

2m11.2908.8

Université de Montréal

Étude du rôle de la malonyl-CoA décarboxylase dans la  
transduction de signaux de la cellule  $\beta$ -pancréatique

Par

Frédéric Massé

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté des Études Supérieures

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

Août, 2001

©Frédéric Massé, 2001



QH  
506  
154  
2001  
N. 020

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude du rôle de la malonyl-CoA décarboxylase dans la  
transduction de signaux de la cellule  $\beta$ -pancréatique

présenté par :

Frédéric Massé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ted Bradley : Président du jury  
Dr. Marc Prentki : Directeur de recherche  
Dr. Christine Des Rosiers : Membre du jury

Mémoire accepté le :

## SOMMAIRE

Le diabète de type II est une maladie touchant de plus en plus de gens de tous âges. La plupart des patients diabétiques de type II sont obèses. Une augmentation des acides gras à longue chaîne carbonée (LC-CoA) causerait une résistance à l'insuline dans le foie, le muscle et les adipocytes et par conséquent une hyperglycémie lorsque la cellule  $\beta$ -pancréatique devient défectueuse ou meure par apoptose.

Un modèle de signalisation dans la cellule  $\beta$  faisant appel à deux voies de transduction de signaux métaboliques et expliquant la sécrétion d'insuline induite par le glucose a été proposé. La première voie implique une augmentation du rapport ATP/ADP et un changement du potentiel membranaire. La deuxième est une voie anaplérotique impliquant le malonyl-CoA et les acyls-CoA à longue chaîne carbonée. La relation qui existe entre les acides gras, la sécrétion d'insuline et l'apoptose des cellules  $\beta$  n'est pas bien comprise. Il est donc intéressant d'étudier dans la cellule  $\beta$  le rôle des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des acides gras. Une interaction importante en ce qui a trait à l'oxydation des acides gras est celle entre le malonyl-CoA et la carnitine palmitoyltransférase-I (CPT-I). Le malonyl-CoA sert d'une part de substrat pour la biosynthèse des acides gras et inhibe d'autre part la CPT-I empêchant ainsi la dégradation des acides gras. Une enzyme qui régule la concentration de malonyl-CoA est la malonyl-CoA décarboxylase. Le rôle et la régulation de cette enzyme sont peu connus.

Nous avons étudié la régulation du gène de la MCD à court et long terme par les acides gras et le glucose au niveau de l'expression de son ARNm et de sa protéine, ainsi que de son activité enzymatique. De plus, afin de tester le modèle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, nous avons produit des cellules  $\beta$ (INS) pancréatiques stables surexprimant la MCD dans le cytosol (MCDc). De plus, nous avons étudié l'effet de la surexpression de la MCD lors de l'infection des

îlots de Langerhans avec un adénovirus recombinant codant soit pour la MCD de type sauvage (MCDn) ou la MCDc.

Nos résultats démontrent que le glucose et les acides gras ne régulent pas à long terme les niveaux d'ARNm et de protéine MCD dans la lignée cellulaire INS-832/13. Par contre le glucose et l'oléate augmentent l'activité enzymatique de la MCD à court et long terme. Finalement, le niveau d'ARNm de la MCD ne changent pas dans les rats hyperglycémiques mais augmente dans les rats hyperlipidiques.

De plus, nous démontrons que la surexpression de la MCDc n'altèrent pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules  $\beta$ (INS). Par contre, la surexpression de la MCDc, et non celle de la MCDn, altère la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les îlots de Langerhans de rats.

Les résultats indiquent que la MCD est régulée par le glucose et les acides gras au niveau de son activité enzymatique et renforcent l'hypothèse selon laquelle la sécrétion d'insuline induite par le glucose implique la voie anaplérotique/malonyl-CoA tel que démontré lors de la surexpression de la MCDc dans les îlots de Langerhans. De plus, l'effet différent observé lors de la surexpression de la MCDc dans la lignée cellulaire INS semble indiquer que ce modèle n'est pas optimal pour étudier l'implication de la voie anaplérotique/malonyl-CoA dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Enfin des études ultérieures de fractionnement cellulaire nous permettra d'éclaircir l'importance de la compartimentation du malonyl-CoA.

## TABLE DES MATIÈRES

Listes des figures .....	viii
Listes des abréviations.....	x
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. Le pancréas.....	1
1.1. Les tissus exocrines et endocrines.....	1
1.2. L'insuline.....	1
2. L'homéostasie du glucose .....	3
2.1. Définition .....	3
2.2. Post-prandiale.....	3
2.3. Durant le jeûne .....	3
3. Le diabète .....	5
3.1. Statistiques .....	5
3.2. La pathologie.....	5
3.2.1. Les types de diabète.....	6
3.2.1.a.Le diabète de type I .....	7
3.2.1.b.Le diabète de type II .....	7
4. La sécrétion d'insuline .....	10
4.1. Les sécrétagogues de la cellule pancréatique $\beta$ .....	10
4.2. Les mécanismes de la sécrétion d'insuline .....	11
4.2.1. La voie dépendante de l'ATP et du $\text{Ca}^{2+}$ .....	11
4.2.2. La voie anaplérotique/malonyl-CoA .....	13
4.2.2.a.Les évidences de la voie anaplérotique/malonyl-CoA .....	15
5. Le malonyl-CoA .....	16
5.1. Rôles du malonyl-CoA.....	16
5.2. Régulation du malonyl-CoA dans la cellule pancréatique $\beta$ .....	18
6. La malonyl-CoA décarboxylase .....	19
6.1. Phylogénie.....	19
6.1.1. MCD de l'oie.....	20

6.1.2. MCD des mammifères.....	21
6.1.2.a.Le rat.....	21
6.1.2.b.Le lapin.....	23
6.1.2.c.L'humain .....	23
6.2. Mutations du gène de la MCD .....	24
7. Effets des acides gras sur la sécrétion d'insuline .....	25
7.1. Effets à court terme.....	25
7.1.1. Les cibles des acides gras à longue chaîne.....	26
7.2. Effet à long terme des acides gras sur la cellule pancréatique $\beta$ .....	28
7.3. Le diabète adipogénique.....	30
7.4. La lipotoxicité dans la cellule pancréatique $\beta$ .....	32
8. Thématique et but du travail de maîtrise.....	33
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>36</b>

1. Matériels.....	36
2. Rat hyperglycémiques et hyperlipidiques.....	36
3. Isolation d'îlots de Langerhans pancréatiques et culture cellulaire .....	36
4. Préparation des solutions d'acides gras liés à l'albumine.....	37
5. Isolation de l'ARN et analyse par RT-PCR.....	37
6. Buvarpage Southern .....	38
7. Génération des anticorps dirigés contre la MCD .....	38
8. Purification des IgG (immunoglobulines G) .....	39
9. Immunobuvarpage.....	39
10. Mesure de l'activité enzymatique de la MCD.....	40
11. Productions des clones stables INSrTA-3/MCDc .....	41
12. Production d'adénovirus recombinants et infection des îlots de Langerhans.....	42
13. Expériences de sécrétion d'insuline.....	42
14. Dosage de l'insuline par essai radioimmunologique.....	43
15. Statistiques.....	44

<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS</b> .....	45
1. Étude <i>in vitro</i> de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de l'ARNm de la MCD .....	45
2. Étude <i>in vivo</i> de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de l'ARNm de la MCD .....	47
3. Étude <i>in vitro</i> de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de la protéine de la MCD .....	49
4. Étude <i>in vitro</i> de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'activité enzymatique de la MCD .....	52
5. Effet <i>in vitro</i> à court terme du glucose et de l'oléate sur l'activité enzymatique de la MCD .....	53
6. Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline .....	54
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION</b> .....	59
1. Effets à long terme du glucose sur la régulation du gène et de l'activité enzymatique de la MCD .....	60
2. Effet des acides gras sur la régulation du gène et de l'activité enzymatique de la MCD .....	66
3. Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline .....	69
<b>CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE</b> .....	73

## LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Le pancréas.....	2
Figure 2 : L'insuline humaine.....	2
Figure 3 : Homéostasie du glucose dans la situation post-prandiale et lors d'un jeûne.....	4
Figure 4 : Comparaison du taux de mortalité causé par le diabète par rapport à d'autres maladies majeures.....	6
Figure 5 : Homéostasie du glucose dans le diabète de type II.....	8
Figure 6 : La pathogénèse du diabète de type II.....	9
Figure 7 : Stimulateurs et inhibiteurs de la sécrétion d'insuline.....	11
Figure 8 : Le système de transduction métabolique de la cellule pancréatique $\beta$ : la voie dépendante de l'ATP et du $Ca^{2+}$ .....	12
Figure 9 : Modèle des voies de transduction de signaux dans la cellule pancréatique $\beta$ .....	14
Figure 10 : Comparaison des séquences de la MCD de l'oie, du rat et de l'humain.....	20
Figure 11 : Les cibles des acyl-CoAs à longue chaîne carbonée.....	27
Figure 12 : Le cycle de Randle.....	29
Figure 13 : Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète adipogénique.....	31
Figure 14 : Modèle de la lipotoxicité de la cellule $\beta$ via la voie des céramides.....	33
Figure 15 : Réactions enzymatiques couplées utilisées pour la mesure de l'activité enzymatique de la MCD.....	40
Figure 16 : Exemple de linéarité d'amplification de l'ARNm de la MCD lors d'une RT-PCR semi-quantitative.....	45
Figure 17 : Étude de l'action du glucose sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans la cellule pancréatique $\beta$ .....	46
Figure 18 : Étude de l'action de l'oléate et du palmitate sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les cellules $\beta$ (INS).....	46
Figure 19 : Étude de l'action du glucose <i>in vivo</i> sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les îlots de Langerhans.....	47

