll., 1997). De plus, il a été démontré que la p85 α était impliquée dans le transport de glucose en réponse à l'insuline, mais que cette enzyme ne se lie ni à l'IRS-1, ni à l'IRS-2 dans le coeur (Kessler et coll., 2001). Différents mécanismes pourraient expliquer comment l'insuline activerait la PI3K indépendamment des IRSs. Tout d'abord, le récepteur à l'insuline a la capacité de lier et d'activer directement la PI3K (Van Horn et coll., 1994; Rajala et coll., 2004). Cette interaction entre les deux protéines pourrait être suffisante pour stimuler la p85, au moins partiellement, et ainsi activer le transport de glucose en réponse à l'insuline. Une autre possibilité réside dans l'existence de molécules telles Gab1 qui, comme l'IRS-1, interagissent avec le récepteur à l'insuline et la PI3K (Holgado-Madruga et coll., 1996). De plus, dans le coeur, il a été rapporté qu'une phosphoprotéine de 200-kDa a la capacité de s'associer avec la PI3K et pourrait servir de protéine de liaison entre le récepteur à l'insuline et la PI3K (Till et coll., 2000). D'autres études seront nécessaires pour clarifier la relation exacte entre le récepteur à l'insuline, l'IRS-1 et la PI3K ainsi que leur importance relative dans la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cardiocytes.

Comme nous l'avons démontré, une exposition chronique au β -hydroxybutyrate bloque complètement l'activation de l'IRS-1 et réduit partiellement celle de la PI3K et de la PKB en réponse à l'insuline. Par quels mécanismes, les corps cétoniques pourraient-ils inhiber ces enzymes ? Une hypothèse intéressante serait la production de ROS par les corps cétoniques qui pourrait entraver l'activation de la voie de signalisation qui régule le transport de glucose en réponse à l'insuline. Dans les adipocytes, il a été démontré que le H_2O_2 inhibe l'IRS-1, la PI3K et la PKB en réponse à l'insuline et ainsi inhibe la stimulation du transport de glucose (Tirosh et coll., 1999). Le stress oxydatif pourrait ainsi exercer son effet via l'activation de deux mécanismes d'action différents : l'activation de sérine/thréonine kinases et la surexpression de phosphatases.

Tout d'abord, le stress oxydatif peut induire la résistance à l'insuline en activant des sérine/thréonine kinases (Bloch-Damti et Bashan, 2005; Evans et coll., 2005) telles ERK1/2, JNK (Jun N-terminal kinase) (Evans et coll., 2003), NF- κ B (Ogihara et coll., 2004) et mTOR (Potashnik et coll., 2003). Ces enzymes peuvent diminuer le transport de glucose en phosphorylant l'IRS-1 sur les résidus sérine et/ou en altérant le recrutement de la p85 à la membrane des microsomes à faible densité (De Fea et Roth, 1997; Ogihara et coll., 2004). Puisque les corps cétoniques augmentent l'activité de base de ERK1/2, peut-être via la surproduction de ROS, nous avons inhibé l'activation de cette enzyme afin de vérifier s'il était possible de rétablir la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline dans les cardiocytes incubés avec les corps cétoniques. Nos résultats démontrent que la suractivation de ERK1/2 ne semble pas être impliquée dans la diminution du transport de glucose dans les cellules rendues insulino-résistantes par les corps cétoniques. Par contre, d'autres sérine/thréonine kinases, tel que mentionné,

pourraient être activées par les corps cétoniques afin d'inhiber le transport de glucose en réponse en l'insuline.

Il a été démontré que la PTP1B était surexprimée dans certains modèles de résistance à l'insuline (Hirata et coll., 2003). La production excessive de ROS serait responsable, du moins en partie, de cette augmentation de la PTP1B (Fang et coll., 2005a). Ainsi, le stress oxydatif induit par l'hypercétonémie pourrait également altérer la voie de signalisation de l'insuline en activant certaines phosphatases spécifiques.

III. EFFET DES COMPOSÉS DE VANADATE SUR LA RÉSISTANCE À L'INSULINE INDUITE PAR LE β -HYDROXYBUTYRATE

A. Effet d'une exposition aiguë au pervanadate

Dans le but d'élucider les mécanismes qui participent à l'inhibition du transport de glucose dans les cardiocytes, nous avons évalué l'effet du pervanadate et du vanadate. Nous avons démontré que le pervanadate stimule le transport de glucose lorsqu'il est donné de façon aiguë. Le pervanadate est un puissant inhibiteur irréversible des protéines tyrosine phosphatases. Cependant, le β -hydroxybutyrate supprime l'effet du pervanadate sur l'activation de la PKB et sur le transport de glucose. Ainsi, lorsqu'administré de façon aiguë, après une exposition aux corps cétonique, le pervanadate ne peut pas contrebalancer le développement de la résistance à l'insuline induit par le β -hydroxybutyrate dans les cardiocytes. Ces résultats sont compatibles avec l'hypothèse que l'hypercétonémie déclenche un ou plusieurs mécanismes globaux qui altèrent le transport de glucose en réponse à différents stimuli dans le muscle cardiaque. Si une exposition chronique aux corps cétoniques devait altérer l'expression de certaines protéines, modifier la fluidité membranaire ou entraîner l'accumulation de certains

métabolites, tel que mentionné précédemment, un traitement aigu avec le pervanadate ne pourrait probablement pas compenser pour tous ces changements.

B. Effet d'une exposition chronique au vanadate

Contrairement à une exposition aiguë au pervanadate, une exposition chronique au vanadate prévient la résistance à l'insuline observée en réponse à l'hypercétonémie. Aussi, l'activation de la voie de signalisation PI3K/PKB et de la stimulation du transport de glucose sont observées en réponse au vanadate malgré une exposition chronique au β -hydroxybutyrate. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de prévenir les effets néfastes des corps cétoniques sur le transport de glucose par un traitement concomitant au vanadate. Deux mécanismes pourraient expliquer comment le vanadate prévient la diminution du transport de glucose dans les cardiocytes exposés aux corps cétoniques : l'inhibition des protéines tyrosines phosphatases et son effet antioxydant.

Le principal mode d'action du vanadate pour induire un effet insulino-mimétique est l'inhibition des protéines tyrosines phosphatases. Le pouvoir d'action du vanadate diffère selon les protéines tyrosines phosphatases (Bevan et coll., 1995). Bien que non significatif, le vanadate semble stimuler le transport de glucose de façon un peu plus importante dans les cardiocytes incubés avec le β -hydroxybutyrate comparativement aux cellules contrôles. L'augmentation de la production de ROS par les corps cétoniques pourrait expliquer cet effet puisqu'il a été démontré que le vanadate a un meilleur pouvoir inhibiteur sur les protéines tyrosines phosphatases dans de telles circonstances (Lu et coll., 2001). Donc, la première façon par laquelle le vanadate pourrait contrecarrer l'effet du β -hydroxybutyrate est en inhibant les phosphatases spécifiques à la PI3K, afin de garder l'activation de cette enzyme intacte.

Bien que certains composés de vanadium augmentent la production de ROS (Gandara et coll., 2005), d'autres ont des propriétés antioxydantes (Siddiqui et coll., 2005; Ramachandran et coll., 2004). Il a été démontré que le vanadate prévient la résistance à l'insuline induite par le H_2O_2 dans les cellules embryonnaires de rein (Hansen et coll., 1999). Genet et coll. ont obtenu des résultats similaires dans le cœur, où l'administration de vanadate prévient les dommages cellulaires occasionnés par l'augmentation du stress oxydatif dans un modèle de diabète de type 1 (Genet et coll., 2002). En agissant comme antioxydant, le vanadate pourrait potentiellement contrecarrer la surproduction des ROS induites par les corps cétoniques et ainsi prévenir les effets inhibiteurs du stress oxydatif sur la stimulation du transport de glucose dans le muscle cardiaque.

IV. EFFET DU β -HYDROXYBUTYRATE SUR LA VOIE DE SIGNALISATION ACTIVÉE PAR LE DNP

Puisque la voie de signalisation activée par le DNP n'était pas bien caractérisée, nous avons voulu identifier les enzymes activées par le DNP qui pourraient être impliquées dans ce processus.

A. Caractérisation de la voie de signalisation activée par le DNP

L'utilisation du DNP, pour mimer l'hypoxie, nous a permis de caractériser une voie de signalisation impliquée dans le transport de glucose qui est distincte de celle activée par l'insuline. Le DNP active l'AMPK qui est impliquée dans le transport de glucose. En exploitant différentes approches expérimentales (inhibiteur pharmacologique et adénovirus), nous avons démontré que l'inhibition de l'AMPK réduit le transport de glucose de façon partielle. Bien que l'augmentation du transport de glucose en réponse à

l'ischémie soit également inhibée partiellement dans le cœur surexprimant un DN-AMPK (Xing et coll., 2003), ce processus est totalement supprimé en réponse à l'ischémie partielle dans le cœur surexprimant une KD-AMPK (Russell III et coll., 2004). L'inhibition plus prononcée du transport de glucose par la KD-AMPK, comparativement au DN-AMPK, pourrait être due à une meilleure inhibition de l'activité de l'AMPK dans le modèle surexprimant la KD-AMPK. Par contre, les résultats obtenus dans les cultures primaires de cardiocytes adultes avec le DNP ont récemment été confirmés dans un modèle animal surexprimant une KD-AMPK α 1 dans le cœur. Li et coll. ont démontré que l'inhibition de l'AMPK dans le cœur entraîne une diminution partielle de la stimulation du transport de glucose en réponse à l'hypoxie (Li et coll., 2005). Cela suggère donc que l'hypoxie et l'ischémie complète activent deux voies de signalisation pour augmenter le transport de glucose dans le cœur: une voie AMPK-dépendante et une AMPK-indépendante; alors que le transport de glucose en réponse à une ischémie partielle dépend uniquement d'une voie AMPK-dépendante. Ainsi, la contribution relative de l'AMPK dans la stimulation du transport de glucose pourrait dépendre de la sévérité du stress métabolique perçu au niveau cellulaire. Ainsi, pour subvenir à ses besoins énergétiques, quand l'apport en oxygène et/ou en nutriment est nul, le cœur pourrait activer deux voies de signalisation complémentaires afin d'assurer une captation minimale de glucose même si l'une des deux voies devait être altérée.

Dans le muscle squelettique, l'AMPK est également activée en réponse à plusieurs stimuli différents tels l'AICAR (un analogue de l'adénosine) (Lemieux et coll., 2003), l'hypoxie (Hayashi et coll., 2000) et la contraction (Musi et coll., 2001). Mu et coll. ont démontré que l'inhibition de l'AMPK entraîne une réduction partielle du

transport de glucose en réponse à la contraction dans le muscle squelettique surexprimant une KD-AMPK α 2 (Mu et coll., 2001). L'implication de l'AMPK dans ce processus est controversée puisque l'inhibition de l'AMPK n'affecte pas la stimulation du transport de glucose en réponse à la contraction dans les souris transgéniques ou KO pour l'AMPK α 2 (Fujii et coll., 2005; Jorgensen et coll., 2004). Par contre, l'AMPK joue un rôle important dans le transport de glucose en réponse à l'AICAR dans le muscle squelettique puisqu'il a été démontré que ce processus est complètement bloqué en réponse à l'AICAR dans le muscle squelettique des souris surexprimant une AMPK ayant une sous-unité α 2 inactive (Sakoda et coll., 2002) ou les souris KO pour l'AMPK α 2 (Jorgensen et coll., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus en réponse à l'hypoxie dans les muscles squelettiques des souris surexprimant une KD-AMPK α 2 (Mu et coll., 2001). Ces résultats suggèrent que la stimulation du transport de glucose en réponse à l'AICAR et à l'hypoxie est totalement dépendante de l'AMPK dans le muscle squelettique contrairement au muscle cardiaque où deux voies de signalisation semblent activées par l'hypoxie et aux adipocytes où l'AMPK ne semble pas impliquée dans la stimulation du transport de glucose en réponse à l'AICAR (Sakoda et coll., 2002). Tous ces résultats laissent supposer que l'AMPK joue un rôle dans le transport de glucose de façon stimulus et tissu spécifique.

Nous avons également identifié la p38MAPK, située en aval de l'AMPK, comme étant une enzyme impliquée dans la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP. Plusieurs études ont démontré que la p38MAPK est activée par l'AMPK (Li et coll., 2005; Lemieux et coll., 2003; Xi et coll., 2001) et l'insuline (Somwar et coll., 2000; Moon et coll., 2003), mais son rôle exact dans le transport de glucose reste imprécis.

Somwar et coll. ont démontré que l'inhibition pharmacologique de la p38MAPK avec le SB203580 entraîne une inhibition partielle du transport de glucose en réponse à l'insuline dans le muscle squelettique (Somwar et coll., 2000). Par contre, la stimulation du transport de glucose par l'insuline n'est pas affectée dans le muscle squelettique des souris KO pour la p38MAPK β (Turban et coll., 2005) ou celui surexprimant la DN-p38MAPK α et p38MAPK β (Antonescu et coll., 2005). De plus, il a été rapporté que l'inhibition du transport de glucose par le SB203580 est indépendante de l'effet de cet inhibiteur sur l'activité de la p38MAPK dans les myotubes L6 (Antonescu et coll., 2005), probablement parce que le SB203580 agit comme un inhibiteur compétitif qui se lie sur les sites endofaciaux des transporteurs de glucose pour réduire leur activité (Yamagata et coll., 1992). L'implication de la p38MAPK dans la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline est controversée puisque l'inhibition de la p38MAPK à l'aide d'un DN-p38MAPK réduit partiellement le transport de glucose induit par l'insuline dans les 3T3-L1 (Somwar et coll., 2002). Il a également été démontré que la p38MAPK est impliquée dans le transport de glucose en réponse à l'AICAR dans le muscle squelettique (Lemieux et coll., 2003). Des résultats similaires ont été observés en réponse au DNP dans les cardiocytes (Pelletier et coll., 2005). Bien que l'AMPK semble responsable de la translocation des vésicules de GLUT4 en réponse à l'AICAR et au DNP, la p38MAPK ne serait pas impliquée dans ce processus dans le muscle squelettique (Lemieux et coll., 2003) et les adipocytes (Somwar et coll., 2002; Yamaguchi et coll., 2005). Ainsi, il a été proposé que la p38MAPK régule l'activité intrinsèque de GLUT4 plutôt que sa translocation (Lemieux et coll., 2003). Par contre, Li et coll. ont récemment démontré que l'inhibition de la p38MAPK entraîne une diminution de la translocation de GLUT4

en réponse à l'AICAR et à l'hypoxie dans le cœur (Li et coll., 2005). Comme l'AMPK, la p38MAPK pourrait donc avoir un rôle tissu- et stimulus-spécifique. En plus de l'AMPK et de la p38MAPK, il a été démontré que le NO serait également impliqué dans la translocation de GLUT4 en réponse à l'activation de l'AMPK dans le cœur (Li et coll., 2004). Ainsi, des études plus approfondies sur la translocation de GLUT4 devront être effectuées dans le cœur afin de bien identifier et définir le rôle des enzymes qui modulent ce processus, particulièrement celui de la p38MAPK et du eNOS.

En plus, le DNP et l'hypoxie semblent entraîner l'activation d'une voie AMPK-indépendante. Bien que nous n'ayons pas identifié les enzymes impliquées dans cette voie de signalisation, nous avons identifié quelques candidats. Tout d'abord, il a été démontré que le DNP active les PKC classiques et que leur inhibition induit une diminution du transport de glucose en réponse au DNP dans le muscle squelettique (Khayat et coll., 1998). Des résultats similaires ont été rapportés en réponse à l'ischémie dans des cellules cardiaques (Agnetti et coll., 2005), renforçant ainsi l'implication de ces PKC dans le transport de glucose en réponse au DNP. De plus, il a été proposé que le DNP utilise le Ca^{2+} comme second messenger pour stimuler le transport de glucose (Khayat et coll., 1998). Dans le muscle squelettique, le transport de glucose, en réponse à l'hypoxie, est régulé par un mécanisme Ca^{2+} -dépendant qui inclue la participation de la CAMK (Wright et coll., 2005). Ainsi, la CAMK représente une autre enzyme qui pourrait jouer un rôle dans le transport de glucose en réponse au DNP dans le muscle cardiaque. L'implication de ces enzymes dans la stimulation du transport de glucose en réponse au DNP devra toutefois être confirmée dans des expériences futures effectuées dans le muscle cardiaque.

B. Effet du β -hydroxybutyrate sur l'activation de la voie de signalisation AMPK-dépendante

Nous avons démontré qu'une exposition chronique des cardiocytes au β -hydroxybutyrate inhibe l'activation de la voie de signalisation AMPK/p38MAPK, voie essentielle pour stimuler de façon maximale le transport de glucose en réponse au DNP. L'inhibition de l'AMPK a également été observée après la prise d'une diète riche en gras, l'infusion chronique de glucose et chez les rats Zucker obèses (Fang et coll., 2005b; Kraegen et coll., 2006; Itani et coll., 2003; Liu et coll., 2006). Il est bien connu que l'activation de l'AMPK est induite par une baisse du statut énergétique, mais les données présentées ci-haut suggèrent que l'activation de l'AMPK est également modulée par un excès énergétique. Ainsi, un surplus énergétique pourrait induire une rétroaction négative sur l'activité de l'AMPK afin de limiter l'influx de glucose en période d'abondance énergétique. Cela renforce le rôle de l'AMPK comme senseur énergétique.

