

2M11.2715.9

Université de Montréal

Étude du rôle de l'interaction malonyl-CoA / carnitine palmitoyltransférase I (CPT I)
dans le contrôle de la sécrétion d'insuline.

par

Mélanie Béland

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Décembre, 1998

© Mélanie Béland, 1998



QH
506
U54
1999
V.008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude du rôle de l'interaction malonyl-CoA / carnitine palmitoyltransférase I (CPT I)
dans le contrôle de la sécrétion d'insuline.

présenté par:

Mélanie Béland

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Dominique Garrel : Président du jury
Dr Marc Prentki : Directeur de recherche
Dr Yves Langelier : Membre du jury

Mémoire accepté le: 99.05.12

SOMMAIRE

La nature exacte des facteurs de couplage qui relie le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline est méconnue. La fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP et une élévation de la concentration de calcium libre dans le cytoplasme sont des éléments clés de la voie de transduction des signaux de la cellule β -pancréatique. Toutefois, de nombreuses évidences suggèrent l'existence de voie(s) de signalisation indépendante(s) qu'il reste à identifier. Tout d'abord, les capacités anaplérotiques sont particulièrement élevées dans la cellule β et ce, en dépit d'une très faible activité lipogénique. L'augmentation de la concentration de malonyl-CoA induite suite au métabolisme du glucose provoque l'inhibition de la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I). Cette enzyme catalyse le transfert des acides gras à chaîne longue (AGCL) dans la mitochondrie, où ils sont oxydés. Des études ont permis de démontrer que l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA provoque une diminution de l'oxydation des AGCLs ainsi qu'une augmentation de leur estérification en lipides complexes. De plus, l'ajout d'acides gras exogènes entraîne une stimulation importante de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Par ailleurs, les résultats provenant d'études pharmacologiques indiquent que l'utilisation d'inhibiteurs de la CPT I suppriment l'oxydation des acides gras alors qu'ils potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. À l'opposé, l'inhibition de la synthèse du malonyl-CoA amène une stimulation de l'oxydation des acides gras accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline.

Basé sur ces observations, un modèle métabolique rendant compte de l'ensemble des effets des nutriments sur la sécrétion d'insuline a récemment été proposé. Ce dernier suggère l'existence d'une voie anaplérotique dans laquelle l'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT I jouerait un rôle important dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. En fait, l'hypothèse émise stipule que l'accumulation cytoplasmique de dérivés lipidiques actifs, résultant de l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA, potentialiserait la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré des adénovirus recombinants codant une protéine chimérique insensible au malonyl-CoA. Cette enzyme résulte de la fusion entre la séquence codant les 147 premiers acides aminés de la

CPT I et la séquence codant la CPT II insensible au malonyl-CoA, normalement présente dans la membrane interne de la mitochondrie. Ainsi, la fonction de la région CPT I consiste à localiser la CPT II à la surface de la membrane externe mitochondriale de manière à obtenir une activation constitutive de l'oxydation des acides gras. Par conséquent, cette stratégie nous a permis de contourner l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA et de ce fait, d'augmenter la capacité d'oxydation des acides gras bien que la concentration de glucose soit élevée.

L'étude visant à corréler le métabolisme des acides gras à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été réalisée dans la lignée cellulaire β -pancréatique INS-1. Les résultats obtenus indiquent que l'augmentation des capacités oxydatives, observée dans les cellules qui expriment la protéine chimérique, n'affecte pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose. De plus, la stimulation de la sécrétion d'insuline provoquée par l'ajout d'acides gras exogènes dans le milieu de culture, ne fait pas intervenir leur oxydation mitochondriale. Nous avons également pu démontrer que le mécanisme par lequel le 2-bromopalmitate potentialise la libération de l'insuline, est indépendant de son effet inhibiteur sur la CPT I. Finalement, la mesure de l'incorporation du palmitate dans les lipides totaux indique que la disponibilité du glycérol 3-phosphate ainsi que le niveau d'oxydation des acides gras ne régulent pas les processus d'estérification.

À la suite de ces constatations, il apparaît évident que le modèle métabolique proposé doit, en partie, être modifié. En effet, les résultats obtenus démontrent clairement que l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA n'est pas impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Il ne faut toutefois pas écarter la possibilité que le malonyl-CoA de même que les acides gras à chaîne longue ou leurs dérivés lipidiques, puissent malgré tout contrôler la sécrétion d'insuline.

Table des matières

Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
I. INTRODUCTION	1
A. L'homéostasie du glucose	1
1) La glycémie	1
2) Le pancréas	1
3) L'insuline	2
4) Le glucagon	2
5) L'état postprandial	3
6) L'état de jeûne	5
B. La pathologie du diabète	7
C. La sécrétion d'insuline	8
D. Le projet de recherche	10
1) Le modèle métabolique	10
2) Les arguments en faveur du modèle	11
3) Les cibles potentielles des acyl-CoAs à chaîne longue	14
4) La stratégie utilisée	16

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	19
A. Culture cellulaire	19
1) Lignée cellulaire INS-1	19
2) Lignée cellulaire 293	19
B. Production d'adénovirus recombinants par cotransfection de cellules 293 avec les plasmides pJM17 et pACCMV.pLpA	20
1) Principe	20
2) Procédure expérimentale	21
C. Amplification virale	24
D. Extraction de l'ADN viral	24
E. Analyse de L'ADN viral par Southern blot	25
1) Principe	25
2) Procédure expérimentale	26
F. Purification des adénovirus sur gradient de CsCl	28
G. Titration sur agar	29
H. Infection des cellules INS-1	29
I. Mesure de la capacité d'oxydation des acides gras	30
1) Principe	30
2) Incubation des cellules INS-1	30
3) Traitement des échantillons	31
4) Procédure expérimentale	31
5) Calculs	32

J. Mesure de l'estérification des acides gras	33
1) Principe	33
2) Incubation des cellules INS-1	33
3) Traitement des échantillons	34
4) Procédure expérimentale	34
5) Calculs	35
K. Dosage de l'insuline	35
1) Principe	35
2) Incubation des cellules INS-1	35
3) Traitement des échantillons	36
4) Procédure expérimentale	37
III. RÉSULTATS	39
A. Analyse de l'ADN du virus recombinant	39
B. Effet de la protéine chimérique sur la capacité d'oxydation des acides gras	40
C. Étude de l'action du 2-bromopalmitate sur l'activité de la protéine chimérique ...	42
D. Effet d'une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras sur la sécrétion d'insuline	44
E. Effet des acides gras exogènes sur la sécrétion d'insuline	46
F. Effet de la protéine chimérique sur l'estérification des acides gras	48
IV. DISCUSSION	50
V. RÉFÉRENCES	56

Liste des tableaux

Tableau I	Conditions expérimentales de l'oxydation des acides gras	31
Tableau II	Conditions expérimentales de l'estérification des acides gras	33
Tableau III	Conditions expérimentales de la sécrétion d'insuline	36

Liste des figures

Figure 1	L'îlot de Langerhans du pancréas	2
Figure 2	Les effets biologiques engendrés par l'activation du récepteur à l'insuline	3
Figure 3	La voie dépendante de l'ATP et du calcium	9
Figure 4	Modèle métabolique illustrant le rôle putatif de l'interaction malonyl-CoA / carnitine palmitoyltransférase I dans le contrôle de la sécrétion d'insuline	11
Figure 5	Les cibles potentielles des acyl-CoAs à chaîne longue	15
Figure 6	Les trois étapes de l'oxydation mitochondriale des acides gras	16
Figure 7	Stratégie utilisée afin de permettre une augmentation de la capacité d'oxydation mitochondriale des acides gras	18
Figure 8	Production d'adénovirus recombinants par cotransfection de cellules 293 avec les plasmides pJM17 et pACCMV.pLpA	23
Figure 9	Transfert capillaire de l'ADN sur un support solide	26
Figure 10	Schéma illustrant la procédure utilisée afin de mesurer la capacité d'oxydation des acides gras	32
Figure 11	Détection du fragment Nter.CPT I/CPT II dans le génome de l'adénovirus CPT I/CPT II	39
Figure 12	La capacité d'oxydation du palmitate est augmentée de manière spécifique dans les cellules qui expriment la protéine chimérique	41
Figure 13	L'activité de la protéine chimérique est indépendante de l'action du 2- bromopalmitate	43
Figure 14	La sécrétion d'insuline induite par le glucose n'est pas affectée par une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras	45
Figure 15	La stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras exogènes ne fait pas intervenir leur oxydation mitochondriale	47
Figure 16	L'action du glucose sur les processus d'estérification est indépendante de l'oxydation mitochondriale des acides gras	49

Liste des abréviations

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADP	Adénosine-diphosphate
AGCL	Acide gras à chaîne longue
AMPc	Adénosine-monophosphate cyclique
ATP	Adénosine-triphosphate
BBS	BES-buffered solution
BrP	Bromopalmitate
BSA	Bovine serum albumin
CAT	Carnitine acyl-carnitine translocase
CL	Citrate lyase
CoA	Coenzyme A
CPT I	Carnitine palmitoyltransférase I
CPT II	Carnitine palmitoyltransférase II
DAG	Diacylglycérol
FCS	Fetal calf serum
GK	Glucokinase
G6P	Glucose 6-phosphate
MCD	Malonyl-CoA décarboxylase
MBS	Modified bovine serum
OAA	Oxaloacétate
ONS	Oxyde nitrique synthétase
PC	Pyruvate carboxylase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
pfu	Plaque-forming units
PBS	Phosphate-buffered saline
KRB	Krebs-ringer bicarbonate
VLDL	Very low density lipoprotein

*À ma mère, Louise,
pour sa confiance sans fin ainsi que
pour m'avoir permis de recevoir l'éducation
sans laquelle la rédaction de ce mémoire
n'aurait pu être possible.*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Marc Prentki pour m'avoir reçu dans son laboratoire ainsi que pour m'avoir permis de travailler sur un projet de recherche aussi passionnant. De plus, je désire remercier le Dr Stéphane Thumelin avec qui ce fût un grand plaisir de travailler. Je souhaite aussi remercier le Dr Raphaël Roduit pour ses nombreux conseils judicieux, particulièrement dans le domaine de l'informatique! Finalement je remercie toute l'équipe du laboratoire Prentki pour avoir rempli mes deux années de maîtrise, de moments inoubliables. Le temps passe si vite...

I. INTRODUCTION

A. L'homéostasie du glucose

1) La glycémie

Afin de remplir leurs fonctions respectives, les cellules du corps consomment de l'énergie. Dans la plupart des cas, celle-ci peut être obtenue suite au métabolisme des différents nutriments provenant de l'alimentation. Toutefois, certaines cellules comme celles du cerveau, de la rétine et de l'épithélium germinale des gonades n'utilisent que le glucose comme combustible. Il est donc important que la glycémie (concentration de glucose dans le sang) soit suffisamment élevée pour permettre l'apport énergétique nécessaire au fonctionnement normal de ces cellules. À l'opposé, la glycémie ne doit pas être trop élevée puisque la pression osmotique exercée par une concentration excessive de glucose extracellulaire risque de causer la déshydratation des cellules. Ainsi, dans le but de prévenir un déséquilibre homéostatique, la glycémie doit être maintenue à un niveau stable (entre 5 et 5.5mM). Cette fonction est assurée par la sécrétion d'hormones pancréatiques (Guyton & Halls, 1996).

2) Le pancréas

Le pancréas est un organe possédant à la fois une activité exocrine et une activité endocrine. La portion exocrine du pancréas représente de 80 à 85% de l'organe. Elle est constituée de cellules acineuses qui produisent un suc digestif riche en enzymes. Ces enzymes participent à la dégradation des glucides, lipides et protéines. Le suc pancréatique est sécrété dans la lumière du duodénum. La portion endocrine du pancréas est formée d'amoncellements de cellules, appelés îlots de Langerhans. Ces derniers, au nombre d'environ 1 million, sont considérés comme des micro-organes chargés de détecter la concentration des nutriments dans le sang afin de permettre une sécrétion hormonale adaptée aux besoins de l'organisme. Les trois types fondamentaux de cellules qui forment l'îlot sont

β , α et δ (**Figure 1**). Elles représentent environ 70%, 20% et 10%, respectivement, de la population cellulaire de l'îlot. Les principales caractéristiques qui permettent la distinction entre les différents types cellulaires sont leur localisation ainsi que leur contenu hormonal. Les cellules β sont situées dans la région centrale de l'îlot et sécrètent l'insuline. Elles sont entourées par les cellules α , qui sécrètent le glucagon, et les cellules δ qui sécrètent la somatostatine.

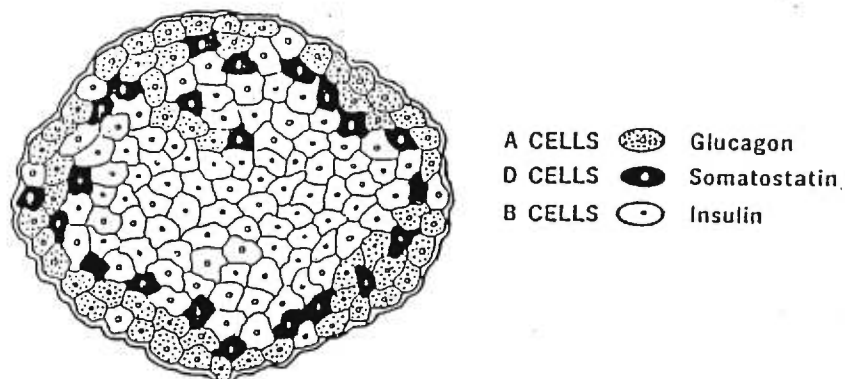


Figure 1 : L'îlot de Langerhans du pancréas.
(Tiré de Orci & Unger, 1975)

3) L'insuline

L'insuline est une protéine de 5.8 kDa constituée de deux chaînes polypeptidiques liées l'une à l'autre par deux ponts disulfures. Elle est synthétisée dans la cellule β -pancréatique sous forme de précurseur et doit subir une série de modifications dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans l'appareil de Golgi avant d'être stockée dans des granules de sécrétion. Comme il s'agit d'une hormone hypoglycémisante, elle est sécrétée lorsque la concentration de glucose sanguin est supérieure à 3mM.

4) Le glucagon

Le glucagon est un polypeptide de 3.5 kDa composé d'une seule chaîne de 29 acides aminés. Contrairement à l'insuline, le glucagon est une hormone aux propriétés hyperglycémisantes. Elle est sécrétée par les cellules α du pancréas lorsque la concentration de glucose dans le sang est inférieure à 18mM (pancréas perfusé) ou 10mM (îlots).

5) L'état postprandial

Durant la première heure après un repas, la glycémie est augmentée. Ceci représente un stimulus important pour les cellules β -pancréatiques qui libèrent aussitôt leur sécrétion dans la circulation sanguine. Les nombreux effets reliés à la sécrétion d'insuline sont observés suite à la liaison de la molécule à son récepteur membranaire, présent à la surface des cellules cibles. Le récepteur à l'insuline comporte deux sous unités α (extracellulaires) et deux sous unités β (intracellulaires). L'union des quatre sous unités est assurée par la formation de ponts de type disulfure. L'interaction de l'insuline avec les sous unités α entraîne l'autophosphorylation des sous unités β sur les résidus de tyrosine. Le récepteur ainsi activé possède une fonction tyrosine kinase lui permettant de phosphoryler une protéine appelée IRS-1. Ceci permet l'ancrage, à IRS-1, de protéines possédant des groupements SH2 telles la PI-3 kinase et GRB2. Par la suite, une cascade de phosphorylation / déphosphorylation de plusieurs protéines conduit à la manifestation des effets biologiques de l'hormone (Khan, 1994) (figure 2).

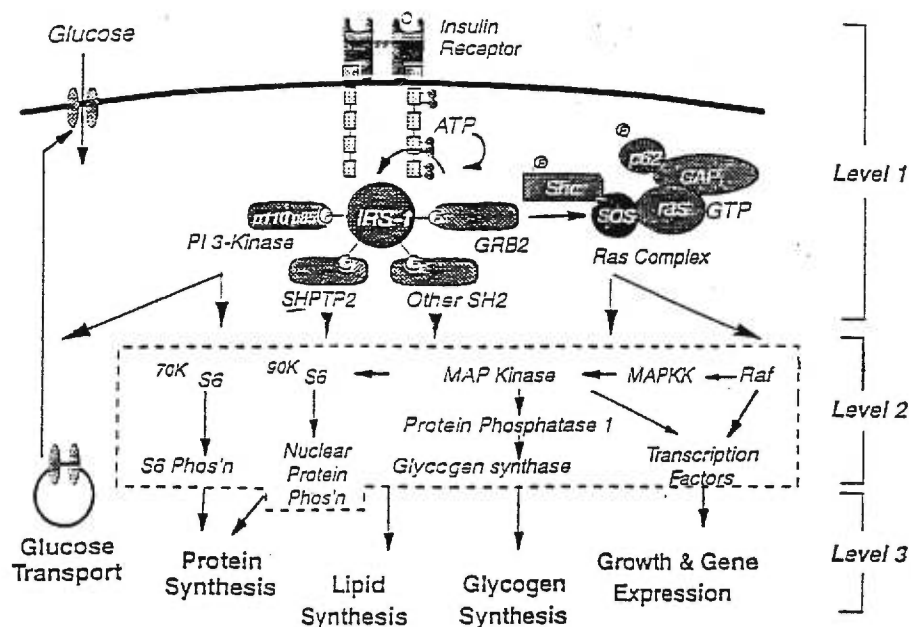


Figure 2 : Les effets biologiques engendrés par l'activation du récepteur à l'insuline.
(Tiré de Kahn, 1994)

Les effets de l'insuline sont particulièrement importants dans le foie, le muscle et le tissu adipeux. D'une façon générale, la diminution de la glycémie est causée par une augmentation de la perméabilité membranaire des cellules cibles au glucose. Ceci est surtout vrai pour les cellules musculaires et adipocytaires dans lesquelles le glucose pénètre grâce à un transporteur dépendant de l'insuline. Dans ces cellules, l'action de l'insuline est requise pour permettre le recrutement des transporteurs, de type Glut-4, à la surface de la membrane cytoplasmique. Toutefois, l'insuline n'accélère pas l'entrée du glucose dans les hépatocytes puisque ces derniers sont pourvus de transporteurs indépendants de l'action de l'insuline, appelés Glut-2.