Figure 20 : Effet d'une infusion d'intralipides dans des rats sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les îlots de Langerhans.....	48
Figure 21 : Distribution tissulaire de la protéine MCD de rat. ....	50
Figure 22 : Étude de l'action du glucose sur l'expression de la protéine MCD dans la cellule pancréatique $\beta$ . ....	51
Figure 23 : Effet à long terme du glucose et de divers acides gras sur l'expression de la protéine de l'activité enzymatique de la MCD dans les cellules INS-832/13. ....	52
Figure 24 : Étude de la dépendance en fonction du temps de l'action du glucose sur l'activité enzymatique de la MCD.....	53
Figure 25 : Étude de la dépendance en fonction du temps de l'action de l'oléate sur l'activité enzymatique de la MCD.....	54
Figure 26 : Transfection de la construction codant pour la MCD cytosolique dans les cellules INSrTA-3 et expression de la GFP.....	55
Figure 27 : Surexpression de la MCD cytosolique dans les cellules INSrTA-3 grâce à un système régulé par la tétracycline. ....	56
Figure 28 : Sécrétion d'insuline dans les clones qui surexpriment la MCD. ....	57
Figure 29 : Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline dans les îlots de Langerhans. ....	58

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACC :	Acétyl-CoA carboxylase
Ac-CoA :	Acétyl-CoA
ACO :	Acyl-CoA oxydase
ACS :	Acyl-CoA synthétase
ADQ :	Association du Diabète du Québec
AGD :	Acides gras dicarboxylés
AGE :	«Advanced glycation end product»
AGL :	Acides gras libres
AICAR :	5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside
AMPK :	Protéine kinase activée par l'AMP
AN :	Acide nicotinique
ANT :	Adénine nucléotide transférase
AP-1 :	Protéine activatrice-1
BSA :	Albumine de sérum bovin
CCK :	Cholécystokinine
CEDRW:	«Congresionally-Established Diabetes Research Working Group»
CKII :	Caséine kinase II
CL :	Citrate lyase
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	Promoteur du cytomégalovirus
COUP-TFII :	«Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II»
CPT-1 :	Carnitine palmitoyltransférase-1
CS :	Citrate synthase
DAG :	Diacylglycérol
EGTA :	Bis(aminoéthyl)glycoéther-N,N,N',N'-tétraacétate
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FAS :	Acide gras synthétase
FDP :	Fructose 1,6-bisphosphate
F6P :	Fructose 6-phosphate

GAD :	Glutamate décarboxylase
GAPDH :	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFP :	Protéine fluorescente verte
GIP :	«Glucose-dependent insulintropic polypeptide»
GK :	Glucokinase
GLP-1:	«Glucagon-like peptide-1»
GLUT:	Transporteur de glucose
GOT :	Glutamate-oxaloacétate transaminase
GRE:	Élément de réponse au glucose
G6P :	Glucose 6-phosphate
G6Pase :	Glucose 6-phosphatase
HNF :	Facteur nucléaire hépatocytaire
HSL :	Lipase hormono-sensible
ICA :	«Islet cell antigen»
IgG :	Immunoglobuline G
iNOS :	Oxyde nitrique synthétase inductible
K-ATP :	Canaux potassiques ATP-dépendants
LC-CoA :	Acyl-CoA à longue chaîne carbonée
LDH :	Lactate déshydrogénase
LPL :	Lipoprotéine lipase
MCD :	Malonyl-CoA décarboxylase
ME :	Enzyme malique
MODY :	«Maturity-onset diabetes of youth»
NIDDM :	«Non-insulin-dependent diabetes mellitus»
NO :	Oxyde nitrique
NPY :	Neuropeptide Y
OAA :	Oxaloacétate
PA :	Acide phosphatidique
PC :	Pyruvate carboxylase
PC2/3 :	Prohormone convertase-2 et 3
PCC :	Propionyl-CoA carboxylase

PDH :	Pyruvate déshydrogénase
PDHK :	Pyruvate déshydrogénase kinase
PDX-1 :	«Pancreatic and duodenal homeobox protein-1»
PEPCK :	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFK-1 :	6-Phosphofructo-1-kinase
PI-3K :	Phosphatidylinositol-3 kinase
PK :	Pyruvate kinase
PKA :	Protéine kinase AMPc-dépendante
PKC :	Protéine kinase C
PL :	Phospholipides
PLM :	Préséquence de localisation mitochondriale
PPAR :	«Peroxisome proliferator activated receptor»
PP2A et 2C :	Protéine phosphatase 2A et 2C
rtTA :	Protéine transactivatrice inversée dépendante de la tétracycline
SPT :	Sérine palmitoyltransférase
TGD :	Diminution de la tolérance au glucose
UCP-2 :	Protéine découplante-2
USF/MLTF :	«Upstream stimulatory factor/major late transcription factor»
TG :	Triglycéride
VP16 :	Domaine activateur de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex
ZDF :	Rat diabétique Zucker fa/fa
$\alpha$ -GPDH :	$\alpha$ -Glycérol 3-phosphate déshydrogénase
$\alpha$ -KGDH :	$\alpha$ -Cétoglutarate déshydrogénase

*Je remercie le Dr. Marc Prentki pour sa confiance et d'avoir partagé sa passion  
pour la science.*

*Je remercie sincèrement le Dr. Raphaël Roduit pour sa patience, ses  
encouragements, ses conseils et son amitié tout au long de ma maîtrise.*

*Je tiens à remercier le Dr. Sylvain Foisly pour ses conseils scientifiques et son  
amitié.*

*Je remercie Johane Morin pour ses conseils, son soutien moral et son amitié tout  
au long de mon travail dans le laboratoire.*

*Je remercie tous les étudiants du laboratoire qui m'ont permis de passer des  
moments inoubliables.*

*Je dédicace ce mémoire à mes parents, Guy et Denise, ainsi qu'à ma sœur Geneviève qui m'ont soutenu depuis le début de mes études.*

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

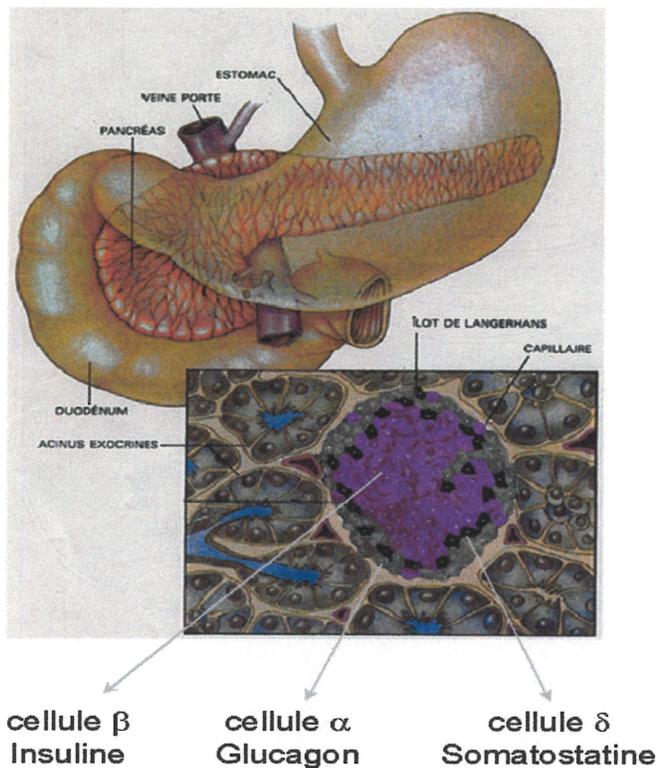
### 1- LE PANCRÉAS

#### 1.1- LES TISSUS EXOCRINES ET ENDOCRINES

Le pancréas situé derrière l'estomac (Fig. 1) est formé des tissus exocrines et endocrines. Le tissu exocrine sécrète les enzymes de la digestion tels les lipases et l'amylase tandis que le tissu endocrine formé des îlots de Langerhans, sécrète dans la circulation certaines hormones. On compte environ 1 million d'îlots dans le pancréas humain d'un adulte et ceci représente 1% du tissu total. Les îlots sont formés des cellules  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  et PP qui sécrètent respectivement l'insuline, le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique. Environ 75% des cellules de l'îlots sont des cellules  $\beta$  (Greenspan, 1991).

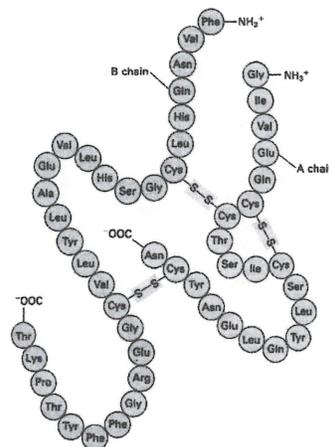
#### 1.2- L'INSULINE

L'insuline est une hormone composée de deux chaînes polypeptidiques (Fig. 2). La chaîne A comprend 21 acides aminés et un pont disulfure et la chaînes B comprend 30 acides aminés. Les deux chaînes sont reliées par deux ponts disulfures. L'insuline est synthétisée sous la forme d'une préprohormone et subit plusieurs modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Elle est emmagasinée dans des granules et sécrétée sous forme d'hexamère par la cellule  $\beta$  (Ashcroft et Ashcroft, 1992). Le rôle principal de l'insuline est de réguler la glycémie.