L'inhibition de la voie de signalisation AMPK-dépendante par le β -hydroxybutyrate est un mécanisme par lequel les corps cétoniques pourraient altérer le transport de glucose en réponse au DNP. Bien que nous n'ayons pas identifié comment les corps cétoniques modulent l'activation de l'AMPK, plusieurs possibilités peuvent être envisagées. D'abord, le métabolisme du β -hydroxybutyrate entraîne une consommation de NAD^+ et une production de NADH ce qui contribue à augmenter le ratio NADH/NAD^+ (Takehiro et coll., 2005; Scotini et coll., 1983). Récemment, il a été démontré qu'une élévation des niveaux de NADH prévient l'activation de l'AMPK en bloquant les sites liant l'ATP ou l'ADP (Rafaeloff-Phail et coll., 2004). Ainsi, l'altération du ratio NADH/NAD^+ par le métabolisme des corps cétoniques pourrait

moduler l'activation de l'AMPK en réponse au DNP. L'activation de l'AMPK pourrait également être modulée par une altération du contenu cardiaque en glycogène par le β -hydroxybutyrate. Dans le cœur, il a été démontré que les corps cétoniques favorisent l'incorporation du glucose en glycogène (Russell III et coll., 1997). Puisqu'une augmentation du contenu en glycogène est associée à une réduction de l'activation de l'AMPK et du transport de glucose dans le muscle squelettique (Derave et coll., 2000), il est possible que des mécanismes similaires opèrent dans le muscle cardiaque. Finalement, le β -hydroxybutyrate pourrait influencer l'activité de l'AMPK en modulant l'action ou l'expression de kinases ou de phosphatases spécifiques. Chez les rats Zucker obèses, il a été rapporté que l'expression et l'activité de LKB1, une AMPKK (Woods et coll., 2003), sont diminuées (Sriwijitkamol et coll., 2006). Ainsi, le β -hydroxybutyrate pourrait avoir des effets similaires sur LKB1 dans les cardiocytes ce qui entraînerait une diminution de l'activation de l'AMPK. D'autres études devront être réalisées afin d'établir par quel mécanisme précis les corps cétoniques exercent leur action sur l'AMPK.

Un des mécanismes proposés pour expliquer la diminution du transport de glucose en réponse au DNP dans les cardiocytes exposés aux corps cétoniques implique le stress oxydatif. Bien que la surproduction de ROS par le β -hydroxybutyrate semble jouer un rôle dans l'effet inhibiteur des corps cétoniques sur le transport de glucose, nos résultats suggèrent que cet effet n'est pas relié à l'inhibition de la voie de signalisation AMPK/p38MAPK. Puisque la stimulation du transport de glucose par le DNP implique l'activation de deux voies de signalisation, une AMPK-dépendante et une AMPK-indépendante, la surproduction de ROS pourrait altérer l'activation de cette seconde voie

de signalisation. Il a été démontré que les ROS activent la PKC δ (Talior et coll., 2003) et que cette dernière est impliquée dans la résistance à l'insuline (Dey et coll., 2006). Par contre, aucune donnée démontre que les PKC classiques, activées par le DNP (Khayat et coll., 1998), sont inhibées par la présence de ROS. Plusieurs études restent donc à être complétées afin de déterminer l'impact des ROS sur les enzymes potentiellement impliquées dans la voie AMPK-indépendante.

V. LIMITES DU MODÈLE

Bien que l'utilisation de notre modèle expérimentale comporte de nombreux avantages, il possède tout de même des limites. Une des limites de ce projet provient de l'emploi du DNP afin de créer un stress métabolique similaire à celui de l'hypoxie. Les expériences-clés se rapportant au DNP pourraient être répétées en utilisant une chambre hypoxique afin de confirmer la signification physiopathologique de nos études. Ainsi, les études mécanistiques subséquentes pourraient être réalisées sur des cardiocytes en culture à l'aide la chambre hypoxique. L'utilisation de cultures primaires de cardiocytes adultes représente une autre limite à souligner. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire stable de cardiocytes possédant toutes les caractéristiques structurales et physiologiques de ces cellules, l'emploi de culture primaire de cardiocytes adultes de rats représente le meilleur moyen disponible pour étudier différents processus physiologiques en contrôlant tous les paramètres externes. Étant donné que les cardiocytes sont des cellules différenciées de façon terminale, il est impossible de réaliser plusieurs techniques basées sur la réplication cellulaire telles la transfection, la création de clones, les études de prolifération cellulaire, etc. De plus, 48 heures après avoir été mises en culture, les cellules entrent dans un stade de dédifférenciation. Il donc est impossible de concevoir des expériences qui

s'échelonnent sur une période de temps prolongée. Puisque la culture primaire de cellule ne représente pas un modèle parfait bien qu'utile, l'utilisation d'un modèle de cœur perfusé ou un modèle animal s'avère essentiel pour confirmer certains résultats obtenus avec les cardiocytes en culture.

VI. CONCLUSION

En conclusion, une exposition chronique au β -hydroxybutyrate induit une diminution du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP (Figure 15). La diminution de l'action de l'insuline est due à une inhibition de la voie de signalisation PI3K/PKB par le β -hydroxybutyrate. Par contre, un traitement chronique au vanadate, un inhibiteur des protéines tyrosines phosphatases, peut contourner ces effets inhibiteurs et

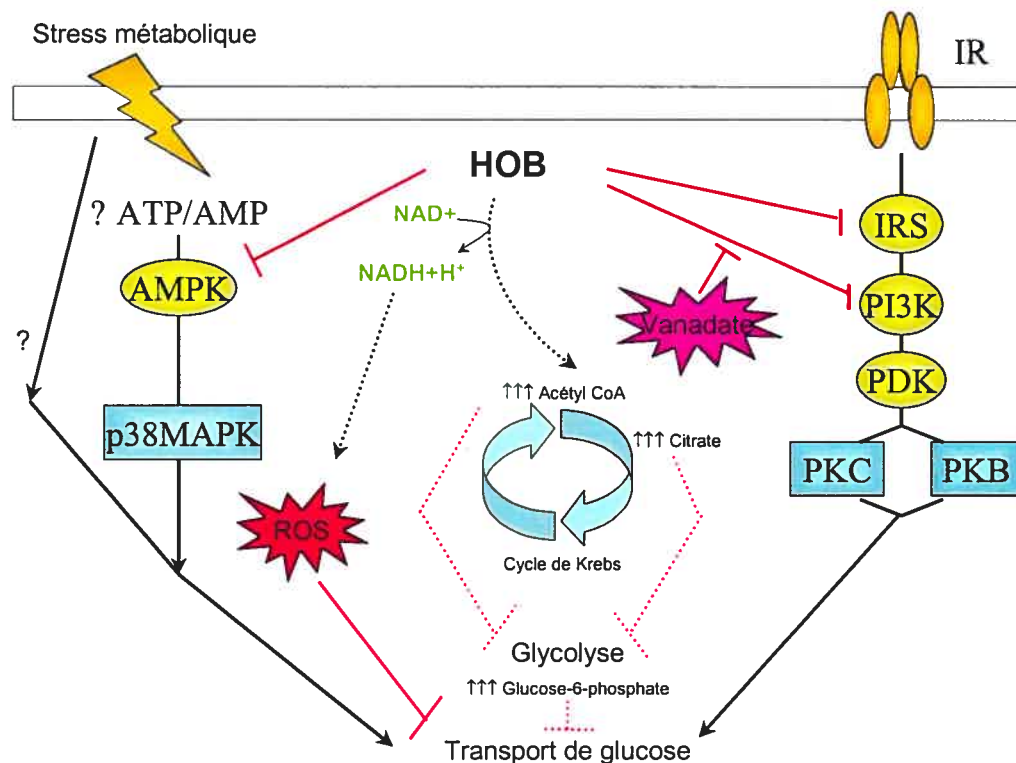


Figure 15 : Représentation schématique du modèle expérimental. Nous avons démontré que le β -hydroxybutyrate inhibe la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline et au DNP. Ce schéma résume les mécanismes par lesquels le β -hydroxybutyrate agit sur la voie de signalisation activée par l'insuline et au DNP. Les flèches noires servent à indiquer ce qui stimule et les barres rouges ce qui inhibe. Les flèches et les barres entières représentent ce que nous avons démontré et celles en pointillées représentent les mécanismes hypothétiques par lesquels le β -hydroxybutyrate pourrait aussi agir. HOB, β -hydroxybutyrate

augmenter le transport de glucose dans les cardiocytes rendus insulino-résistants par la présence des corps cétoniques. L'augmentation du stress oxydatif et l'inhibition de la voie de signalisation AMPK/p38MAPK par les corps cétoniques sont responsables de la diminution du transport de glucose en réponse au DNP. Parce que le glucose est un substrat essentiel au bon fonctionnement cardiaque, les corps cétoniques pourraient contribuer au développement des MCV en réduisant l'apport de glucose au niveau du muscle cardiaque.

VII. PERSPECTIVES

Les résultats obtenus dans cette thèse laisse entrevoir de nombreuses perspectives de recherche pour l'avenir. Cette section permettra donc d'élaborer sur les différentes voies à explorer afin de mieux définir les mécanismes d'action des corps cétoniques sur la régulation du transport de glucose et d'évaluer leur implication dans l'augmentation des maladies cardiovasculaires.

A. Les mécanismes d'action des corps cétoniques sur le transport de glucose

1. *Implication du stress oxydatif*

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la surproduction de ROS par les corps cétoniques joue un rôle important sur la diminution du transport de glucose en réponse au DNP dans les cardiocytes. Puisque le β -hydroxybutyrate exerce également des effets néfastes sur la stimulation du transport de glucose en réponse à l'insuline, des expériences sur l'implication du stress oxydatif dans ce processus devront être réalisées, afin de déterminer si la surproduction de ROS est impliquée dans l'insulino-résistance induite par le β -hydroxybutyrate. L'infection de cardiocytes avec un adénovirus pour

surexprimer la catalase ou l'utilisation d'animaux transgéniques surexprimants la catalase au niveau cardiaque représentent de bons moyens pour confirmer l'implication du stress oxydatif dans l'altération du transport de glucose par les corps cétoniques en réponse à l'insuline et au DNP.

Puisque le stress oxydatif n'altère pas l'activation de la voie de signalisation AMPK-dépendante activée par le DNP, il serait intéressant d'investiguer comment les ROS agissent pour inhiber le transport de glucose. Deux hypothèses seraient à évaluer. Tout d'abord, il faudrait vérifier si les ROS affectent l'activation de la voie de signalisation AMPK-indépendante. Pour ce faire, il faudrait tout d'abord identifier les enzymes impliquées dans cette voie, en commençant par la PKC et la CAMK, pour ensuite vérifier leur implication dans le transport de glucose en utilisant des inhibiteurs spécifiques ou des adénovirus dominant-négatif pour ces enzymes. L'autre possibilité, aussi applicable à l'insuline, réside dans l'altération de la translocation des vésicules de GLUT4 par les ROS. Cela pourrait être évalué en mesurant le contenu en GLUT4 des différents compartiments cellulaires séparés par fractionnement ou immunofluorescence.

Il a été démontré que la phosphorylation des résidus sérine des protéines tyrosines kinases de la voie de l'insuline constitue un mécanisme qui pourrait expliquer comment les ROS affectent l'action de l'insuline (Bloch-Damti et Bashan, 2005). Afin de vérifier cette hypothèse dans notre système, il faudrait analyser les niveaux de phosphorylation en sérine de l'IRS-1 et de la p85 dans des cardiocytes exposés aux corps cétoniques. L'augmentation de l'expression et de l'activité des protéines tyrosines phosphatases pourraient également jouer un rôle dans le développement de l'insulino-

résistance induite par le β -hydroxybutyrate. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer ces deux paramètres.

2. *Activation du cycle de Randle*

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le métabolisme du β -hydroxybutyrate peut entraîner l'augmentation de plusieurs intermédiaires du cycle de Krebs tels le citrate et l'acétyl CoA. Il a été démontré que l'accumulation de ces métabolites peut inhiber la glycolyse et, par conséquent, le transport de glucose dans le muscle cardiaque. En mesurant ces métabolites par essai enzymatique par spectrofluorométrie, il serait possible de déterminer s'ils sont augmentés suite à une exposition chronique aux corps cétoniques.

B. Implication des corps cétoniques dans le développement des maladies cardiovasculaires

Les résultats que nous avons obtenus démontrent qu'une exposition chronique aux corps cétoniques a un impact négatif sur le transport de glucose dans les cardiocytes adultes. Puisque le glucose joue un rôle primordial dans le maintien des fonctions cardiaques, surtout lors d'une hypoxie, une altération de son transport par le β -hydroxybutyrate pourrait avoir des répercussions importantes sur le développement des maladies cardiovasculaires chez les patients en hypercétonémie. Pour cette raison, l'étude de l'effet des corps cétoniques sur la mort cellulaire et sur le maintien des fonctions cardiaques s'avère être une voie de recherche essentielle.

1. *Effet des corps cétoniques sur la mort cellulaire*

Il serait intéressant d'évaluer l'effet d'une exposition chronique au β -hydroxybutyrate sur la viabilité des cardiocytes exposés au stress prolongé, avec des concentrations élevées de DNP ou en les mettant dans une chambre hypoxique. Par la suite, on pourrait caractériser le type de mort cellulaire (nécrose/apoptose) observé lors d'un stress prolongé et déterminer comment les corps cétoniques modulent ce processus. Pour évaluer la mortalité cellulaire par apoptose, on peut compter les cellules colorées par TUNEL ou Hoechst ou mesurer l'activité de certaines enzymes spécifiquement stimulées par l'apoptose telles la caspase-3 ou évaluer la fragmentation de l'ADN.

Il serait intéressant de déterminer l'importance de la diminution du transport de glucose dans l'augmentation de la mort cellulaire. Pour ce faire, on pourrait déterminer l'effet d'une augmentation du transport de glucose dans les cellules incubées avec des corps cétoniques en infectant les cellules avec des adénovirus pour surexprimer GLUT1 ou GLUT4, en traitant les cellules avec du vanadate ou en augmentant les concentrations de glucose dans le milieu de culture lors de la période de stress.

2. *Effet des corps cétoniques sur la fonction cardiaque*

Par la suite, des études *in vivo*, sur un modèle hypercétonémique devraient être réalisées afin de déterminer l'impact des corps cétoniques sur la fonction cardiaque en condition physiologique ou pathophysiologique. (hypoxie ou ischémie). Le meilleur modèle animal pour étudier l'effet chronique des corps cétoniques est probablement celui de la souris transgénique surexprimant la HMG-CoA synthase mitochondriale au niveau du foie, puisque cette souris a des niveaux sanguins de corps cétoniques trois fois plus élevés que ceux des animaux témoins alors que les concentrations de glucose et de

triglycérides dans le sang sont comparables entre ces deux groupes (Valera et coll., 1994). Bien que la suractivation de la voie de signalisation des Ras-MEK-ERK1/2 par le β -hydroxybutyrate ne soit pas impliquée dans la diminution du transport de glucose en réponse à l'insuline, la stimulation de cette voie pourrait contribuer au développement de l'hypertrophie cardiaque et ainsi altérer la fonction systolique du cœur. Pour cette raison, il serait important de déterminer l'effet des corps cétoniques sur la morphologie et la fonction cardiaque. Si les corps cétoniques entraînent une dysfonction cardiaque, il faudrait déterminer si la diminution du transport de glucose et l'augmentation du stress oxydatif induites par ces derniers représentent des facteurs indépendants impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires. L'utilisation d'animaux transgéniques surexprimants GLUT1, GLUT4 ou la catalase dans le cœur pourrait servir d'outil pour étudier ces paramètres.