Dans le foie, la majorité du glucose absorbé est converti en glycogène (glycogénèse). La régulation de ce processus par l'insuline débute par l'activation de la glucokinase qui phosphoryle le glucose dès son entrée dans l'hépatocyte. Sous cette forme, le glucose est incapable de rediffuser vers la circulation sanguine. De plus, l'insuline inactive la glucose 6-phosphatase, catalysant la réaction inverse de la glucokinase. Les enzymes directement impliquées dans l'anabolisme et le catabolisme du glycogène sont également régulées par l'insuline. En effet, l'hormone stimule l'activité de la glycogène synthétase, catalysant la formation du glycogène, alors qu'elle inhibe celle de la phosphorylase hépatique, responsable de la dégradation du glycogène en glucose 1-phosphate. Néanmoins, la capacité du foie à emmagasiner le glycogène est limitée (5 à 6% de sa masse). C'est pourquoi l'insuline stimule aussi la conversion de l'excès de glucose en acides gras. Pour ce faire, le glucose est d'abord oxydé dans la voie glycolytique. Celle-ci consiste en suite de réactions enzymatiques menant à la formation de deux molécules de pyruvate par molécule de glucose. Dans la mitochondrie, la carboxylation du pyruvate par la pyruvate carboxylase augmente le niveau des intermédiaires du cycle de Krebs ce qui provoque la fuite du citrate vers le cytoplasme. Grâce à l'action de l'ATP citrate lyase, le citrate est converti en acétyl-CoA. Par la suite, l'enzyme acétyl-CoA carboxylase, dont l'activité est stimulée par le glucose, catalyse la formation de malonyl-CoA. Celui-ci sert de substrat à l'acide gras synthétase afin de produire des acides gras à chaîne longue (14 à 18 carbones). Les triglycérides sont ensuite synthétisés à partir d'une molécule de glycérol 3-phosphate, un monosaccharide à trois carbones issu de la glycolyse, sur laquelle sont branchés trois acides gras à chaîne longue. Ces réactions

d'estérification sont catalysées par plusieurs enzymes spécifiques. En dernier lieu, les triglycérides sont transportés jusqu'au tissu adipeux par des VLDLs.

Dans la paroi des capillaires du tissu adipeux, l'insuline stimule la lipoprotéine lipase permettant ainsi la dégradation des triglycérides en acides gras. L'activation de cette enzyme est essentielle puisque les triglycérides sont incapables de franchir la membrane plasmique des adipocytes. Une fois dans le cytoplasme, les acides gras sont à nouveau convertis en triglycérides. L'apport en glycérol 3-phosphate est assuré par l'oxydation du glucose capté, dans la voie glycolytique. Finalement, la dégradation des triglycérides est prévenue par l'action inhibitrice de l'insuline sur la lipase hormono-sensible.

Le glucose capté par le muscle est d'abord utilisé pour remplir les besoins énergétiques immédiats des cellules qui le composent. La dégradation du glucose, par la glycolyse et le cycle de Krebs, entraîne la production de 38 molécules d'ATP par molécule de glucose. Lorsque la quantité de glucose disponible excède la quantité nécessaire pour combler les besoins cellulaires immédiats, le surplus est converti en glycogène par l'enzyme glycogène synthétase. Ces réserves pourront ensuite être utilisées lors d'une activité musculaire intense nécessitant un apport rapide d'énergie.

Outre son rôle dans le métabolisme des lipides et des glucides, l'insuline influence également le métabolisme des protéines. Notamment, elle accélère l'entrée des acides aminés dans les cellules et stimule la synthèse des protéines. De plus, elle inhibe la plupart des enzymes hépatiques impliquées dans la néoglucogénèse, processus par lequel les acides aminés sont convertis en glucose.

6) L'état de jeûne

Entre les repas, l'abaissement du glucose sanguin cause une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques. Ainsi, tous les effets résultant de l'action de l'insuline sont renversés. Un des plus importants est probablement la stimulation de la lipolyse adipocytaire suite à laquelle les acides gras libres deviennent le principale substrat

énergétique utilisé par la majorité des cellules de l'organisme. La mobilisation des acides gras est causée par la levée de l'inhibition de la lipase hormono-sensible. Dans la circulation, les acides gras sont transportés par une protéine plasmatique, appelée albumine. L'oxydation mitochondriale des acides gras par les cellules cibles entraîne alors la production d'une quantité considérable d'énergie. La suite des événements qui caractérisent l'oxydation des acides gras est décrite de façon précise dans la section portant sur le modèle métabolique de la sécrétion d'insuline que nous avons testé (voir plus bas).

En plus des effets reliés à la diminution de l'insuline, la période de jeûne est également marquée par une augmentation de la sécrétion du glucagon par les cellules α du pancréas. Cette sécrétion est stimulée par la diminution de la glycémie.

Le foie est la principale cible du glucagon. Son action dans cet organe consiste à stimuler la glycogénolyse afin de remettre le glucose en circulation. Le récepteur du glucagon n'est pas aussi bien caractérisé que celui de l'insuline mais on sait cependant qu'il est couplé à un système de seconds messagers. Comme ce dernier permet une amplification marquée des signaux de transduction, il n'est pas surprenant de constater qu'une faible concentration sanguine de glucagon provoque des effets puissants sur la régulation de la glycémie. Le glucagon stimule d'abord l'activation de l'adénylate cyclase, l'enzyme qui catalyse la formation d'AMPc. La production massive de ce second messenger permet la régulation d'un certain nombre de protéines cytoplasmiques, dont les protéines kinases. L'une d'entre elles, la phosphorylase kinase, catalyse la conversion de la phosphorylase b en phosphorylase a. Dans sa conformation active, cette enzyme est maintenant apte à stimuler la dégradation du glycogène en glucose 1-phosphate. Étant donné la faible concentration de l'insuline, la glucose 6-phosphatase est activée et le glucose déphosphorylé peut être relargué dans la circulation sanguine (Guyton & Halls, 1996).

Le glucagon promeut également la néoglucogénèse hépatique. En effet, l'accroissement prolongée des niveaux d'AMPc stimule l'activation de la transcription du gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, une enzyme qui catalyse l'étape limitante de la formation du phosphoénolpyruvate à partir de l'oxaloacétate (Horton et al., 1993).

B. La pathologie du diabète

Le diabète mellitus est un désordre métabolique résultant de l'absence, de l'insuffisance ou de l'inefficacité de l'insuline. Il se traduit par une diminution de l'absorption du glucose par les cellules de l'organisme entraînant une élévation de la glycémie à jeun à des valeurs supérieures à 7mM. Contrairement aux individus normaux, chez qui la glycémie retourne à une valeur normale à l'intérieur des deux heures qui suivent la prise alimentaire, les personnes diabétiques ont une glycémie postprandiale nettement plus élevée qui met jusqu'à six heures avant de revenir à sa valeur contrôle (Guyton & Halls, 1996). Ce phénomène auquel on fait référence sous le nom d'intolérance au glucose, représente un critère important permettant le diagnostic du diabète. Comme ces individus sont incapables d'utiliser le glucose de façon appropriée, les besoins énergétiques nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme doivent être comblés par le métabolisme des lipides et des protéines. L'augmentation accrue des acides gras circulants, due à la stimulation de la lipolyse adipocytaire, permet aux cellules d'utiliser l'énergie engendrée par leur oxydation mitochondriale. Toutefois, l'oxydation exagérée des acides gras produit également des acides organiques, nommés corps cétoniques, dont l'accumulation a pour effet de diminuer le pH sanguin (acidocétose). Par ailleurs, la dégradation des protéines tissulaires en acides aminés, en vue de leur utilisation subséquente comme substrat énergétique, a pour effet de réduire la masse musculaire. Ainsi le diabète est un syndrome qui se caractérise par une perturbation du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines.

Le diabète mellitus compte parmi les dix premières causes de décès en Amérique du Nord. Il existe sous deux formes: le diabète insulino-dépendant (type I) et le diabète non insulino-dépendant (type II). On les distingue principalement par leurs caractéristiques cliniques et étiologiques.

Le diabète de type I représente 10% des cas de diabète. Il se développe généralement durant l'adolescence et se caractérise par une absence totale d'insuline. Ainsi, les patients qui en sont atteints doivent s'administrer plusieurs doses quotidiennes d'insuline. La cause de cette maladie est liée à la destruction des cellules β -pancréatiques par le système

immunitaire. La contribution des facteurs génétiques au développement de cette pathologie est particulièrement documentée. Il semblerait qu'une susceptibilité génétique liée à des allèles spécifiques du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (HLA-D) puisse prédisposer certains individus à développer une réaction auto-immune dirigée contre les antigènes des cellules β . Plusieurs agents environnementaux, comme les virus et les toxines, sont également à l'origine de ce type de diabète (Montague, 1983; Cotran et al., 1994).

Le diabète de type II est beaucoup plus fréquent. Il survient généralement après l'âge de 40 ans et il est fortement associé à l'obésité. Le traitement est plutôt simple et consiste souvent en une diète contrôlée, couplée à un exercice physique régulier. Le stade précoce de la maladie est caractérisé par une augmentation de la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. Néanmoins, la résistance à elle seule n'est pas suffisante pour causer une hyperglycémie puisque les cellules β -pancréatiques la compensent en sécrétant une plus grande quantité d'insuline. La progression du diabète vers un stade plus avancé est marquée par une réduction de la masse des cellules β -pancréatiques ainsi que par une diminution de leur capacité à répondre au glucose. La perte de l'effet compensatoire qui en découle mène à l'hyperglycémie. L'hérédité est le facteur prédominant de cette maladie. Plusieurs agents environnementaux y sont également associés, mais dans une moindre mesure.

C. La sécrétion d'insuline

La cellule β -pancréatique présente un caractère unique qui la distingue des autres types cellulaires. Son activité est modulée non seulement par des agents neurohormonaux tels que la somatostatine, la galanine, l'adrénaline et le glucagon, mais aussi, et surtout, par des nutriments comme le glucose, les acides gras et certains acides aminés. Les systèmes de transduction utilisés par ces deux classes d'agonistes diffèrent considérablement. Alors que l'action des neuromodulateurs résulte de l'interaction entre l'agoniste et son récepteur membranaire, la sécrétion d'insuline induite par les nutriments nécessite leur métabolisme intracellulaire (Malaisse et al., 1979; Hedekov, 1980; Prentki & Matschinsky, 1987; Porte, 1991).

La nature biochimique des événements qui mènent à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est pas bien connue. La suite des événements proximaux est néanmoins largement documentée (**Figure 3**). La diffusion du glucose dans la cellule β -pancréatique est facilitée par la protéine membranaire Glut-2 qui est aussi exprimée dans les cellules du foie (Thorens et al., 1988). La phosphorylation du glucose par l'enzyme glucokinase permet sa capture définitive dans le cytoplasme puisque la glucose 6-phosphatase n'est que très peu exprimée dans les cellules β . L'oxydation subséquente du glucose dans la voie glycolytique génère deux molécules de pyruvate. Celles-ci sont utilisées dans la mitochondrie comme substrat pour deux réactions distinctes. Dans la première, la pyruvate déshydrogénase catalyse la formation d'acétyl-CoA. Dans la seconde, le pyruvate est converti en oxaloacétate sous l'action de l'enzyme pyruvate carboxylase. L'activation de ces voies métaboliques entraîne une augmentation de la production d'acétyl-CoA et des intermédiaires du cycle de Krebs et par conséquent, une élévation du rapport ATP/ADP cytoplasmique. Ceci provoque ensuite la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Cook & Hales, 1984; Rorsman & Trube, 1985), la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée du calcium dans le cytoplasme contribue finalement à l'exocytose des granules de sécrétion qui contiennent l'insuline.

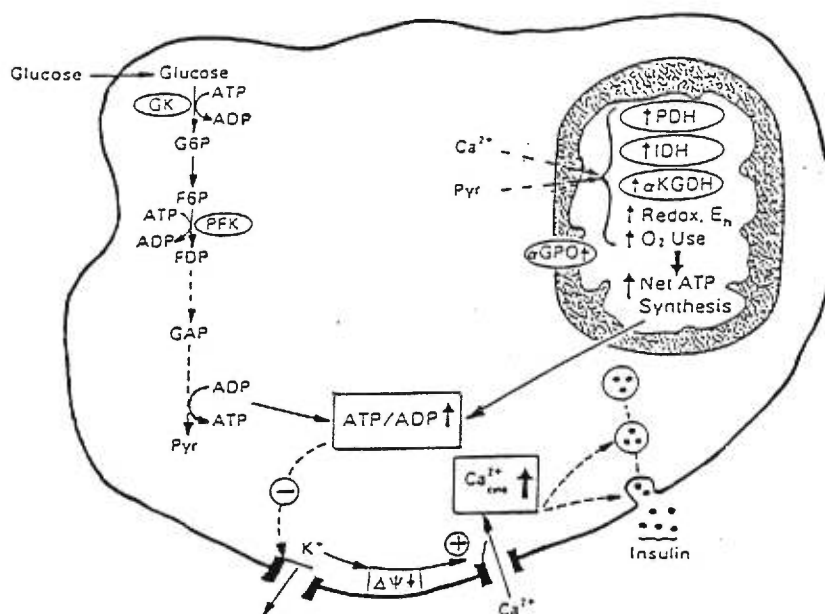


Figure 3 : La voie dépendante de l'ATP et du calcium.
(Tiré de Prentki, non publié)

Plusieurs études ont toutefois démontré que le glucose contrôle aussi la sécrétion d'insuline indépendamment de son action sur les canaux potassiques sensibles à l'ATP. Les expériences menées par Gembal et ses collaborateurs (Gembal et al., 1992) indiquent que la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose demeure intacte dans des conditions où la fermeture des canaux potassiques est prévenue par l'utilisation de diazoxide. Ce processus requiert cependant une élévation du calcium intracellulaire.

Par conséquent, même si l'ATP et le calcium sont des éléments clés dans la transduction des signaux de la cellule β , le mécanisme par lequel le glucose induit la sécrétion d'insuline fait intervenir une ou plusieurs autres voies indépendantes qui demeurent, à ce jour, mal connues.

D. Le projet de recherche

1) Le modèle métabolique

L'identification des facteurs de couplage métabolique impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'insuline fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. Une hypothèse, formulée par Prentki et Corkey, suggère l'existence d'une voie anaplérotique dans laquelle le malonyl-CoA et les acyl-CoAs à chaîne longue occuperaient une fonction importante dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Prentki & Matschinsky, 1987; Corkey et al., 1989; Prentki et al., 1991; Prentki et al., 1992; Brun et al., 1992). Les différentes étapes de ce modèle métabolique sont représentées à la **Figure 4**.

Le glucose est d'abord métabolisé sous la forme de pyruvate dans la voie glycolytique. L'action des enzymes mitochondriales, pyruvate carboxylase et pyruvate déshydrogénase, favorise la conversion du pyruvate en oxaloacétate et acétyl-CoA, respectivement. L'anaplérose résultant de l'augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs provoque, en plus de l'élévation du rapport ATP/ADP, la fuite du citrate dans le cytoplasme. Par la suite, l'ATP citrate lyase (CL) catalyse la formation d'acétyl-CoA à partir du citrate. Le malonyl-CoA est enfin produit via la carboxylation de l'acétyl-CoA par l'enzyme acétyl-CoA

carboxylase (ACC). En plus de servir comme substrat dans les réactions de synthèse des lipides (estérification), ce métabolite possède également la capacité d'inhiber la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I), une enzyme mitochondriale qui catalyse l'étape limitante du transfert des acides gras à chaîne longue dans la mitochondrie où ils sont oxydés.

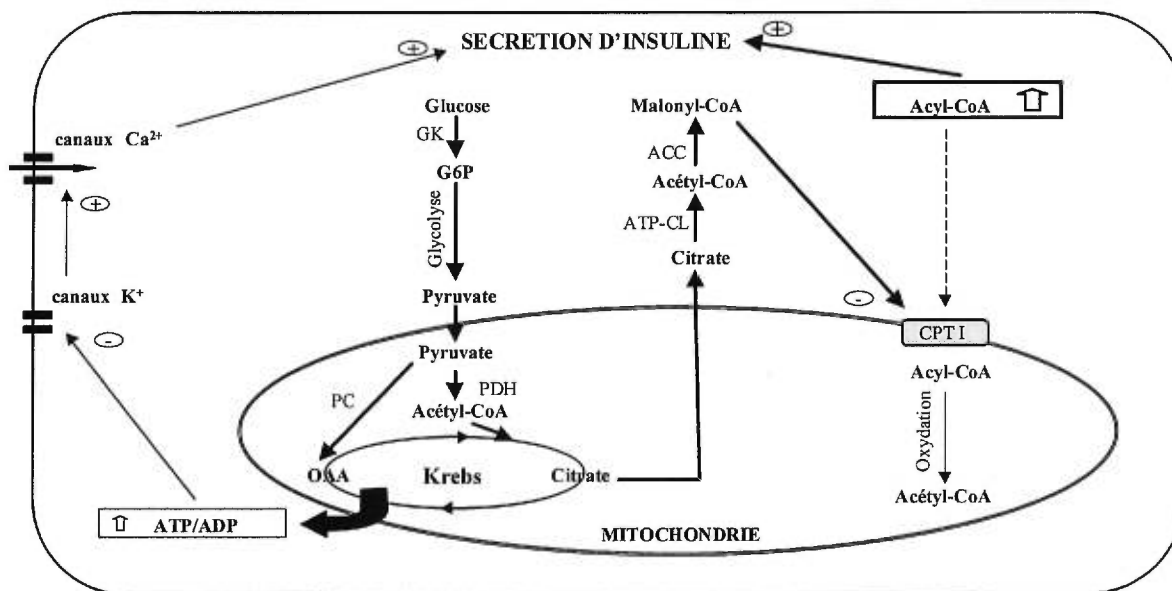


Figure 4 : Modèle métabolique illustrant le rôle putatif de l'interaction malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransférase I dans le contrôle de la sécrétion d'insuline.

Selon l'hypothèse émise, l'accumulation cytoplasmique des acyl-CoAs à chaîne longue, résultant de l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA potentialiserait la sécrétion d'insuline induite par le glucose soit directement, soit indirectement via la formation de lipides complexes. Ainsi, le malonyl-CoA agirait en tant que molécule régulatrice afin de contrôler la disponibilité de molécules effectrices, les acyl-CoAs.

2) Les arguments en faveur du modèle

Plusieurs études dans le domaine de la sécrétion d'insuline ont permis de démontrer l'importance du modèle proposé. Effectivement, les arguments en faveur d'un rôle comme facteurs de couplage métabolique pour le malonyl-CoA et les acyl-CoAs dans le contrôle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, s'accroissent et méritent notre considération.