**Figure 1.** Le pancréas situé derrière l'estomac est composé des tissus exocrine et endocrine. Le tissu exocrine sécrète des sucs digestifs. Le tissu endocrine contient les îlots de Langerhans (encadré) composé des cellules  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  qui sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline et la somatostatine. (Modifié de La grande encyclopédie de la médecine, 1980)

**Figure 2.** L'insuline humaine composée de deux chaînes peptidiques contient 51 acides aminés. Deux ponts disulfures relient des cystéines des chaînes A et B. (Tiré de Darnell et al., 1993)



## 2- L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE

### 2.1- DÉFINITION

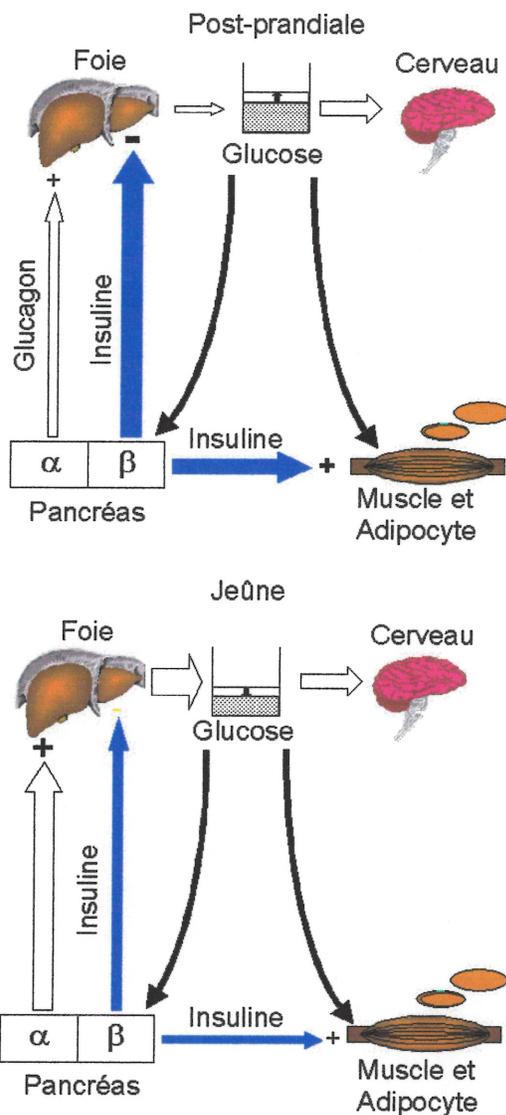
L'homéostasie du glucose est un équilibre entre l'ingestion et/ou la production de glucose hépatique et l'utilisation du glucose par les tissus insulino-dépendants (adipocytes et muscles) et les tissus insulino-indépendants (cerveau et reins) (Kahn, 1994). La glycémie plasmatique est une représentation médicale de l'homéostasie glucidique; celle-ci varie chez une personne normale entre 3.6 et 6.1mM de glucose (Guyton et Hall, 1996).

### 2.2-POST-PRANDIALE

Le glucose est absorbé au niveau de l'intestin lors de l'ingestion d'aliments (Fig. 3A). On observe alors une légère augmentation de la glycémie. Une partie considérable du glucose est utilisée par le cerveau de façon insulino-indépendante. Le glucose entre dans la cellule  $\beta$  et stimule la sécrétion d'insuline. L'insuline a un effet sur les tissus périphériques. Dans un premier temps, l'insuline inhibe la glycogénolyse, ce qui entraîne une diminution de la production de glucose hépatique. Dans un deuxième temps, l'insuline stimule l'entrée du glucose dans les muscles et les adipocytes leur permettant ainsi d'utiliser le glucose comme source d'énergie. De plus, les adipocytes produisent des triglycérides et les muscles du glycogène à partir du glucose afin de garder le glucose comme source d'énergie pour une utilisation ultérieure. Suite à la capture de glucose par les tissus, une glycémie de base est retrouvée (Darnell et al., 1993).

### 2.3- DURANT LE JEÛNE

Lors du jeûne, le cerveau utilise la même quantité de glucose comme source d'énergie et l'on observe une diminution du glucose sanguin (hypoglycémie).



**Figure 3. Homéostasie du glucose dans la situation post-prandiale (A) et lors d'un jeûne (B).** Après un repas, l'intestin absorbe le glucose et l'on observe une augmentation de la glycémie ( $> 6.1$  mM). Une fraction du glucose est utilisée par le cerveau de façon insulino-indépendante. Le glucose entre dans la cellule  $\beta$ -pancréatique grâce au transporteur de glucose GLUT-2. La stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose inhibe la glycogénolyse hépatique et permet le stockage du glucose dans le foie et son entrée dans le muscle et les adipocytes. Ainsi, une glycémie normale est retrouvée. Lors d'un jeûne, la glycémie diminue et la sécrétion d'insuline est réduite. Le cerveau utilise la même quantité de glucose. Les cellules  $\alpha$  qui sont aussi sensibles au niveau de glucose sécrète plus de glucagon. La glycogénolyse hépatique est alors stimulée et l'entrée du glucose dans les muscles et les adipocytes diminue. La glycémie est ainsi maintenue à environ 4 mM. (Modifié de Kahn, 1994)

Cette baisse de la glycémie favorise la sécrétion du glucagon par les cellules  $\alpha$  du pancréas (Fig. 3B). Ainsi l'effet du glucagon est dominant sur celui de l'insuline ce qui cause une stimulation de la glycogénolyse et la gluconéogenèse. Par conséquent, la production du glucose hépatique est augmentée. De plus, l'entrée du glucose dans les muscles et les adipocytes est réduite. Ceci permet de maintenir la glycémie à environ 4mM (Darnell et al., 1993).

### 3- LE DIABÈTE

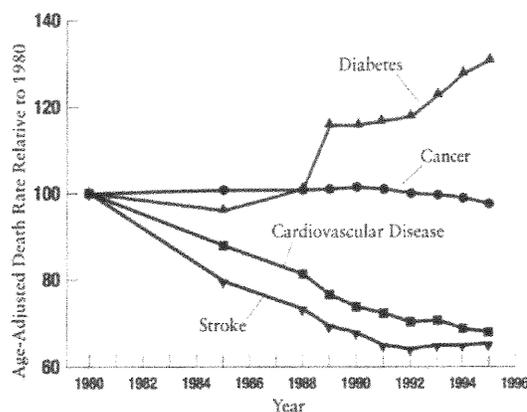
#### 3.1- STATISTIQUES

Le diabète est une maladie qui frappe de plus en plus de gens dans le monde. Près de 500 000 personnes au Québec sont atteintes du diabète, dont 40% l'ignorent. Ce chiffre s'élève à plus de 16 millions de personnes atteintes au États-Unis (Congressionally-Established Diabetes Research Working Group (CEDRW), 1999) et on rapporte que 300 millions de personnes seront atteintes mondialement d'ici 2025 (site internet de l'Association Diabète Québec (ADQ, 2001). Le taux de mortalité relié au diabète augmente de plus en plus depuis 1988 par rapport aux cancers et les maladies cardiovasculaires (Fig. 4). Au niveau économique, c'est un fardeau de plus en plus lourd estimé à près de 2 milliards de dollars par année au Québec et plus de 100 milliards de dollars aux États-Unis (Rapport du CEDRW et site internet ADQ). Le diabète est un problème de société grandissant qu'il est impératif de combattre sur tous les fronts. À ce jour, la nature même de la maladie n'est pas entièrement connue. Mais d'année en année, la recherche fait des progrès importants dans diverses voies, tant au niveau de la cause et du développement de la maladie que de sa prévention et de son traitement.

#### 3.2- LA PATHOLOGIE

**Figure 4. Comparaison du taux de mortalité causé par le diabète par rapport à d'autres maladies majeures.**

Depuis 1988, le taux de mortalité causé par le diabète (relatif à 1980) augmente significativement d'année en année comparativement aux maladies cardiovasculaires, le cancer et les accidents cérébrovasculaires (Tiré du rapport du CEDRW)



Le diabète est une affection chronique due à une carence ou à l'inefficacité de l'insuline entraînant un excès de glucose dans le sang (hyperglycémie). Une caractéristique essentielle associée au diabète est les complications où l'on note des problèmes microvasculaires tels la néphropathie, la neuropathie, la rétinopathie et une augmentation des maladies cardiaques (Brownlee, 2000). La cause des complications n'est pas bien comprise mais un phénomène de glycation des protéines pourrait être impliqué. En effet, l'on pense que le glucose et ses dérivés de la glycolyse (fructose 6-phosphate, glucose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate) glycosylent des protéines produisant ainsi des «advanced glycation end product» (AGE). Les AGEs, en se liant à leur récepteur, altèrent l'expression de certains gènes. De plus, les AGEs altèrent la fonction des protéines et l'interaction cellulaire. Ainsi les AGEs semblent être en partie responsable des complications causées par le diabète.

### 3.2.1- LES TYPES DE DIABÈTES

Il existe deux principales formes de diabète que l'on nomme diabète de type I et II. La première description connue à ce jour décrivant le diabète date de deux cents ans avant Jésus-Christ. Elle est tirée d'un texte de médecine indienne et décrit de façon remarquable, pour l'époque, les deux types de diabète.

«La personne ayant une urine extrêmement sucrée, visqueuse, trouble et qui ressemble au jus de la canne à sucre... souffre de glycosurie. Il existe deux types de désordres urinaires. L'un, naturel, est causé par des facteurs génétiques; l'autre par une vie où règne l'abondance et une diète sans restriction. Le patient souffrant du premier est maigre, blême, mange peu et boit beaucoup... Le patient souffrant du second est habituellement obèse, mange beaucoup, est corpulent, a des habitudes sédentaires et dort trop.»

- Charaka Samhita et Sushnita Ayurveda (100-200 av. JC.) (tiré de Kahn, 1994)

La première description correspond au diabète de type I et la seconde au diabète de type II. À l'époque, les médecins ne connaissaient pas le métabolisme. Par contre, ils avaient un très bon sens de l'observation. Aujourd'hui, nous avons beaucoup plus d'informations caractérisant les deux types de diabète.

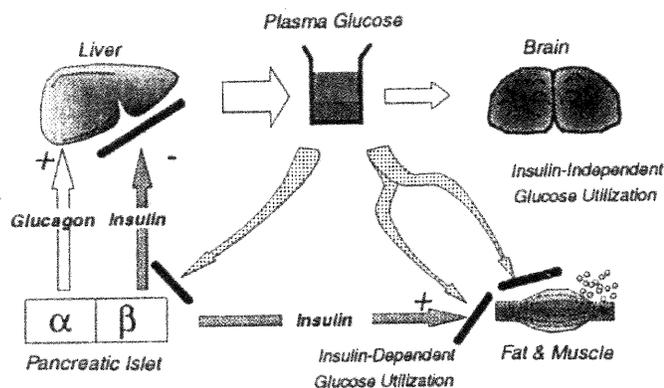
### 3.2.1a- LE DIABÈTE DE TYPE I

Le diabète de type I représente 10% des diabétiques. Ce type de diabète est une maladie autoimmune caractérisée par une destruction des cellules  $\beta$  du pancréas et une absence d'insuline. Des anticorps dirigés contre les antigènes de la cellule  $\beta$  tels l'insuline, la glutamate décarboxylase (GAD), les gangliosides et les «islet cell antigens» (ICA) servent de marqueurs moléculaires du diabète de type I. Des études ont démontré une association entre la présence de certains antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II et la susceptibilité au diabète de type I (Tisch et McDevitt, 1996). Ces patients requièrent des injections d'insuline quotidiennes afin de normaliser leur glycémie.