Bibliographie

- Abdel-Aleem,S., St Louis,J.D., Hughes,G.C., and Lowe,J.E. (1999). Metabolic changes in the normal and hypoxic neonatal myocardium. *Ann. N. Y. Acad Sci* 874, 254-261.
- Agnetti,G., Maraldi,T., Fiorentini,D., Giordano,E., Prata,C., Hakim,G., Muscari,C., Guarnieri,C., and Caldarera,C.M. (2005). Activation of glucose transport during simulated ischemia in H9c2 cardiac myoblasts is mediated by protein kinase C isoforms. *Life Sci* 78, 264-270.
- Ahmed,Z., Smith,B.J., and Pillay,T.S. (2000). The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett.* 475, 31-34.
- An,J., Muoio,D.M., Shiota,M., Fujimoto,Y., Cline,G.W., Shulman,G.I., Koves,T.R., Stevens,R., Millington,D., and Newgard,C.B. (2004). Hepatic expression of malonyl-CoA decarboxylase reverses muscle, liver and whole-animal insulin resistance. *Nat. Med.* 10, 268-274.
- Antonescu,C.N., Huang,C., Niu,W., Liu,Z., Evers,P.A., Heidenreich,K.A., Bilan,P.J., and Klip,A. (2005). Reduction of insulin-stimulated glucose uptake in L6 myotubes by the protein kinase inhibitor SB203580 is independent of p38MAPK activity. *Endocrinology* 146, 3773-3781.
- Appleton,D.B. and DeVivo,D.C. (1974). An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia* 15, 211-227.
- Apstein,C.S. (2000). Increased glycolytic substrate protection improves ischemic cardiac dysfunction and reduces injury. *Am Heart J* 139, S107-S114.
- Apstein,C.S., Gravino,F.N., and Haudenschild,C.C. (1983). Determinants of a protective effect of glucose and insulin on the ischemic myocardium. Effects on contractile function, diastolic compliance, metabolism, and ultrastructure during ischemia and reperfusion. *Circ. Res* 52, 515-526.
- Araki,E., Lipes,M.Y., Patti,M.E., Bruning,J.C., Hagg,H.B., Johnson,R.S., and Kahn,C.R. (1994). Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-I gene. *Nature* 372, 186-189.
- Arias,G., Asins,G., Hegardt,F.G., and Serra,D. (1997). The effect of fasting/refeeding and insulin treatment on the expression of the regulatory genes of ketogenesis in intestine and liver of suckling rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 340, 287-298.
- Ashour,B. and Hansford,R.G. (1983). Effect of fatty acids and ketones on the activity of pyruvate dehydrogenase in skeletal-muscle mitochondria. *Biochem. J* 214, 725-736.
- Atsumi,T., Fujisawa,S., and Tonosaki,K. (2005). Relationship between intracellular ROS production and membrane mobility in curcumin- and tetrahydrocurcumin-treated

- human gingival fibroblasts and human submandibular gland carcinoma cells. *Oral Dis.* 11, 236-242.
- Augustin,L.S., Franceschi,S., Jenkins,D.J., Kendall,C.W., and La Vecchia,C. (2002). Glycemic index in chronic disease: a review. *Eur. J Clin Nutr.* 56, 1049-1071.
- Bae,S.S., Cho,H., Mu,J., and Birnbaum,M.J. (2003). Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. *J Biol Chem.* 278, 49530-49536.
- Baker,K.M., Booz,G.W., and Dostal,D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev Physiol* 54, 227-241.
- Balasse,E., Couturier,E., and Franckson,J.R. (1967). Influence of sodium beta-hydroxybutyrate on glucose and free fatty acid metabolism in normal dogs. *Diabetologia* 3, 488-493.
- Balasse,E.O. and Fery,F. (1989). Ketone body production and disposal: effects of fasting, diabetes, and exercise. *Diabetes Metab Rev* 5, 247-270.
- Bandyopadhyay,G., Standaert,M.L., Kikkawa,U., Ono,Y., Moscat,J., and Farese,R.V. (1999). Effects of transiently expressed atypical (zeta, lambda), conventional (alpha, beta) and novel (delta, epsilon) protein kinase C isoforms on insulin-stimulated translocation of epitope-tagged GLUT4 glucose transporters in rat adipocytes: specific interchangeable effects of protein kinases C-zeta and C-lambda. *Biochem. J* 337 (Pt 3), 461-470.
- Bandyopadhyay,G.K., Yu,J.G., Ofrecio,J., and Olefsky,J.M. (2005). Increased p85/55/50 Expression and Decreased Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Insulin-Resistant Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 54, 2351-2359.
- Banting, W. Letter on Corpulence. Addressed to the Public, 2nd edition . 1863. London, England, Harrison and Sons.
- Baron,A.D., Brechtel,G., and Edelman,S.V. (1989). Effects of free fatty acids and ketone bodies on in vivo non-insulin-mediated glucose utilization and production in humans. *Metabolism* 38, 1056-1061.
- Baumann,C.A., Ribon,V., Kanzaki,M., Thurmond,D.C., Mora,S., Shigematsu,S., Bickel,P.E., Pessin,J.E., and Saltiel,A.R. (2000). CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* 407, 202-207.
- Beauloye,C., Marsin,A.S., Bertrand,L., Vanoverschelde,J.L., Rider,M.H., and Hue,L. (2002). The stimulation of heart glycolysis by increased workload does not require AMP-activated protein kinase but a wortmannin-sensitive mechanism. *FEBS Lett.* 531, 324-328.

- Becker,C., Sevilla,L., Tomas,E., Palacin,M., Zorzano,A., and Fischer,Y. (2001). The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology* 142, 5267-5276.
- Becker,K.P. and Hannun,Y.A. (2005). Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling. *Cell Mol. Life Sci* 62, 1448-1461.
- Belke,D.D., Larsen,T.S., Gibbs,E.M., and Severson,D.L. (2000). Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 279, E1104-E1113.
- Berenson,G.S., Srinivasan,S.R., Bao,W., Newman,W.P., III, Tracy,R.E., and Wattigney,W.A. (1998). Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *N. Engl. J Med.* 338, 1650-1656.
- Berger,M., Hagg,S.A., Goodman,M.N., and Ruderman,N.B. (1976). Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and disposition. *Biochem. J* 158, 191-202.
- Bergman,P. and van der,L.J. (2005). Atherosclerosis of the ascending aorta as a major determinant of the outcome of cardiac surgery. *Nat. Clin Pract. Cardiovasc Med.* 2, 246-251.
- Best,T.H., Franz,D.N., Gilbert,D.L., Nelson,D.P., and Epstein,M.R. (2000). Cardiac complications in pediatric patients on the ketogenic diet. *Neurology* 54, 2328-2330.
- Bevan,A.P., Drake,P.G., Yale,J.-F., Shaver,A., and Posner,B.I. (1995). Peroxovanadium compounds: Biological actions and mechanism of insulin-mimesis. *Mol. Cell. Biochem.* 153, 49-58.
- Binas,B., Danneberg,H., McWhir,J., Mullins,L., and Clark,A.J. (1999). Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J* 13, 805-812.
- Bing,R.J. (1955). The metabolism of the heart. *Trans. Am Coll. Cardiol.* 5, 8-14.
- Bing,R.J., Siegel,A., Ungar,I., and Gilbert,M. (1954). Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism. *Am J Med.* 16, 504-515.
- Bisschop,P.H., de Metz,J., Ackermans,M.T., Endert,E., Pijl,H., Kuipers,F., Meijer,A.J., Sauerwein,H.P., and Romijn,J.A. (2001). Dietary fat content alters insulin-mediated glucose metabolism in healthy men. *Am J Clin Nutr.* 73, 554-559.
- Bjorkman,O. and Eriksson,L.S. (1985). Influence of a 60-hour fast on insulin-mediated splanchnic and peripheral glucose metabolism in humans. *J Clin Invest* 76, 87-92.

- Bjornholm,M., Kawano,Y., Lehtihet,M., and Zierath,J.R. (1997). Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes* 46, 524-527.
- Bjorntorp,P. and Schersten,T. (1967). Effect of beta-hydroxybutyrate on lipid mobilization. *Am J Physiol* 212, 683-687.
- Bloch-Damti,A. and Bashan,N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1553-1567.
- Blomqvist,G., Alvarsson,M., Grill,V., Von Heijne,G., Ingvar,M., Thorell,J.O., Stone-Elander,S., Widen,L., and Ekberg,K. (2002). Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 283, E20-E28.
- Botker,H.E., Helligso,P., Kimose,H.H., Thomassen,A.R., and Nielsen,T.T. (1994). Determination of high energy phosphates and glycogen in cardiac and skeletal muscle biopsies, with special reference to influence of biopsy technique and delayed freezing. *Cardiovasc Res* 28, 524-527.
- Bowker-Kinley,M.M., Davis,W.I., Wu,P., Harris,R.A., and Popov,K.M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J* 329 (Pt 1), 191-196.
- Bravata,D.M., Sanders,L., Huang,J., Krumholz,H.M., Olkin,I., Gardner,C.D., and Bravata,D.M. (2003). Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. *JAMA* 289, 1837-1850.
- Bricknell,O.L. and Opie,L.H. (1978). Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated rat heart during underperfusion and on release of lactate dehydrogenase and arrhythmias during reperfusion. *Circ. Res* 43, 102-115.
- Brindley,D.N. and Waggoner,D.W. (1998). Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. *J Biol Chem.* 273, 24281-24284.
- Broderick,T.L. and Poirier,P. (2005). Cardiac function and ischaemic tolerance during acute loss of metabolic control in the diabetic BB Wor rat. *Acta Diabetol.* 42, 171-178.
- Brownlee,M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Brownsey,R.W., Boone,A.N., and Allard,M.F. (1997). Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res* 34, 3-24.

- Caglayan,E., Blaschke,F., Takata,Y., and Hsueh,W.A. (2005). Metabolic syndrome-interdependence of the cardiovascular and metabolic pathways. *Curr. Opin. Pharmacol* 5, 135-142.
- Camps,M., Castello,A., Munoz,P., Monfar,M., Testar,X., Palacin,M., and Zorzano,A. (1992). Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem. J* 282 (Pt 3), 765-772.
- Candiloros,H., Muller,S., Zeghari,N., Donner,M., Drouin,P., and Ziegler,O. (1995). Decreased erythrocyte membrane fluidity in poorly controlled IDDM. Influence of ketone bodies. *Diabetes Care* 18, 549-551.
- Caputo,G.M., Cavanagh,P.R., Ulbrecht,J.S., Gibbons,G.W., and Karchmer,A.W. (1994). Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *N. Engl. J Med.* 331, 854-860.
- Carling,D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci* 29, 18-24.
- Carlson,C.J., Koterski,S., Sciotti,R.J., Braillard Pocard,G., and Rondinone,C.M. (2003). Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes. Potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes* 52, 634-641.
- Carmena,R., Duriez,P., and Fruchart,J.C. (2004). Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. *Circulation* 109, III2-III7.
- Casals,N., Roca,N., Guerrero,M., Gil-Gomez,G., Ayte,J., Ciudad,C.J., and Hegardt,F.G. (1992). Regulation of the expression of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene. Its role in the control of ketogenesis. *Biochem. J* 283 (Pt 1), 261-264.
- Cheatham,B. and Kahn,C.R. (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 16, 117-142.
- Chen,V., Wagner,G., and Spitzer,J.J. (1984). Regulation of substrate oxidation in isolated myocardial cells by beta-hydroxybutyrate. *Horm. Metab Res* 16, 243-247.
- Chen,Z.P., Mitchelhill,K.I., Michell,B.J., Stapleton,D., Rodriguez-Crespo,I., Witters,L.A., Power,D.A., Ortiz de Montellano,P.R., and Kemp,B.E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285-289.
- Chiu,L.L., Tsai,Y.L., Lee,W.C., Cho,Y.M., Ho,H.Y., Chen,S.M., Chen,M.T., and Kuo,C.H. (2005). Acute effect of exercise-hypoxia challenge on GLUT4 protein expression in rat cardiac muscle. *High Alt. Med. Biol* 6, 256-262.

- Cho,H., Mu,J., Kim,J.K., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Crenshaw,E.B., III, Kaestner,K.H., Bartolomei,M.S., Shulman,G.I., and Birnbaum,M.J. (2001a). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731.
- Cho,H., Thorvaldsen,J.L., Chu,Q., Feng,F., and Birnbaum,M.J. (2001b). Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 276, 38349-38352.
- Chyrek-Borowska,S., Szymanski,W., Zlotnik,I., and Rogalewska,A. (1992). Humoral response in asthma patients sensitive to house dust mites during specific immunotherapy with Alutard SQ. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 60 *Suppl* 1, 49-52.
- Coderre,L., Kandror,K.V., Vallega,G., and Pilch,P.F. (1995). Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 270, 27584-27588.
- Coven,D.L., Hu,X., Cong,L., Bergeron,R., Shulman,G.I., Hardie,D.G., and Young,L.H. (2003). Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 285, E629-E636.
- Cullingford,T.E. (2004). The ketogenic diet; fatty acids, fatty acid-activated receptors and neurological disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 253-264.
- Cutler,D.L., Gray,C.G., Park,S.W., Hickman,M.G., Bell,J.M., and Kolterman,O.G. (1995). Low-carbohydrate diet alters intracellular glucose metabolism but not overall glucose disposal in exercise-trained subjects. *Metabolism* 44, 1264-1270.
- Dadke,S., Kusari,A., and Kusari,J. (2001). Phosphorylation and activation of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B by insulin receptor. *Mol. Cell Biochem.* 221, 147-154.
- Dashti,H.M., Bo-Abbas,Y.Y., Asfar,S.K., Mathew,T.C., Hussein,T., Behbahani,A., Khoursheed,M.A., Al Sayer,H.M., and Al Zaid,N.S. (2003). Ketogenic diet modifies the risk factors of heart disease in obese patients. *Nutrition* 19, 901-902.
- De Fea,K. and Roth,R.A. (1997). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 272, 31400-31406.
- Dekaban,A.S. (1966). Plasma lipids in epileptic children treated with the high fat diet. *Arch. Neurol.* 15, 177-184.
- Derave,W., Ai,H., Ihlemann,J., Witters,L.A., Kristiansen,S., Richter,E.A., and Ploug,T. (2000). Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes* 49, 1281-1287.
- Des,R.C., David,F., Garneau,M., and Brunengraber,H. (1991). Nonhomogeneous labeling of liver mitochondrial acetyl-CoA. *J Biol Chem.* 266, 1574-1578.

- Dey,D., Basu,D., Roy,S.S., Bandyopadhyay,A., and Bhattacharya,S. (2006). Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Mol. Cell Endocrinol.* 246, 60-64.
- Dhalla,N.S., Liu,X., Panagia,V., and Takeda,N. (1998). Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. *Cardiovasc Res* 40, 239-247.
- Dincer,U.D., Bidasee,K.R., Guner,S., Tay,A., Ozcelikay,A.T., and Altan,V.M. (2001). The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes* 50, 455-461.
- Doerge,H., Bocianski,A., Scheepers,A., Axer,H., Eckel,J., Joost,H.G., and Schurmann,A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359, 443-449.
- Dombrowski,L., Roy,D., Marcotte,B., and Marette,A. (1996). A new procedure for the isolation of plasma membranes, T tubules, and internal membranes from skeletal muscle. *Am J Physiol.* 270, E667-76.
- Donthi,R.V., Huisamen,B., and Lochner,A. (2000). Effect of vanadate and insulin on glucose transport in isolated adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 14, 463-470.
- Dorn,G.W. and Force,T. (2005). Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest* 115, 527-537.
- Dostal,D.E. (2001). Regulation of cardiac collagen: angiotensin and cross-talk with local growth factors. *Hypertension* 37, 841-844.
- Dubois,M.J., Bergeron,S., Kim,H.J., Dombrowski,L., Perreault,M., Fournès,B., Faure,R., Olivier,M., Beauchemin,N., Shulman G.I., Siminovitch,K.A., Kim,J.K., and Marette,A. (2006). The SHP-1 protein tyrosine phosphatase negatively modulates glucose homeostasis. *Nature Medicine* 12, 549-556.
- Egawa,K., Maegawa,H., Shi,K., Nakamura,T., Obata,T., Yoshizaki,T., Morino,K., Shimizu,S., Nishio,Y., Suzuki,E., and Kashiwagi,A. (2002). Membrane localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 stimulates activities of Akt and atypical protein kinase C but does not stimulate glucose transport and glycogen synthesis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 277, 38863-38869.
- Egert,S., Nguyen,N., and Schwaiger,M. (1999). Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *J Mol. Cell Cardiol.* 31, 1337-1344.
- Eldar-Finkelman,H. and Krebs,E.G. (1997). Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9660-9664.

- Ellis,E.A., Grant,M.B., Murray,F.T., Wachowski,M.B., Guberski,D.L., Kubilis,P.S., and Luty,G.A. (1998). Increased NADH oxidase activity in the retina of the BBZ/Wor diabetic rat. *Free Radic. Biol Med.* 24, 111-120.
- Erecinska,M., Nelson,D., Daikhin,Y., and Yudkoff,M. (1996). Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. *J Neurochem.* 67, 2325-2334.
- Evans,J.L., Goldfine,I.D., Maddux,B.A., and Grodsky,G.M. (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?
1. *Diabetes* 52, 1-8.
- Evans,J.L., Maddux,B.A., and Goldfine,I.D. (2005). The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistances. *Antioxid. Redox. Signal.* 7, 1040-1052.
- Fang,C.X., Dong,F., Ren,B.H., Epstein,P.N., and Ren,J. (2005a). Metallothionein alleviates cardiac contractile dysfunction induced by insulin resistance: role of Akt phosphorylation, PTB1B, PPARgamma and c-Jun. *Diabetologia* 48, 2412-2421.
- Fang,X., Palanivel,R., Zhou,X., Liu,Y., Xu,A., Wang,Y., and Sweeney,G. (2005b). Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced alteration of adiponectin receptor expression and adiponectin effects in L6 myoblasts. *J Mol. Endocrinol.* 35, 465-476.
- Farese,R.V. (2002). Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin-sensitive and insulin-resistant states. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 283, E1-11.
- Fein,F.S., Strobeck,J.E., Malhotra,A., Scheuer,J., and Sonnenblick,E.H. (1981). Reversibility of diabetic cardiomyopathy with insulin in rats. *Circ. Res* 49, 1251-1261.
- Felicio,J.S., Ferreira,S.R., Plavnik,F.L., Moises,V., Kohlmann,O., Jr., Ribeiro,A.B., and Zanella,M.T. (2000). Effect of blood glucose on left ventricular mass in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Am J Hypertens.* 13, 1149-1154.
- Finck,B.N. (2004). The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway in pathological remodeling of the diabetic heart. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* 7, 391-396.
- Finck,B.N., Lehman,J.J., Leone,T.C., Welch,M.J., Bennett,M.J., Kovacs,A., Han,X., Gross,R.W., Kozak,R., Lopaschuk,G.D., and Kelly,D.P. (2002). The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *J Clin Invest* 109, 121-130.
- Fiordaliso,F., Li,B., Latini,R., Sonnenblick,E.H., Anversa,P., Leri,A., and Kajstura,J. (2000). Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin II-dependent. *Lab Invest* 80, 513-527.