Les capacités anaplerotiques sont particulièrement élevées dans la cellule β (MacDonald, 1993). Elles sont associées à une forte expression de l'enzyme pyruvate carboxylase (Ashcroft & Randle, 1970; Curi et al., 1991; MacDonald et al., 1992; Brun et al., 1996). Les tissus qui font de la néoglucogénèse ainsi que de la lipogénèse expriment également cette enzyme en grande quantité. Cependant, les cellules β -pancréatiques ne font pas de néoglucogénèse (MacDonald et al., 1992) et ne possèdent qu'une activité lipogénique limitée (Sener & Malaisse, 1991; Brun et al., 1996). Ces données semblent donc indiquer que l'anaplerose rempli d'autres fonctions dans la transduction des signaux de la cellule β . Parmi celles-ci on note l'élévation du rapport ATP/ADP, essentiel à la fermeture des canaux potassiques, et la production de citrate, le précurseur du malonyl-CoA.

Lorsqu'il est produit en abondance, le citrate s'échappe de la mitochondrie. C'est d'ailleurs suite à la stimulation de cellules β par le glucose que les concentrations cytoplasmiques de citrate sont augmentées (Brun et al., 1996). La synthèse du malonyl-CoA est ensuite favorisée par la présence du citrate. En effet, ce dernier stimule l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase, l'enzyme qui catalyse la formation du malonyl-CoA. En accord avec cet énoncé, des études ont démontré que cette enzyme est exprimée à des niveaux appréciables dans les cellules β et que son activité est fortement stimulée par le glucose (Louis & Witters, 1992; Brun et al., 1996).

L'étape limitante de la biosynthèse des acides gras est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase. Toutefois, les cellules β ne font que très peu de lipogénèse. Ceci est principalement dû au fait que l'acide gras synthétase, l'enzyme qui utilise le malonyl-CoA pour en faire des acides gras, est faiblement exprimée dans ces cellules (Brun et al., 1996). Pourtant, il a déjà été établi que le glucose induit une augmentation rapide de malonyl-CoA et ce, avant même que la sécrétion d'insuline n'ait eu lieu (Corkey et al., 1989). De ce fait, l'accumulation du malonyl-CoA dans le cytoplasme semble remplir des fonctions indépendantes de la synthèse lipidique.

Les cellules β -pancréatiques au repos (non stimulées par le glucose) utilisent les lipides comme principal substrat énergétique (Malaisse et al., 1983). Toutefois lorsqu'elles sont

stimulées par des concentrations de glucose requises pour induire la sécrétion d'insuline, l'oxydation des acides gras est inhibée (Berne, 1975; Sener & Malaisse, 1984; Tamarit-Rodriguez et al., 1984; Vara & Tamarit-Rodriguez, 1986). Ainsi le glucose semble induire un changement dans le type de combustible utilisé pour produire de l'énergie. Dans les tissus cibles de l'insuline, particulièrement le foie, la suppression de l'oxydation des acides gras résulte de l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA (McGarry & Foster, 1979; McGarry & Foster, 1980). L'enzyme CPT I qui est bien exprimée par les îlots de Langerhans, possède une activité pouvant aussi être inhibée par le malonyl-CoA (Shrago et al., 1986). De plus, l'inhibition de l'oxydation des acides gras dans la cellule β , est associée à une augmentation de leur estérification en lipides (Berne, 1975; Berne, 1975; Tamarit-Rodriguez et al., 1984; Vara & Tamarit-Rodriguez, 1986; Corkey et al., 1989). Ces évidences viennent donc renforcer l'hypothèse selon laquelle le malonyl-CoA aurait pour fonction de réguler la disponibilité des acyl-CoAs.

L'ajout d'acides gras à chaîne longue dans les milieux d'incubation d'îlots pancréatiques isolés a pour effet de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Tamarit-Rodriguez et al., 1984; Vara et al., 1988). Les mêmes résultats ont été obtenus dans la lignée cellulaire β -pancréatique HIT (Prentki et al., 1992). De plus, il apparaît important de mentionner que l'effet stimulateur des acides gras requiert la présence du glucose. Cette observation supporte le modèle puisque le métabolisme du glucose fournit l'énergie nécessaire au processus de sécrétion et provoque l'accumulation cytoplasmique du malonyl-CoA, permettant l'inhibition de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Les travaux de recherche effectués par Stein et ses collègues (Stein et al., 1996) ont démontré que non seulement, les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose, mais ils y sont aussi essentiels. Dans cette étude, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est pas modifiée selon qu'il s'agisse de rats nourris ou à jeun depuis plusieurs heures (18-24h). Toutefois, lorsque les auteurs administrent une drogue antilipolytique (acide nicotinique) aux deux groupes d'animaux, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est inhibée chez les rats à jeun alors qu'elle n'est pas affectée chez les rats nourris. Ainsi les acides gras libres circulants font synergie avec le glucose pour permettre une sécrétion d'insuline efficace. Ces données reflètent bien la valeur du concept selon lequel, à l'état de jeûne, les acides gras

circulants sont élevés et rapidement oxydés dans la mitochondrie. À l'opposé, la période postprandiale favorise l'utilisation du glucose et l'accumulation des acides gras dans le cytoplasme de la cellule β , vu l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA.

D'autres données en faveur du modèle proviennent d'études pharmacologiques qui indiquent, entre autres, que l'utilisation d'inhibiteurs de la CPT I, comme le 2-bromopalmitate, suppriment l'oxydation des acides gras alors qu'ils potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Prentki et al., 1992; Chen et al., 1994). Par ailleurs, l'hydroxycitrate, un inhibiteur de l'ATP citrate lyase et par conséquent de la formation du malonyl-CoA, favorise l'oxydation des acides gras mais diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Chen et al., 1994).

3) Les cibles potentielles des acyl-CoAs à chaîne longue

Il existe de nombreux arguments selon lesquels les acyl-CoAs, ou encore leurs dérivés lipidiques, pourraient être les molécules effectrices responsables de la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Par conséquent, plusieurs possibilités quant à leur mode d'action, peuvent être envisagées (**Figure 5**).

D'abord, les acyl-CoAs pourraient activer les protéines kinase C directement, ou indirectement via la production de diacylglycérol (DAG) (Shoyab, 1985; Bronfman et al., 1988). Parallèlement, une augmentation significative de la concentration de DAG a été observée dans les cellules β stimulées par le glucose (Peter-Riesch et al., 1988). Les acyl-CoAs pourraient également moduler l'activité des canaux potassiques, impliqués dans la signalisation de la voie dépendante de l'ATP et du calcium. La régulation des canaux potassiques par les acides gras a déjà été démontrée dans les cellules du muscle lisse (Ordway et al., 1989). D'autre part, les acyl-CoAs pourraient induire l'acylation de certaines protéines impliquées dans l'exocytose des vésicules de sécrétion, qui contiennent l'insuline nouvellement synthétisée. Par exemple, certaines études ont établi que le transport des vésicules entre les citernes de l'appareil de Golgi, est stimulé par les acyl-CoAs (Glick & Rothman, 1987). Notamment, la présence de palmitoyl-CoA accélère le bourgeonnement des

vésicules de transport et leur fusion avec la membrane de la citerne suivante (Pfanner et al., 1989; Pfanner et al., 1990; Rothman & Orci, 1990). Plusieurs protéines qui participent à la transduction des signaux cellulaires, comme les protéines G, les canaux ioniques ainsi que les protéines qui forment le cytosquelette, sont acylées (Schmidt, 1989). D'ailleurs, de nombreuses protéines G ont été impliquées dans les processus d'exocytose (Aridor et al., 1993; Kelly, 1993; Olszewski et al., 1994). Finalement, il a récemment été démontré que les vésicules qui séquestrent les transporteurs de type Glut-4 dans le cytoplasme, contiennent l'enzyme acyl-CoA synthétase-1 et son produit, les acyl-CoAs (Sleeman et al., 1998). Ainsi, la translocation de ces vésicules à la surface de la membrane plasmique, en réponse à l'insuline, pourrait faire intervenir des mécanismes communs aux autres systèmes de transport mentionnés plus haut.

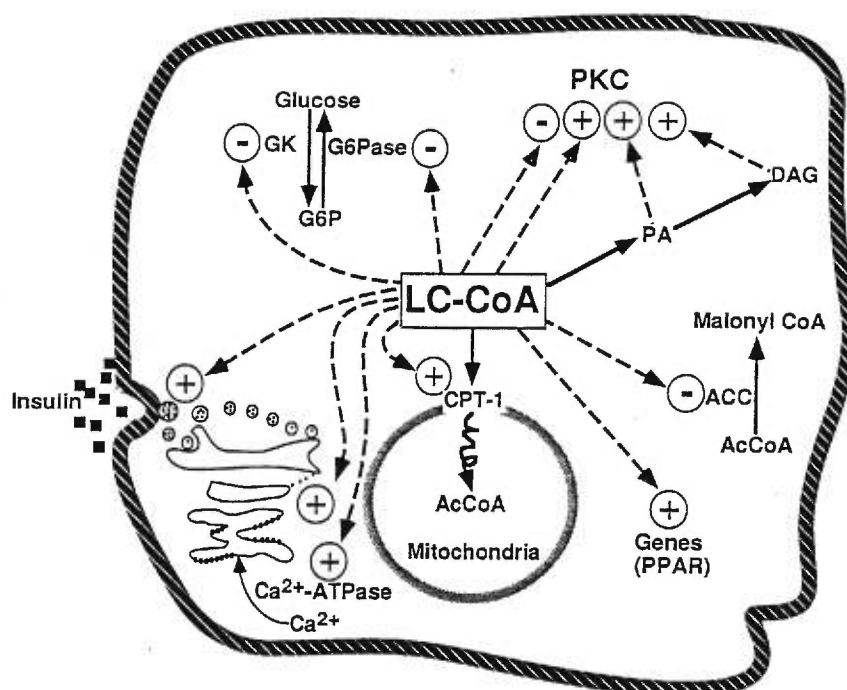


Figure 5 : Les cibles potentielles des acyl-CoAs à chaîne longue.
(Tiré de Prentki & Corkey, 1996)

4) La stratégie utilisée

Le mécanisme par lequel les acides gras sont dégradés en acétyl-CoA est divisé en trois étapes: l'activation des acides gras dans le cytoplasme, leur transport dans la mitochondrie et leur oxydation (Horton et al., 1993) (**Figure 6**).

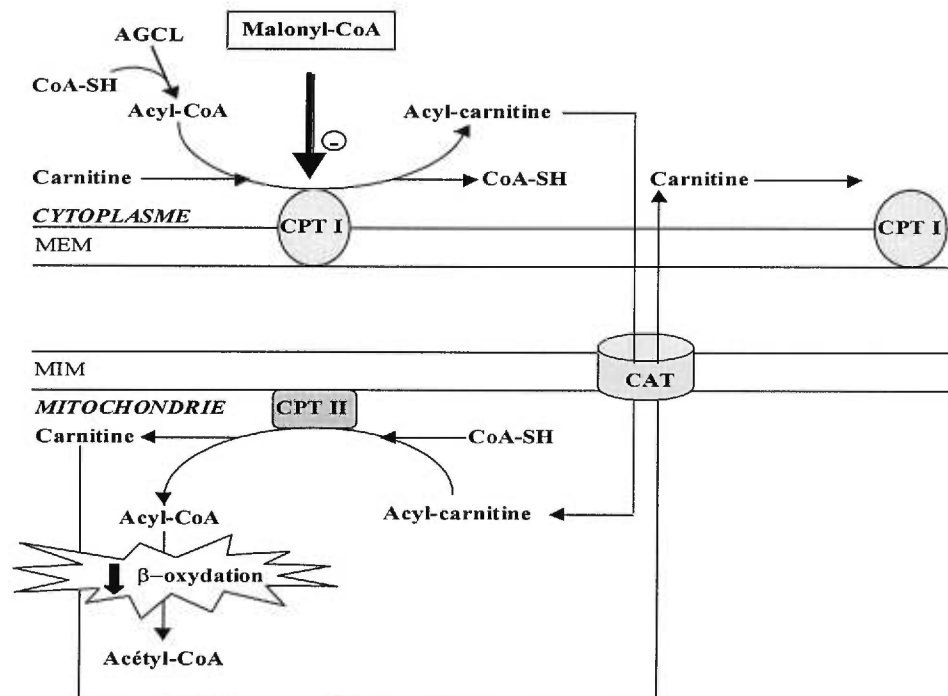


Figure 6 : Les trois étapes de l'oxydation mitochondriale des acides gras.

Suite à leur entrée dans le cytoplasme, les acides gras à chaîne longue (AGCL) sont activés par une enzyme (acyl-CoA synthétase) qui catalyse leur conversion en acyl-CoA. Afin de traverser la membrane externe mitochondriale (MEM), l'acyl-CoA doit réagir avec la carnitine pour former l'acyl-carnitine. Cette réaction est rendue possible grâce à l'action de la CPT I. Par la suite, l'acyl-carnitine est transportée au travers de la membrane interne mitochondriale (MIM) par une translocase. Cette dernière, connue sous le nom de carnitine acyl-carnitine translocase (CAT), catalyse simultanément le transport de la carnitine libre via un système d'échange de type antiport. Dans la mitochondrie, l'enzyme CPT II accélère la

régénération de l'acyl-CoA à partir de l'acyl-carnitine. La dégradation subséquente de l'acyl-CoA en acétyl-CoA fait intervenir les différentes étapes enzymatiques qui composent le cycle de la β -oxydation. Comme résultat final, l'ensemble de ces réactions provoque une diminution des acides gras à chaîne longue dans le cytoplasme ainsi que la production d'une quantité d'énergie équivalente à 129 molécules d'ATP par molécule de palmitate oxydé.

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'accumulation des acyl-CoAs dans le cytoplasme potentialiserait la sécrétion d'insuline induite par le glucose, nous avons modulé, à la hausse, la capacité d'oxydation des acides gras de cellules β -pancréatiques. Étant donné que la CPT II est capable de catalyser la même réaction que la CPT I sans toutefois être inhibée par le malonyl-CoA (McGarry et al., 1990), nous avons dirigé cette enzyme à la surface de la membrane externe mitochondriale. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules de la lignée INS-1 avec des adénovirus recombinants codant une protéine chimérique mitochondriale, insensible au malonyl-CoA. Cette protéine résulte de la fusion entre la séquence codant la CPT II et la séquence codant les 147 premiers acides aminés de la CPT I. La portion CPT II contient l'activité catalytique de la protéine alors que la portion CPT I permet sa localisation à la surface de la membrane externe mitochondriale (**Figure 7**).

Cette stratégie devrait nous permettre de contourner l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA et, par conséquent, d'augmenter la capacité d'oxydation des acides gras à des concentrations de glucose qui induisent la sécrétion d'insuline. Toutefois, si la surexpression de cette enzyme ne provoque pas l'effet attendu sur l'oxydation des acides gras, ceci indiquerait que la CPT I n'est pas limitante pour ce processus dans les cellules INS-1 et qu'une autre enzyme est impliquée. Dans ce cas, nous porterons notre attention sur les autres enzymes de la voie de la β -oxydation. D'autre part, si la capacité d'oxydation des cellules infectées est augmentée de manière efficace et que la sécrétion d'insuline demeure inchangée, cela voudrait dire que l'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT I n'est pas impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. À ce moment nous procéderons à l'étude des enzymes qui catalysent l'estérification des acides gras et la formation de lipides complexes, possiblement impliqués dans la sécrétion d'insuline. Finalement, si l'augmentation de l'oxydation des acides gras entraîne, comme prévue, une

diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, alors nous aurons confirmé l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA exerce une influence sur le mécanisme par lequel le glucose stimule la sécrétion d'insuline.

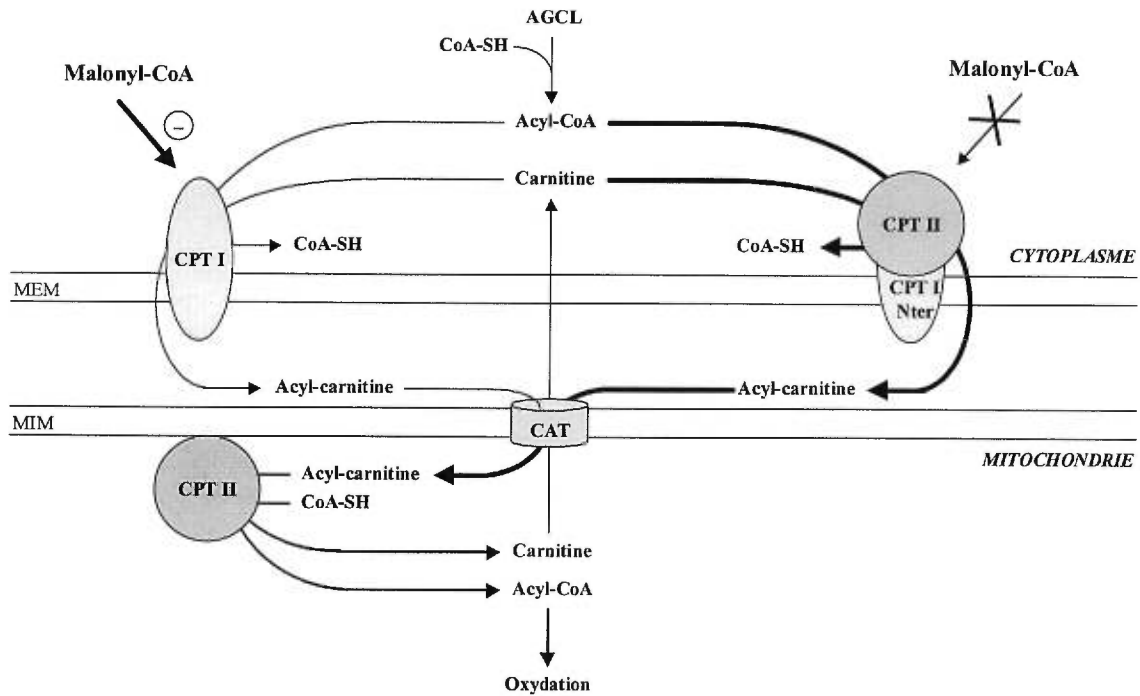


Figure 7 : Stratégie utilisée afin de permettre une augmentation de la capacité d'oxydation mitochondriale des acides gras.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Culture cellulaire

1) Lignée cellulaire INS-1

Cette lignée cellulaire β -pancréatique de rat a été isolée à partir d'insulinomes induits par des rayons X (Asfari et al., 1992). Les cellules INS-1 sont dépendantes du 2-mercaptoéthanol, en ce qui a trait à la sécrétion d'insuline, et sensibles à des concentrations physiologiques de glucose.