### 3.2.1.b- LE DIABÈTE DE TYPE II

Le diabète de type II (ou NIIDM pour «non-insulin-dependent diabetes mellitus») représente 90% des diabétiques. Il n'est pas caractérisé par une absence d'insuline mais plutôt par un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  qui ne peuvent plus sécréter de l'insuline de façon appropriée en fonction de la concentration de glucose sanguin (Fig. 5). De plus, on observe une résistance à l'insuline dans les tissus

périphériques causée par un défaut dans la cascade de signalisation des messagers secondaires suite à la liaison de l'insuline à son récepteur et une diminution du nombre de récepteur à l'insuline. Enfin, on observe une augmentation de la production du glucose hépatique (Kahn, 1994).



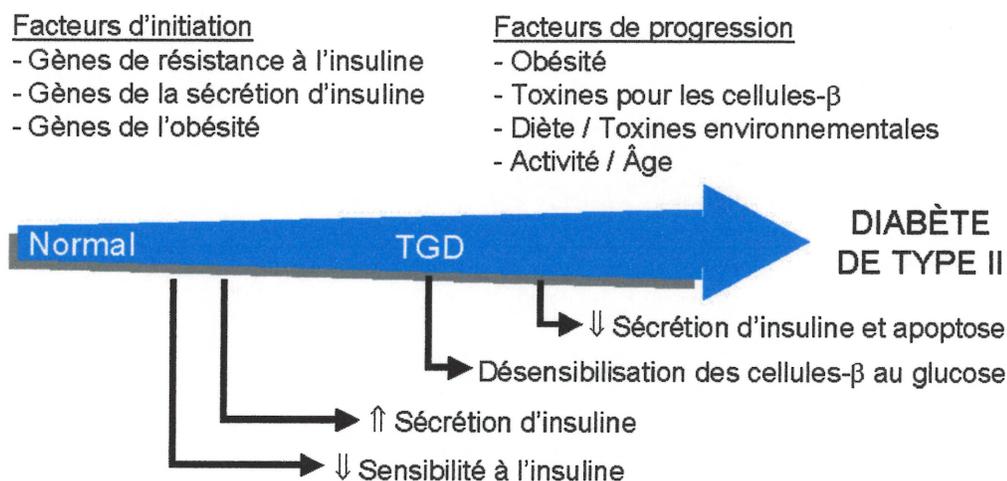
### Figure 5. Homéostasie du glucose dans le diabète de type II.

L'équilibre entre la production du glucose hépatique et l'utilisation du glucose de façon insulino-indépendante par le cerveau et de façon insulino-dépendante par le muscle et les adipocytes est régulé principalement par la production d'insuline de la cellule β et la production de glucagon par les cellules α du pancréas. Dans le diabète de type II, il y a d'une part une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et d'autre part une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. La résistance à l'insuline se traduit par une inhibition de l'action de l'insuline pour promouvoir l'entrée du glucose dans les muscles et les adipocytes ainsi qu'une inhibition de la glycogénolyse. (Tiré de Kahn, 1994)

Le diabète de type II est une maladie hétérogène causée par des facteurs génétiques et environnementaux. On observe un taux particulièrement élevé dans les populations asiatiques et amérindiennes. Certaines formes de diabète sont monogéniques en particulier le type MODY («maturity-onset diabetes of youth»). Il existe cinq formes de MODY dont quatre sont causés par une mutation d'un gène codant pour un facteur de transcription. Les mutations inactivant les facteurs de transcription HNF-4α (facteur nucléaire hépatocyttaire-4α), HNF-1α, «pancreatic and duodenal homeobox protein-1» (PDX-1) et HNF-1β causent

respectivement les MODY1, MODY3, MODY4 et MODY5. Les HNF régulent l'expression des gènes du métabolisme et des transporteurs du glucose, tandis que PDX-1 est impliqué dans le développement du pancréas et la régulation du gène de l'insuline. Une mutation de la glucokinase (GK), qui catalyse l'étape limitante de la glycolyse, provoque le MODY2. Le MODY2 est la forme la plus courante et plus de 80 mutations ont été identifiées à ce jour (So et al., 2000).

Dans la majorité des cas, plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sont impliqués chez les patients atteints du diabète de type II. Les facteurs d'initiation génétiques ou diabétogènes comprennent des gènes de résistance à l'insuline, de la sécrétion d'insuline et de l'obésité (Fig. 6). Initialement on observe une phase



**Figure 6. La pathogénèse du diabète de type II.**

La modification de certains gènes de la sécrétion d'insuline, la résistance à l'insuline et l'obésité contribuent à l'initiation du diabète. Une diminution de la sensibilité des tissus à l'insuline entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline afin de compenser la résistance. Après un certain temps, on observe une diminution de la tolérance au glucose (TGD). Les facteurs de progression, tels l'obésité, les toxines, la diète, l'âge et la sédentarité désensibilisent les cellules  $\beta$  au glucose. Par la suite, on note une altération de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, la mort des cellules  $\beta$  par apoptose et enfin le NIDDM apparaît.. (Modifié de Kahn et al., 1996)

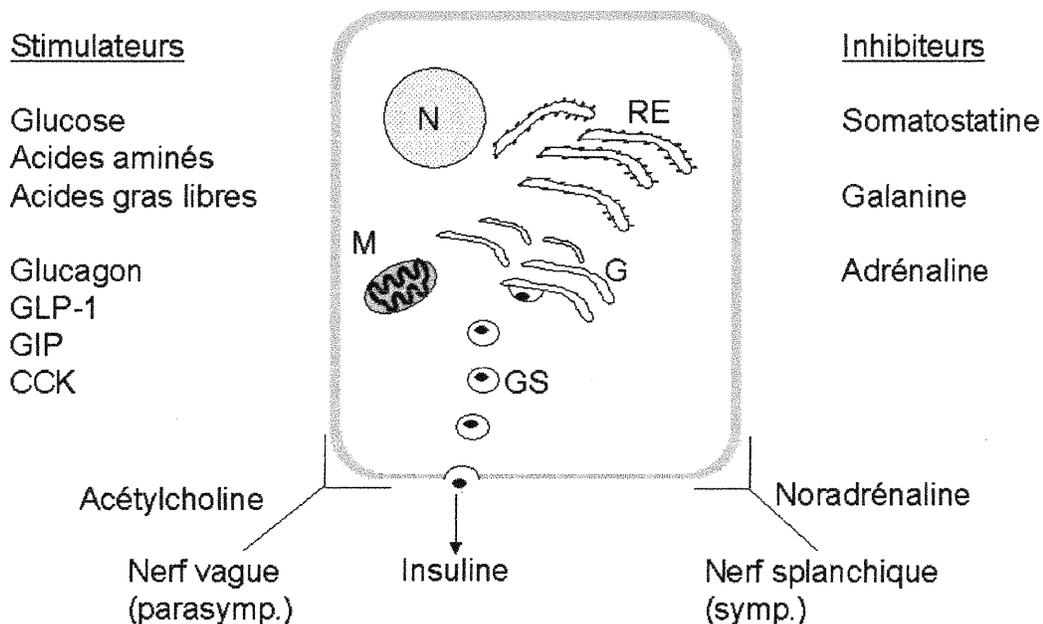
compensatoire marquée par une hyperinsulinémie qui permet de compenser la diminution de la sensibilité des tissus à l'insuline (i.e. résistance à l'insuline).

Pendant cette période qui peut durer des années la tolérance au glucose est diminuée; c'est-à-dire que la concentration de glucose dans le sang, suite à une prise alimentaire, demeure plus longtemps élevée avant de revenir à la normale. Par après, on observe une phase de décompensation où il y a une diminution majeure de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, laquelle est accentuée par la mort des cellules  $\beta$  par apoptose. La sédentarité, les toxines environnementales, la diète et l'âge contribuent à la progression vers ce type de diabète. Une étroite relation existe entre l'obésité et le diabète de type II. Plus de 70% des diabétiques de type II sont obèses et cette maladie affecte de plus en plus les enfants et les adolescents obèses (Haffner, 1995; Kahn et al., 1996; Pinhas-Hamiel et Zeitler, 2000).

#### 4- LA SÉCRÉTION D'INSULINE

##### 4.1- LES SÉCRÉTAGOGUES DE LA CELLULE $\beta$ -PANCRÉATIQUE

Plusieurs nutriments et agents neurohormonaux stimulent la sécrétion d'insuline (Fig. 7). Parmi les nutriments calorigéniques, le glucose, les acides gras libres et les acides aminés, tels la leucine et la glutamine, stimulent la sécrétion d'insuline. Parmi les agents neurohormonaux, on retrouve le glucagon, le «glucagon-like peptide-1» (GLP-1), le «glucose-dependent insulintropic polypeptide» (Pralong et al., 1994) et la cholécystokinine (CCK). Notons que les systèmes de transduction de signaux utilisés par les agents neurohormonaux d'une part, et les nutriments calorigéniques d'autre part, sont très différents car les premiers modulent la sécrétion d'insuline suite à une liaison à un récepteur membranaire tandis que les nutriments stimulent la sécrétion suite à leur métabolisme intracellulaire (Hedekov, 1980; Wollheim et Sharp, 1981; Prentki et Matschinsky, 1987).