- Fischer,Y., Bottcher,U., Eblenkamp,M., Thomas,J., Jungling,E., Rosen,P., and Kammermeier,H. (1997a). Glucose transport and glucose transporter GLUT4 are regulated by product(s) of intermediary metabolism in cardiomyocytes. *Biochem. J.* 321 (Pt 3), 629-638.
- Fischer,Y., Thomas,J., Sevilla,L., Munoz,P., Becker,C., Holman,G., Kozka,I.J., Palacin,M., Testar,X., Kammermeier,H., and Zorzano,A. (1997b). Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem.* 272, 7085-7092.
- Fossel,E.T. and Solomon,A.K. (1977). Membrane mediated link between ion transport and metabolism in human red cells. *Biochim. Biophys. Acta* 464, 82-92.
- Foster,D.W. (2004). The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann. N. Y. Acad Sci* 1033, 1-16.
- Foster,K.J., Alberti,K.G., Hinks,L., Lloyd,B., Postle,A., Smythe,P., Turnell,D.C., and Walton,R. (1978). Blood intermediary metabolite and insulin concentrations after an overnight fast: reference ranges for adults, and interrelations. *Clin Chem.* 24, 1568-1572.
- Fratelli,M., Goodwin,L.O., Orom,U.A., Lombardi,S., Tonelli,R., Mengozzi,M., and Ghezzi,P. (2005). Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13998-14003.
- Freeman,J.M., Vining,E.P., Pillas,D.J., Pyzik,P.L., Casey,J.C., and Kelly,L.M. (1998). The efficacy of the ketogenic diet-1998: a prospective evaluation of intervention in 150 children. *Pediatrics* 102, 1358-1363.
- Freund,G.G., Wittig,J.G., and Mooney,R.A. (1995). The PI3-kinase serine kinase phosphorylates its p85 subunit and IRS-1 in PI3-kinase/IRS-1 complexes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 206, 272-278.
- Fujii,N., Hirshman,M.F., Kane,E.M., Ho,R.C., Peter,L.E., Seifert,M.M., and Goodyear,L.J. (2005). AMP-activated protein kinase alpha2 activity is not essential for contraction- and hyperosmolarity-induced glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 280, 39033-39041.
- Fukao,T., Lopaschuk,G.D., and Mitchell,G.A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 243-251.
- Fukatsu,A., Sato,N., and Shimizu,H. (1996). 50-mile walking race suppresses neutrophil bactericidal function by inducing increases in cortisol and ketone bodies. *Life Sci* 58, 2337-2343.

- Gaitanaki,C., Konstantina,S., Chrysa,S., and Beis,I. (2003). Oxidative stress stimulates multiple MAPK signalling pathways and phosphorylation of the small HSP27 in the perfused amphibian heart. *J Exp. Biol* 206, 2759-2769.
- Galbiati,F., Razani,B., and Lisanti,M.P. (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106, 403-411.
- Gandara,R.M., Soares,S.S., Martins,H., Gutierrez-Merino,C., and Aureliano,M. (2005). Vanadate oligomers: in vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *J Inorg. Biochem.* 99, 1238-1244.
- Gao,Z., Hwang,D., Bataille,F., Lefevre,M., York,D., Quon,M.J., and Ye,J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem.* 277, 48115-48121.
- Garland,P.B., Randle,P.J., and Newsholme,E.A. (1963). Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes, and starvation. *Nature* 200, 169-170.
- Garofalo,R.S., Orena,S.J., Rafidi,K., Torchia,A.J., Stock,J.L., Hildebrandt,A.L., Coskran,T., Black,S.C., Brees,D.J., Wicks,J.R., McNeish,J.D., and Coleman,K.G. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197-208.
- Ge,J., Liu,F., Bhate,R., Haude,M., Gorge,G., Baumgart,D., Sack,S., and Erbel,R. (1999). Does remodeling occur in the diseased human saphenous vein bypass grafts? An intravascular ultrasound study. *Int J Card Imaging* 15, 295-300.
- Genet,S., Kale,R.K., and Baquer,N.Z. (2002). Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*). *Mol. Cell Biochem.* 236, 7-12.
- Gibala,M.J., Young,M.E., and Taegtmeier,H. (2000). Anaplerosis of the citric acid cycle: role in energy metabolism of heart and skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 168, 657-665.
- Gillespie-Brown,J., Fuller,S.J., Bogoyevitch,M.A., Cowley,S., and Sugden,P.H. (1995). The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 270, 28092-28096.
- Glennon,P.E., Kaddoura,S., Sale,E.M., Sale,G.J., Fuller,S.J., and Sugden,P.H. (1996). Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ. Res* 78, 954-961.

- Goberna,R., Tamarit,J., Jr., Osorio,J., Fussganger,R., Tamarit,J., and Pfeiffer,E.F. (1974). Action of B-hydroxy butyrate, acetoacetate and palmitate on the insulin release in the perfused isolated rat pancreas. *Horm. Metab Res* 6, 256-260.
- Goodwin,G.W., Arteaga,J.R., and Taegtmeier,H. (1995). Glycogen turnover in the isolated working rat heart. *J Biol Chem.* 270, 9234-9240.
- Greene,A.E., Todorova,M.T., McGowan,R., and Seyfried,T.N. (2001). Caloric restriction inhibits seizure susceptibility in epileptic EL mice by reducing blood glucose. *Epilepsia* 42, 1371-1378.
- Griendling,K.K., Sorescu,D., Lassegue,B., and Ushio-Fukai,M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 20, 2175-2183.
- Grinblat,L., Pacheco Bolanos,L.F., and Stoppani,A.O. (1986). Decreased rate of ketone-body oxidation and decreased activity of D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase and succinyl-CoA:3-oxo-acid CoA-transferase in heart mitochondria of diabetic rats. *Biochem. J* 240, 49-56.
- Grover-McKay,M., Walsh,S.A., and Thompson,S.A. (1999). Glucose transporter 3 (GLUT3) protein is present in human myocardium. *Biochim. Biophys. Acta* 1416, 145-154.
- Gual,P., Shigematsu,S., Kanzaki,M., Gremeaux,T., Gonzalez,T., Pessin,J.E., Marchand-Brustel,Y., and Tanti,J.F. (2002). A Crk-II/TC10 signaling pathway is required for osmotic shock-stimulated glucose transport. *J Biol Chem.* 277, 43980-43986.
- Gudbjarnason,S., Mathes,P., and Ravens,K.G. (1970). Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol. Cell Cardiol.* 1, 325-339.
- Guerci,B., Tubiana-Rufi,N., Bauduceau,B., Bresson,R., Cuperlier,A., Delcroix,C., Durain,D., Fermon,C., Le Floch,J.P., Le Devehat,C., Melki,V., Monnier,L., Mosnier-Pudar,H., Taboulet,P., and Hanaire-Broutin,H. (2005). Advantages to using capillary blood beta-hydroxybutyrate determination for the detection and treatment of diabetic ketosis. *Diabetes Metab* 31, 401-406.
- Guerra,L., Cerbai,E., Gessi,S., Borea,P.A., and Mugelli,A. (1996). The effect of oxygen free radicals on calcium current and dihydropyridine binding sites in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 118, 1278-1284.
- Gupte,A. and Mora,S. (2006). Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 342, 751-757.
- Guyton,A.C. and Hall,J.E. (1996). *Textbook of Medical Physiology.* (Philadelphia, United States of America: W.B.Saunders Company).

- Haber,C.A., Lam,T.K., Yu,Z., Gupta,N., Goh,T., Bogdanovic,E., Giacca,A., and Fantus,I.G. (2003). N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 285, E744-E753.
- Haffner,S.M., Lehto,S., Ronnema,T., Pyorala,K., and Laakso,M. (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J Med.* 339, 229-234.
- Halestrap,A.P. and Price,N.T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J* 343 Pt 2, 281-299.
- Hallows,K.R. (2005). Emerging role of AMP-activated protein kinase in coupling membrane transport to cellular metabolism. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 14, 464-471.
- Hansen,L.L., Ikeda,Y., Olsen,G.S., Busch,A.K., and Mosthaf,L. (1999). Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H₂O₂. Evidence for a role of H₂O₂ in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem.* 274, 25078-25084.
- Hansford,R.G. and Zorov,D. (1998). Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol. Cell Biochem.* 184, 359-369.
- Harris,R.A., Huang,B., and Wu,P. (2001). Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Adv. Enzyme Regul.* 41, 269-288.
- Hashimoto,T., Kambara,N., Nohara,R., Yazawa,M., and Taguchi,S. (2004). Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. *J Appl. Physiol* 97, 843-851.
- Hasselbaink,D.M., Glatz,J.F., Luiken,J.J., Roemen,T.H., and Van Der Vusse,G.J. (2003). Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem. J* 371, 753-760.
- Hawkins,R.A., Williamson,D.H., and Krebs,H.A. (1971). Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem. J* 122, 13-18.
- Hayashi,T., Hirshman,M.F., Fujii,N., Habinowski,S.A., Witters,L.A., and Goodyear,L.J. (2000). Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes* 49, 527-531.
- Heilbronn,L.K. and Ravussin,E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr.* 78, 361-369.
- Heled,Y., Dror,Y., Moran,D.S., Rosenzweig,T., Sampson,S.R., Epstein,Y., and Meyerovitch,J. (2005). Physical exercise increases the expression of TNFalpha and

- GLUT 1 in muscle tissue of diabetes prone Psammomys obesus. *Life Sci* 77, 2977-2985.
- Helge, J.W. (2002). Prolonged adaptation to fat-rich diet and training; effects on body fat stores and insulin resistance in man. *Int J Obes. Relat Metab Disord.* 26, 1118-1124.
- Henning, S.L., Wambolt, R.B., Schonekess, B.O., Lopaschuk, G.D., and Allard, M.F. (1996). Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. *Circulation* 93, 1549-1555.
- Henry, R.R., Brechtel, G., and Lim, K.H. (1990). Effects of ketone bodies on carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *Metabolism* 39, 853-858.
- Heyliger, C.E., Tahiliani, A.G., and McNeill, J.H. (1985). Effect of vanadate on elevated glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227, 1474-1477.
- Hirata, A.E., Alvarez-Rojas, F., Carnevalheira, J.B., Carvalho, C.R., Dolnikoff, M.S., and Abdalla Saad, M.J. (2003). Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. *Life Sci* 73, 1369-1381.
- Holgado-Madruga, M., Emler, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., and Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.
- Horiuchi, M., Akishita, M., and Dzau, V.J. (1999). Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension* 33, 613-621.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., and Scrimshaw, N.S. (1994). *Principes de biochimie.* (Bruxelles: De Boeck-Wesmael S.A.).
- Houstis, N., Rosen, E.D., and Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-948.
- Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E.Y., and Schlessinger, J. (1993). Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol. Cell Biol* 13, 7677-7688.
- Hue, L. and Rider, M.H. (1987). Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *Biochem. J* 245, 313-324.
- Huisamen, B., van Zyl, M., Keyser, A., and Lochner, A. (2001). The effects of insulin and beta-adrenergic stimulation on glucose transport, GLUT 4 and PKB activation in the myocardium of lean and obese non-insulin dependent diabetes mellitus rats. *Mol. Cell Biochem.* 223, 15-25.
- Huttenlocher, P.R. (1976). Ketonemia and seizures: metabolic and anticonvulsant effects of two ketogenic diets in childhood epilepsy. *Pediatr. Res* 10, 536-540.

- Ikeda, T.S., Hwang, E.S., Coady, M.J., Hirayama, B.A., Hediger, M.A., and Wright, E.M. (1989). Characterization of a Na⁺/glucose cotransporter cloned from rabbit small intestine. *J Membr. Biol* 110, 87-95.
- Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.H., and Saltiel, A.R. (2003). The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422, 629-633.
- Isenberg, G., Han, S., Schiefer, A., and Wendt-Gallitelli, M.F. (1993). Changes in mitochondrial calcium concentration during the cardiac contraction cycle. *Cardiovasc Res* 27, 1800-1809.
- Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieder, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Itani, S.I., Saha, A.K., Kurowski, T.G., Coffin, H.R., Tornheim, K., and Ruderman, N.B. (2003). Glucose autoregulates its uptake in skeletal muscle: involvement of AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 52, 1635-1640.
- Jackson, T.K., Salhanick, A.I., Sparks, J.D., Sparks, C.E., Bolognino, M., and Amatruda, J.M. (1988). Insulin-mimetic effects of vanadate in primary cultures of rat hepatocytes. *Diabetes* 37, 1234-1240.
- Jafri, M.S., Dudycha, S.J., and O'Rourke, B. (2001). Cardiac energy metabolism: models of cellular respiration. *Annu. Rev Biomed. Eng* 3, 57-81.
- Jain, S.K., Kannan, K., Lim, G., McVie, R., and Bocchini, J.A., Jr. (2002). Hyperketonemia increases tumor necrosis factor- α secretion in cultured U937 monocytes and Type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency. *Diabetes* 51, 2287-2293.
- Jain, S.K. and McVie, R. (1999). Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 48, 1850-1855.
- Jain, S.K., McVie, R., Jackson, R., Levine, S.N., and Lim, G. (1999). Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care* 22, 1171-1175.
- Jain, S.K., McVie, R., Jaramillo, J.J., and Chen, Y. (1998). Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL + VLDL in Type-I diabetic patients. *Free Radic. Biol Med.* 24, 175-181.
- Jaramillo, M. and Olivier, M. (2002). Hydrogen peroxide induces murine macrophage chemokine gene transcription via extracellular signal-regulated kinase- and cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent pathways: involvement of NF- κ B

- B, activator protein 1, and cAMP response element binding protein. *J Immunol.* *169*, 7026-7038.
- JeBailey,L., Rudich,A., Huang,X., Ciano-Oliveira,C., Kapus,A., and Klip,A. (2004). Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling. *Mol. Endocrinol.* *18*, 359-372.
- Jeukendrup,A.E. (2002). Regulation of fat metabolism in skeletal muscle. *Ann. N. Y. Acad Sci* *967*, 217-235.
- Jones,N.M. and Bergeron,M. (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb. Blood Flow Metab* *21*, 1105-1114.
- Joost,H.G. and Thorens,B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol* *18*, 247-256.
- Jorgensen,S.B., Viollet,B., Andreelli,F., Frosig,C., Birk,J.B., Schjerling,P., Vaulont,S., Richter,E.A., and Wojtaszewski,J.F. (2004). Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside but not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* *279*, 1070-1079.
- Kaczmarczyk,S.J., Andrikopoulos,S., Favaloro,J., Domenighetti,A.A., Dunn,A., Ernst,M., Grail,D., Fodero-Tavoletti,M., Huggins,C.E., Delbridge,L.M., Zajac,J.D., and Proietto,J. (2003). Threshold effects of glucose transporter-4 (GLUT4) deficiency on cardiac glucose uptake and development of hypertrophy. *J Mol. Endocrinol.* *31*, 449-459.
- Kandror,K.V., Coderre,L., Pushkin,A.V., and Pilch,P.F. (1995). Comparison of glucose-transporter-containing vesicles from rat fat and muscle tissues: evidence for a unique endosomal compartment. *Biochem. J* *307 (Pt 2)*, 383-390.
- Kang,H.C., Chung,d.E., Kim,D.W., and Kim,H.D. (2004). Early- and late-onset complications of the ketogenic diet for intractable epilepsy. *Epilepsia* *45*, 1116-1123.
- Kannel,W.B., Hjortland,M., and Castelli,W.P. (1974). Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol.* *34*, 29-34.
- Kanzaki,M. and Pessin,J.E. (2003). Insulin signaling: GLUT4 vesicles exit via the exocyst. *Curr. Biol.* *13*, R574-R576.
- Kaplan,P., Babusikova,E., Lehotsky,J., and Dobrota,D. (2003). Free radical-induced protein modification and inhibition of Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biochem.* *248*, 41-47.
- Kashiwaya,Y., King,M.T., and Veech,R.L. (1997). Substrate signaling by insulin: a ketone bodies ratio mimics insulin action in heart. *Am J Cardiol.* *80*, 50A-64A.