Les cellules sont cultivées en présence de RPMI-1640 "11mM glucose" (Gibco-BRL) auquel on ajoute 2g de NaHCO_3 et 2.383g d'HEPES par litre de milieu. Le pH est ajusté à 7.2 et le milieu est filtré (0.22 μm de maillage). Le milieu de culture est ensuite complété par l'ajout de FCS (Gibco-BRL) inactivé (10% final), 2mM L-glutamine, 1mM Na pyruvate, 50 μM 2-mercaptoéthanol, 100 U/ml pénicilline et 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine. Les conditions d'incubation sont de 37°C et 5% CO_2 . Le milieu de culture est changé tous les 3 à 4 jours. Suite à l'atteinte d'une confluence d'environ 80%, les cellules sont dissociées. À cette fin, ces dernières sont incubées (37°C, 5% CO_2) en présence de trypsine-EDTA (Gibco-BRL) pour environ 3 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de milieu frais. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée (1 000rpm, 5min) à température ambiante. Le culot de cellules est repris dans du milieu de culture frais et redistribué dans des boîtes de Petri (rapport 1:4-5). Le passage des cellules utilisées pour cette étude est compris entre 30 et 70.

2) Lignée cellulaire 293

Les cellules 293 sont des cellules embryonnaires de reins humains transformées par l'Adénovirus de type 5 (Ad 5) (Graham et al., 1977). Elles contiennent et expriment la région précoce 1 (E1) du virus Ad 5, dans laquelle se trouvent les gènes E1a impliqués dans la

réplication de l'ADN viral. Ainsi, ces cellules permettent la réplication des adénovirus recombinants délétés dans la région E1.

La culture de ces cellules s'effectue en présence de DMEM "Bas glucose" (Gibco-BRL) auquel on ajoute 2g de NaHCO₃ et 3.6g de glucose (25mM final) par litre de milieu. Le pH est ajusté à 7.2 et le milieu est filtré (0.22µm de maillage). Le milieu de culture est ensuite complété par l'ajout de FCS (Gibco-BRL) inactivé (10% final), 2mM L-glutamine, 100 U/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine. Les conditions d'incubation sont de 37°C et 5% CO₂. Le milieu de culture est changé tous les 3 à 4 jours. Lorsque les cellules atteignent une confluence approximative de 90%, elles sont alors dissociées. Pour ce faire, le milieu de culture est remplacé par un petit volume de milieu frais dans lequel les cellules sont détachées mécaniquement et remises en suspension. Par la suite, cette suspension est diluée dans du milieu frais et redistribuée dans de nouvelles boîtes de Petri. Le rapport de dissociation est de 1:3.

B. Production d'adénovirus recombinants par cotransfection de cellules 293 avec les plasmides pJM17 et pACCMV.pLpA

1) Principe

Le choix de l'adénovirus comme vecteur permettant le transfert d'informations génétiques dans les cellules de mammifère comporte plusieurs avantages. D'abord, le génome recombinant ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte mais existe plutôt dans un mode épisomal. Ceci représente un avantage puisque l'expression du gène transféré se fait indépendamment du cycle cellulaire. Ainsi, le virus à ADN s'avère être l'option idéale pour l'étude de types cellulaires dont l'activité mitotique est faible. De plus, ces vecteurs permettent l'insertion de fragments d'ADN dont la taille peut atteindre jusqu'à 7kb.

L'adénovirus est obtenu suite à une recombinaison entre les régions homologues des plasmides pJM17 et pACCMV.pLpA (Becker et al., 1994). Le vecteur pACCMV.pLpA

provient de la modification du plasmide pAC dans lequel ont été insérés le promoteur précoce du cytomégalo virus (CMV), une cassette de clonage pUC19 ainsi que le signal de polyadénylation du SV40. Grâce à ses sites de clonage multiples, ce plasmide permet l'insertion de fragments d'ADN étranger. De plus, le vecteur de 8.8kb contient également deux séquences de l'Ad5 (comprises entre 0.0-1.3 m.u. et 9.3-17.0 m.u.) permettant la recombinaison avec le plasmide pJM17. Finalement, le gène de résistance à l'ampicilline est inclus dans une séquence bactérienne. Le plasmide pJM17 consiste en une version modifiée de l'adénovirus type 5 auquel un insert pBRX a été ajouté (McGrory et al., 1988). Ce fragment de 4.3kb contient les gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline ainsi qu'une origine de répllication bactérienne. Le plasmide fait au total 40.3kb et les régions homologues au pACCMV.pLpA sont situées entre 0.0-1.3 m.u. et 9.3-17.0 m.u..

Les changements apportés à l'Ad5 ont pour conséquences la délétion de la région E1 de même que des insertions et délétions dans la région E3. Ainsi la répllication de l'adénovirus, résultant de la recombinaison des deux plasmides, nécessite que la fonction de la région E1 soit fournie en *trans*. Cette propriété est donc assurée par la lignée cellulaire 293. Comme elle est permissive à l'infection, le cycle de répllication de l'adénovirus recombinant se termine par la lyse des membranes cellulaires et l'expulsion des virions hors des cellules.

2) Procédure expérimentale (**Figure 8**)

➤ Préparation des plasmides

Des bactéries compétentes (*E. coli* DH5 α) transformées avec les plasmides pJM17, pACCMV.pLpA ou pGEM sont étalées sur des boîtes de Petri de LB-agar contenant 100 μ g/mL ampicilline. L'ADN plasmidique est isolé par le système MaxiPrep (QIAGEN). Le plasmide pJM17 est alors prêt à l'usage. Par contre, les vecteurs pGEM et pACCMV.pLpA ne sont pas utilisés tels quels. En effet, on peut dire que le pACCMV.pLpA n'est pour l'instant qu'un vecteur vierge puisqu'il ne contient aucun ADN étranger. Cet ADN se trouve en fait dans le troisième vecteur. Il s'agit d'un fragment (Nter.CPT I/CPT II) de 2.4kb codant une protéine chimérique insensible au malonyl-CoA (Cohen et al., 1998) inséré entre les sites de restriction Eco RI et Hind III du plasmide pGEM. Ainsi, la prochaine étape

consiste donc en la production d'un pACCMV.pLpA recombinant. Pour ce faire, on digère d'abord les deux plasmides avec les enzymes de restriction Eco RI et Hind III (Pharmacia Biotech). La digestion se fait pendant 1 heure à 37°C. Par la suite, les produits de la digestion sont déposés sur un gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium. La purification du fragment Nter.CPT I/CPT II et du pACCMV.pLpA est réalisée grâce au système d'extraction QIAEX II (QIAGEN). La ligation du fragment au plasmide est assurée par l'enzyme "Bacteriophage T4 DNA ligase" (Pharmacia Biotech). La réaction se produit à 16°C sur une période de 1 à 4 heures. Des bactéries compétentes sont transformées avec le plasmide recombinant nouvellement obtenu et étalées sur des plaques de LB-agar tel que mentionné plus haut. Le plasmide est également isolé par le système MaxiPrep (QIAGEN).

➤ Cotransfection de cellules 293

L'introduction de plasmides (pACCMV.pLpA recombinant et pJM17) dans les cellules 293 se fait par le système de co-précipitation au phosphate de calcium (Stratagene). En effet, le précipité formé par le CaPO₄ augmente l'absorption au niveau des membranes cellulaires et limite parallèlement la digestion de l'ADN par des DNases présentes dans les cellules transfectées.

PRÉPARATION DE LA SUSPENSION D'ADN

- (a) Prélever de 5 à 15µg de chaque plasmide et compléter le volume à 450µL avec de l'eau stérile.
- (b) Ajouter 50µL de CaCl₂ 2.5M et 500µL de BES-Buffered solution 2X (BBS 2X).
Mélanger en tapant délicatement les parois du tube avec le bout du doigt.
- (c) Incuber la suspension d'ADN à température ambiante pour 20 minutes.

PRÉPARATION DES CELLULES

Les cellules 293 sont cotransfectées lorsque leur confluence atteint approximativement 80%.

- (a) Retirer le milieu de culture des boîtes de Petri de 60 x 15mm.
- (b) Laver le tapis cellulaire deux fois au PBS.
- (c) Ajouter 5mL de milieu de culture dans lequel le FCS a été remplacé par 5% de Modified bovine serum (MBS).

APPLICATION DE LA SUSPENSION D'ADN

- Ajouter 500 μ L de la suspension d'ADN, goutte à goutte en tournant la boîte de Petri.
- Faire circuler la suspension afin de bien la répartir sur le tapis cellulaire.
- Incuber (37°C, 5% CO₂) pour une période de 3 heures.
- Laver les cellules à trois reprises au PBS et incuber (37°C, 5% CO₂) en présence de 5mL du milieu de culture standard.

La formation de plages de lyse, résultant de la réplication de l'adénovirus, se produit entre 2 et 4 semaines après la cotransfection. La progression de l'infection entraîne par la suite la lyse complète du tapis cellulaire. Le milieu contenant les particules virales est à ce moment prélevé et les cellules qui sont demeurées intactes sont lysées par plusieurs cycles de "congélation/décongélation" du milieu. Les débris cellulaires sont finalement éliminés par centrifugation (3 500rpm, 30min, 4°C) et le surnageant de cotransfection est congelé à -20°C.

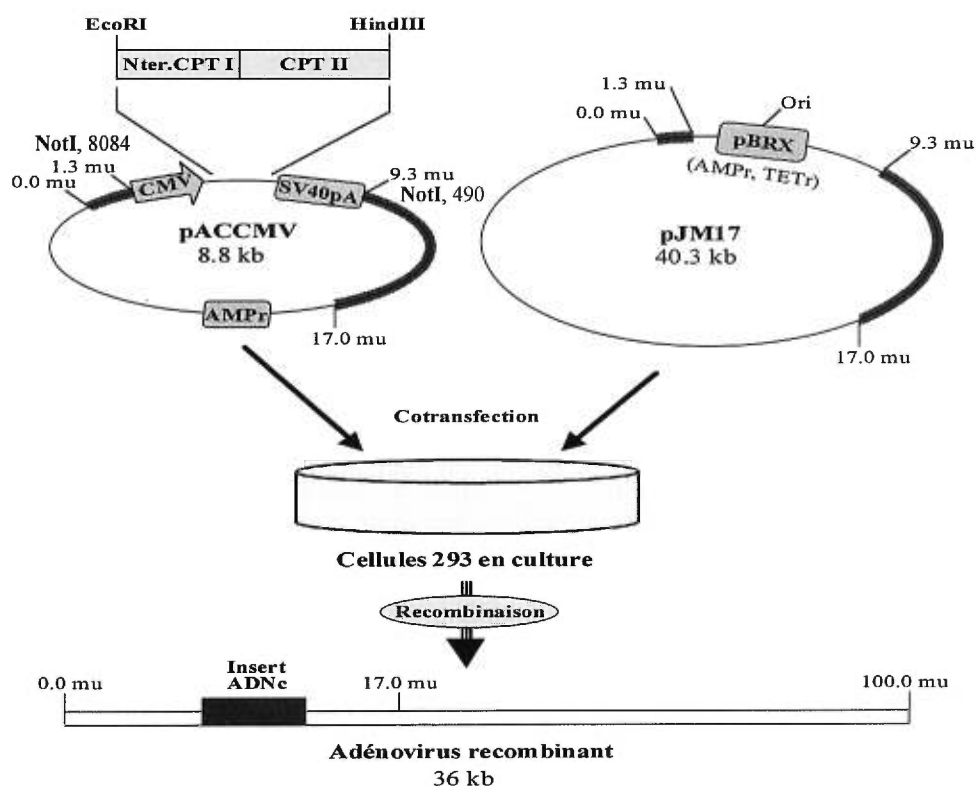


Figure 8 : Production d'adénovirus recombinants par cotransfection de cellules 293 avec les plasmides pJMI7 et pACCMV.pLpA.

C. Amplification virale

Un des avantages de l'adénovirus recombinant est la capacité d'obtenir un titre élevé de stock viral. Toutefois, le titre du lysat initial n'est pas optimal. L'amplification du surnageant de cotransfection est la méthode utilisée afin d'accroître l'ordre de grandeur du titre.

Chaque boîte de Petri (150 x 25mm) de cellules 293 confluentes à 80% est incubée en présence de 10mL de milieu de culture complet auquel 200 μ L du surnageant de cotransfection ont été ajoutés. L'incubation (37°C, 5% CO₂) se fait sur une période de 1 heure. Par la suite, le tapis cellulaire est lavé une fois au PBS et les cellules sont à nouveau incubées dans 20mL de milieu de culture frais. Le milieu récupéré après la lyse complète des membranes cellulaires subit plusieurs cycles de "congélation/décongélation" avant d'être centrifugé (3 500rpm, 30min, 4°C). Le surnageant obtenu est congelé à -20°C. Il s'agit du "stock viral P1".

Il est à noter que pour l'ensemble des expériences effectuées dans ce projet, l'adénovirus β -galactosidase, contenant le gène de la β -galactosidase, est utilisé comme contrôle. Ce dernier a été préparé par le Dr Newgard grâce à la même technique utilisée pour construire l'adénovirus CPT I/CPT II. Il nous a été donné sous la forme de stock viral P1.

D. Extraction de l'ADN viral

La procédure expérimentale utilisée afin d'extraire l'ADN viral a été développée à partir du protocole d'isolation de l'ADN du virus polyome (Hirt, 1967).

- (a) Pour chacun des deux adénovirus, infecter une boîte de Petri (150 x 25mm) de cellules 293 confluentes à 80% avec 200 μ L du stock viral P1 dilué dans 25mL de milieu complet. Incuber (37°C, 5% CO₂).
- (b) Approximativement 36 heures plus tard, les cellules apparaissent rondes mais adhèrent toujours au fond de la boîte. Aspirer le milieu et laver le tapis cellulaire deux fois au PBS.

- (c) Ajouter 2mL de tampon de lyse (0.6% SDS, 10mM EDTA, 100µg/mL Protéinase K) et incuber sous agitation pour une période de 1 heure à 37°C.
- (d) Ajouter 500µL de NaCl 5M, goutte à goutte en faisant tourner la boîte de Petri afin d'homogénéiser le lysat. Laisser reposer 1 heure à 4°C.
- (e) Transférer le lysat dans un eppendorf et centrifuger (13 000rpm, 60min, 4°C). Retirer le culot à l'aide de pinces.
- (f) Au surnageant, ajouter 1Vol. de "phénol / chloroforme (4% alcool isoamylique)". Agiter par inversion et centrifuger (13 000rpm, 1min, 4°C).
- (g) Récupérer la phase du dessus et y ajouter 1Vol. de chloroforme (4% alcool isoamylique). Agiter par inversion et centrifuger (13 000rpm, 1min, 4°C).
- (h) Prélever à nouveau la phase supérieure et précipiter l'ADN viral en ajoutant 0.25M d'acétate de sodium pH 5.2 et 2.5Vol. d'éthanol 100%. Agiter par inversion et centrifuger (13 000rpm, 1min, 4°C).
- (i) Laver le culot avec de l'éthanol 75% et resuspendre l'ADN viral dans 25-50µL de Tris 10mM contenant 10µg/mL de RNase A inactivée.

E. Analyse de l'ADN viral par Southern blot

1) Principe

Afin de s'assurer que l'adénovirus recombinant contient le fragment Nter.CPT I/CPT II, il est essentiel d'en faire l'analyse par Southern blot. L'ADN de l'adénovirus β -Gal sert de contrôle négatif alors que le vecteur pACCMV.pLpA recombinant est utilisé comme contrôle positif.

Selon cette méthode (Southern, 1975), l'ADN est d'abord digéré par l'enzyme de restriction NOT I. Le fragment libéré par cette réaction contient les éléments initialement compris entre les régions 1.3 et 9.3 m.u. du vecteur pACCMV.pLpA recombinant. Les fragments obtenus sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose. L'ADN est par la suite transféré sur une membrane de nylon et hybridé à une sonde marquée

à l'aide d'un isotope radioactif. La position des bandes complémentaires à la sonde est détectée par autoradiographie.

2) Procédure expérimentale

DIGESTION DE L'ADN

- Digérer 1 μ g de l'ADN viral codant la protéine chimérique, avec l'enzyme de restriction NOT I (Pharmacia Biotech). Incuber 1 heure à 37°C.
- Faire de même pour l'ADN viral codant l'enzyme β -galactosidase.
- Digérer 200ng du vecteur pACCMV.pLpA recombinant, avec l'enzyme de restriction NOT I (Pharmacia Biotech). Incuber 1 heure à 37°C.

ÉLECTROPHORÈSE ET TRANSFERT

- Déposer les produits de la digestion sur un gel d'agarose 1%, coloré au bromure d'éthidium.
- Transférer l'ADN du gel d'agarose vers la membrane "Zeta-Probe" (Bio-Rad). Pour ce faire, préparer le montage illustré à la **Figure 9**. Le transfert prend environ 16 heures.
- Fixer l'ADN sur la membrane de nylon en exposant cette dernière aux rayons U.V..

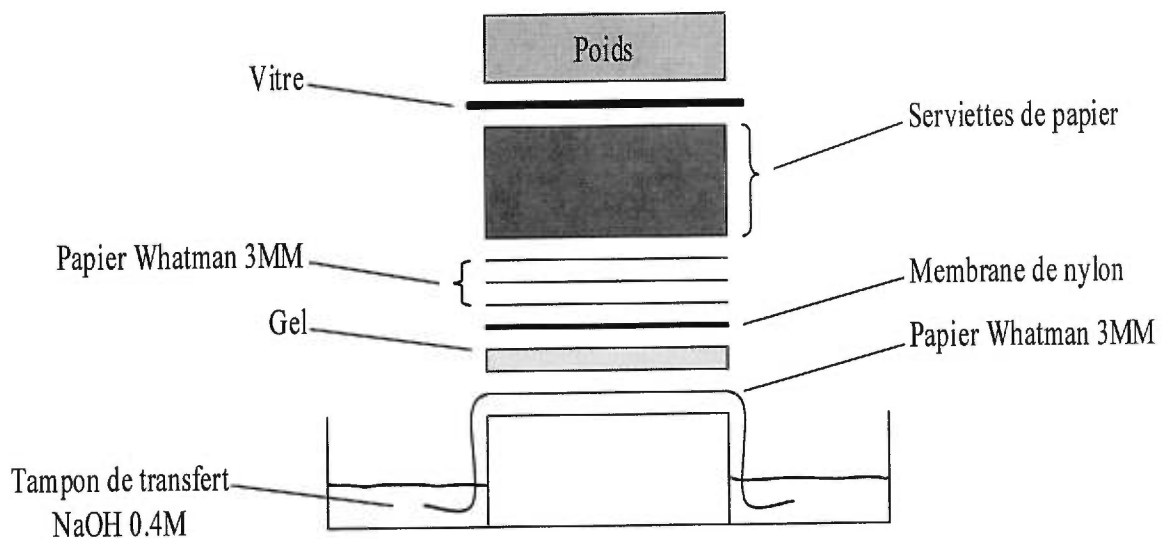


Figure 9 : Transfert capillaire de l'ADN sur un support solide.