**Figure 7. Stimulateurs et inhibiteurs de la sécrétion d'insuline.**

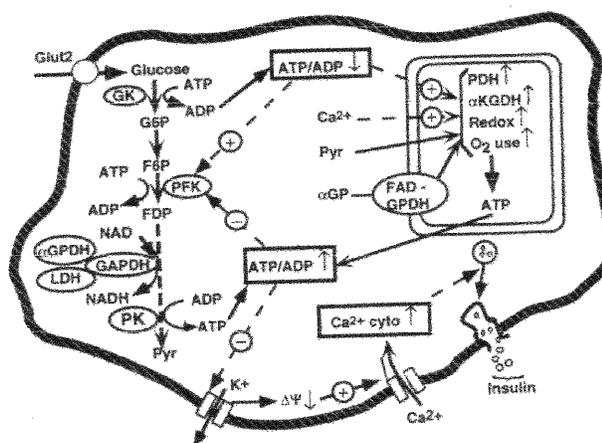
Les nutriments calorigéniques (glucose, acides aminés et acides gras libres) et certains peptides (glucagon, GLP-1, GIP et CCK) stimulent la sécrétion d'insuline, alors que la somatostatine, la galanine et l'adrénaline inhibent la sécrétion. L'action des nutriments se fait suite à leur métabolisme intracellulaire, tandis que les différents agents neurohormonaux se lient à leur récepteur membranaire respectifs pour moduler le processus de sécrétion. GLP-1, glucagon-like peptide-1; GIP, glucose-dependent insulintropic polypeptide; CCK, cholécystokinine.

## 4.2- LES MÉCANISMES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE

### 4.2.1- LA VOIE DÉPENDANTE DE L'ATP ET DU $\text{Ca}^{2+}$

Un mécanisme reconnu fait appel à la voie dépendante de l'ATP et du calcium (Fig. 8). Le glucose diffuse dans la cellule  $\beta$  grâce à la protéine membranaire transporteur de glucose-2 (GLUT-2). Le glucose est alors phosphorylé par la glucokinase pour produire du glucose-6-phosphate (G6P). Le G6P est transformé en pyruvate par la voie glycolytique. Le pyruvate entre dans la mitochondrie pour être décarboxylé en acétyl-CoA (Ac-CoA) par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'Ac-CoA entre dans le cycle de Krebs ce qui entraîne une augmentation de la

production d'ATP et une élévation du rapport ATP/ADP. Cette augmentation provoque la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (K-ATP), une



**Figure 8. Le système de transduction métabolique de la cellule pancréatique β : la voie dépendante de l'ATP et du Ca<sup>2+</sup>.**

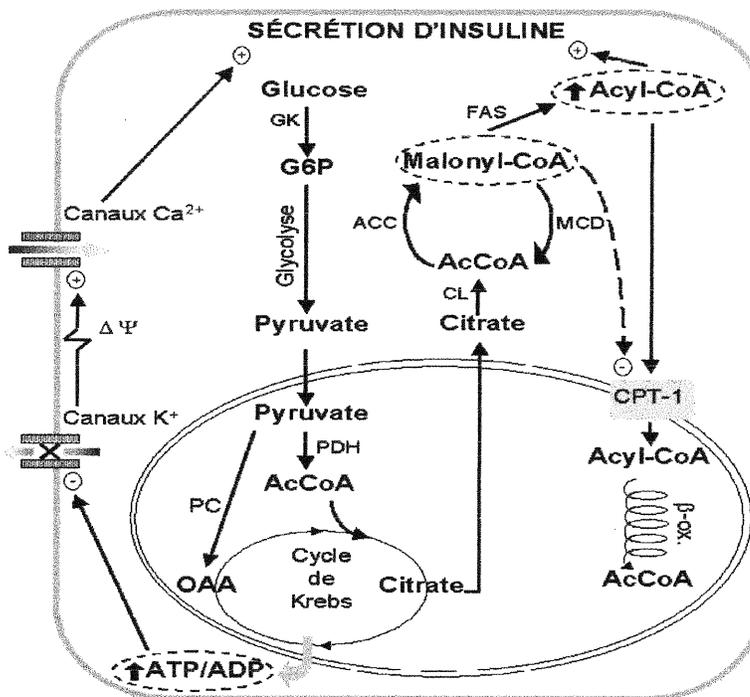
La voie traditionnelle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose implique une augmentation du rapport ATP/ADP et une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Suite à l'entrée du glucose grâce au transporteur GLUT-2, celui-ci est phosphorylé par la glucokinase et transformé en pyruvate via la glycolyse. La PDH produit l'acétyl-CoA à partir du pyruvate. L'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs entraînant une augmentation du rapport ATP/ADP dans le cytoplasme. On observe alors une fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants, une dépolarisation de la membrane plasmique, une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée du Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. Le Ca<sup>2+</sup> promeut la sécrétion d'insuline contenu dans des vésicules de sécrétion. Glut2, transporteur du glucose 2; GK, glucokinase; G6P, glucose 6-phosphate; F6P, fructose 6-phosphate; FDP, fructose 1,6-bisphosphate; PFK, phosphofructokinase; αGPDH, α-glycérol 3-phosphate déshydrogénase; GAPDH, glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase; LDH, lactate déshydrogénase; PK, pyruvate kinase; Pyr, pyruvate; PDH, pyruvate déshydrogénase; αKGDH, α-cétoglutarate déshydrogénase; αGP, α-glycérol 3-phosphate; FAD, flavine adénine dinucléotide. (Tiré de Prentki et al., 1994)

dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. Ceci permet l'entrée du calcium dans la cellule et promeut l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline (Prentki et Corkey,

1996). Par contre, Gembal et ses coll. (Gembal et al., 1992) ont démontré l'existence d'une voie indépendante des canaux K-ATP. En effet, lors de l'ajout d'un agent pharmacologique (diazoxide) qui outrepassse les canaux potassiques en les gardant ouverts, la sécrétion d'insuline induite par le glucose était maintenue. Toutefois, ceci requiert la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire élevé (ajout d'une concentration dépolarisante de  $\text{K}^+$ ). Par conséquent, le calcium libre joue un rôle permissif dans la sécrétion d'insuline promue par le glucose, mais n'est pas suffisant. Ainsi, la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose implique une ou plusieurs autres voies qui demeurent à ce jour mal connues.

#### 4.2.2-LA VOIE ANAPLÉROTIQUE/MALONYL-CoA

Dans la plupart des tissus, une augmentation du métabolisme mitochondrial et une production d'ATP précèdent l'activation cellulaire et l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  (McCormack et Denton, 1990). La cellule  $\beta$  est unique en son genre, dans la mesure où l'activation du métabolisme mitochondrial induit par les nutriments calorigéniques précède l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  et la sécrétion d'insuline (Pralong et al., 1990; Pralong et al., 1994). Donc la production d'un facteur de couplage métabolique provenant du cycle de Krebs est fort probable. Une voie dite anaplérotique, qui permet une augmentation du niveau des intermédiaires du cycle de Krebs, a été proposée par Prentki et Corkey (1996). Cette voie agirait en synergie avec la voie dépendante de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans cette voie illustrée à la Fig. 9, le malonyl-CoA et les acyl-CoA à longue chaîne carbonée ou leurs dérivés agissent comme facteurs de couplage métabolique (Corkey et al., 1989; Prentki et al., 1992). La cascade d'événements proposée dans ce modèle est la suivante. Le glucose est métabolisé en pyruvate par la voie glycolytique. L'action conjuguée de la PDH et de la pyruvate carboxylase (PC) transforme le pyruvate mitochondrial en Ac-CoA et en oxaloacétate (Schuit et al., 1997). L'augmentation



**Figure 9** Modèle des voies de transduction de signaux dans la cellule pancréatique  $\beta$ .

Le glucose une fois phosphorylé par la GK est transformé en pyruvate via la glycolyse. L'Ac-CoA produit à partir du pyruvate et la PDH entre dans le cycle de Krebs. Par conséquent le rapport ATP/ADP augmente, les canaux potassiques se ferment, la membrane plasmique se dépolarise et les canaux calciques s'ouvrent. Ainsi, le  $\text{Ca}^{2+}$  entre dans la cellule et stimule la sécrétion d'insuline. Néanmoins, le calcium a un rôle permissif dans la sécrétion d'insuline et ne peut expliquer toute l'action du glucose dans le processus de sécrétion. La deuxième voie dite anaplérotique implique une augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs. Elle débute par la carboxylation du pyruvate en OAA par la PC. L'OAA fusionne avec l'Ac-CoA pour produire du citrate. Le citrate en excès sort de la mitochondrie où il est retransformé en Ac-CoA cytosolique par la CL. L'ACC carboxyle l'Ac-CoA en malonyl-CoA. Le malonyl-CoA sert de substrat pour la FAS pour produire des acyl-CoAs, mais inhibe en même temps la CPT-1 qui catalyse l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation des acyl-CoAs. Ainsi, les acyl-CoAs augmentent dans le cytoplasme pour stimuler directement la sécrétion d'insuline ou indirectement via la production de DAG, l'activation de certaines PKC ou l'acylation de protéines impliquées dans le processus de sécrétion. Le malonyl-CoA et les acyl-CoAs agissent comme des facteurs de couplage métabolique régulateur et effecteur, respectivement. GK, glucokinase; G6P, glucose 6-phosphate; PDH, pyruvate déshydrogénase; AcCoA, acétyl-CoA; PC, pyruvate carboxylase; OAA, oxaloacétate; CL, cytrate lyase; ACC, acétyl-CoA carboxylase; MCD, malonyl-CoA décarboxylase; FAS, acide gras synthétase; CPT-1, carnitine palmitoyltransférase-1;  $\beta$ -ox,  $\beta$ -oxydation. (Modifié de Prentki et Corkey, 1996)

des intermédiaires du cycle de Krebs favorise la production d'ATP ainsi que celle du citrate, lequel sort de la mitochondrie. Par la suite, le citrate cytosolique est transformé en Ac-CoA par la citrate lyase (CL). L'Ac-CoA cytosolique est carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Le malonyl-CoA permet la formation d'acyl-CoAs par l'intermédiaire de l'acide gras synthétase (FAS) mais cette enzyme est fort peu exprimée dans la cellule  $\beta$  (Brun et al., 1996). Le malonyl-CoA est aussi un inhibiteur de la CPT-I, l'enzyme limitant de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale, c'est-à-dire de la dégradation des acyl-CoAs. Ainsi l'inhibition de la CPT-1 par le malonyl-CoA cause une augmentation des acyl-CoAs à longue chaîne carbonée dans le cytosol permettant la sécrétion d'insuline soit directement ou indirectement via la production de lipides complexes, l'activation de certaines protéines kinases C (PKC) ou l'acylation de protéines (Corkey et al., 2000). Ainsi dans ce modèle, le malonyl-CoA agit comme molécule régulatrice alors que les acyl-CoAs sont des molécules effectrices (Prentki et Corkey, 1996).