- Kashiwaya, Y., Sato, K., Tsuchiya, N., Thomas, S., Fell, D.A., Veech, R.L., and Passonneau, J.V. (1994). Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J Biol Chem.* 269, 25502-25514.
- Kashiwaya, Y., Takeshima, T., Mori, N., Nakashima, K., Clarke, K., and Veech, R.L. (2000). D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5440-5444.
- Katome, T., Obata, T., Matsushima, R., Masuyama, N., Cantley, L.C., Gotoh, Y., Kishi, K., Shiota, H., and Ebina, Y. (2003). Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J Biol Chem.* 278, 28312-28323.
- Katz, E.B., Stenbit, A.E., Hatton, K., DePinho, R., and Charron, M.J. (1995). Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377, 151-155.
- Kerbey, A.L., Randle, P.J., Cooper, R.H., Whitehouse, S., Pask, H.T., and Denton, R.M. (1976). Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. *Biochem. J* 154, 327-348.
- Kerner, J. and Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 1-17.
- Kessler, A., Uphues, I., Ouwens, D.M., Till, M., and Eckel, J. (2001). Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 280, E65-E74.
- Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology* 146, 1473-1481.
- Khayat, Z.A., Tsakiridis, T., Ueyama, A., Somwar, R., Ebina, Y., and Klip, A. (1998). Rapid stimulation of glucose transport by mitochondrial uncoupling depends in part on cytosolic Ca²⁺ and cPKC. *Am J Physiol* 275, C1487-C1497.
- Kim, Y.B., Kotani, K., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., and Kahn, B.B. (2003). Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes* 52, 1935-1942.
- Kim, Y.B., Nikoulina, S.E., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., and Kahn, B.B. (1999). Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104, 733-741.

- King, H., Aubert, R.E., and Herman, W.H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21, 1414-1431.
- King, L.M. and Opie, L.H. (1998). Glucose and glycogen utilisation in myocardial ischemia--changes in metabolism and consequences for the myocyte. *Mol. Cell Biochem.* 180, 3-26.
- King, L.M., Sidell, R.J., Wilding, J.R., Radda, G.K., and Clarke, K. (2001). Free fatty acids, but not ketone bodies, protect diabetic rat hearts during low-flow ischemia. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H1173-H1181.
- Kish, S.J., Dixon, L.M., and Sherwin, A.L. (1988). Aspartic acid aminotransferase activity is increased in actively spiking compared with non-spiking human epileptic cortex. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 552-556.
- Klein, R., Klein, B.E.K., and Moss, S.E. (1996). Relation of glyemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 124 (1 pt 2), 90-96.
- Koeslag, J.H., Noakes, T.D., and Sloan, A.W. (1980). Post-exercise ketosis. *J Physiol* 301, 79-90.
- Kolter, T., Uphues, I., and Eckel, J. (1997). Molecular analysis of insulin resistance in isolated ventricular cardiomyocytes of obese Zucker rats. *Am J Physiol* 273, E59-E67.
- Kopp, S.J., Daar, J., Paulson, D.J., Romano, F.D., and Laddaga, R. (1997). Effects of oral vanadyl treatment on diabetes-induced alterations in the heart GLUT-4 transporter. *J Mol. Cell Cardiol.* 29, 2355-2362.
- Kraegen, E.W., Saha, A.K., Preston, E., Wilks, D., Hoy, A.J., Cooney, G.J., and Ruderman, N.B. (2006). Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 290, E471-E479.
- Kraegen, E.W., Sowden, J.A., Halstead, M.B., Clark, P.W., Rodnick, K.J., Chisholm, D.J., and James, D.E. (1993). Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4. *Biochem. J* 295 (Pt 1), 287-293.
- Krolewski, A.S., Kosinski, E.J., Warram, J.H., Leland, O.S., Busick, E.J., Asmal, A.C., Rand, L.I., Christlieb, A.R., Bradley, R.F., and Kahn, C.R. (1987). Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 59, 750-755.
- Krook, A., Björnholm, M., Galuska, D., Jiang, X.J., Fahlman, R., Myers, M.G., Jr., Wallberg-Henriksson, H., and Zierath, J.R. (2000). Characterization of signal

- transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49, 284-292.
- Kruszynska, Y.T., Worrall, D.S., Ofrecio, J., Frias, J.P., Macaraeg, G., and Olefsky, J.M. (2002). Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol. Metab* 87, 226-234.
- Kunau, W.H., Dommes, V., and Schulz, H. (1995). beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res* 34, 267-342.
- Kuroda, M., Honnor, R.C., Cushman, S.W., Londos, C., and Simpson, I.A. (1987). Regulation of insulin-stimulated glucose transport in the isolated rat adipocyte. cAMP-independent effects of lipolytic and antilipolytic agents. *J Biol Chem.* 262, 245-253.
- Kwiterovich, P.O., Jr. (2002). Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol.* 90, 30i-47i.
- Laffel, L. (1999). Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab Res. Rev.* 15, 412-426.
- Laing, S.P., Swerdlow, A.J., Slater, S.D., Burden, A.C., Morris, A., Waugh, N.R., Gatling, W., Bingley, P.J., and Patterson, C.C. (2003). Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia* 46, 760-765.
- Lajoie, C., Calderone, A., and Beliveau, L. (2004a). Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch.* 449, 26-32.
- Lajoie, C., Calderone, A., Trudeau, F., Lavoie, N., Massicotte, G., Gagnon, S., and Beliveau, L. (2004b). Exercise training attenuated the PKB and GSK-3 dephosphorylation in the myocardium of ZDF rats. *J Appl. Physiol* 96, 1606-1612.
- Larsen, T.S. and Severson, D.L. (1990). Influence of exogenous fatty acids and ketone bodies on rates of lipolysis in isolated ventricular myocytes from normal and diabetic rats. *Can. J Physiol Pharmacol* 68, 1177-1182.
- Lawrence, J.C., Jr., Hiken, J.F., and James, D.E. (1990). Phosphorylation of the glucose transporter in rat adipocytes. Identification of the intracellular domain at the carboxyl terminus as a target for phosphorylation in intact-cells and in vitro. *J Biol Chem.* 265, 2324-2332.
- Lawson, J.W. and Uyeda, K. (1987). Effects of insulin and work on fructose 2,6-bisphosphate content and phosphofructokinase activity in perfused rat hearts. *J Biol Chem.* 262, 3165-3173.

- Laybutt,D.R., Thompson,A.L., Cooney,G.J., and Kraegen,E.W. (1997). Selective chronic regulation of GLUT1 and GLUT4 content by insulin, glucose, and lipid in rat cardiac muscle in vivo. *Am J Physiol* 273, H1309-H1316.
- Lazou,A., Bogoyevitch,M.A., Clerk,A., Fuller,S.J., Marshall,C.J., and Sugden,P.H. (1994). Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade in adult rat heart preparations in vitro. *Circ. Res* 75, 932-941.
- Lean,M.E., Han,T.S., Prvan,T., Richmond,P.R., and Avenell,A. (1997). Weight loss with high and low carbohydrate 1200 kcal diets in free living women. *Eur. J Clin Nutr.* 51, 243-248.
- Lee,D.W. and Yu,B.P. (1990). Modulation of free radicals and superoxide dismutases by age and dietary restriction. *Aging (Milano.)* 2, 357-362.
- Lee,J. and Pilch,P.F. (1994). The insulin receptor: structure, function, and signaling. *Am J Physiol* 266, C319-C334.
- Lei,B., Matsuo,K., Labinsky,V., Sharma,N., Chandler,M.P., Ahn,A., Hintze,T.H., Stanley,W.C., and Recchia,F.A. (2005). Exogenous nitric oxide reduces glucose transporters translocation and lactate production in ischemic myocardium in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6966-6971.
- Lemieux,K., Konrad,D., Klip,A., and Marette,A. (2003). The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *FASEB J.* 17, 1658-1665.
- Lewin,T.M. and Coleman,R.A. (2003). Regulation of myocardial triacylglycerol synthesis and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1634, 63-75.
- Li,J., DeFea,K., and Roth,R.A. (1999). Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation by an Akt/phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem.* 274, 9351-9356.
- Li,J., Miller,E.J., Ninomiya-Tsuji,J., Russell,R.R., III, and Young,L.H. (2005). AMP-Activated Protein Kinase Activates p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Increasing Its Recruitment to TAB1 in the Ischemic Heart. *Circ. Res* 97, 872-879.
- Li, J., Selvakumar, P., Russell III, RR., Cushman, S. W., Holman, G. D., and Young, L. H. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287[5], E834-E841. 2004.
- Libby,P., Nathan,D.M., Abraham,K., Brunzell,J.D., Fradkin,J.E., Haffner,S.M., Hsueh,W., Rewers,M., Roberts,B.T., Savage,P.J., Skarlatos,S., Wassef,M., and Rabadan-Diehl,C. (2005). Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on

- Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. *Circulation* 111, 3489-3493.
- Lip, G.Y., Felmeden, D.C., Li-Saw-Hee, F.L., and Beevers, D.G. (2000). Hypertensive heart disease. A complex syndrome or a hypertensive 'cardiomyopathy'? *Eur. Heart J* 21, 1653-1665.
- Lipschutz, J.H. and Mostov, K.E. (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr. Biol* 12, R212-R214.
- Little, J.R., Goto, M., and Spitzer, J.J. (1970). Effect of ketones on metabolism of FFA by dog myocardium and skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 219, 1458-1463.
- Liu, B., Clanachan, A.S., Schulz, R., and Lopaschuk, G.D. (1996). Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ. Res* 79, 940-948.
- Liu, G.X., Hanley, P.J., Ray, J., and Daut, J. (2001). Long-chain acyl-coenzyme A esters and fatty acids directly link metabolism to K(ATP) channels in the heart. *Circ. Res* 88, 918-924.
- Liu, J., Kimura, A., Baumann, C.A., and Saltiel, A.R. (2002). APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol* 22, 3599-3609.
- Liu, Y., Wan, Q., Guan, Q., Gao, L., and Zhao, J. (2006). High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPK α in rats' skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 339, 701-707.
- Lommi, J., Koskinen, P., Naveri, H., Harkonen, M., and Kupari, M. (1997). Heart failure ketosis. *J Intern. Med.* 242, 231-238.
- Lommi, J., Kupari, M., and Yki-Jarvinen, H. (1998). Free fatty acid kinetics and oxidation in congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 81, 45-50.
- Longnus, S.L., Wambolt, R.B., Barr, R.L., Lopaschuk, G.D., and Allard, M.F. (2001). Regulation of myocardial fatty acid oxidation by substrate supply. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H1561-H1567.
- Longnus, S.L., Wambolt, R.B., Parsons, H.L., Brownsey, R.W., and Allard, M.F. (2003). 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 284, R936-R944.
- Lopaschuk, G.D., Collins-Nakai, R., Olley, P.M., Montague, T.J., McNeil, G., Gayle, M., Penkoske, P., and Finegan, B.A. (1994). Plasma fatty acid levels in infants and adults after myocardial ischemia. *Am Heart J* 128, 61-67.

- Lu, B., Ennis, D., Lai, R., Bogdanovic, E., Nikolov, R., Salamon, L., Fantus, C., Le Tien, H., and Fantus, I.G. (2001). Enhanced sensitivity of insulin-resistant adipocytes to vanadate is associated with oxidative stress and decreased reduction of vanadate (+5) to vanadyl (+4). *J Biol Chem.* 276, 35589-35598.
- Lund, S., Holman, G.D., Schmitz, O., and Pedersen, O. (1995). Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5817-5821.
- Luscombe, N.D., Noakes, M., and Clifton, P.M. (1999). Diets high and low in glycemic index versus high monounsaturated fat diets: effects on glucose and lipid metabolism in NIDDM. *Eur. J Clin Nutr.* 53, 473-478.
- Lyon, C.J. and Hsueh, W.A. (2003). Effect of plasminogen activator inhibitor-1 in diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Am J Med.* 115 Suppl 8A, 62S-68S.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 273, 13375-13378.
- Maher, F., Davies-Hill, T.M., and Simpson, I.A. (1996). Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J* 315 (Pt 3), 827-831.
- Malhotra, A., Penpargkul, S., Fein, F.S., Sonnenblick, E.H., and Scheuer, J. (1981). The effect of streptozotocin-induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Circ. Res* 49, 1243-1250.
- Malmberg, K., Yusuf, S., Gerstein, H.C., Brown, J., Zhao, F., Hunt, D., Piegas, L., Calvin, J., Keltai, M., and Budaj, A. (2000). Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation* 102, 1014-1019.
- Mansell, P.I. and Macdonald, I.A. (1990). The effect of starvation on insulin-induced glucose disposal and thermogenesis in humans. *Metabolism* 39, 502-510.
- Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Vanden, B.G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr. Biol* 10, 1247-1255.
- Marwick, T.H. (2006). Diabetic heart disease. *Heart* 92, 296-300.
- Massie, B.M. (2002). Obesity and heart failure--risk factor or mechanism? *N. Engl. J Med.* 347, 358-359.

- Matsubara,T., Musat-Marcu,S., Misra,H.P., and Dhalla,N.S. (1995). Protective effect of vanadate on oxyradical-induced changes in isolated perfused heart. *Mol. Cell Biochem.* 153, 79-85.
- Matsuzawa,Y. (2005). White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best. Pract. Res Clin Endocrinol. Metab* 19, 637-647.
- McCall,A.L., Fixman,L.B., Fleming,N., Tornheim,K., Chick,W., and Ruderman,N.B. (1986). Chronic hypoglycemia increases brain glucose transport. *Am J Physiol* 251, E442-E447.
- McCormack,J.G. and Denton,R.M. (1989). Influence of calcium ions on mammalian intramitochondrial dehydrogenases. *Methods Enzymol.* 174, 95-118.
- McDonald,T.F., Hunter,E.G., and MacLeod,D.P. (1971). Adenosinetriphosphate partition in cardiac muscle with respect to transmembrane electrical activity. *Pflugers Arch.* 322, 95-108.
- McFarlane,S.I. and Sowers,J.R. (2003). Cardiovascular endocrinology 1: aldosterone function in diabetes mellitus: effects on cardiovascular and renal disease. *J Clin Endocrinol. Metab* 88, 516-523.
- McGarry,J.D., Mills,S.E., Long,C.S., and Foster,D.W. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem. J* 214, 21-28.
- McNulty,P.H., Darling,A., and Whiting,J.M. (1996). Glycogen depletion contributes to ischemic preconditioning in the rat heart in vivo. *Am J Physiol* 271, H2283-H2289.
- Miles,J.M., Haymond,M.W., and Gerich,J.E. (1981). Suppression of glucose production and stimulation of insulin secretion by physiological concentrations of ketone bodies in man. *J Clin Endocrinol. Metab* 52, 34-37.
- Mochizuki,S. and Neely,J.R. (1979). Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. *J Mol. Cell Cardiol.* 11, 221-236.
- Mohammad,A., Wang,J., and McNeill,J.H. (2002). Bis(maltolato)oxovanadium(IV) inhibits the activity of PTP1B in Zucker rat skeletal muscle in vivo. *Mol. Cell Biochem.* 229, 125-128.
- Moller,D.E. and Kaufman,K.D. (2005). Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu. Rev Med.* 56, 45-62.
- Moller,N., Rizza,R.A., Ford,G.C., and Nair,K.S. (2001). Assessment of postabsorptive renal glucose metabolism in humans with multiple glucose tracers. *Diabetes* 50, 747-751.

- Moniotte,S., Kobzik,L., Feron,O., Trochu,J.N., Gauthier,C., and Balligand,J.L. (2001). Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103, 1649-1655.
- Montessuit,C. and Thorburn,A. (1999). Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists. *J Biol Chem.* 274, 9006-9012.
- Moon,B., Kwan,J.J., Duddy,N., Sweeney,G., and Begum,N. (2003). Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 285, E106-E115.
- Morena,M., Delbosc,S., Dupuy,A.M., Canaud,B., and Cristol,J.P. (2005). Overproduction of reactive oxygen species in end-stage renal disease patients: a potential component of hemodialysis-associated inflammation. *Hemodial. Int* 9, 37-46.
- Morgan,H.E., Henderson,M.J., Regen,D.M., and Park,C.R. (1961). Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats. *J Biol Chem.* 236, 253-261.
- Morisco,C., Condorelli,G., Trimarco,V., Bellis,A., Marrone,C., Condorelli,G., Sadoshima,J., and Trimarco,B. (2005). Akt mediates the cross-talk between beta-adrenergic and insulin receptors in neonatal cardiomyocytes. *Circ. Res* 96, 180-188.
- Morris,A.J., Martin,S.S., Haruta,T., Nelson,J.G., Vollenweider,P., Gustafson,T.A., Mueckler,M., Rose,D.W., and Olefsky,J.M. (1996). Evidence for an insulin receptor substrate 1 independent insulin signaling pathway that mediates insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8401-8406.
- Mosthaf,L., Grako,K., Dull,T.J., Coussens,L., Ullrich,A., and McClain,D.A. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J* 9, 2409-2413.
- Mu,J., Brozinick,J.T., Jr., Valladares,O., Bucan,M., and Birnbaum,M.J. (2001). A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol. Cell* 7, 1085-1094.
- Mueckler,M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur. J Biochem.* 219, 713-725.
- Muhlberg,A.B., Warnock,D.E., and Schmid,S.L. (1997). Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase. *EMBO J* 16, 6676-6683.
- Musa-Veloso,K. (2004). Non-invasive detection of ketosis and its application in refractory epilepsy. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 329-335.