PRÉPARATION DE LA SONDÉ

- (a) Diluer 25ng d'un fragment ADNdb codant la CPT I native, dans 30 μ L d'eau stérile.
- (b) Dénaturer l'ADN en chauffant la suspension à 100°C pour 5 minutes. Par la suite, déposer rapidement sur la glace afin d'empêcher la renaturation des deux brins d'ADN.
- (c) Système "Prime-a-Gene" de Promega
 - Ajouter (Volume final 50 μ L):
 - Tampon 5X
 - 20 μ M de chacun des dNTPs non marqués
 - 400 μ g/mL de BSA
 - 333nM de [α -³²P] dCTP
 - 100U/mL de l'enzyme ADN polymérase I (Klenow)
 - Homogénéiser le mélange et incubé à température ambiante pour une heure.
- (d) Terminer la réaction en ajoutant 20mM EDTA.
- (e) Purifier la sonde en utilisant une colonne "MicroSpin G-50" (Pharmacia Biotech).

PRÉHYBRIDATION ET HYBRIDATION

- (a) Insérer la membrane dans un tube de verre, ajouter la solution de préhybridation (0.5M Na₂HPO₄ pH 7.2 / 7% SDS) préchauffée et incubé dans un four à hybridation (65°C) pour une période de 1 heure.
- (b) Dénaturer la sonde purifiée en la chauffant 5 minutes à 100°C.
- (c) Vider le contenu du tube de verre en préhybridation et y ajouter la sonde (10⁶ CPM/mL de solution d'hybridation). Remettre la membrane en incubation pour la nuit.

LAVAGES

- (a) Laver d'abord la membrane en présence de 40mM Na₂HPO₄ pH 7.2 / 5% SDS. Incubé dans un four à hybridation (65°C) pour 30 à 60 minutes. Répéter une deuxième fois.
- (b) Remplacer la solution par 40mM Na₂HPO₄ pH 7.2 / 1% SDS et incubé dans les mêmes conditions. Recommencer, au besoin, jusqu'à ce que les régions de la membrane qui ne contiennent pas d'ADN n'émettent aucun signal détectable de radioactivité.

Exposer la membrane à un film radiographique XAR-5 (Kodak) pour une période de 1 heure à -80°C.

F. Purification des adénovirus sur gradient de CsCl

L'utilisation directe des deux types d'adénovirus sous la forme de stock viral P1 n'est pas recommandée pour l'infection de cellules de la lignée INS-1. En effet, ce dernier semble contenir des éléments, non identifiés, entraînant la mort d'une fraction considérable de la population cellulaire infectée (observation faite par notre laboratoire). De ce fait, il est nécessaire de procéder à la purification du stock viral P1 sur gradient de chlorure de césium (Becker et al., 1994).

- (a) Pour chacun des deux adénovirus, infecter une boîte de Petri (150 x 25mm) de cellules 293 confluentes à 80% avec 200 μ L du stock viral P1 dilué dans 25mL de milieu complet. Incuber (37°C, 5% CO₂).
- (b) Attendre la lyse complète des cellules pour récupérer le milieu de culture. C'est dans celui-ci que se trouvent les particules virales. Centrifuger: 20 000g, 30min, 4°C.
- (c) Au surnageant, ajouter 0.5Vol. d'une solution de 20% polyéthylène glycol 8000 / 2.5M NaCl. Laisser reposer à 4°C pour 1 heure, en agitant fréquemment.
- (d) Centrifuger: 20 000g, 10min, 4°C. Écartier le surnageant.
- (e) Resuspendre le culot dans 2.5mL de tampon viral (137mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Tris, 1mM MgCl₂). Centrifuger: 4 000rpm, 10min, 4°C.
- (f) Récupérer le surnageant et y ajouter approximativement 0.5g de CsCl/mL, jusqu'à ce que la masse volumique de la solution atteigne 1.32-1.34mg/mL. Centrifuger: 65 000rpm, 3hrs, 20°C.
- (g) Prélever la bande blanche à l'aide d'une pipette et charger l'extrait sur une colonne "PD-10 Sephadex" (Pharmacia Biotech) équilibrée avec le tampon viral.
- (h) Collecter 8-10 gouttes par eppendorf et déterminer lesquels contiennent la quantité maximale d'adénovirus en mesurant la densité optique à 260nm (dilutions 1/50).
- (i) Rassembler le contenu des eppendorfs les plus concentrés, ajouter 0.2% BSA et conserver à -80°C.

G. Titration sur agar

Avant d'utiliser le stock d'adénovirus purifié pour infecter la lignée cellulaire INS-1, il faut d'abord le titrer. Cette procédure consiste à déterminer le nombre de plages de lyse formées par l'infection de cellules 293 avec des dilutions croissantes du stock viral purifié (Becker et al., 1994). Le résultat obtenu permet d'exprimer la concentration d'adénovirus en terme de "pfu/mL".

- (a) Pour chacun des adénovirus, préparer une série de dilutions du stock viral purifié (10^{-8} à 10^{-12}) dans 2mL de milieu complet.
- (b) Infecter des boîtes de Petri (60 x 15mm) de cellules 293 confluentes à 80% avec les dilutions virales préparées en (a). L'incubation (37°C, 5% CO₂) se fait sur une période de 1 heure.
- (c) Aspirer le milieu et laver le tapis cellulaire deux fois au PBS.
- (d) Ajouter 5mL d'une solution Agar 1.4% (1Vol.) / DMEM 2.5X (1Vol.) contenant 5% FCS (Gibco-BRL) inactivé, 100 U/mL pénicilline, 100µg/mL streptomycine et 0.25µg/mL fungizone.
- (e) Incuber (37°C, 5% CO₂). Les plages de lyse devraient apparaître 7 à 10 jours après l'infection.

H. Infection des cellules INS-1

Une multiplicité d'infection comprise entre 5 et 10pfu/cellule, appliquée pour 1 heure, garanti une efficacité de transfection supérieure à 80% (Becker et al., 1994). À cet effet, des cellules INS-1 en culture (boîtes de Petri de 60 x 15mm), sont infectées par l'ajout d'une solution contenant l'adénovirus purifié, dilué dans 5mL de RPMI complet à 5mM glucose. Ce milieu est préparé à partir de RPMI-1640 "Sans glucose" (Gibco-BRL) auquel on ajoute, en plus des constituants normalement utilisés pour le maintien de la culture cellulaire (Section A.), 5mM glucose. D'autre part, le volume de stock viral prélevé pour obtenir la multiplicité d'infection désirée est établie sur la base du principe que chaque boîte de Petri de

60 x 15mm contient en moyenne 4 millions de cellules. L'incubation (37°C, 5% CO₂) se fait sur une période de 2 heures après laquelle le tapis cellulaire est lavé une fois au PBS. Les cellules sont finalement réincubées en présence de RPMI complet à 5mM glucose. Des niveaux élevés d'expression du gène recombinant sont obtenus 48 heures après l'infection.

Quelques boîtes de Petri de cellules INS-1 non infectées sont également cultivées à bas glucose. Ces dernières serviront à la mesure du blanc et des témoins (voir plus loin).

I. Mesure de la capacité d'oxydation des acides gras

1) Principe

La mesure de la capacité d'oxydation des acides gras est déterminée par la quantité de CO₂ produite suite à l'oxydation du palmitate marqué, présent dans le milieu d'incubation. L'acidification permet de déplacer l'équilibre acido-basique du milieu vers la formation de molécules de CO₂. Ces molécules sont ensuite captées dans une cupule grâce à l'action de l'hydroxyde de benzéthonium et détectées par comptage en scintillation liquide.

2) Incubation des cellules INS-1

Le tapis cellulaire des boîtes de Petri infectées et incubées en milieu RPMI complet à 5mM glucose est lavé une fois au KRB. Les cellules sont par la suite cultivées dans du KRB selon les conditions décrites dans le **Tableau I**. La préincubation se fait dans 3mL de milieu à 3mM glucose et 0.5% BSA en présence ou non de 0.4mM 2-bromopalmitate (BrP) auquel on ajoute 1mM carnitine. L'incubation est réalisée dans 3mL de milieu avec ou sans BrP (0.1mM) contenant 3 ou 20mM glucose, 0.5% BSA, 1mM carnitine, 0.1mM palmitate lié à 0.5% BSA et 0.5µCi/µmol [1-¹⁴C] palmitate (Amersham). Les périodes de préincubation et d'incubation se font à 37°C en présence de 5% CO₂ et durant 30 et 60 minutes respectivement.

Préincubation	Incubation
3mM glucose <ul style="list-style-type: none"> → 0.4mM BrP → Sans BrP 	<ul style="list-style-type: none"> 0.1mM BrP <ul style="list-style-type: none"> → 3mM glucose → 20mM glucose Sans BrP <ul style="list-style-type: none"> → 3mM glucose → 20mM glucose

Tableau I : Conditions expérimentales de l'oxydation des acides gras.

3) Traitement des échantillons

Le milieu d'incubation des échantillons qui serviront à la mesure du blanc est prélevé immédiatement suite à son ajout sur la culture cellulaire. Le milieu des autres échantillons n'est récupéré qu'à la fin de la période d'incubation.

4) Procédure expérimentale (**Figure 10**)

- (a) Transférer 5mL du milieu d'incubation dans un erlenmeyer de 25mL.
- (b) Afin d'empêcher les fuites de CO₂, sceller aussitôt l'erlenmeyer à l'aide d'un bouchon dans lequel une cupule est insérée.
- (c) Au moyen d'une seringue, ajouter 500µL de HClO₄ 40% (4-6% final) directement dans le milieu d'incubation (en évitant bien la cupule).
- (d) Également avec une seringue, ajouter 400µL d'hydroxyde de benzéthonium métalonique dans la cupule.
- (e) Laisser reposer pour une période de 2 à 3 heures.
- (f) Enlever le bouchon et retirer délicatement la cupule avant de la déposer dans une fiole de comptage.
- (g) Ajouter 5mL de scintillant. Vortexer.
- (h) Incuber à température ambiante pour environ 16 heures.
- (i) Évaluer au compteur beta.

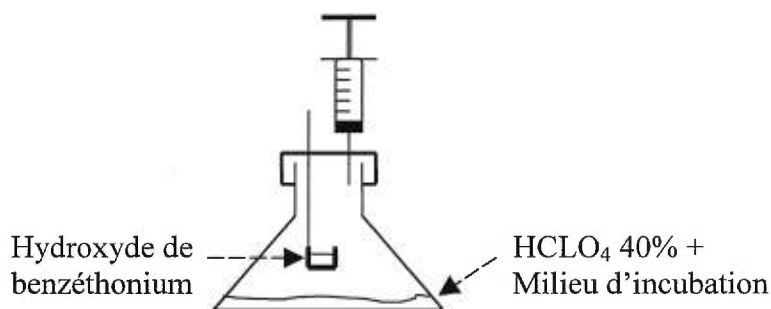


Figure 10 : Schéma illustrant la procédure utilisée afin de mesurer la capacité d'oxydation des acides gras.

5) Calculs

Résultat "R" exprimé en "%" du niveau d'oxydation de cellules témoins incubées en présence de 3mM glucose (Tm G₃):

$$R = \frac{\text{Valeur de l'échantillon en cpm} - \text{Valeur du blanc en cpm}}{\text{Valeur du Tm G}_3 \text{ en cpm} - \text{Valeur du blanc en cpm}} \times 100$$

Résultat "R" exprimé en nmol de palmitate oxydé:

$$R = \frac{\text{Valeur de l'échantillon en cpm} - \text{Valeur du blanc en cpm}}{\text{Activité spécifique en cpm} \times 1 \text{ heure} \times 4 \times 10^6 \text{ cellules}}$$

La mesure de l'activité spécifique correspond à la quantité de radioactivité présente dans 200µL du milieu d'incubation. Comme la concentration en palmitate de ce dernier est de 0.1mM, on retrouve donc 20nmol de palmitate dans les 200µL prélevés. Ainsi, l'activité spécifique (A.S.) est déterminée de la façon suivante:

$$\text{A.S.} = \text{Valeur de 200}\mu\text{L de l'échantillon en cpm} / 20\text{nmol de palmitate}$$

J. Mesure de l'estérification des acides gras

1) Principe

La mesure de l'incorporation des acides gras exogènes dans les lipides totaux est rendue possible grâce à une technique permettant d'extraire les lipides d'une culture cellulaire (Folch et al., 1957). Des acides gras marqués par un isotope radioactif sont utilisés comme substrat et l'incorporation de ces derniers dans des molécules lipidiques est détectée par la lecture des extraits lipidiques purifiés au compteur beta.

2) Incubation des cellules INS-1

Le tapis cellulaire des boîtes de Petri infectées et incubées en milieu RPMI complet à 5mM glucose est lavé une fois au KRB. La préincubation (37°C, 5% CO₂) se fait dans 3mL de KRB à 3mM glucose et 0.5% BSA. Après 30 minutes, les cellules sont cultivées pour 1 heure (37°C, 5% CO₂) en présence de 3mL d'un milieu d'incubation où les concentrations de glucose et de palmitate sont variables (**Tableau II**). Celui-ci est préparé à partir de KRB auquel on ajoute 3 ou 20mM glucose, 0.5% BSA, 1mM carnitine, 0.1 ou 0.4mM palmitate lié à 0.5% BSA et 0.5μCi/μmol [1-¹⁴C] palmitate (Amersham).

Incubation	
3mM glucose	0.1mM palmitate
	0.4mM palmitate
20mM glucose	0.1mM palmitate
	0.4mM palmitate

Tableau II : Conditions expérimentales de l'estérification des acides gras.

3) Traitement des échantillons

Le milieu d'incubation des échantillons qui serviront à la mesure du blanc est prélevé immédiatement suite à son ajout sur la culture cellulaire. Le milieu des autres échantillons n'est récupéré qu'à la fin de la période d'incubation après laquelle le tapis cellulaire est lavé à deux reprises au PBS. Les cellules sont ensuite dissociées, centrifugées (3 500rpm, 15min, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est congelé à -80°C.

4) Procédure expérimentale

- (a) Au culot cellulaire, ajouter 4mL de Folch (2Vol. chloroforme : 1Vol. méthanol). Vortexer.
- (b) Laisser reposer à température ambiante pour une période de 2 heures.
- (c) Centrifuger: 3 500rpm, 30min, 4°C.
- (d) Prélever 3mL de la phase supérieure et y ajouter 600µL de CaCl₂ 0.028%. Vortexer.
- (e) Laisser reposer à température ambiante pour 30 minutes.
- (f) Centrifuger: 3 500rpm, 10min, température ambiante.
- (g) Éliminer la phase supérieure et ajouter 1.5mL de solution de lavage Folch (3Vol. chloroforme : 48Vol. méthanol : 47Vol. CaCl₂ 0.028%). Vortexer.
- (h) Répéter 2 fois les étapes (f) et (g).
- (i) Centrifuger: 3 500rpm, 10min, température ambiante.
- (j) Aspirer la phase supérieure et ajouter 1mL de méthanol. Vortexer.
- (k) Évaporer le méthanol sous azote.
- (l) Resuspendre le culot dans 500µL de Folch. Vortexer.
- (m) Transférer 100µL dans une fiole de comptage et ajouter 5mL de scintillant. Vortexer.
- (n) Laisser reposer 1 heure à température ambiante.
- (o) Évaluer au compteur beta.

5) Calculs

Résultat “R” exprimé en nmol de palmitate incorporé dans les lipides totaux:

$$R = \frac{\text{Valeur de l'échantillon en cpm} - \text{Valeur du blanc en cpm}}{\text{Activité spécifique en cpm} \times 1 \text{ heure} \times 4 \times 10^6 \text{ cellules}}$$

La mesure de l'activité spécifique est réalisée telle que décrit dans la section portant sur l'oxydation des acides gras (Section I.).

K. Dosage de l'insuline

1) Principe

L'insuline présente dans les échantillons est dosée selon la méthode “Coated Charcoal Radioimmunoassay” (Herbert et al., 1965). Il s'agit d'une méthode radioimmunologique où la substance à mesurer est l'antigène. Cet antigène froid (Ag) est en compétition avec l'antigène marqué par un isotope radioactif (*Ag) pour lier l'anticorps (Ac) et former des complexes antigène-anticorps (AgAc). La séparation des antigènes libres et des complexes formés entre antigènes et anticorps est assurée par l'action du charbon enrobé. Après centrifugation, ce dernier fixe les petites molécules libres mais pas les complexes de grandes tailles tels que ceux formés par les anticorps et antigènes. Ainsi, en déterminant la quantité de radioactivité présente dans le culot de charbon et en la comparant à celle d'une courbe standard (où les concentrations d'insuline froide sont connues), il est possible d'estimer la concentration d'insuline présente dans un échantillon.

2) Incubation des cellules INS-1

Le tapis cellulaire des boîtes de Petri infectées et incubées en milieu RPMI complet à 5mM glucose est lavé une fois au KRB. Les cellules sont par la suite cultivées dans du KRB selon les conditions décrites dans le **Tableau III**. La préincubation (37°C, 5% CO₂) se fait

durant 30 minutes dans 3mL de milieu à 3mM glucose et 0.5% BSA, en présence ou non de 0.4mM 2-bromopalmitate (BrP) auquel on ajoute 1mM carnitine. Par la suite, les cellules sont incubées pour une autre période de 30 minutes (37°C, 5% CO₂) dans 3mL de milieu avec ou sans bromopalmitate (0.4mM), contenant 3 ou 20mM glucose, 0.5% BSA, 1mM carnitine, et en présence ou non d'oléate (0.4mM).

Préincubation	Incubation
3mM glucose <ul style="list-style-type: none"> → 0.4mM BrP → Sans BrP 	<ul style="list-style-type: none"> 0.4mM BrP <ul style="list-style-type: none"> → 3mM glucose → 20mM glucose Sans BrP <ul style="list-style-type: none"> → 3mM glucose +/- 0.4mM oléate → 20mM glucose +/- 0.4mM oléate

Tableau III : Conditions expérimentales de la sécrétion d'insuline.