#### 4.2.2a- LES ÉVIDENCES DE LA VOIE ANAPLÉROTIQUE/MALONYL-CoA

Plusieurs évidences mettent en valeur la voie anaplérotique/malonyl-CoA. La PC est fortement exprimée dans la cellule  $\beta$  (MacDonald, 1995; Brun et al., 1996; Schuit et al., 1997). Une étroite relation existe entre la concentration de glucose, le contenu en citrate, le malonyl-CoA de la cellule  $\beta$  et la sécrétion d'insuline. Le citrate est un activateur allostérique de l'ACC et l'augmentation du citrate causée par le glucose dans la cellule  $\beta$  précède la sécrétion d'insuline (Corkey et al., 1989; Roche et al., 1998; Farfari et al., 2000). De plus, l'acide phénylacétique qui inhibe la PC, diminue la concentration de citrate des cellules  $\beta$  et inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Farfari et al., 2000). L'inhibiteur de la CL, l'hydroxycitrate, inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Chen et al., 1994). L'expression d'un ARN antisens ACC dans les cellules INS-1 diminue le niveau de malonyl-CoA et la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Zhang et Kim, 1998). On observe une diminution de l'oxydation des acides gras, une

augmentation de la synthèse des phospholipides, des triglycérides et du diacylglycérol lorsque l'on expose chroniquement des cellules  $\beta$  à une concentration élevée de glucose et ces altérations du métabolisme sont associés à une sécrétion d'insuline de base accrue (Roche et al., 1998).

D'autres études sont en faveur du concept proposant un rôle des acyl-CoAs dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline. L'addition d'inhibiteurs de la CPT-1, soit le 2-bromopalmitate, le 2-bromostéarate ou l'étomoxir, supprime l'oxydation des acides gras et stimule la sécrétion d'insuline des îlots de Langerhans (Chen et al., 1994). L'oléate et le palmitate exogènes augmentent l'activité de la PKC- $\zeta$  et stimulent la sécrétion d'insuline (Yaney et al., 2000). *In vitro*, l'oléoyl-CoA et le palmitoyl-CoA stimulent la PKC- $\zeta$ . Le palmitate et le myristate augmentent la sécrétion d'insuline en présence d'EGTA qui permet de séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire et ainsi d'outrepasser la voie dépendante de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$  (Komatsu et Sharp, 1998; Komatsu et al., 1999).

Enfin, des expériences ont démontré que la voie indépendante de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$  existe aussi dans les îlots humains (Straub et al., 1998).

## 5- LE MALONYL-CoA

### 5.1-RÔLES DU MALONYL-CoA

Le malonyl-CoA sert de substrat à la synthèse *de novo* des acides gras mais de plus il régule l'activité enzymatique de la CPT-I. Par conséquent, le malonyl-CoA affecte indirectement une multitude de processus car il module la concentration de substrat et/ou de produit de la CPT-I. Une augmentation du malonyl-CoA entraîne une inhibition de la CPT-1 et une augmentation des acyl-CoAs à longue chaîne carbonée dans le cytoplasme tandis qu'une diminution du malonyl-CoA permet

la formation d'acylcarnitines par la CPT-I. Les acylcarnitines sont dégradés en acétyl-CoA grâce à la  $\beta$ -oxydation (Zammit, 1999).

Le cancer du sein est caractérisé par une forte expression de la FAS et une synthèse d'acides gras élevée. Une étude *in vitro* et *in vivo*, effectuée par le groupe de Pizer et al. (Pizer et al., 2000), effectué dans la lignée tumorale du cancer du sein MCF-7 a amené des évidences expérimentales permettant de penser qu'une concentration élevée en malonyl-CoA cause l'apoptose des cellules cancérogènes. En effet, l'inhibition de l'ACC (enzyme catalysant la formation du malonyl-CoA) avec un agent pharmacologique empêche l'apoptose, tandis que l'inhibition de la FAS (enzyme qui utilise le malonyl-CoA comme substrat) provoque une augmentation du malonyl-CoA et cause l'apoptose des cellules. Toutefois, le mécanisme par lequel le malonyl-CoA pourrait induire l'apoptose n'est pas connu (Pizer et al., 2000).

Certaines personnes ont un appétit incontrôlable, ce qui peut provoquer l'obésité et par conséquent engendrer des problèmes de santé. Récemment, une étude a démontré que l'inhibition de la FAS provoque chez la souris une diminution de l'ingestion de nourriture et une perte de poids. De plus, on observe une augmentation de 110% de la concentration de malonyl-CoA. Le mécanisme par lequel le malonyl-CoA contrôlerait l'appétit n'est pas connu. Certains chercheurs pensent qu'il pourrait inhiber l'action du neuropeptide Y (NPY) responsable, en partie, de la stimulation de l'appétit (Loftus et al., 2000; McGarry, 2000).

Le malonyl-CoA sert de signal énergétique régulant l'oxydation et l'estérification des acides gras. La voie anaplerotique/malonyl-CoA est présente dans le foie, le cœur et les muscles. Ces tissus utilisent plus de glucose comme source d'énergie à l'état post-prandial. De plus, le glucose augmente la concentration de malonyl-CoA dans ces tissus. Le malonyl-CoA inhibe la CPT-I et empêche la dégradation des acyl-CoAs par la  $\beta$ -oxydation. Ainsi à l'état nourri, les acides gras sont moins utilisés comme source d'énergie. En revanche, à l'état de jeûne, la concentration

de malonyl-CoA est faible, il n'y a pas d'inhibition de la CPT-I et les acyl-CoAs sont oxydés par la  $\beta$ -oxydation et ainsi utilisés comme source d'énergie (Saha et al., 1999; Ruderman et al., 1999; Dyck et al., 2000; Chien et al., 2000; Bavenholm et al., 2000; Hamilton et Saggerson, 2000). Dans les tissus lipogéniques tels que le foie, la FAS est fortement exprimée et le malonyl-CoA sert principalement à la synthèse *de novo* d'acides gras. Dans les tissus non-lipogéniques (cœur, muscle), la synthèse *de novo* d'acides gras est faible (Brun et al., 1996) et le malonyl-CoA sert principalement à la régulation de l'oxydation des acides gras via son action sur la CPT-1.

## 5.2- RÉGULATION DU MALONYL-CoA DANS LA CELLULE $\beta$ -PANCRÉATIQUE

L'îlots de Langerhans est un tissu non-lipogénique et la malonyl-CoA servirait de signal énergétique (voir ci-dessus), mais aussi de facteur de couplage métabolique permettant la sécrétion d'insuline (Prentki et Corkey, 1996). Le malonyl-CoA augmente de trois fois environ dans la cellule  $\beta$  après l'addition de glucose et précède la sécrétion d'insuline (Corkey et al., 1989; Farfari et al., 2000). Seuls les nutriments qui induisent la sécrétion d'insuline augmentent la concentration de malonyl-CoA dans la cellule  $\beta$  (Prentki et al., 1992).

La concentration du malonyl-CoA est régulée par trois enzymes, l'ACC, la FAS et la MCD. L'ACC synthétise le malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA et il a été démontré que les niveaux d'ARNm, de la protéine et de l'activité enzymatique de l'ACC sont augmentés en réponse au glucose (Brun et al., 1996; Zhang et Kim, 1998). L'activité de l'ACC est aussi augmentée à court terme par le glucose dans la cellule  $\beta$  (Roche et al., 1998), probablement via une déphosphorylation de l'enzyme (Zhang et Kim, 1998). La FAS utilise le malonyl-CoA comme source de carbones pour la synthèse des acides gras et il a été démontré que la FAS est très peu exprimée dans la cellule  $\beta$  (Brun et al., 1996). La MCD dégrade le malonyl-

CoA en acétyl-CoA. Peu de choses sont connues en ce qui concerne le rôle et la régulation de la MCD dans divers tissus.

## 6- LA MALONYL-CoA DÉCARBOXYLASE

### 6.1-PHYLOGÉNIE

On observe la présence de la MCD dans les bactéries, les oiseaux, les mammifères et même chez *C. elegans* (FitzPatrick et al., 1999; Sacksteder et al., 1999). La fermentation anaérobie du malonate en acétate permet la croissance des bactéries, *Sporomusa malonica*, *Klebsiella oxytoca* et *Rhodobacter capsulatus* (Dehning et Schink, 1994). La conversion du malonate en acétate implique la formation du malonyl-CoA suite à la réaction entre le malonate et l'acétyl-CoA par la CoA transférase. La décarboxylation du malonyl-CoA par la MCD libère de l'énergie libre utilisée pour la synthèse de l'ATP par un processus inconnu à ce jour. La MCD a été clonée chez l'oie en premier (Jang et al., 1989), par la suite chez le rat (Voilley et al., 1999) et chez l'humain (Gao et al., 1999). L'identité entre la MCD<sub>oie</sub> et la MCD<sub>rat</sub> et celle entre la MCD<sub>oie</sub> et la MCD<sub>humain</sub> sont de 68% et 70% respectivement, tandis que l'identité entre la MCD<sub>rat</sub> et la MCD<sub>humain</sub> est de 86% (Fig. 10). Le haut degré d'identité entre les différentes espèces indique une évolution conservée. On remarque chez les trois MCD une préséquence de localisation mitochondriale au bout N-terminal et une séquence de localisation peroxysomale SKL en C-terminal. Il est intéressant de noter que les trois MCDs contiennent deux sites possibles d'initiation de la transcription grâce à la présence de séquences consensus KOZAK donnant ainsi deux sites possibles de l'initiation de la traduction. La séquence de rat démontre aussi plusieurs sites possibles de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) et la PKC (Voilley et al., 1999).