- Musi, N., Hayashi, T., Fujii, N., Hirshman, M.F., Witters, L.A., and Goodyear, L.J. (2001). AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E677-E684.
- Musi, N., Hirshman, M.F., Arad, M., Xing, Y., Fujii, N., Pomerleau, J., Ahmad, F., Berul, C.I., Seidman, J.G., Tian, R., and Goodyear, L.J. (2005). Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. *FEBS Lett.* 579, 2045-2050.
- Newsholme, E.A. and Dimitriadis, G. (2001). Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. *Exp. Clin Endocrinol. Diabetes* 109 Suppl 2, S122-S134.
- Newton, C.A. and Raskin, P. (2004). Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. *Arch. Intern. Med.* 164, 1925-1931.
- Nichols, B.J., Rigoulet, M., and Denton, R.M. (1994). Comparison of the effects of Ca²⁺, adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD(+)-isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. *Biochem. J* 303 (Pt 2), 461-465.
- Niedowicz, D.M. and Daleke, D.L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem. Biophys.* 43, 289-330.
- Nishimura, H., Pallardo, F.V., Seidner, G.A., Vannucci, S., Simpson, I.A., and Birnbaum, M.J. (1993). Kinetics of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 268, 8514-8520.
- Nishino, Y., Miura, T., Miki, T., Sakamoto, J., Nakamura, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, H., and Shimamoto, K. (2004). Ischemic preconditioning activates AMPK in a PKC-dependent manner and induces GLUT4 up-regulation in the late phase of cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61, 610-619.
- Noda, C., Masuda, T., Sato, K., Ikeda, K., Shimohama, T., Matsuyama, N., and Izumi, T. (2003). Vanadate improves cardiac function and myocardial energy metabolism in diabetic rat hearts. *Jpn. Heart J.* 44, 745-757.
- Nordli, D. (2002). The ketogenic diet: uses and abuses. *Neurology* 58, S21-S24.
- Odland, L.M., Heigenhauser, G.J., and Spriet, L.L. (2000). Effects of high fat provision on muscle PDH activation and malonyl-CoA content in moderate exercise. *J Appl. Physiol* 89, 2352-2358.
- Ogihara, T., Asano, T., Katagiri, H., Sakoda, H., Anai, M., Shojima, N., Ono, H., Fujishiro, M., Kushiya, A., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Noguchi, N., Aburatani, H., Gotoh, Y., Komuro, I., and Fujita, T. (2004). Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* 47, 794-805.

- Ohgami,M., Takahashi,N., Yamasaki,M., and Fukui,T. (2003). Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain. *Biochem. Pharmacol* 65, 989-994.
- Olson,N.L., Carrell,R., Cummings,R., Rieck,R., and Reimer,S. (1995). Atomic emission detection for gas chromatographic analysis of nitrogen-containing herbicides in water. *J AOAC Int* 78, 1464-1473.
- Oram,J.F. and Bornfeldt,K.E. (2004). Direct effects of long-chain non-esterified fatty acids on vascular cells and their relevance to macrovascular complications of diabetes. *Front Biosci.* 9, 1240-1253.
- Oudit,G.Y., Sun,H., Kerfant,B.G., Crackower,M.A., Penninger,J.M., and Backx,P.H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol. Cell Cardiol.* 37, 449-471.
- Owen,O.E., Felig,P., Morgan,A.P., Wahren,J., and Cahill,G.F., Jr. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest* 48, 574-583.
- Owen,O.E., Morgan,A.P., Kemp,H.G., Sullivan,J.M., Herrera,M.G., and Cahill,G.F., Jr. (1967). Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46, 1589-1595.
- Owen,O.E. and Reichard,G.A., Jr. (1975). Ketone body metabolism in normal, obese and diabetic subjects. *Isr. J Med. Sci* 11, 560-570.
- Pan,J.W., Bebin,E.M., Chu,W.J., and Hetherington,H.P. (1999). Ketosis and epilepsy: 31P spectroscopic imaging at 4.1 T. *Epilepsia* 40, 703-707.
- Pan,J.W., Rothman,T.L., Behar,K.L., Stein,D.T., and Hetherington,H.P. (2000). Human brain beta-hydroxybutyrate and lactate increase in fasting-induced ketosis. *J Cereb. Blood Flow Metab* 20, 1502-1507.
- Parker,B., Noakes,M., Luscombe,N., and Clifton,P. (2002). Effect of a high-protein, high-monounsaturated fat weight loss diet on glycemic control and lipid levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25, 425-430.
- Patti,M.E., Sun,X.J., Bruening,J.C., Araki,E., Lipes,M.A., White,M.F., and Kahn,C.R. (1995). 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J Biol Chem.* 270, 24670-24673.
- Pelletier, A., Chiasson, J.-L., and Coderre, L. Could elevated ketone bodies contribute to diabetic cardiomyopathy? *Diabetes* 51 Suppl 2, 1851-P. 2002.
- Pelletier,A., Joly,E., Prentki,M., and Coderre,L. (2005). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 146, 2285-2294.

- Petersen, K.F. and Shulman, G.I. (2002). Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* *90*, 11G-18G.
- Peterson, S.J., Tangney, C.C., Pimentel-Zablah, E.M., Hjelmgren, B., Booth, G., and Berry-Kravis, E. (2005). Changes in growth and seizure reduction in children on the ketogenic diet as a treatment for intractable epilepsy. *J Am Diet. Assoc.* *105*, 718-725.
- Peuhkurinen, K.J. and Hassinen, I.E. (1982). Pyruvate carboxylation as an anaplerotic mechanism in the isolated perfused rat heart. *Biochem. J* *202*, 67-76.
- Phinney, S.D., Bistrian, B.R., Evans, W.J., Gervino, E., and Blackburn, G.L. (1983). The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation. *Metabolism* *32*, 769-776.
- Poirier, P., Bogaty, P., Garneau, C., Marois, L., and Dumesnil, J.G. (2001). Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* *24*, 5-10.
- Poitout, V. and Robertson, R.P. (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* *143*, 339-342.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., Kemp, B.E., and Stapleton, D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol* *13*, 867-871.
- Poornima, I.G., Parikh, P., and Shannon, R.P. (2006). Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ. Res* *98*, 596-605.
- Potashnik, R., Bloch-Damti, A., Bashan, N., and Rudich, A. (2003). IRS1 degradation and increased serine phosphorylation cannot predict the degree of metabolic insulin resistance induced by oxidative stress. *Diabetologia* *46*, 639-648.
- Price, N., van der, L.F., Jackson, V., Corstorphine, C., Thomson, R., Sorensen, A., and Zammit, V. (2002). A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics* *80*, 433-442.
- Quon, M.J., Butte, A.J., Zarnowski, M.J., Sesti, G., Cushman, S.W., and Taylor, S.I. (1994). Insulin receptor substrate 1 mediates the stimulatory effect of insulin on GLUT4 translocation in transfected rat adipose cells. *J Biol Chem.* *269*, 27920-27924.
- Quon, M.J., Chen, H., Ing, B.L., Liu, M.L., Zarnowski, M.J., Yonezawa, K., Kasuga, M., Cushman, S.W., and Taylor, S.I. (1995). Roles of 1-phosphatidylinositol 3-kinase and

- ras in regulating translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol. Cell Biol* 15, 5403-5411.
- Rafaeloff-Phail,R., Ding,L., Conner,L., Yeh,W.K., McClure,D., Guo,H., Emerson,K., and Brooks,H. (2004). Biochemical regulation of mammalian AMP-activated protein kinase activity by NAD and NADH. *J Biol Chem.* 279, 52934-52939.
- Rajala,R.V., McClellan,M.E., Chan,M.D., Tsiokas,L., and Anderson,R.E. (2004). Interaction of the retinal insulin receptor beta-subunit with the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochemistry* 43, 5637-5650.
- Ramachandran,B., Ravi,K., Narayanan,V., Kandaswamy,M., and Subramanian,S. (2004). Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol Interact.* 149, 9-21.
- Randle,P.J., Garland,P.B., Hales,C.N., and Newsholm,E.A. (1963). The glucose-fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1, 785-789.
- Randle,P.J., Newsholme,E.A., and Garland,P.B. (1964). Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J* 93, 652-665.
- Ravichandran,L.V., Esposito,D.L., Chen,J., and Quon,M.J. (2001). Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem.* 276, 3543-3549.
- Raynolds, M. V., Bush, E. W., Taft, C. S., Roden, R. A., and Bristow, M. R. Altered gene expression of several rate limiting enzymes in fatty acid oxidation and glycolysis in the failing human heart. *Circulation* 90 *Suppl* 1, I-209. 1994.
- Ren,J., Dominguez,L.J., Sowers,J.R., and Davidoff,A.J. (1996). Troglitazone attenuates high-glucose-induced abnormalities in relaxation and intracellular calcium in rat ventricular myocytes. *Diabetes* 45, 1822-1825.
- Ren,J., Dominguez,L.J., Sowers,J.R., and Davidoff,A.J. (1999). Metformin but not glyburide prevents high glucose-induced abnormalities in relaxation and intracellular Ca²⁺ transients in adult rat ventricular myocytes. *Diabetes* 48, 2059-2065.
- Reszko,A.E., Kasumov,T., David,F., Jobbins,K.A., Thomas,K.R., Hoppel,C.L., Brunengraber,H., and Des,R.C. (2004a). Peroxisomal fatty acid oxidation is a substantial source of the acetyl moiety of malonyl-CoA in rat heart. *J Biol Chem.* 279, 19574-19579.
- Reszko,A.E., Kasumov,T., David,F., Thomas,K.R., Jobbins,K.A., Cheng,J.F., Lopaschuk,G.D., Dyck,J.R., Diaz,M., Des,R.C., Stanley,W.C., and Brunengraber,H.

- (2004b). Regulation of malonyl-CoA concentration and turnover in the normal heart. *J Biol Chem.* 279, 34298-34301.
- Reusch,R.N., Bryant,E.M., and Henry,D.N. (2003). Increased poly-(R)-3-hydroxybutyrate concentrations in streptozotocin (STZ) diabetic rats. *Acta Diabetol.* 40, 91-94.
- Richter,E.A., Derave,W., and Wojtaszewski,J.F. (2001). Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol* 535, 313-322.
- Ritchie, R. H. and Delbridge, L. M. D. Cardiac hypertrophy, substrate utilisation and metabolic remodelling: cause or effect? *Proc.Aust.Physiol.Soc.* 36, 35-43. 2005.
- Rodgers,C.D. and Vranic,M. (1998). Mediation of glucoregulation at rest and during exercise by the glucose-fatty acid cycle: in vivo and in vitro studies. *Can. J Appl. Physiol* 23, 534-557.
- Rolo,A.P. and Palmeira,C.M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 212, 167-178.
- Ross,R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801-809.
- Rovetto,M.J., Lamberton,W.F., and Neely,J.R. (1975). Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ. Res* 37, 742-751.
- Rovetto,M.J., Whitmer,J.T., and Neely,J.R. (1973). Comparison of the effects of anoxia and whole heart ischemia on carbohydrate utilization in isolated working rat hearts. *Circ. Res* 32, 699-711.
- Rude,M.K., Duhaney,T.A., Kuster,G.M., Judge,S., Heo,J., Colucci,W.S., Siwik,D.A., and Sam,F. (2005). Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 46, 555-561.
- Ruderman,N.B., Houghton,C.R., and Hems,R. (1971). Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism. *Biochem. J* 124, 639-651.
- Russ,M. and Eckel,J. (1995). Insulin action on cardiac glucose transport: studies on the role of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1265, 73-78.
- Russell,A.P. (2004). Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. *Int J Obes. Relat Metab Disord.* 28 Suppl 4, S66-S71.
- Russell,R.R., III, Bergeron,R., Shulman,G.I., and Young,L.H. (1999). Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am. J. Physiol.* 277, H643-H649.

- Russell,R.R., III, Cline,G.W., Guthrie,P.H., Goodwin,G.W., Shulman,G.I., and Taegtmeyer,H. (1997). Regulation of exogenous and endogenous glucose metabolism by insulin and acetoacetate in the isolated working rat heart. A three tracer study of glycolysis, glycogen metabolism, and glucose oxidation. *J Clin Invest* 100, 2892-2899.
- Russell,R.R., III, Li,J., Coven,D.L., Pypaert,M., Zechner,C., Palmeri,M., Giordano,F.J., Mu,J., Birnbaum,M.J., and Young,L.H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J. Clin. Invest* 114, 495-503.
- Sachetelli,S., Liu,Q., Zhang,S.L., Liu,F., Hsieh,T.J., Brezniceanu,M.L., Guo,D.F., Filep,J.G., Ingelfinger,J.R., Sigmund,C.D., Hamet,P., and Chan,J.S. (2006). RAS blockade decreases blood pressure and proteinuria in transgenic mice overexpressing rat angiotensinogen gene in the kidney. *Kidney Int* 69, 1016-1023.
- Saddik,M. and Lopaschuk,G.D. (1991). Myocardial triglyceride turnover and contribution to energy substrate utilization in isolated working rat hearts. *J Biol Chem.* 266, 8162-8170.
- Saha,A.K., Vavvas,D., Kurowski,T.G., Apazidis,A., Witters,L.A., Shafrir,E., and Ruderman,N.B. (1997). Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am J Physiol* 272, E641-E648.
- Sakoda,H., Ogihara,T., Anai,M., Fujishiro,M., Ono,H., Onishi,Y., Katagiri,H., Abe,M., Fukushima,Y., Shojima,N., Inukai,K., Kikuchi,M., Oka,Y., and Asano,T. (2002). Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 282, E1239-E1244.
- Sato,K., Kashiwaya,Y., Keon,C.A., Tsuchiya,N., King,M.T., Radda,G.K., Chance,B., Clarke,K., and Veech,R.L. (1995). Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *FASEB J* 9, 651-658.
- Schreyer,S., Ledwig,D., Rakatzi,I., Kloting,I., and Eckel,J. (2003). Insulin receptor substrate-4 is expressed in muscle tissue without acting as a substrate for the insulin receptor. *Endocrinology* 144, 1211-1218.
- Scotini,E., Caparrotta,L., Tessari,F., and Fassina,G. (1983). Age-related changes in rat adipose tissue in response to fasting: protein, lactate and pyruvate levels. *Life Sci* 32, 2701-2708.
- Seebach,D., Brunner,A., Burger,H.M., Schneider,J., and Reusch,R.N. (1994). Isolation and ¹H-NMR spectroscopic identification of poly(3-hydroxybutanoate) from prokaryotic and eukaryotic organisms. Determination of the absolute configuration (R) of the monomeric unit 3-hydroxybutanoic acid from *Escherichia coli* and spinach. *Eur. J Biochem.* 224, 317-328.

- Sekar,N., Li,J., and Shechter,Y. (1996). Vanadium salts as insulin substitutes: mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.* *31*, 339-359.
- Senior,B. and Loridan,L. (1968). Direct regulatory effect of ketones on lipolysis and on glucose concentrations in man. *Nature* *219*, 83-84.
- Sesti,G., Federici,M., Hribal,M.L., Lauro,D., Sbraccia,P., and Lauro,R. (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* *15*, 2099-2111.
- Shah,A. and Shannon,R.P. (2003). Insulin resistance in dilated cardiomyopathy. *Rev Cardiovasc Med.* *4 Suppl 6*, S50-S57.
- Sharma,P.M., Egawa,K., Gustafson,T.A., Martin,J.L., and Olefsky,J.M. (1997). Adenovirus-mediated overexpression of IRS-1 interacting domains abolishes insulin-stimulated mitogenesis without affecting glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol* *17*, 7386-7397.
- Sharma,P.M., Egawa,K., Huang,Y., Martin,J.L., Huvar,I., Boss,G.R., and Olefsky,J.M. (1998). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action. *J Biol Chem.* *273*, 18528-18537.
- Sharman,M.J., Kraemer,W.J., Love,D.M., Avery,N.G., Gomez,A.L., Scheett,T.P., and Volek,J.S. (2002). A ketogenic diet favorably affects serum biomarkers for cardiovascular disease in normal-weight men. *J Nutr.* *132*, 1879-1885.
- Shaw,J.H. and Wolfe,R.R. (1984). Influence of beta-hydroxybutyrate infusion on glucose and free fatty acid metabolism in dogs. *Am J Physiol* *247*, E756-E764.
- Shepherd,P.R. (2005). Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand.* *183*, 3-12.
- Sherwin,R.S., Hendler,R.G., and Felig,P. (1975). Effect of ketone infusions on amino acid and nitrogen metabolism in man. *J Clin Invest* *55*, 1382-1390.
- Siddiqui,M.R., Taha,A., Moorthy,K., Hussain,M.E., Basir,S.F., and Baquer,N.Z. (2005). Amelioration of altered antioxidant status and membrane linked functions by vanadium and *Trigonella* in alloxan diabetic rat brains. *J Biosci.* *30*, 483-490.
- Slot,J.W., Geuze,H.J., Gigengack,S., James,D.E., and Lienhard,G.E. (1991). Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 7815-7819.
- Sohal,R.S. and Weindruch,R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* *273*, 59-63.