3) Traitement des échantillons

❖ Insuline sécrétée

À la fin de la période d'incubation, 1mL du milieu est prélevé pour la mesure de la sécrétion d'insuline. Toutefois, le milieu d'incubation des échantillons qui serviront à la mesure du blanc est prélevé immédiatement après son ajout sur le tapis cellulaire. Les échantillons prélevés sont centrifugés (2 000 rpm, 5 min, 4°C) et 85% du surnageant est récupéré puis congelé à -20°C.

❖ Insuline cellulaire

Une fois dépourvu du milieu d'incubation, le tapis cellulaire est lavé deux fois au PBS. Afin de permettre la lyse des cellules, ces dernières sont incubées à 4°C pour une période approximative de 16 heures en présence d'une solution d'éthanol/acide (75% éthanol, 185mM HCl concentrée). Par la suite, les cellules sont détachées et la suspension est alors congelée à -20°C.

4) Procédure expérimentale

Réactifs:

◆ Milieu tamponné:

NaCl	9g/L
Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O	2.7g/L
KH ₂ PO ₄	5.4g/L
EDTA- 4Na- 2H ₂ O	10.4g/L
Sodium azide	1g/L

Ajouter 1% de BSA (Sigma), ajuster le pH à 7.4 et filtrer (0.22µm de maillage).

◆ Courbe standard:

Les différents points de la courbe standard sont obtenus suite à la dilution du stock "Standard d'Insuline de Rat" (Linco Research) dans le milieu tamponné:

4mL de solution stock pour 1mL de milieu tamponné	8ng/mL
2mL de solution stock pour 3mL de milieu tamponné	4ng/mL
1mL de solution stock pour 4mL de milieu tamponné	2ng/mL
0.5mL de solution stock pour 4.5mL de milieu tamponné	1ng/mL
0.25mL de solution stock pour 4.75mL de milieu tamponné	0.5ng/mL
0.1mL de solution stock pour 4.9mL de milieu tamponné	0.2ng/mL
0.05mL de solution stock pour 4.95mL de milieu tamponné	0.1ng/mL
0mL de solution stock pour 5mL de milieu tamponné	0ng/mL

Échantillonner et conserver à -20°C.

◆ Suspension Charbon/Sérum:

33mL de FBS
100mL de glycine 0.2M, pH 8.8
250mg de dextran T70
3g de charbon actif (Charcoal Norit)

Bien agiter. Cette préparation doit être faite extemporanément.

JOUR 1:

L'insuline totale, le NSB (liaison non spécifique) ainsi que les standards sont faits en triplicata. Les échantillons sont faits en duplicata.

- (a) Pipetter 100 μ L du standard ou de l'échantillon (compléter à 100 μ L, si nécessaire, avec le milieu tamponné).
- (b) Ajouter le tampon: 300 μ L pour les tubes NSB et 100 μ L pour les standards et les échantillons. Vortexer.
- (c) Ajouter 100 μ L “[¹²⁵I] Insuline Humaine Purifiée par HPLC” (Linco Research) à tous les tubes. Vortexer.
- (d) Ajouter 100 μ L “Anticorps Anti-Insuline” (Linco Research) à tous les tubes sauf ceux qui sont identifiés NSB et insuline totale. Vortexer.
- (e) Incuber à 4°C pour une période de 16 heures.

JOUR 2:

- (a) Ajouter 400 μ L de la solution Charbon/Sérum à tous les tubes, sauf ceux qui servent à la mesure de l'insuline totale.
- (b) Centrifuger: 3 500rpm, 15min, 4°C.
- (c) Compter le culot au compteur gamma.

III. RÉSULTATS

A. Analyse de l'ADN du virus recombinant

L'adénovirus représente un outil moléculaire puissant permettant le transfert de gènes recombinants dans les cellules de mammifères. Étant donné que les systèmes de transfection traditionnels se sont avérés peu efficaces dans les cellules de la lignée INS-1, nous avons donc eu recours à la production d'adénovirus recombinants. La construction a été obtenue par la cotransfection de cellules 293 avec les vecteurs pJM17 et pACCMV.pLpA recombinant, dans lequel un fragment d'ADN (Nter.CPT I/CPT II) codant une protéine chimérique insensible au malonyl-CoA a été inséré. Afin de détecter la présence du gène recombinant dans le génome de l'adénovirus CPT I/CPT II (Ad CPT I/CPT II), nous avons procédé à la digestion de l'ADN viral par l'enzyme de restriction NOT I suivie d'une analyse par Southern blot à l'aide d'une sonde d'ADN codant la CPT I native. L'ADN de l'adénovirus β -galactosidase (Ad β -Gal), ne contenant pas le fragment Nter.CPT I/CPT II, a été employé comme contrôle négatif, alors que le plasmide pACCMV.pLpA recombinant a servi de contrôle positif. Les résultats obtenus sont illustrés à la **Figure 11**. Ceux-ci indiquent clairement que, contrairement à l'Ad β -Gal et comme le vecteur pACCMV.pLpA recombinant, l'Ad CPT I/CPT II contient le fragment d'ADN codant la protéine chimérique insensible au malonyl-CoA.

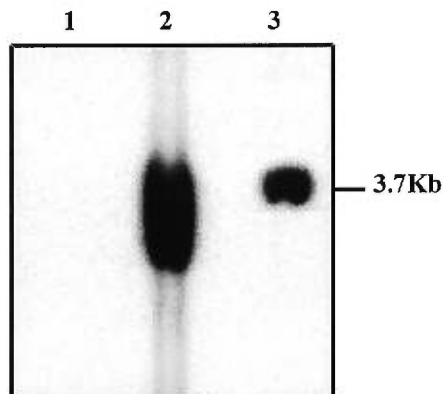


Figure 11 : Détection du fragment Nter.CPT I/CPT II dans le génome de l'adénovirus CPT I/CPT II. Les fragments de l'ADN digéré par l'enzyme NOT I ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et transférés sur une membrane de nylon hybridée avec la sonde 32 P-CPT I. (1): Ad β -Gal (>10 μ g); (2): Ad CPT I/CPT II (>10 μ g); (3): pACCMV.pLpA recombinant (200ng).

B. Effet de la protéine chimérique sur la capacité d'oxydation des acides gras

L'enzyme CPT I catalyse l'étape limitante de l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie (McGarry et al., 1990). De ce fait, elle joue un rôle important dans le partage des acides gras entre leur oxydation mitochondriale et leur accumulation dans le cytoplasme (Zammit, 1996). Selon le modèle proposé, l'inhibition de son activité par le malonyl-CoA serait impliquée dans le contrôle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ainsi, dans le but de vérifier le rôle putatif de l'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT I, nous avons d'abord mesuré la capacité d'oxydation du palmitate, un acide gras à chaîne longue, dans des cellules qui expriment la protéine chimérique insensible au malonyl-CoA. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules β -pancréatiques de la lignée INS-1 avec différentes doses de l'Ad CPT I/CPT II. Afin de s'assurer que les conditions de l'infection n'affectent pas la capacité d'oxydation des acides gras, nous avons également infecté les cellules avec l'Ad β -Gal et comparé leurs capacités oxydatives à celles de cellules "témoins" non infectées.

Les résultats sont exprimés en fonction de la capacité d'oxydation de cellules témoins incubées à 3mM glucose (**Figure 12**). Celles-ci manifestent une capacité d'oxydation particulièrement élevée (100%) puisque cette basse concentration de glucose n'est pas suffisante pour provoquer l'augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs, essentielle à la formation de malonyl-CoA. Cependant, lorsqu'on augmente la concentration de glucose à 20mM, les cellules témoins oxydent en moyenne 5 à 6 fois moins de palmitate. En fait, la présence du malonyl-CoA entraîne l'inhibition de la CPT I endogène et par conséquent, la suppression de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Les cellules infectées par l'Ad β -Gal et incubées en présence de 20mM glucose, ont un niveau d'oxydation similaire à celui de cellules témoins incubées dans les mêmes conditions, et ce indépendamment de la dose d'adénovirus utilisée. Ainsi peut-on dire que le processus d'infection n'exerce aucune influence sur l'oxydation des acides gras et que l'Ad β -Gal représente un bon contrôle. Par ailleurs, les cellules qui expriment la protéine chimérique ont une capacité d'oxydation des acides gras, à 20mM glucose, qui croît de façon proportionnelle à la dose d'Ad CPT I/CPT II

utilisée lors de l'infection. Ces résultats démontrent que la construction adénovirale est fonctionnelle et que de ce fait, elle constitue un moyen efficace permettant d'augmenter l'oxydation mitochondriale du palmitate à des concentrations de glucose qui induisent la sécrétion d'insuline. De plus, la dose d'adénovirus requise pour obtenir un niveau d'oxydation, à 20mM glucose, comparable à celui de cellules "témoins" incubées à 3mM glucose, doit être au moins égale ou supérieure à 4 pfu/cellule. Ainsi, toutes les expériences subséquentes ont été réalisées dans des cellules infectées avec une dose d'adénovirus correspondant à 6 pfu/cellule.

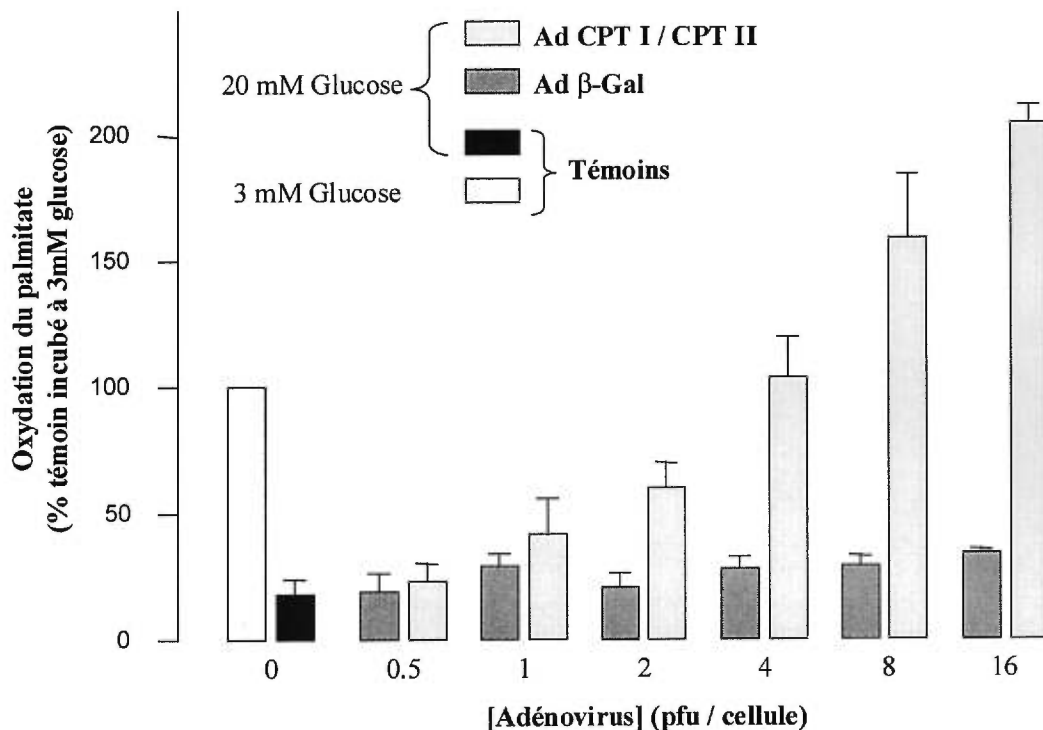


Figure 12 : La capacité d'oxydation du palmitate est augmentée de manière spécifique dans les cellules qui expriment la protéine chimérique. 48 heures après l'infection, les cellules sont préincubées en présence de KRB 3mM glucose et 0.5% BSA pour une période de 30 minutes. L'incubation se fait à 3 ou 20 mM glucose, en présence de 0.5% BSA, 1mM carnitine et 0.1mM palmitate pendant 1 heure. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins l'écart type moyen de 4-8 expériences.

C. Étude de l'action du 2-bromopalmitate sur l'activité de la protéine chimérique.

L'activité de l'enzyme CPT I, contrairement à celle de la CPT II, est inhibée par le malonyl-CoA et le 2-bromopalmitate (Declercq et al., 1987). Le 2-bromopalmitate est un agent pharmacologique non métabolisable qui inhibe, de manière irréversible, la CPT I endogène (Schulz, 1991). Afin d'exercer son effet inhibiteur, cet acide organique doit être converti intracellulairement en 2-bromopalmitoyl-CoA (Declercq et al., 1987). Il est à noter que la présence de la carnitine est essentielle à ce processus. Basé sur les travaux de Chase et Tubbs (Chase & Tubbs, 1972), il semblerait que l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le 2-bromopalmitoyl-CoA et la carnitine résulte de la formation d'un complexe ternaire au site actif de la CPT I (McGarry et al., 1990). Dans le but de déterminer l'effet du 2-bromopalmitate sur la protéine chimérique, nous avons mesuré l'oxydation du palmitate dans des cellules INS-1 infectées par l'Ad CPT I/CPT II et incubées en présence de 3 ou 20mM glucose avec ou sans 2-bromopalmitate (**Figure 13**).

En absence de 2-bromopalmitate, la protéine chimérique augmente de façon significative la quantité de palmitate oxydé par les cellules infectées avec l'Ad CPT I/CPT II, comparativement à la situation contrôle. L'ajout de l'inhibiteur dans les milieux de préincubation et d'incubation des cellules infectées par le virus contrôle, Ad β -Gal, a entraîné une réduction considérable de l'activité de la CPT I endogène, comme en témoigne la diminution de l'oxydation du palmitate. Cependant, le 2-bromopalmitate n'a pas affecté les capacités oxydatives promues par la protéine chimérique. Si l'activité de cette dernière est diminuée en présence de l'inhibiteur, ce n'est pas parce que le 2-bromopalmitate exerce une influence sur l'enzyme chimérique mais plutôt parce que les cellules infectées par l'Ad CPT I/CPT II expriment également la CPT I endogène dont l'activité est presque complètement abolie par l'agent inhibiteur. En conséquence, ces résultats démontrent que l'augmentation accrue de l'oxydation du palmitate, conférée par la protéine chimérique, ne peut être inhibée par le 2-bromopalmitate.

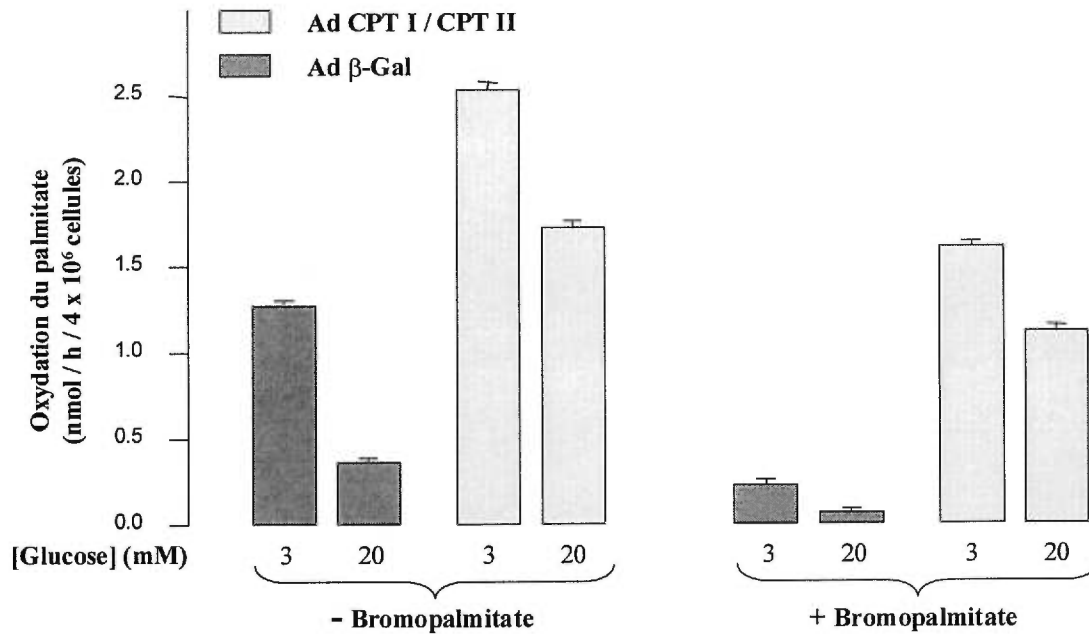


Figure 13 : L'activité de la protéine chimérique est indépendante de l'action du 2-bromopalmitate. 48 heures après l'infection, les cellules sont préincubées en présence de KRB 3mM glucose et 0.5% BSA, avec ou sans 0.4mM BrP (1mM carnitine), pour une période de 30 minutes. L'incubation se fait avec ou sans BrP (0.1mM), à 3 ou 20 mM glucose, en présence de 0.5% BSA, 1mM carnitine et 0.1mM palmitate pendant 1 heure. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins l'écart type moyen de 6-8 expériences.

D. Effet d'une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras sur la sécrétion d'insuline

Selon le modèle proposé, l'accumulation des acyl-CoAs dans le cytoplasme, résultant de l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA, potentialiserait la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG). Si cette hypothèse est juste, l'inhibition de la CPT I par le 2-bromopalmitate devrait inhiber l'oxydation mitochondriale des acides gras et stimuler la sécrétion d'insuline. C'est d'ailleurs ce que certains groupes de recherche ont démontré (Prentki et al., 1992; Chen et al., 1994). Toutefois, aucune évidence n'a permis d'établir l'existence d'un lien direct entre l'effet inhibiteur du 2-bromopalmitate sur la CPT I, et la stimulation de la sécrétion d'insuline. Nous avons donc entrepris d'éclaircir la situation. Étant donné que l'activité de la protéine chimérique n'est pas inhibée par le 2-bromopalmitate, nous avons mesuré la sécrétion d'insuline dans des cellules INS-1 infectées par l'Ad CPT I/CPT II et incubées en présence de 3 ou 20mM glucose avec ou sans 2-bromopalmitate (**Figure 14**).

Dans la situation contrôle, une augmentation de la concentration de glucose, de 3 à 20mM, stimule la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, l'ajout du 2-bromopalmitate permet de doubler la quantité d'insuline sécrétée en réponse au glucose. Ces résultats sont donc en accord avec les données publiées précédemment. Dans le cas des cellules qui expriment la protéine chimérique, les processus de sécrétion ne sont pas affectés par l'augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras. En effet, ces cellules sécrètent autant d'insuline que leur contrôle respectif à 3 et 20mM. D'autre part, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose demeure inchangée par l'ajout du 2-bromopalmitate, lorsqu'on compare à la situation contrôle en présence de l'inhibiteur. Pourtant, l'oxydation des acides gras n'est pas inhibée dans les cellules qui expriment la protéine chimérique puisque celle-ci est insensible au 2-bromopalmitate. En résumé, ces résultats montrent que des variations dans la capacité des cellules INS-1 à oxyder les acides gras ne permettent de contrôler la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ainsi peut-on dire que l'inhibition de la CPT I par le malonyl-CoA ne permet pas de réguler la sécrétion d'insuline dans les cellules clonales β (INS-1). De plus, le

mécanisme par lequel le 2-bromopalmitate stimule la sécrétion d'insuline n'est pas lié à son effet inhibiteur sur la CPT I et l'oxydation mitochondriale des acides gras puisque celui-ci potentialise la sécrétion dans des conditions où son action inhibitrice sur l'oxydation du palmitate est outrepassée.