MCD oie	M R G L R R G L S R L G P R L G P W A V P R S L R R V L . . . . . A A G P W R Q S S M G S V S	44
MCD humain	M R G F . . G F P . . G P G L . . . . . T A R R L L P L R L P P R P P G P R L A S G Q A A L	39
MCD rat	M R G L . . G . . . . . P S L . . . . . R A R R L L P L R Y F P R P P G P R . . P R L C S G L T	35
MCD oie	E R G G A S M E E V L S R S V P L L P P E T K E N A P P A E R R S R E E M V R Y I R S L E A G S R	94
MCD humain	E R . . . . M D E L L R R A V R D T P A T E L R E K T T R A P A E D D Q R D G V S F P G O L A E T R D	88
MCD rat	A \$ . . . . A M D E L L R R A V R D T P A T E L R E K T T R A P A E G Q C A D G F V S F P G O L A E T R D	82
MCD oie	R A E L L G C L A R D F G A D H G R V A E F S A K V L H A R E D E R E D G A L L Q A E D R L R Y L	144
MCD humain	R A E L L G R L A R G F G V D H G R V A E Q S A G V L H R R D Q Q R E S A V L L Q A E D R L R Y A L	136
MCD rat	R A E L L G R L A Q G F G V D H G R V A E D S A G V L L R R D Q S R E A V A V L L Q A E D R L R Y A L	132
MCD oie	T P R Y R A L P Q H L G R L E S G L R F L V E L R G D L V E G L A A A V D G P H V K E M S S V L R	184
MCD humain	V P R Y R G L F H H T S K L D G G V R F L V Q L R A D L L E A D A L K L V E G P D V R E M N G V L R	180
MCD rat	V P R Y R G L F H H T S K L D G G V R F L V Q L R A D L L E A D A L K L V E G P H V R E M N G V L R	182
MCD oie	N M L S E M P F S T G F L N L E R V T M Q S P C E V L Q N I S D S E A V H P V R R M V D L R R V S P	244
MCD humain	Q M L S E M P F S S G F L N L E R V T M H S P C E V L Q N I S E A E A V H P V R R M V D M L R R V S P	238
MCD rat	\$ M L S E M P F S S G F L N L E R V T M H S P C E V L Q N I S G C E A V Q P V K N M D M L R R V S P	232
MCD oie	Y R R C V F F S H C A I P G E P I I L H V A L T S D I S S I D S V K D V E S L E T E D A E R I	294
MCD humain	Y R R C V F F S H C S T P G E P L V V L H V A L T G D I S S N I D A V K E H P P S E T E E N N I	286
MCD rat	Y R R C V F F S H C S T P G D P V V L H V A L T G D I S N N I D S I V K E C P P S E T E E N N I	282
MCD oie	T T A I F Y S I S L A Q G L D G V E L G N H L I K R V V K E L O R D L P Q I E A F S S L S P I P G	344
MCD humain	T A A I F Y S I S L T Q D S K W S W E H S S I K R V V K E L O R E P P H L O V F S S L S P I P G	336
MCD rat	A A A V F Y S I S L T Q G L D G W G L G T F L I K R V V K E L O R E P P H L G A F S S L S P I P G	332
MCD oie	F T K W V G L L S S Q T N E L G R N E L F T E S E R O E T S E T T E S T T E T L R K L L T N S E	384
MCD humain	F T K W L G L L N S D T K E H G R N E L F T D S E Q N E T E T I D G P I N E T R L L L S N S E	380
MCD rat	F T K W L G L L N V D T K E Y G R N E L F T D S E Q N E T A E V T D D P V H E S S T G L L S S G E	382
MCD oie	W V N S E K L V K A L H S P L M R L C A W Y L Y G E K H R G Y A L N P V A N F H L Q N G A V L W R	444
MCD humain	W V Q S E K L V R A L D T P L M R L C A W Y L Y G E K H R G Y A L N P V A N F H L Q N G A V L W R	438
MCD rat	W A K S E K L A Q A L D G P L M R L C A W Y L Y G E K H R G Y A L N P V A N F H L Q N G A V M W R	432
MCD oie	N W M A D V S L R Q I T G S C G G M A N Y R Y F L E E T G P N S T S Y L G S K I T K A S E D I L S	484
MCD humain	N W M A D V S L R Q I T G S C G G M A N Y R Y F L E E T G P N S T S Y L G S K I T K A S E D I L S	488
MCD rat	N W M A D S S L K G L L S S C G G M V N Y R Y L E E T G P N S I S Y L G S K I N T K A S E D I L S	482
MCD oie	V S D F Q Q N S K L	504
MCD humain	V A D F Q K N S K L	498
MCD rat	V A D F R S N S K L	492

**Figure 10. Comparaison des séquences de la MCD de l'oie, du rat et de l'humain.** Les résidus identiques sont contenus dans une boîte noire. L'identité entre la MCD<sub>oie</sub> et la MCD<sub>rat</sub> et celle entre la MCD<sub>oie</sub> et la MCD<sub>humain</sub> sont de 68% et 70% respectivement, tandis que l'identité entre la MCD<sub>rat</sub> et la MCD<sub>humain</sub> est de 86%. L'ARNm de la MCD contient deux séquences ATG (méthionine 1 et 39 chez le rat) permettant l'initiation de la traduction (encadrée). Le deuxième ATG (méthionine 39) contient un site consensus KOZAK. La partie N-terminale contient une séquence de localisation mitochondriale (riche en acides aminés chargés positivement et hydroxylés) (soulignée). La partie C-terminale contient une séquence de localisation peroxysomale (SKL) (encadrée).

### 6.1.1- MCD DE L'OIE

Le gène codant pour la MCD de l'oie comprend 5 exons, et le premier exon contient les deux sites potentiels d'initiation de la traduction (ATG) séparés par 150 paires de bases. Dans la plupart des tissus, la transcription débute au premier ATG générant ainsi un transcrit plein longueur de 3000 nucléotides. La protéine complète possède 462 acides aminés, mais on observe en électrophorèse la présence de deux protéines, de 50 et 55 kDa. La protéine de 55 kDa contient la séquence de localisation mitochondriale. La fonction mitochondriale de la MCD est incertaine. Certains auteurs ont suggéré que dans la mitochondrie, la MCD

empêche l'inhibition d'enzymes clés de la matrice mitochondriale, tels que la PC, par le malonyl-CoA généré par la propionyl-CoA carboxylase (PCC) qui peut utiliser l'acétyl-CoA comme faux substrat (Voilley et al., 1999). L'oie possède une glande uropygiale qui synthétise spécialement des acides gras méthylés qui servent à la formation de cires utilisées pour le lissage des plumes de l'oiseau. L'utilisation d'un promoteur alternatif génère un transcrit initié entre les deux ATGs et la protéine produite (1% des protéines solubles) s'accumule dans le cytoplasme de cette glande. La MCD permet la formation d'acides gras méthylés car en diminuant le niveau de malonyl-CoA, le méthylmalonyl-CoA devient le substrat préférentiel pour la FAS (Kim et Kolattukudy, 1978; Kolattukudy et al., 1987; Jang et al., 1989; Courchesne-Smith et al., 1992).

#### 6.1.2-MCD DES MAMMIFÈRES

La MCD a été identifiée chez le rat, le lapin, la souris (Gao et al., 1999) et l'humain. La littérature est plus abondante en ce qui concerne la MCD du rat et de l'humain.

##### 6.1.2a- LE RAT

L'ARNm de la MCD est exprimée ubiquitairement. Dans le cerveau, son activité enzymatique est faible mais augmente graduellement après la naissance. L'enzyme se localise dans la mitochondrie. Le rôle physiologique de la MCD pourrait être lié à la détoxification du malonyl-CoA mitochondrial (Dickson et al., 1994).

Lors de la contraction *in vitro* du muscle squelettique, le niveau de malonyl-CoA diminue et l'oxydation des acides gras augmente. La diminution du malonyl-CoA est attribuable à la diminution de l'activité enzymatique de l'ACC mais aussi à une augmentation de 2-3 fois de l'activité enzymatique de la MCD comme démontré dans une étude récente en collaboration avec notre groupe (Saha et al., 2000). La

régulation semble s'effectuer de façon post-traductionnelle car la phosphorylation de la MCD par la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) augmente l'activité enzymatique de la MCD. Le  $K_m$  de la MCD pour le malonyl-CoA dans le muscle est de  $180\mu\text{M}$  (Saha et al., 2000). De plus, le groupe de Rudermann a démontré que des rats traités chroniquement avec le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR), un activateur de l'AMPK, voient l'activité enzymatique de la MCD augmentée de 1.5 fois (Rudermann, communication privilégiée).

Le cœur nécessite beaucoup d'énergie pour son bon fonctionnement. La majeure partie de cette énergie provient des lipides. Dans une étude, l'augmentation du travail cardiaque a accru de 40% la  $\beta$ -oxydation des acides gras et diminué de 33% la concentration de malonyl-CoA. L'activité enzymatique de l'ACC est demeurée inchangée. En revanche, l'activité enzymatique de la MCD a été augmentée de 55% en condition de substrat limitant (Goodwin et Taegtmeier, 1999). La MCD cardiaque a une masse moléculaire apparente de 190 kDa sous sa forme tétramérique et chaque monomère a une masse de  $\sim 50$  kDa. De plus, la déphosphorylation de la protéine par l'alcaline phosphatase augmente l'activité enzymatique de la MCD (Dyck et al., 1998).

Le foie exprime abondamment la MCD. On observe une seule protéine de masse moléculaire de 50 kDa (en condition dénaturante) (Dyck et al., 2000). Le cDNA de la MCD hépatique contient deux ATG et la transfection de ce cDNA dans des cellules COS produit deux protéines de 55 et 50 kDa. La mutation du second ATG permet tout de même la production des deux isoformes. Par conséquent, le second ATG n'est pas nécessaire à la production de la protéine de 50 kDa et cette isoforme provient probablement d'un «processing» intracellulaire de la protéine de 55 kDa. La localisation intracellulaire de la MCD hépatique est débattue. Certains ont identifié la MCD dans la mitochondrie et les peroxysomes (FitzPatrick et al., 1999) tandis que d'autres l'ont observé dans le cytoplasme et les peroxysomes (Sacksteder et al., 1999). L'activité enzymatique de la MCD hépatique augmente

de deux fois lorsque des rats jeûnent pendant 48h sans toutefois changer le niveau de la protéine. Ceci favorise la diminution du niveau de malonyl-CoA, permet d'enrayer l'inhibition de la CPT-1 et d'augmenter l'oxydation des acides gras afin de récupérer l'énergie nécessaire (Dyck et al., 2000). De plus, la déphosphorylation de la MCD hépatique par l'alcaline phosphatase augmente l'activité enzymatique.