- Somwar,R., Koterski,S., Sweeney,G., Sciotti,R., Djuric,S., Berg,C., Trevillyan,J., Scherer,P.E., Rondinone,C.M., and Klip,A. (2002). A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.* 277, 50386-50395.
- Somwar,R., Niu,W., Kim,D.Y., Sweeney,G., Randhawa,V.K., Huang,C., Ramlal,T., and Klip,A. (2001). Differential effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibition on intracellular signals regulating GLUT4 translocation and glucose transport. *J. Biol. Chem.* 276, 46079-46087.
- Somwar,R., Perreault,M., Kapur,S., Taha,C., Sweeney,G., Ramlal,T., Kim,D.Y., Keen,J., Cote,C.H., Klip,A., and Marette,A. (2000). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. *Diabetes* 49, 1794-1800.
- Sonta,T., Inoguchi,T., Tsubouchi,H., Sekiguchi,N., Kobayashi,K., Matsumoto,S., Utsumi,H., and Nawata,H. (2004). Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic. Biol Med.* 37, 115-123.
- Squires,J.E., Sun,J., Caffrey,J.L., Yoshishige,D., and Mallet,R.T. (2003). Acetoacetate augments beta-adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 284, H1340-H1347.
- Srere,P.A., Matsuoka,Y., and Mukherjee,A. (1973). Inhibition studies of rat citrate synthase. *J Biol Chem.* 248, 8031-8035.
- Srinivasan,S.R. and Berenson,G.S. (1995). Serum apolipoproteins A-I and B as markers of coronary artery disease risk in early life: the Bogalusa Heart Study. *Clin Chem.* 41, 159-164.
- Sriwijitkamol,A., Ivy,J.L., Christ-Roberts,C., DeFronzo,R.A., Mandarino,L.J., and Musi,N. (2006). LKB1-AMPK signaling in muscle from obese insulin-resistant Zucker rats and effects of training. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 290, E925-E932.
- Staehr,P., Hother-Nielsen,O., Landau,B.R., Chandramouli,V., Holst,J.J., and Beck-Nielsen,H. (2003). Effects of free fatty acids per se on glucose production, gluconeogenesis, and glycogenolysis. *Diabetes* 52, 260-267.
- Stam,H., Broekhoven-Schokker,S., and Hulsmann,W.C. (1986). Characterization of mono-, di- and triacylglycerol lipase activities in the isolated rat heart. *Biochim. Biophys. Acta* 875, 76-86.
- Stanley,W.C., Lopaschuk,G.D., Hall,J.L., and McCormack,J.G. (1997). Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res* 33, 243-257.

- Stanley, W.C., Meadows, S.R., Kivilo, K.M., Roth, B.A., and Lopaschuk, G.D. (2003). beta-Hydroxybutyrate inhibits myocardial fatty acid oxidation in vivo independent of changes in malonyl-CoA content. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H1626-H1631.
- Stanley, W.C., Recchia, F.A., and Lopaschuk, G.D. (2005). Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85, 1093-1129.
- Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A., and Kemp, B.E. (1996). Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*. 271, 611-614.
- Staubs, P.A., Nelson, J.G., Reichart, D.R., and Olefsky, J.M. (1998). Platelet-derived growth factor inhibits insulin stimulation of insulin receptor substrate-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes without affecting glucose transport. *J Biol Chem*. 273, 25139-25147.
- Stephens, J.M. and Pilch, P.F. (1995). The metabolic regulation and vesicular transport of GLUT4, the major insulin-responsive glucose transporter. *Endocr Rev* 16, 529-546.
- Stephens, J.M., Sulway, M.J., and Watkins, P.J. (1971). Relationship of blood acetoacetate and 3-hydroxybutyrate in diabetes. *Diabetes* 20, 485-489.
- Storino, W.D. and Engel, G.H. (1978). Office surgical management of recalcitrant axillary lesions. *Cutis* 21, 338-341.
- Stout, R.W., Henry, R.W., and Buchanan, K.D. (1976). Triglyceride metabolism in acute starvation: the role of secretin and glucagon. *Eur. J Clin Invest* 6, 179-185.
- Stratford, S., Hoehn, K.L., Liu, F., and Summers, S.A. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem*. 279, 36608-36615.
- Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A., Matthews, D.R., Manley, S.E., Cull, C.A., Hadden, D., Turner, R.C., and Holman, R.R. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321, 405-412.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., and van Haeften, T.W. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333-1346.
- Su, S.W., Cilio, M.R., Sogawa, Y., Silveira, D.C., Holmes, G.L., and Stafstrom, C.E. (2000). Timing of ketogenic diet initiation in an experimental epilepsy model. *Brain Res Dev. Brain Res* 125, 131-138.
- Sugden, M.C. and Holness, M.J. (1993). Physiological modulation of the uptake and fate of glucose in brown adipose tissue. *Biochem. J* 295 (Pt 1), 171-176.

- Sugden, M.C., Orfali, K.A., and Holness, M.J. (1995). The pyruvate dehydrogenase complex: nutrient control and the pathogenesis of insulin resistance. *J Nutr.* 125, 1746S-1752S.
- Sul, H.S. and Wang, D. (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu. Rev Nutr.* 18, 331-351.
- Sultan, A.M. (1988). D-3-hydroxybutyrate metabolism in the perfused rat heart. *Mol. Cell Biochem.* 79, 113-118.
- Sultan, A.M. (1990). The effect of fasting on D-3-hydroxybutyrate metabolism in the perfused rat heart. *Mol. Cell Biochem.* 93, 107-118.
- Sun, D., Nguyen, N., DeGrado, T.R., Schwaiger, M., and Brosius, F.C., III (1994). Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation* 89, 793-798.
- Sun, J. Acetoacetate restores contractile performance and antioxidant potential of H₂O₂-injured myocardium. *J Mol. Cell. Cardiol.* 33A, 115. 2001.
- Swanton, E.M. and Saggerson, E.D. (1997). Glycerolipid metabolizing enzymes in rat ventricle and in cardiac myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1346, 93-102.
- Swiatek, K.R., Dombrowski, G.J., Jr., and Chao, K.L. (1984). The metabolism of D- and L-3-hydroxybutyrate in developing rat brain. *Biochem. Med.* 31, 332-346.
- Taegtmeier, H., King, L.M., and Jones, B.E. (1998). Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am J Cardiol.* 82, 54K-60K.
- Taggart, A.K., Kero, J., Gan, X., Cai, T.Q., Cheng, K., Ippolito, M., Ren, N., Kaplan, R., Wu, K., Wu, T.J., Jin, L., Liaw, C., Chen, R., Richman, J., Connolly, D., Offermanns, S., Wright, S.D., and Waters, M.G. (2005). (D)-beta-Hydroxybutyrate inhibits adipocyte lipolysis via the nicotinic acid receptor PUMA-G. *J Biol Chem.* 280, 26649-26652.
- Takehiro, M., Fujimoto, S., Shimodaira, M., Shimono, D., Mukai, E., Nabe, K., Radu, R.G., Kominato, R., Aramaki, Y., Seino, Y., and Yamada, Y. (2005). Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate inhibits glucose-induced insulin release from pancreatic islets by decreasing NADH contents. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 288, E372-E380.
- Talior, I., Yarkoni, M., Bashan, N., and Eldar-Finkelman, H. (2003). Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-delta activation in adipocytes of obese, insulin-resistant mice. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 285, E295-E302.
- Talluto, M.R. (1954). A discussion on methods for blood amylase determination. *Am J Med. Technol.* 20, 69-75.

- Tamemoto,H., Kadowaki,T., Tobe,K., Yagi,T., Sakura,H., Hayakawa,T., Terauchi,Y., Ueki,K., Kaburagi,Y., Satoh,S., Sekihara,H., Yoshioka,S., Horikoshi,H., Furuta,Y., Ikawa,Y., Kasuga,M., Yazaki,Y., and Aizawa,S. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
- Tanti,J.F., Grillo,S., Gremeaux,T., Coffey,P.J., Van Obberghen,E., and Marchand-Brustel,Y. (1997). Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology* 138, 2005-2010.
- Tardif,A., Julien,N., Chiasson,J.L., and Coderre,L. (2003). Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment in cardiomyocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAPK activation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E1055-E1064.
- Tardif,A., Julien,N., Pelletier,A., Thibault,G., Srivastava,A.K., Chiasson,J.L., and Coderre,L. (2001). Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1205-E1212.
- Taskinen,M.R., Bogardus,C., Kennedy,A., and Howard,B.V. (1985). Multiple disturbances of free fatty acid metabolism in noninsulin-dependent diabetes. Effect of oral hypoglycemic therapy. *J Clin Invest* 76, 637-644.
- Thiele,E.A. (2003). Assessing the efficacy of antiepileptic treatments: the ketogenic diet. *Epilepsia* 44 Suppl 7, 26-29.
- Thomassen,A.R. (1992). Myocardial uptake and effects of glutamate during non-ischaemic and ischaemic conditions. A clinical study with special reference to possible interrelationships between glutamate and myocardial utilization of carbohydrate substrates. *Dan. Med. Bull.* 39, 471-488.
- Tian,R. and Abel,E.D. (2001). Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation* 103, 2961-2966.
- Tieu,K., Perier,C., Caspersen,C., Teismann,P., Wu,D.C., Yan,S.D., Naini,A., Vila,M., Jackson-Lewis,V., Ramasamy,R., and Przedborski,S. (2003). D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J. Clin. Invest* 112, 892-901.
- Till,M., Kolter,T., and Eckel,J. (1997). Molecular mechanisms of contraction-induced translocation of GLUT4 in isolated cardiomyocytes. *Am J Cardiol.* 80, 85A-89A.
- Till,M., Ouwens,D.M., Kessler,A., and Eckel,J. (2000). Molecular mechanisms of contraction-regulated cardiac glucose transport. *Biochem. J* 346 Pt 3, 841-847.
- Tirosh,A., Potashnik,R., Bashan,N., and Rudich,A. (1999). Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism

- for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 274, 10595-10602.
- Tonelli,J., Kishore,P., Lee,D.E., and Hawkins,M. (2005). The regulation of glucose effectiveness: how glucose modulates its own production. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* 8, 450-456.
- Tremblay,F., Gagnon,A., Veilleux,A., Sorisky,A., and Marette,A. (2005). Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146, 1328-1337.
- Tremblay,F. and Marette,A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 276, 38052-38060.
- Tsai,Y.C., Chou,Y.C., Wu,A.B., Hu,C.M., Chen,C.Y., Chen,F.A., and Lee,J.A. (2005). Stereoselective effects of 3-hydroxybutyrate on glucose utilization of rat cardiomyocytes. *Life Sci.*
- Tschopp,O., Yang,Z.Z., Brodbeck,D., Dummler,B.A., Hemmings-Mieszczak,M., Watanabe,T., Michaelis,T., Frahm,J., and Hemmings,B.A. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943-2954.
- Turban,S., Beardmore,V.A., Carr,J.M., Sakamoto,K., Hajduch,E., Arthur,J.S., and Hundal,H.S. (2005). Insulin-stimulated glucose uptake does not require p38 mitogen-activated protein kinase in adipose tissue or skeletal muscle. *Diabetes* 54, 3161-3168.
- Ui,M. (1966). A role of phosphofructokinase in pH-dependent regulation of glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 124, 310-322.
- Umpierrez,G.E., Watts,N.B., and Phillips,L.S. (1995). Clinical utility of beta-hydroxybutyrate determined by reflectance meter in the management of diabetic ketoacidosis. *Diabetes Care* 18, 137-138.
- Valera,A., Pelegrin,M., Asins,G., Fillat,C., Sabater,J., Pujol,A., Hegardt,F.G., and Bosch,F. (1994). Overexpression of mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase in transgenic mice causes hepatic hyperketogenesis. *J Biol Chem.* 269, 6267-6270.
- Van der Lee,K.A., Willemsen,P.H., Samec,S., Seydoux,J., Dulloo,A.G., Pelsers,M.M., Glatz,J.F., Van Der Vusse,G.J., and van Bilsen,M. (2001). Fasting-induced changes in the expression of genes controlling substrate metabolism in the rat heart. *J Lipid Res* 42, 1752-1758.
- Van Horn,D.J., Myers,M.G., Jr., and Backer,J.M. (1994). Direct activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase by the insulin receptor. *J Biol Chem.* 269, 29-32.

- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J* 346 Pt 3, 561-576.
- Velloso, L.A., Carvalho, C.R., Rojas, F.A., Folli, F., and Saad, M.J. (1998). Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovasc Res* 40, 96-102.
- Venable, C.L., Frevert, E.U., Kim, Y.B., Fischer, B.M., Kamatkar, S., Neel, B.G., and Kahn, B.B. (2000). Overexpression of protein-tyrosine phosphatase-1B in adipocytes inhibits insulin-stimulated phosphoinositide 3-kinase activity without altering glucose transport or Akt/Protein kinase B activation. *J Biol Chem.* 275, 18318-18326.
- Vila Petroff, M.G. and Mattiazzi, A.R. (2001). Angiotensin II and cardiac excitation-contraction coupling: questions and controversies. *Heart Lung Circ.* 10, 90-98.
- Vining, E.P., Freeman, J.M., Ballaban-Gil, K., Camfield, C.S., Camfield, P.R., Holmes, G.L., Shinnar, S., Shuman, R., Trevathan, E., and Wheless, J.W. (1998). A multicenter study of the efficacy of the ketogenic diet. *Arch. Neurol.* 55, 1433-1437.
- Walton, K.G., Schneider, R.H., and Nidich, S. (2004). Review of controlled research on the transcendental meditation program and cardiovascular disease. Risk factors, morbidity, and mortality. *Cardiol. Rev* 12, 262-266.
- Watson, R.T., Furukawa, M., Chiang, S.H., Boeglin, D., Kanzaki, M., Saltiel, A.R., and Pessin, J.E. (2003). The exocytotic trafficking of TC10 occurs through both classical and nonclassical secretory transport pathways in 3T3L1 adipocytes. *Mol. Cell Biol* 23, 961-974.
- Welsh, G.I., Hers, I., Berwick, D.C., Dell, G., Wherlock, M., Birkin, R., Leney, S., and Tavaré, J.M. (2005). Role of protein kinase B in insulin-regulated glucose uptake. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 346-349.
- White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E413-E422.
- White, N.H. (2003). Management of diabetic ketoacidosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 4, 343-353.
- Wilkinson, J.H. and Robinson, J.M. (1974). Effect of ATP on release of intracellular enzymes from damaged cells. *Nature* 249, 662-663.
- Williams, S.B., Cusco, J.A., Roddy, M.A., Johnstone, M.T., and Creager, M.A. (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll. Cardiol.* 27, 567-574.

- Williamson,D.H., Bates,M.W., and Krebs,H.A. (1968). Activity and intracellular distribution of enzymes of ketone-body metabolism in rat liver. *Biochem. J* 108, 353-361.
- Williamson,J.R. (1966). Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J Biol Chem.* 241, 5026-5036.
- Williamson,J.R. and Cooper,R.H. (1980). Regulation of the citric acid cycle in mammalian systems. *FEBS Lett.* 117 *Suppl*, K73-K85.
- Williamson,J.R. and Krebs,H.A. (1961). Acetoacetate as fuel of respiration in the perfused rat heart. *Biochem. J* 80, 540-547.
- Wood,I.S. and Trayhurn,P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 89, 3-9.
- Woods,A., Johnstone,S.R., Dickerson,K., Leiper,F.C., Fryer,L.G., Neumann,D., Schlattner,U., Wallimann,T., Carlson,M., and Carling,D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol* 13, 2004-2008.
- Wright,D.C., Geiger,P.C., Holloszy,J.O., and Han,D.H. (2005). Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca²⁺-dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 288, E1062-E1066.
- Xi,X., Han,J., and Zhang,J.Z. (2001). Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 41029-41034.
- Xiang,S.Q., Cianflone,K., Kalant,D., and Sniderman,A.D. (1999). Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 40, 1655-1663.
- Xing,Y., Musi,N., Fujii,N., Zou,L., Luptak,I., Hirshman,M.F., Goodyear,L.J., and Tian,R. (2003). Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 28372-28377.
- Xu,Y., He,Z., and King,G.L. (2005). Introduction of hyperglycemia and dyslipidemia in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Curr. Diab. Rep.* 5, 91-97.
- Yamagata,M., Kitahara,H., Minami,S., Takahashi,K., Isobe,K., Moriya,H., and Tamaki,T. (1992). Mechanical stability of the pedicle screw fixation systems for the lumbar spine. *Spine* 17, S51-S54.
- Yamaguchi,S., Katahira,H., Ozawa,S., Nakamichi,Y., Tanaka,T., Shimoyama,T., Takahashi,K., Yoshimoto,K., Imaizumi,M.O., Nagamatsu,S., and Ishida,H. (2005). Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its

- glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* 289, E643-E649.
- Yang, J. and Holman, G.D. (2004). Insulin and contraction stimulate exocytosis but increased AMPK activity resulting from oxidative-metabolism stress slows endocytosis of GLUT4 in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.*
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dummler, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 350-354.
- Yokoo, H., Saitoh, T., Shiraishi, S., Yanagita, T., Sugano, T., Minami, S., Kobayashi, H., and Wada, A. (2003). Distinct effects of ketone bodies on down-regulation of cell surface insulin receptor and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp. Ther.* 304, 994-1002.
- Young, L.H., Coven, D.L., and Russell, R.R., III (2000). Cellular and molecular regulation of cardiac glucose transport. *J Nucl. Cardiol.* 7, 267-276.
- Young, L.H., Renfu, Y., Russell, R., Hu, X., Caplan, M., Ren, J., Shulman, G.I., and Sinusas, A.J. (1997). Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation* 95, 415-422.
- Yudkin, J.S., Stehouwer, C.D., Emeis, J.J., and Coppack, S.W. (1999). C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 19, 972-978.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R., and Nissim, I. (1997). Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J Neurochem.* 69, 682-692.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., and Nissim, I. (2001a). Brain amino acid metabolism and ketosis. *J Neurosci. Res* 66, 272-281.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., and Nissim, I. (2001b). Ketogenic diet, amino acid metabolism, and seizure control. *J Neurosci. Res* 66, 931-940.
- Yuen, V.G., Orvig, C., Thompson, K.H., and McNeill, J.H. (1993). Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can. J Physiol Pharmacol* 71, 270-276.
- Zhang, D.X., Fryer, R.M., Hsu, A.K., Zou, A.P., Gross, G.J., Campbell, W.B., and Li, P.L. (2001). Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic-reperfused myocardium of rats. *Basic Res Cardiol.* 96, 267-274.