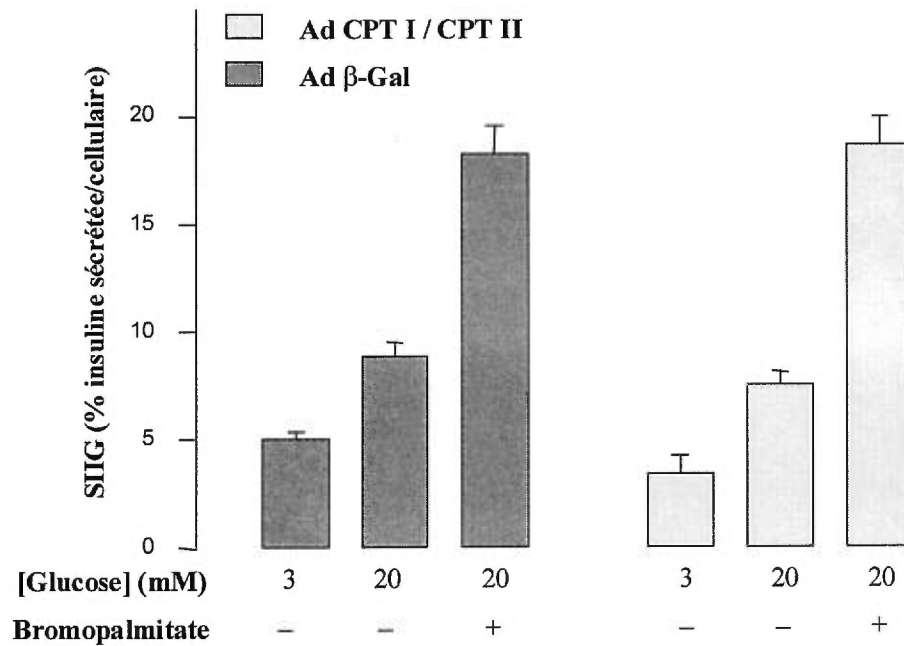


Figure 14 : La sécrétion d'insuline induite par le glucose n'est pas affectée par une augmentation de la capacité d'oxydation des acides gras. 48 heures après l'infection, les cellules sont préincubées en présence de KRB 3mM glucose et 0.5% BSA, avec ou sans 0.4mM BrP (1mM carnitine), pour une période de 30 minutes. L'incubation se fait pendant 30 minutes avec ou sans BrP (0.4mM), à 3 ou 20 mM glucose, en présence de 0.5% BSA et 1mM carnitine. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins l'écart type moyen de 6 expériences.

E. Effet des acides gras exogènes sur la sécrétion d'insuline

La stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras exogènes est associée à une élévation importante du contenu cellulaire en acyl-CoAs (Prentki et al., 1992). On croit en fait que les acides gras fournissent les groupements acyls nécessaires à la formation de molécules d'acyl-CoAs, ou de leur dérivés lipidiques, dont on croit qu'ils sont impliqués dans la sécrétion d'insuline. Comme l'action du glucose sur la sécrétion d'insuline ne semble pas dépendre des changements liés à l'oxydation des acides gras, nous nous sommes proposés de démontrer que le mécanisme d'action par lequel les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline, ne fait pas intervenir leur oxydation mitochondriale. Pour ce faire, nous avons mesuré la sécrétion d'insuline dans des cellules INS-1 infectées par l'Ad CPT I/CPT II et incubées à 3 ou 20mM glucose, en présence de BSA ou d'oléate, un acide gras à chaîne longue, lié à la BSA (**Figure 15**).

Comme l'indiquent les résultats obtenus dans la situation contrôle, l'oléate stimule la sécrétion d'insuline, à 3 et 20mM glucose, par rapport aux cellules incubées en présence de BSA seulement. Les cellules dans lesquelles la capacité d'oxydation des acides gras est augmentée, présentent également une sécrétion d'insuline potentialisée par l'ajout d'oléate et ce, au même niveau que les cellules infectées par le virus contrôle. Ainsi, comme nous l'avions anticipé, la stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras exogènes ne semble pas dépendre de leur oxydation mitochondriale. Ces résultats, de même que ceux obtenus dans la section précédente, suggèrent que le flux oxydatif est trop peu important pour influencer de façon considérable la sécrétion d'insuline.

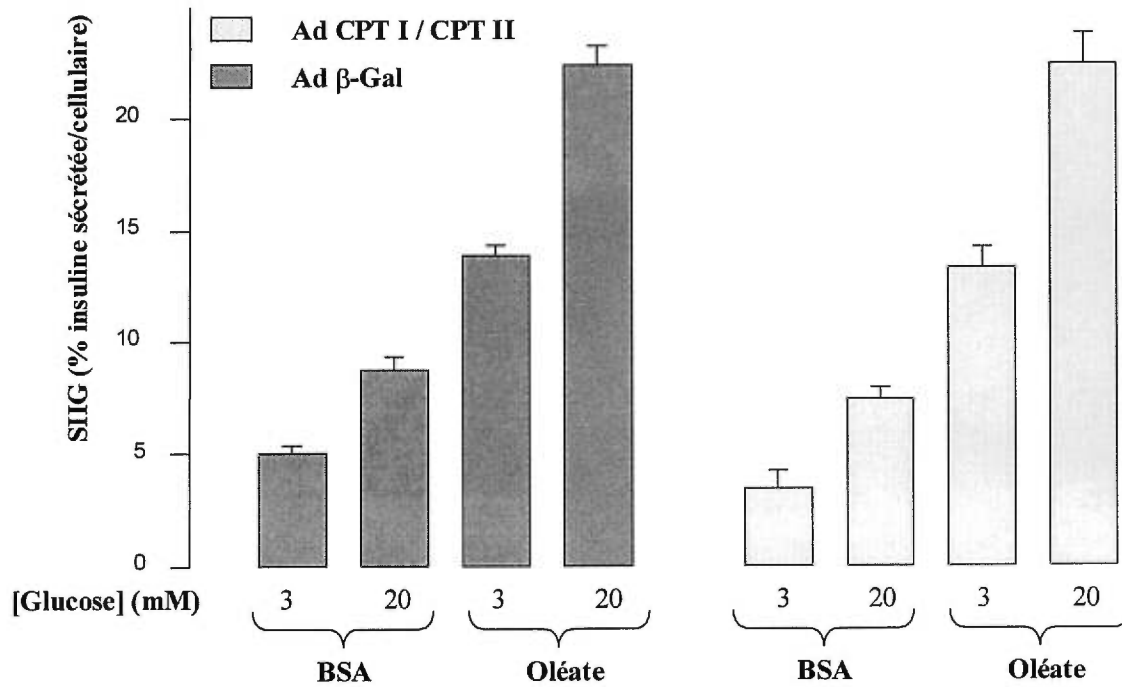


Figure 15 : La stimulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras exogènes ne fait pas intervenir leur oxydation mitochondriale. 48 heures après l'infection, les cellules sont préincubées en présence de KRB 3mM glucose et 0.5% BSA pour une période de 30 minutes. L'incubation se fait pendant 30 minutes avec ou sans oléate (0.4mM), à 3 ou 20 mM glucose, en présence de 0.5% BSA et 1mM carnitine. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins l'écart type moyen de 6 expériences.

F. Effet de la protéine chimérique sur l'estérification des acides gras

Comme nous l'avons déjà mentionné, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est associée à l'inhibition de l'oxydation des acides gras ainsi qu'à une augmentation de leur estérification en lipides complexes. Il a été suggéré qu'une augmentation des acyl-CoAs à chaîne longue dans le cytoplasme ou une synthèse accrue de lipides complexes suite à une inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose pourraient être des phénomènes clés dans la sécrétion d'insuline. Nous avons donc cherché à savoir si le flux oxydatif mitochondrial contrôle l'estérification des acides gras et par conséquent, la formation de lipides complexes, possiblement impliqués dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De ce fait, nous avons jugé utile de mesurer l'incorporation du palmitate dans les lipides totaux dans des cellules infectées par l'Ad CPT I/CPT II et incubées en présence de concentrations variables de glucose et de palmitate (**Figure 16**).

En présence de 0.1mM palmitate, la stimulation de cellules contrôles par une augmentation de la concentration de glucose, entraîne une élévation de la quantité de palmitate incorporé dans les lipides. Dans les mêmes conditions d'incubation, les cellules qui expriment la protéine chimérique se sont comportées de manière identique. D'autre part, l'utilisation d'une plus grande concentration de palmitate, soit 0.4mM, provoque une élévation du niveau d'estérification des acides gras indépendamment qu'il s'agisse de cellules infectées par l'Ad β -Gal ou Ad CPT I/CPT II. Un fait intéressant à remarquer est que la disponibilité du glycérol 3-phosphate, un produit de la glycolyse qui compose la plupart des lipides complexes, ne semble pas être un facteur limitant pour les réactions d'estérification. Effectivement, l'incorporation du palmitate dans les lipides totaux, pour une même concentration de glucose est augmenté si la concentration de palmitate l'est aussi. Ces résultats permettent donc d'affirmer que le glucose stimule l'estérification des lipides mais que l'oxydation des acides gras, à court terme, ne l'influence aucunement. Il apparaît donc évident qu'il existe d'autres facteurs, contrôlés par le glucose, qui régulent les processus d'estérification.

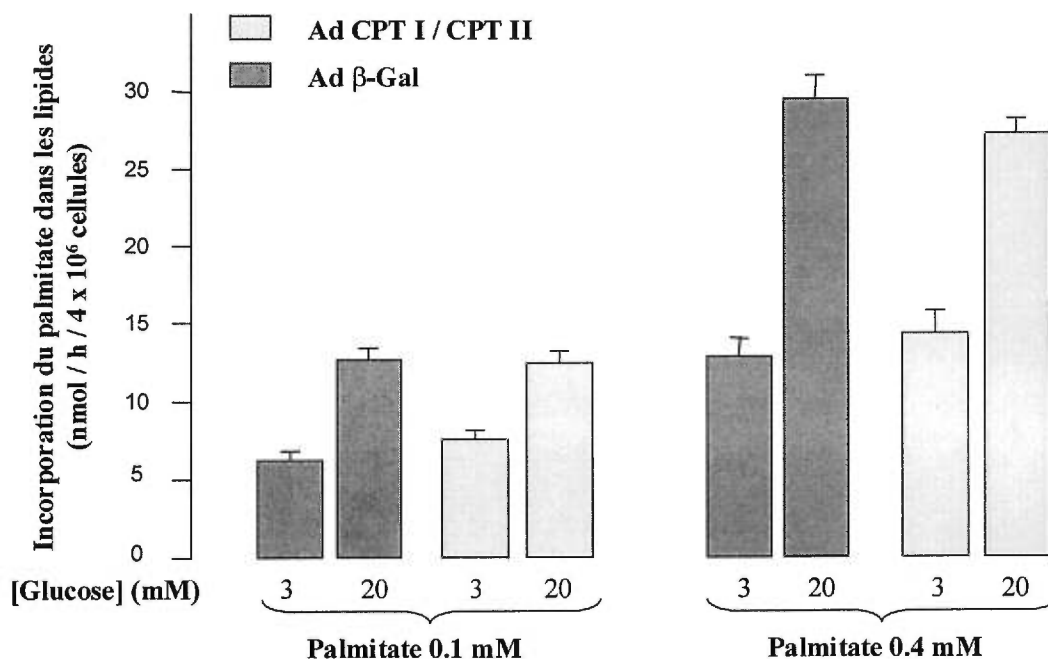


Figure 16 : L'action du glucose sur les processus d'estérification est indépendante de l'oxydation mitochondriale des acides gras. 48 heures après l'infection, les cellules sont préincubées en présence de KRB 3mM glucose et 0.5% BSA pour une période de 30 minutes. L'incubation se fait avec 0.1 ou 0.4mM palmitate, à 3 ou 20 mM glucose, en présence de 0.5% BSA, et 1mM carnitine pendant 1 heure. Les valeurs représentent la moyenne plus ou moins l'écart type moyen de 5-10 expériences.

IV. DISCUSSION

Il va sans dire que depuis un certain nombre d'années, plusieurs constatations ont permis d'établir un lien étroit entre le métabolisme du glucose et celui des lipides, dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. Alors que la régulation de ce processus par le glucose s'explique en partie par la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP et une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, le glucose semble également induire une altération du métabolisme lipidique. En effet, la stimulation de cellules β -pancréatiques, par des concentrations de glucose qui induisent la sécrétion d'insuline, accélère la formation de malonyl-CoA. Grâce à son action inhibitrice sur l'enzyme mitochondriale CPT I, le malonyl-CoA provoque une réduction de l'oxydation des acides gras ainsi qu'une augmentation de leur estérification en lipides. Basé sur ces observations, Prentki et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse que les acyl-CoAs pourraient être des facteurs de couplages métaboliques impliqués dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et que leur accumulation dans le cytoplasme est régulée par l'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT I.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons perturbé le métabolisme lipidique de la cellule β -pancréatique par une approche moléculaire. Ainsi nous avons utilisé un adénovirus recombinant, codant une protéine chimérique insensible au malonyl-CoA, afin d'activer de manière constitutive l'oxydation mitochondriale des acides gras. Comme nous l'avons démontré, les cellules INS-1 infectées avec une dose supérieure ou égale à 4 pfu/cellule et incubées à 20mM glucose, présentent une capacité d'oxydation des acides gras comparable (ou supérieure) à celle de cellules infectées par un virus contrôle β -Gal et incubées en présence de 3mM glucose. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus indique que les capacités oxydatives ne contrôlent pas la disponibilité cytoplasmique des dérivés lipidiques actifs, qui pourraient être impliqués dans la sécrétion d'insuline. De ce fait, il s'ensuit que le modèle métabolique proposé doit, en partie, être modifié. Néanmoins, nous ne remettons pas en cause le rôle potentiel du malonyl-CoA et de la CPT I en tant que régulateurs individuels des processus de l'insulinosécrétion. Nous croyons simplement que l'inhibition de l'oxydation des acides gras par le malonyl-CoA agissant sur la CPT I, ne

permet pas d'expliquer la disponibilité des acyl-CoAs pour les processus d'estérification ainsi que la sécrétion d'insuline.

Au même moment où nous avons entrepris l'étude de ce projet de recherche, d'autres groupes ont également tenté d'adresser la question au moyen de stratégies différentes. Notamment, Antinozzi et ses collègues (Antinozzi et al., 1998) ont construit un adénovirus recombinant contenant l'ADNc codant la malonyl-CoA décarboxylase (MCD), une enzyme qui décarboxyle le malonyl-CoA en acétyl-CoA. Les résultats obtenus suite à l'infection de cellules INS-1 avec cet adénovirus indiquent que la sécrétion d'insuline demeure inchangée bien que l'oxydation des acides gras ait été stimulée. Contrairement, aux résultats que nous avons obtenus, ceux-ci suggèrent que le malonyl-CoA ne contribue pas au mécanisme par lequel le glucose induit la sécrétion d'insuline. Cependant nous nous permettons de discuter la valeur de ces observations et ce, pour plusieurs raisons. D'abord, le fragment d'ADNc codant la MCD n'a pas été dépourvu de sa séquence de localisation peroxisomale. Il est donc probable que l'enzyme n'ait été exprimée que dans ce compartiment et non dans le cytoplasme, où l'accumulation du malonyl-CoA est jugée importante. De plus, la multiplicité d'infection utilisée pour infecter les cellules correspond à une dose de 1 000 pfu/cellule, appliquée pour 24 heures. Une dose plutôt élevée puisque seulement 5 à 10 pfu/cellule, appliqués pour une heure, sont suffisants pour permettre une efficacité de transfection supérieure à 80% (Becker et al., 1994). Par ailleurs, la mesure de la sécrétion d'insuline a été effectuée dans des cellules dont le passage était compris entre 180 et 260. Selon notre expérience, les cellules dont le passage excède le nombre de 100, ne répondent plus au glucose. De ce fait, ceci pourrait possiblement expliquer l'absence d'un effet au niveau de la sécrétion d'insuline.

D'autres observations, cette fois-ci provenant des études menées par Zhang et Kim (Zhang & Kim, 1998), nous permettent de croire que le malonyl-CoA est impliqué dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ces auteurs ont généré des transfectants stables de cellules INS-1 exprimant un ARN antisens spécifique dirigé contre celui codant l'acétyl-CoA carboxylase. Leurs résultats montrent que la diminution de l'expression de l'enzyme est accompagnée d'une forte réduction de la synthèse du malonyl-CoA ainsi que d'une élévation

de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Parallèlement, l'inhibition de la production du malonyl-CoA a entraîné une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, en utilisant une approche différente, permettant également d'inhiber l'accroissement des niveaux de malonyl-CoA, Zhang et Kim sont parvenus à une toute autre conclusion.

En accord avec ces observations, la sécrétion d'insuline en réponse à 20mM glucose est réduite de manière considérable lorsque des îlots pancréatiques perfusés sont mis en présence d'hydroxycitrate (Chen et al., 1994). Les résultats issus de la même publication démontrent que des îlots isolés et cultivés en présence d'hydroxycitrate, manifestent une augmentation de l'oxydation mitochondriale du palmitate et une réduction de l'incorporation de ce dernier dans les phospholipides. Il est à noter que le groupe d'Antinozzi a également observé une réduction de l'incorporation du palmitate dans les lipides totaux chez les cellules infectées par l'adénovirus recombinant et incubées à 20mM glucose (Antinozzi et al., 1998).