- Zhang,J., Choi,Y., Mavromatis,B., Lichtenstein,A., and Li,W. (2003). Preferential killing of PTEN-null myelomas by PI3K inhibitors through Akt pathway. *Oncogene* 22, 6289-6295.
- Zhao,Q., Stafstrom,C.E., Fu,D.D., Hu,Y., and Holmes,G.L. (2004). Detrimental effects of the ketogenic diet on cognitive function in rats. *Pediatr. Res* 55, 498-506.
- Zhou,Y.T., Grayburn,P., Karim,A., Shimabukuro,M., Higa,M., Baetens,D., Orci,L., and Unger,R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1784-1789.
- Zierath,J.R., Tsao,T.S., Stenbit,A.E., Ryder,J.W., Galuska,D., and Charron,M.J. (1998). Restoration of hypoxia-stimulated glucose uptake in GLUT4-deficient muscles by muscle-specific GLUT4 transgenic complementation. *J Biol Chem.* 273, 20910-20915.
- Zimmerman,A.N., Meijler,F.L., and Hulsmann,W.C. (1962). The inhibitory effect of acetoacetate on myocardial contraction. *Lancet* 2, 757-758.
- Zimmet,P., Alberti,K.G., and Shaw,J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.
- Zorzano,A., Sevilla,L., Camps,M., Becker,C., Meyer,J., Kammermeier,H., Munoz,P., Guma,A., Testar,X., Palacin,M., Blasi,J., and Fischer,Y. (1997). Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol.* 80, 65A-76A.
- Zou,Z., Sasaguri,S., Rajesh,K.G., and Suzuki,R. (2002). dl-3-Hydroxybutyrate administration prevents myocardial damage after coronary occlusion in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 283, H1968-H1974.
- Zraika,S., Aston-Mourney,K., Laybutt,D.R., Kebede,M., Dunlop,M.E., Proietto,J., and Andrikopoulos,S. (2006). The influence of genetic background on the induction of oxidative stress and impaired insulin secretion in mouse islets. *Diabetologia*.

ANNEXE

**Accord des co-auteurs et permission de l'éditeur
pour les articles présentés dans cette thèse**

Annexe II

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

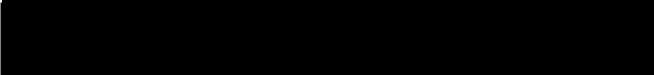
Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001 Dec, 281 (6): E1205-12.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

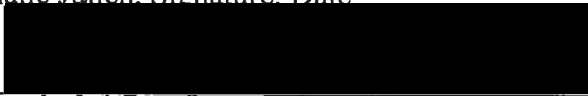
À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.


Annie Tardif, Signature, Date


30/03/2006


Nathalie Julien, Signature, Date

27/05/2006


Gaétan Thibault, Signature, Date

3/30/2006


Ashok K Srivastava, Signature, Date

3/30/2006


Jean-Louis-Chiasson, Signature, Date

1/6/2006


Lise Coderre, Signature, Date

5/6/2006

Annexe II

PERMISSION DE L'ÉDITEUR
Copyright permission

B) Permission de l'éditeur d'une revue ou d'un livre
Permission of the editor of a journal or a book

1. Identification de la revue
Identification of the journal

American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,
American Physiological Society
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3991
301-634-7164 (phone)
301-634-7241 (fax)

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs
Identification of the editor (s)

Dr. Michael Mueckler

3. Identification de l'article
Identification of the article

Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001 Dec, 281 (6): E1205-12.

L'étudiante Amélie Pelletier est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

The student Amélie Pelletier is authorized to reproduce the entire article stated above in her thesis untitled Régulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

Name, Signature, Date

THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY
9650 Rockville Pike-Bethesda, MD 20814-3991

Permission is granted for use of the material specified above provided the publication is credited as the source, including the words "used with permission."


Publications Manager & Executive Editor

APPROVED
By PRipka at 2:10 pm, 3/31/08

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Pelletier A, Tardif A, Gingras M-H, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K. Mol Cell Biochem 2005, soumis pour publication.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.


Annie Tardif, Date

05/02/2006


Marie-Èlène Gingras, Date

31/05/2006


Jean-Louis Chiasson, Date

1/6/2004


Lise Coderre, Date

16/05/2006

Date: Fri, 22 Dec 2006 09:25:13 +0100

De: "Permissions Europe/NL, Springer NL" <permissions.dordrecht@springer.com>

À: [REDACTED]

Objet: RE: Copyright permission request-pelletier

Dear Ms. Pelletier,

With reference to your request (copy herewith) to reprint material on which Springer Science and Business Media controls the copyright, our permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry.

This permission

- * allows you non-exclusive reproduction rights throughout the World.
- * permission includes use in an electronic form, provided that content is
- * password protected;
- * at intranet;
- * excludes use in any other electronic form. Should you have a specific project in mind, please reapply for permission.

* requires a full credit (Springer/Kluwer Academic Publishers book/journal title, volume, year of publication, page, chapter/article title, name(s) of author (s), figure number(s), original copyright notice) to the publication in which the material was originally published, by adding: with kind permission of Springer Science and Business Media.

* The material can only be used for the purpose of defending your dissertation, and with a maximum of 100 extra copies in paper.

Permission free of charge on this occasion does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

Kind regards,

Marion Wagenaar
Springer
Special Licensing Department

-
Van Godewijckstraat 30 / 3311 GX
Office number 04C16b
P.O.Box 17 / 3300 AA
Dordrecht / The Netherlands

tel + 31 (0) 78 657 6842
fax + 31 (0) 78 657 6300

permissions.dordrecht@springer.com

[REDACTED]
www.springeronline.com
www.springer.com

-----Original Message-----

From: servicel, Springer US
Sent: Tuesday, December 12, 2006 3:30 PM
To: Permissions Europe/NL, Springer NL
Subject: FW: Copyright permission request

-----Original Message-----

From: Amélie Pelletier [mailto: [REDACTED]]
Sent: Tuesday, December 12, 2006 9:28 AM
To: servicel, Springer US
Subject: Copyright permission request

Miss, Mr,

I'm a PhD student and I'm writing my thesis (dissertation). I want to include the entire paper entitled: Pelletier A, Tardif A, Gingras MH, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K. Mol Cell Biochem. 2006 Sep 8; [Epub ahead of print]

I need the permission of the Editor to add this paper in my thesis. In this form these information have to be included:

- 1- The name of the journal + the address + the date
- 2- The name of the editor (s)
- 3- Identification of the article (authors, title, volume, pages, ...)
- 4- It must be mentioned that this article will be included in Amélie Pelletier's thesis (PhD dissertation) untitled Régulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

I would like to know how I should process regarding this copyright permission. I already attached a suggested form from the University of Montreal that can be used if it is in agreement with your policy.

Sincelery,
Amélie Pelletier

--
Amélie Pelletier
Centre de recherche CHUM-Angus
Local 404
2901 Rachel Est
Montréal, Qc
H1W 4A4
Tél: 514-340-8222 ext 3906

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Pelletier A, Joly É, Prentki M, Coderre L. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2005 May, 146 (5): 2285-94.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

Marc Prentki, X [redacted] 27 mai 06
Coauteur, Signature, Date

Erik Joly [redacted] 27 mai 06
Coauteur, Signature, Date

LISE CODERRE [redacted] 5/06/2006
Coauteur, Signature, Date

Date: Mon, 27 Mar 2006 10:38:59 -0500

De: "Epps, Karen" [REDACTED]

À: [REDACTED]

Objet: Granted - Copyright Permission Request

 2 unnamed text/html 9.17 KB 

ï»¿ \v:* {behavior:url(#default#VML);} o:* {behavior:url(#default#VML);} w:* {behavior:url(#default#VML);} .shape {behavior:url(#default#VML);} st1:*{behavior:url(#default#ieooui) }

The Endocrine Society
8401 Connecticut Avenue, Suite 900
Chevy Chase, MD 20815-5817
Telephone: 301-941-0200
Fax: 301-941-0259
www.endo-society.org
TIN Number: 73-0531256

Form was submitted by: [REDACTED]

Original author to publish in a Dissertation.

Date: March 22, 2006

Reference Number:

Name: Amelie Pelletier

Organization: Montreal Diabetes Research Centre, Centre Hospitalier de l'Universite de Montreal

Department:

Address: 3840 St-Urbain

Pavillon Jeanne-Mance 7-135

City, State and Postal Code: Montreal, Quebec H2W 1T8

Country: Canada

Phone: 514-890-8000 #14797

Fax: 514-4127152

Email: [REDACTED]

Journal: Endocrinology

Author Name: Amelie Pelletier

Title: Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Participate in the Stimulation of Glucose Uptake by Dinitrophenol in Adult Cardiomyocytes

Year: 2005

Volume: 146

Page Range: 2285-94

Figure Reproduction:

Figure Number(s): 1, 2, 3, 4, 5, 6

Where will the figures appear:

- Dissertation

- Title: Regulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque

Additional Comments:

As discuss previously with Karen Epps, I need a permission to include the entire paper in my dissertation (thesis). I sent her a form which need to be included in my dissertation (thesis) with the signature of the editor. If it is possible, can you fax it to 514-412-7152. Thank you very much.

The Endocrine Society grants permission to reproduce the entire article stated above in your dissertation contingent upon the following conditions: 1) That you give proper credit to the author(s) and to include in your citation, the title of journal, title of article, volume, issue number, date, and page numbers. 2) That you include the statement *Copyright 2005, The Endocrine Society*. Please understand that permission is granted for one-time use only. Permission must be requested separately for future editions, revisions, translations, derivative works, and promotional pieces.

Name: Karen Epps
Title: Journal Publications Coordinator
Date: March 22, 2006

Annexe II

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

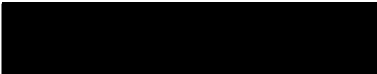
2. Description de l'article

Pelletier A, Coderre L. Ketone Bodies Alter Dinitrophenol-Induced Glucose Uptake Through AMPK Inhibition and Oxidative Stress Generation in Adult Cardiomyocytes, soumis pour publication.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

5 / 06 / 2006


Lise Coderre, Date

Annexe II

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001 Dec, 281 (6): E1205-12.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.


Annie Tardif, Signature, Date

30/03/2006


Nathalie Julien, Signature, Date


27/05/2006


Gaétan Thibault, Signature, Date

3/30/2006


Ashok K Srivastava, Signature, Date

3/30/2006


Jean-Louis-Chiasson, Signature, Date

1/6/2006


Lise Coderre, Signature, Date

5/6/2006

Annexe II

PERMISSION DE L'ÉDITEUR
Copyright permission

B) Permission de l'éditeur d'une revue ou d'un livre
Permission of the editor of a journal or a book

1. Identification de la revue
Identification of the journal

American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism,
American Physiological Society
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3991
301-634-7164 (phone)
301-634-7241 (fax)

2. Identification de l'éditeur ou des éditeurs
Identification of the editor (s)

Dr. Michael Mueckler

3. Identification de l'article
Identification of the article

Tardif A, Julien N, Pelletier A, Thibault G, Srivastava AK, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001 Dec, 281 (6): E1205-12.

L'étudiante Amélie Pelletier est autorisée à inclure l'article ci-dessus dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

The student Amélie Pelletier is authorized to reproduce the entire article stated above in her thesis untitled Régulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

Name, Signature, Date

THE AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY
9650 Rockville Pike-Bethesda, MD 20814-3991

Permission is granted for use of the material specified above provided the publication is credited as the source, including the words "used with permission."


Publications Manager & Executive Editor

APPROVED
By PRipka at 2:10 pm, 3/31/08

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Pelletier A, Tardif A, Gingras M-H, Chiasson JL, Coderre L. Chronic exposure to ketone bodies impairs glucose uptake in adult cardiomyocytes in response to insulin but not vanadate: the role of PI3-K. Mol Cell Biochem 2005, soumis pour publication.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant


À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

 05/02/2006

Annie Tardif, Date

 31/05/2006

Marie-Hélène Gingras, Date

 1/6/2004.

Jean-Louis Chiasson, Date

 16/05/2006

Lise Coderre, Date

Annexe II

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Pelletier A, Joly É, Prentki M, Coderre L. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 2005 May, 146 (5): 2285-94.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.

Marc Prentki, X [redacted] 27 mars 06
Coauteur, Signature, Date

Erik Joly [redacted] 27 mars 06
Coauteur, Signature, Date

LISE CODERRE [redacted] 5/04/2006
Coauteur, Signature, Date

Date: Mon, 27 Mar 2006 10:38:59 -0500

De: "Epps, Karen" [REDACTED]

À: amelie.pelletier@UMontreal.CA

Objet: Granted - Copyright Permission Request

 2 unnamed text/html 9.17 KB 

ï»¿ \:* {behavior:url(#default#VML);} o\:* {behavior:url(#default#VML);} w\:* {behavior:url(#default#VML);} .shape {behavior:url(#default#VML);} st1\:*{behavior:url(#default#ieooui) }

The Endocrine Society
8401 Connecticut Avenue, Suite 900
Chevy Chase, MD 20815-5817
Telephone: 301-941-0200
Fax: 301-941-0259
www.endo-society.org
TIN Number: 73-0531256

Form was submitted by: [REDACTED]

Original author to publish in a Dissertation.

Date: March 22, 2006

Reference Number:

Name: Amelie Pelletier

Organization: Montreal Diabetes Research Centre, Centre Hospitalier de l'Universite de Montreal
Department:

Address: 3840 St-Urbain

Pavillon Jeanne-Mance 7-135

City, State and Postal Code: Montreal, Quebec H2W 1T8

Country: Canada

Phone: 514-890-8000 #14797

Fax: 514-4127152

Email: [REDACTED]

Journal: Endocrinology

Author Name: Amelie Pelletier

Title: Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Participate in the Stimulation of Glucose Uptake by Dinitrophenol in Adult Cardiomyocytes

Year: 2005

Volume: 146

Page Range: 2285-94

Figure Reproduction:

Figure Number(s): 1, 2, 3, 4, 5, 6

Where will the figures appear:

- Dissertation

- Title: Regulation du transport de glucose par le beta-hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque

Additional Comments:

As discuss previously with Karen Epps, I need a permission to include the entire paper in my dissertation (thesis). I sent her a form which need to be included in my dissertation (thesis) with the signature of the editor. If it is possible, can you fax it to 514-412-7152. Thank you very much.

The Endocrine Society grants permission to reproduce the entire article stated above in your dissertation contingent upon the following conditions: 1) That you give proper credit to the author(s) and to include in your citation, the title of journal, title of article, volume, issue number, date, and page numbers. 2) That you include the statement *Copyright 2005, The Endocrine Society*. Please understand that permission is granted for one-time use only. Permission must be requested separately for future editions, revisions, translations, derivative works, and promotional pieces.

Name: Karen Epps
Title: Journal Publications Coordinator
Date: March 22, 2006

Annexe II

ACCORD DES COAUTEURS ET PERMISSION DE L'ÉDITEUR

A) Déclaration des coauteurs d'un article

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs à cet effet et joindre la déclaration signée à l'article en question. Une déclaration distincte doit accompagner chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

1. Identification de l'étudiant et du programme

Amélie Pelletier,
Ph.D. en Sciences biomédicales

2. Description de l'article

Pelletier A, Coderre L. Ketone Bodies Alter Dinitrophenol-Induced Glucose Uptake Through AMPK Inhibition and Oxidative Stress Generation in Adult Cardiomyocytes, soumis pour publication.

3. Déclaration de tous les auteurs autre que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Amélie Pelletier inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre Régulation du transport de glucose par le β -hydroxybutyrate dans le muscle cardiaque.


Lise Coderre, Date

5 / 06 / 2006