L'ensemble de ces données nous amène donc à spéculer que le malonyl-CoA pourrait réguler l'activité de certaines enzymes impliquées dans les réactions d'estérification. Comme la stratégie que nous avons employée pour moduler la sécrétion d'insuline ne devrait pas affecter la concentration de malonyl-CoA, il apparaît possible que ceci explique la raison pour laquelle nous n'avons pas observé d'effet sur l'incorporation du palmitate dans les lipides totaux. De plus, comme nous l'avons déjà mentionné, la stimulation de la sécrétion d'insuline est associée à une augmentation de l'estérification des acides gras en lipides. Dans le but de confirmer les résultats obtenus par l'infection de cellules avec l'adénovirus MCD, Antinozzi et ses collègues ont incubé des cellules INS-1 en présence de triacsin C, un inhibiteur de l'acyl-CoA synthétase (Antinozzi et al., 1998). Cet agent pharmacologique a provoqué une diminution de l'incorporation du palmitate dans les triglycérides (90%) et les phospholipides (50%) sans toutefois affecter la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Nous avons cependant quelques réserves concernant la signification de ces résultats puisqu'il a été démontré que la triacsin C est très efficace pour inhiber la synthèse des triglycérides et phospholipides à partir de glycérol, alors que l'incorporation de l'oléate et de l'acide arachidonique dans les phospholipides demeure relativement inchangée (Igal et al., 1997). À la lumière de ces observations, il est raisonnable de supposer que l'effet diminué de la

triacsin C sur l'estérfication du palmitate en phospholipides ait permis de maintenir une sécrétion d'insuline adéquate en réponse au glucose.

Bien que nous ayons démontré que l'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT I n'est pas impliquée dans la sécrétion d'insuline, cela n'exclue pas la possibilité que l'oxydation mitochondriale puisse remplir d'autres fonctions cellulaires régulées par la CPT I. D'ailleurs, celle-ci a été mentionnée à plusieurs reprises dans un certain nombre de travaux de recherche portant sur le diabète de type II. Avant de discuter de son rôle dans le développement de cette pathologie, nous tenons d'abord à souligner quelques faits importants. Tout d'abord, une portion considérable des individus obèses développe cette forme de diabète. En fait, il est généralement admis que la concentration élevée des acides gras libres dans la circulation de ces personnes représente un facteur étiologique important. Durant le stade précoce de la maladie, l'accumulation des acides gras dans les îlots pancréatiques aurait pour effet de compenser la résistance tissulaire à l'insuline en causant une hyperplasie des cellules β ainsi qu'une surproduction d'insuline. Cependant, lorsque le contenu en acides gras atteint des niveaux extrêmement élevés, les effets compensatoires sont renversés. La perte de près de la moitié de la masse des cellules β semble être à l'origine de la décompensation. Certaines études ont révélé que la "lipotoxicité", induite par l'accumulation des acides gras, stimule l'apoptose de la cellule β -pancréatique. Grâce à l'utilisation d'un modèle animal du diabète de type II (rat ZDF), le groupe de Shimabukuro (Shimabukuro et al., 1998) a démontré que lorsque les acides gras sont captés plus rapidement qu'ils ne peuvent être oxydés dans la mitochondrie de la cellule β , ceux-ci stimulent la formation d'oxyde nitrique et de céramides, deux composés capables de déclencher l'apoptose. L'expression du gène de l'oxyde nitrique synthétase (ONS), l'enzyme qui catalyse la formation d'oxyde nitrique, est normalement stimulée par les acides gras, et les îlots de rats obèses contiennent une quantité considérable de l'enzyme et son produit. La culture des îlots de ces mêmes rats en présence de triacsin C entraîne une diminution de l'expression de l'ONS ainsi que de l'apoptose. Parallèlement, l'utilisation de troglitazone, un agent pharmacologique permettant de réduire le contenu d'acides gras en augmentant leur oxydation mitochondriale, donne des résultats comparables. D'autre part, les auteurs ont démontré que les niveaux de céramides chez le rat ZDF, augmentent progressivement suivant les différents stades du développement du diabète.

Leurs résultats ont également permis d'établir une corrélation positive entre l'accumulation de ce composé et la fragmentation de l'ADN, un indice de l'apoptose. La mesure de l'incorporation du palmitate dans les céramides et de son oxydation mitochondriale a révélé que les rats obèses et diabétiques oxydent environ 77% moins de palmitate que les rats contrôles. À l'opposé, ils synthétisent beaucoup plus de céramides que ces derniers. Dans le but de vérifier si les céramides sont impliqués directement dans l'induction de l'apoptose, Shimabukuro et ses collègues ont mesuré la fragmentation de l'ADN en présence de céramides exogènes ou d'un inhibiteur de la céramide synthétase (fumonisin B₁). Les résultats indiquent que l'ajout de céramides exogènes stimule l'apoptose alors que la fumonisin B₁ la prévient.

En résumé, l'accumulation des acides gras cytoplasmiques, résultant d'une diminution de leur oxydation mitochondriale, favorise la production de céramides et d'oxyde nitrique qui causent l'apoptose de la cellule β . À la suite de ces constatations, nous sommes tentés de croire que la CPT I puisse représenter un mécanisme de protection cellulaire contre l'apoptose. En fait, il a déjà été démontré, dans des cellules souches hématopoïétiques, que l'inhibition de la CPT I par une drogue appelée etomoxir, stimule l'apoptose induite par le palmitate (Paumen et al., 1997). D'autre part, les résultats publiés indiquent qu'en présence de l'inhibiteur, la synthèse de céramides augmente d'un facteur 2. Ainsi peut-on émettre l'hypothèse que la CPT I protège de l'apoptose en régulant à la baisse, la synthèse de céramides.

Finalement, nous sommes d'avis que la CPT I représente un site d'action potentiel pour plusieurs agents pharmacologiques dans le traitement du diabète de type II. Une façon de vérifier cette hypothèse serait de surexprimer la protéine chimérique CPT I/CPT II chez des rats ZDF obèses et diabétiques. L'activation constitutive de l'oxydation mitochondriale des acides gras pourrait possiblement prévenir l'apoptose de la cellule β et par conséquent l'apparition de la maladie.

Perspectives

L'étude du métabolisme dans des lignées cellulaires transformée est compliquée par le fait que ces dernières sont déplacées de leur environnement naturel. Il est donc difficile d'établir une corrélation entre les résultats obtenus dans la présente étude et les événements physiologiques qui caractérisent un organisme. Ainsi, nous nous proposons d'étudier la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans des souris transgéniques qui surexpriment la protéine chimérique insensible au malonyl-CoA, dans les cellules β -pancréatiques. Cette nouvelle approche devrait nous permettre de vérifier si les résultats observés en culture sont reproductibles *in vivo*.

D'autre part, si le malonyl-CoA et la CPT I sont impliqués dans la sécrétion d'insuline, la variation de l'expression de l'acétyl-CoA carboxylase ainsi que celle de l'enzyme CPT I devrait avoir des répercussions sur la transduction des signaux de la cellules β . En vérité, il a déjà été démontré que les acides gras ont un effet considérable sur l'expression de ces transcrits. Alors qu'ils provoquent une répression d'environ 50% de l'expression de l'acétyl-CoA carboxylase et de son activité (Brun et al., 1997), ces nutriments causent inversement une élévation importante du transcrit de la CPT I et de l'oxydation des acides gras (Assimacopoulos-Jeannet et al, 1997). De manière à vérifier si la régulation de l'expression de ces gènes par les acides gras fait intervenir leur oxydation mitochondriale, nous nous proposons de mesurer le niveau d'expression de chacun de ces transcrits dans des cellules de la lignée INS-1 infectées par l'Ad CPT I/CPT II.

En dernier lieu, des travaux sont déjà en cours dans notre laboratoire afin de déterminer le mécanisme par lequel le glucose promeut l'estérification des lipides. Nous sommes particulièrement intéressés à savoir si le glucose, ou le malonyl-CoA, pourrait directement activer la glycérol 3-phosphate acyltransférase, une enzyme qui catalyse l'étape initial de la synthèse des lipides complexes. Il est important de noter que l'activité de cette enzyme est élevée par un facteur 12 dans les îlots pancréatiques de rats ZDF obèses et diabétiques (Lee et al., 1997).

V. RÉFÉRENCES

- Antinozzi, P.A., Segall, L., Prentki, M., McGarry, J.D., and Newgard, C.B. (1998). Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion: a re-evaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis. *J. Biol. Chem.* 273, 16146-54.
- Aridor, M., Rajmilevich, G., Beaven, M.A., and Sagi-Eisenberg, R. (1993). Activation of exocytosis by the heterotrimeric G protein G₁₃. *Science* 262, 1569-72.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., and Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependant differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-78.
- Ashcroft, S.J.H., and Randle, P.J. (1970). Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets. *Biochem. J.* 119, 5-15.
- Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Roche, E., Esser, V., McGarry, J.D., and Prentki, M. (1997). Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic β -cell line INS-1. *J. Biol. Chem.* 272, 1659-64.
- Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gomez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., and Newgard, C.B. (1994). Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods in Cell Biology* 43, 161-89.
- Berne, C. (1975). The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets: the oxidation of fatty acids and ketone bodies. *Biochem. J.* 152, 661-6.
- Berne, C. (1975). The metabolism of lipids in mouse pancreatic islets: the biosynthesis of triacylglycerols and phospholipids. *Biochem. J.* 152, 667-73.
- Bronfman, M., Morales, M.N., and Orellana, A. (1988). Diacylglycerol activation of protein kinase C is modulated by long chain acyl-CoA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 987-92.
- Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., Kim, K.-H., and Prentki, M. (1996). Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic β -cell nutrient signaling. *Diabetes* 45, 190-8.
- Brun, T., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., and Prentki, M. (1997). Long chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the β -cell line INS-1. *Diabetes* 46, 393-400.
- Chase, J.F.A., and Tubbs, P.K. (1972). Specific inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation by 2-bromopalmitate and its coenzyme A and carnitine esters. *Biochem. J.* 129, 55-65.
- Chen, S., Ogawa, A., Ohneda, M., Unger, R.H., Foster, D.W., and McGarry, J.D. (1994). More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic β -cell signaling. *Diabetes* 43, 878-83.

- Cohen, I., Kohl, C., McGarry, J.D., Girard, J., and Prip-Buus., C. (1998). The N-terminal domain of rat liver carnitine palmitoyltransferase I mediates import into the outer mitochondrial membrane and is essential for activity and malonyl-CoA sensitivity. *J. Biol. Chem.* 273, 29896-904.
- Corkey, B.E., Glennon, M.C., Chen, K.S., Deeney, J.T., Matschinsky, F.M., and Prentki, M. (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21608-12.
- Cotran, R.S., Kumar, V., and Robbins, S.L. (1994). *Pathologic basis of disease*. 5th ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Cook, D.L., and Hales, C.N. (1984). Intracellular ATP directly block K^+ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311, 271-73.
- Curi, R., Carpinelli, A.R., and Malaisse, W.J. (1991). Hexose metabolism in pancreatic islets: pyruvate carboxylase activity. *Biochimie* 73, 583-6.
- Declercq, P.E., Falck, J.R., Kuwajima, M., Tyminski, H., Foster, D.W., and McGarry, J.D. (1987). Characterization of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system I. use of inhibitors. *J. Biol. Chem.* 262, 9812-21.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Gembal, M., Gilon, P., and Henquin, J.C. (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse β -cells. *J. Clin. Invest.* 89, 1288-95.
- Glick, B.S., and Rothman, J.E. (1987). Possible role of fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 326, 309-12.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- Guyton, A.C., and Hall, J.E. (1996). *Textbook of medical physiology*. 9th ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Hedeskov, C.J. (1980). Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.* 60, 442-509.
- Herbert, V., Lau, K.-S., Gottlieb, C.W., and Bleicher, J. (1965). Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocr.* 25, 1375-84.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26, 365-69.
- Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D., and Schimgeouh, K.G. (1993). *Principles of biochemistry*. Prentice Hall, Englewood Clippis.
- Igal, R.A., Wang, P., and Coleman, R.A. (1997). Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acids into phospholipids: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. *Biochem. J.* 324, 529-34.

- Kahn, C.R. (1994). Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066-84.
- Kelly, R.B. (1993). Storage and release of neurotransmitters. *Cell*, 72, 43-53.
- Lee, Y., Hirose, H., Zhou, Y.-T., Esser, V., McGarry, J.D., and Unger, R.H. (1997). Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats: a role in the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 46, 408-13.
- Louis, N.A., and Witters, L.A. (1992). Glucose regulation of acetyl-CoA carboxylase in hepatoma and islet cells. *J. Biol. Chem.* 267, 2287-93.
- MacDonald, M.J., McKenzie, D.I., Walker, T.M., and Kaysen, J.H. (1992). Lack of glyconeogenesis in pancreatic islets: expression of gluconeogenic enzyme genes in islet. *Horm. Metab. Res.* 24, 158-60.
- MacDonald, M.J. (1993). Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 205-14.
- Malaisse, W.J., Sener, A., Herchuelz, A., and Hutton, J.C. (1979). Insulin release: The fuel hypothesis. *Metabolism* 28, 373-86.
- Malaisse, W.J., Best, L., Kawasu, S., Malaisse-Lagae, F., and Sener, A. (1983). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: fuel metabolism in islets deprived of exogenous nutrient. *Arch. Biochem. Biophys.* 224, 102-10.
- McGarry, J.D., and Foster D.W. (1979). In support for roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *J. Biol. Chem.* 254, 8163-8.
- McGarry, J.D., and Foster D.W. (1980). Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone bodies production. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 395-420.
- McGarry, J.D., Woeltje, K.F., Schroeder, J.G., Cox, W.F., and Foster, D.W. (1990). Carnitine palmitoyltransferase – structure/function/regulatory relationships. *Prog. Clin. Biol. Res.* 321, 193-208.
- McGrory, W.J., Bautista, D.S., and Graham, F.L. (1988). A simple technique for the rescue of early region 1 mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163, 614-17.
- Montague, W. (1983). *Diabetes and the endocrine pancreas: A biochemical approach.* Oxford university press inc, New York.
- Olszewski, S., Deeney, J.T., Schuppin, G.T., Williams, K.P., Corkey, B.E., and Rhodes, C.J. (1994). Rab3a effector domain peptides induce insulin exocytosis via a specific interaction with a cytosolic protein doublet. *J. Biol. Chem.* 269, 27987-91.
- Orci, L., and Unger, R.H. (1975). Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 2, 1243-4.

- Ordway, R.W., Walsh, J.V., and Singer, J.J. (1989). Arachidonic acid and other fatty acids directly activate potassium channels in smooth muscle cells. *Science* 244, 1176-9.
- Paumen, M.B., Ishida, Y., Muramatsu, M., Yamamoto, M., and Honjo, T. (1997). Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 3324-29.
- Peter-Riesch, B., Fathi, M., Schlegel, W., and Wollheim, C.B. (1988). Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets. *J. Clin. Invest.* 81, 1154-61.
- Pfanner, N., Orci, L., Glick, B.S., Amherdt, M., Arden, S.R., and Malhotra, V. (1989). Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59, 95-102.
- Pfanner, N., Glick, B.S., Arden, S.R., and Rothman, J.E. (1990). Fatty acylation promotes fusion of transport vesicles with Golgi cisternae. *J. Cell. Biol.* 110, 955-61.
- Porte, D. (1991). β -cells in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 40, 166-80.
- Prentki, M., and Matschinsky, F.M. (1987). Ca^{2+} , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67, 1185-248.
- Prentki, M., Vischer, S., Brun, T., Glennon, M.C., and Corkey, B.E. (1991). Metabolic coupling factor in β -cell insulin secretion. In *Diabetes*. Rifkin, H., Colwell, J.A., Taylor, S.I., Eds. Amsterdam, Elsevier. p156-60.
- Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M.C., Regazzi, R., Deeney, J.T., and Corkey, B.E. (1992). Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 267, 5802-10.
- Prentki, M., and Corkey, B.E. (1996). Are the β -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM. *Diabetes* 45, 273-83.
- Rorsman, P., and Trube, G. (1985). Glucose-dependant K^+ channels in pancreatic β -cells are regulated by intracellular ATP. *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* 405, 305-9.
- Rothman, J.E., and Orci, L. (1990). Movement of proteins through the Golgi stack: a molecular dissection of vesicular transport. *FASEB J.* 4, 1460-8.
- Schmidt, M.F.G. (1989). Fatty acylation of protein. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 411-26.
- Schulz, H. (1991). Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1081, 109-20.
- Sener, A., and Malaisse, W.J. (1984). Nutrient metabolism in islet cells. *Experientia* 40, 1026-35.
- Sener, A., and Malaisse, W.J. (1991). Hexose metabolism in pancreatic islets. Effect of (-)-hydroxycitrate upon fatty acid synthesis and insulin release in glucose-stimulated islets. *Biochimie* 73, 1287-90.

Shimabukuro, M., Zhou, Y.-T., Levi, M., and Unger, R.H. (1998). Fatty acid-induced β -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2498-2502.

Shoyab, N. (1985). Long chain acyl-coenzyme A activate both the ligand binding and protein kinase activity of phorboid and ingenoid receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 236, 435-40.

Shrago, E., MacDonald, M.J., Woldegiorgis, G., Bremer, J., and Schalinske, K. (1986). The role of carnitine palmitoyltransferase and carnitine in the metabolism of pancreatic islets. In: Borum P.R., editor. *Clinical aspects of human carnitine deficiency*. New York: Pergamon Press. 28-37.

Sleeman, M.W., Donegan, N.P., Heller-Harrison, R., Lane, W.S., and Czech, M.P. (1998). Association of acyl-CoA synthetase-1 with Glut-4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* 273, 3132-35.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-17.

Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S., and McGarry, J.D. (1996). Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J. Clin. Invest.* 97, 2728-35.

Tamarit-Rodriguez, J., Vara, E., and Tamarit, J. (1984). Starvation-induced changes of palmitate metabolism and insulin secretion in isolated rat islets stimulated by glucose. *Biochem. J.* 221, 317-24.

Thorens, B., Sakar, H.K., Kaback, H.R., and Lodish, H.F. (1988). Cloning and functional expression of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and β -pancreatic islet cells. *Cell* 55, 281-90.

Vara, E., and Tamarit-Rodriguez, J. (1986). Glucose stimulation of insulin secretion in islets of fed and starved rats and its dependence on lipid metabolism. *Metabolism* 35, 266-71.

Vara, E., Fernandez-Martin, O., Garcia, C., and Tamarit-Rodriguez, J. (1988). Palmitate dependence of insulin secretion, "de novo" phospholipid synthesis and $^{14}\text{Ca}^{2+}$ turnover in glucose stimulated rat islets. *Diabetologia* 31, 687-93.

Zammit, V.A. (1996). Role of insulin in hepatic fatty acid partitioning: emerging concepts. *Biochem. J.* 314, 1-14.

Zhang, S., and Kim, K.-H. (1998). Essential role of acetyl-CoA carboxylase in the glucose-induced insulin secretion in a pancreatic β -cell line. *Cell signal* 10, 35-42.