La cellule pancréatique  $\beta$  et la lignée cellulaire INS expriment un transcrit de pleine longueur de 2200 paires de bases comprenant les deux ATG (Voilley et al., 1999). Peu de choses sont connues au niveau de la régulation et la fonction de la MCD dans la cellule  $\beta$ , particulièrement son rôle dans le métabolisme des lipides, la signalisation métabolique et la sécrétion d'insuline.

#### 6.1.2b-LE LAPIN

Au cours du développement, le besoin énergétique s'accroît. Dans le cœur, la source d'énergie provient principalement des acides gras. On observe, dans le cœur des lapins de 7 jours par rapport aux lapins âgés d'un jour, une diminution du malonyl-CoA permettant une augmentation de la production d'énergie grâce à la  $\beta$ -oxydation. L'activité enzymatique de l'ACC diminue mais celle de la MCD s'élève significativement dans le cœur des lapins au cours de la première semaine suivant la naissance. De plus, la déphosphorylation de la MCD par l'alcaline phosphatase ne semble pas changer l'activité de l'enzyme, ce qui diffère de l'observation effectuée dans le cœur de rat (Dyck et al., 1998).

#### 6.1.2c-L'HUMAIN

Le gène codant pour la MCD se situe chez l'humain sur le chromosome 16q24. L'expression de l'ARNm de 2300 paires de bases se retrouve dans tous les tissus. On observe une forte expression dans le muscle, le cœur, le foie, les reins et le pancréas. Les autres tissus expriment faiblement l'ARNm de la MCD. La protéine

de 493 acides aminés a une masse de 50 kDa et un Km pour le malonyl-CoA de 220 $\mu$ M (Gao et al., 1999; Sacksteder et al., 1999).

## 6.2- MUTATIONS DU GÈNE DE LA MCD

Certaines pathologies congénitales du métabolisme démontrent une déficience ou une altération dans l'expression de la MCD entraînant un changement au niveau de la concentration du malonyl-CoA et probablement de l'oxydation des acides gras.

Chez l'humain, sept patients ont été diagnostiqués avec une perte de fonction de la MCD. La déficience en MCD se caractérise par un retard mental, une cardiomyopathie, une hypoglycémie, l'acidurie malonique et méthylmalonique et dans les cas les plus sévères une mort à la naissance. Jusqu'à présent, les quatre mutations indépendantes dans le gène de la MCD provoquent toutes une protéine tronquée. La première, se caractérise par une délétion de quatre nucléotides en 3' de l'exon 2. Ceci produit un codon stop prématuré et une protéine tronquée de 272 acides aminés en C-terminal (Gao et al., 1999). La deuxième mutation est une transversion 442C $\rightarrow$ G provoquant aussi un codon stop prématuré. La troisième est une insertion de 13 paires de bases dans l'ARNm mature causant un changement du cadre de lecture et une protéine tronquée. Cette insertion causée par une substitution A $\rightarrow$ G dans l'intron 4 génère une nouvelle séquence acceptrice d'épissage (FitzPatrick et al., 1999). La dernière est une délétion de deux résidus thymidines et code pour une protéine tronquée de 142 acides aminés en C-terminal (Sacksteder et al., 1999).

On remarque lors d'ischémie cardiaque une diminution du niveau de malonyl-CoA et un taux d'oxydation des acides gras élevé. Ceci diminue le métabolisme du glucose et entraîne une diminution de l'efficacité cardiaque et une augmentation de la sévérité des lésions ischémiques. Une étude *in vitro* chez le rat démontre que la diminution de l'activité de l'ACC et une activité maintenue de la

MCD sont responsables de la diminution du malonyl-CoA pendant l'ischémie cardiaque (Dyck et al., 1998).

L'injection de streptozotocine à des rats détruit les cellules  $\beta$  et rend ceux-ci diabétiques de type I. On observe dans le cœur et le foie de ces rats une augmentation de l'activité enzymatique de la MCD causée par une élévation de l'expression de la protéine. L'augmentation de l'expression de la MCD serait en partie responsable de l'oxydation accrue des acides gras observée dans ces rats (Sakamoto et al., 2000; Dyck et al., 2000).

## 7-EFFETS DES ACIDES GRAS SUR LA SÉCRÉTION D'INSULINE

### 7.1-EFFETS À COURT TERME

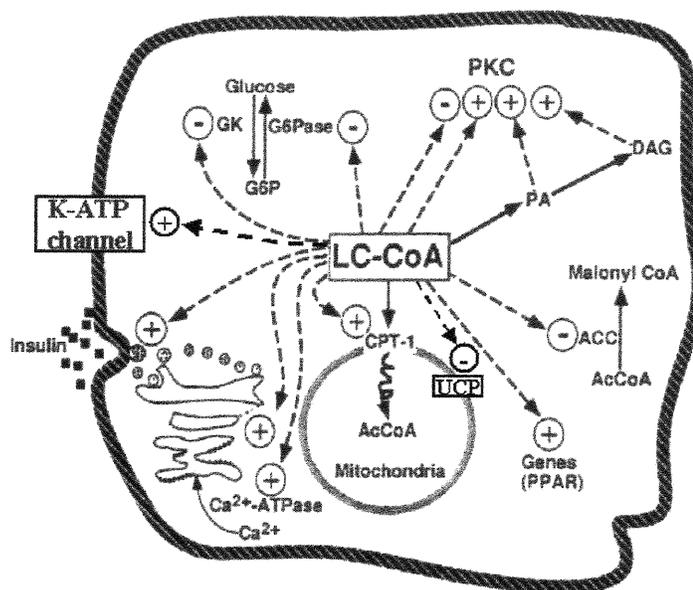
Plusieurs groupes ont démontré que les acides gras stimulent la sécrétion d'insuline à court terme; c'est-à-dire lors d'une incubation des acides gras n'excédant pas 6h. *In vitro*, les acides gras saturés potentialisent la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans la lignée cellulaire  $\beta$ -pancréatique HIT et les îlots de rats et de souris (Vara et al., 1988; Prentki et al., 1992; Warnotte et al., 1994). Les acides gras saturés à longue chaîne carbonée (myristate (C14), palmitate (C16) et stéarate (C18)) stimulent davantage la sécrétion d'insuline que les acides gras insaturés (oléate (C18:1), linoléate (C18:2) et linoléate (C18:3)). De plus, la concentration d'acides gras libres (Landriscina et al., 1971) et non la concentration totale en acide gras du milieu d'incubation corrèle avec l'augmentation de la sécrétion d'insuline (Prentki et al., 1992; Warnotte et al., 1999; McGarry et Dobbins, 1999). Des agents inhibiteurs de la CPT-1 tels le 2-bromopalmitate et le 2-bromostéarate stimulent la sécrétion d'insuline dans les îlots perfusés, les cellules HIT et le pancréas de rat perfusé (Bedoya et al., 1984; Bliss et Sharp, 1992; Prentki et al., 1992).

Les résultats obtenus *in vivo* renforcent ceux obtenus *in vitro*. Lors d'un jeûne de 48h, on observe chez les rats une augmentation des acides gras libres en circulation. L'utilisation de l'acide nicotinique (AN), un agent antilipolytique, permet de diminuer la concentration d'AGL plasmatiques. Dans ces conditions, la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose disparaît complètement. Par contre, l'infusion d'AN avec un mélange d'Intralipid-héparine qui augmente la concentration d'acides gras libres permet la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Stein et al., 1996). Les mêmes résultats ont été obtenus chez l'humain (Dobbins et al., 1998a). De plus, dans les mêmes conditions, les acides gras saturés à longue chaîne carbonée stimulent davantage la sécrétion que les acides gras insaturés à longue chaîne carbonée ou les acides gras à chaîne courte (Stein et al., 1997; McGarry et Dobbins, 1999).

Enfin, l'action permissive des acides gras circulants pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose pendant le jeûne est aussi étendue à tous les types de sécrétagogues (Dobbins et al., 1998b).

#### 7.1.1- LES CIBLES DES ACIDES GRAS À LONGUE CHAÎNE

La forme activée des acides gras à longue chaîne carbonée (LC-CoA) semble agir comme facteur de couplage métabolique dans la cellule  $\beta$ -pancréatique afin de moduler la sécrétion d'insuline. Ceux-ci peuvent réguler plusieurs enzymes et canaux. La Figure 11 illustre des cibles possibles des acyl-CoAs (Prentki et Corkey, 1996). L'élévation des LC-CoAs, de l'acide phosphatidique (PA) et du diacylglycérol (Peter-Riesch et al., 1988) suite à la stimulation de la cellule  $\beta$  par le glucose pourrait directement moduler l'activité enzymatique de certaines isoformes de la PKC (Wollheim et Regazzi, 1990; Limatola et al., 1994; Yaney et al., 2000) ou modifier l'état d'acylation de certaines protéines clés impliquées dans la régulation de canaux nécessaire à l'exocytose de l'insuline (Deeney et al., 2000). D'ailleurs, plusieurs protéines G impliquées dans la transduction des



**Figure 11. Les cibles des acyl-CoAs à longue chaîne carbonée.**

Les acyl-CoAs à longue chaîne carbonée (LC-CoA) sont des effecteurs de plusieurs processus cellulaires et modulent l'activité de divers enzymes. GK, glucokinase; G6Pase, glucose 6-phosphatase; PKC, protéine kinase C; PA, acide phosphatidique; DAG, diacylglycérol; ACC, acétyl-CoA carboxylase; PPAR, «peroxisome proliferator activated receptor»; ANT, adénine-nucléotide transférase; UCP, protéine découplante; CPT-1, carnitine palmitoyltransférase-1. (Modifié de Corkey et al., 2000)

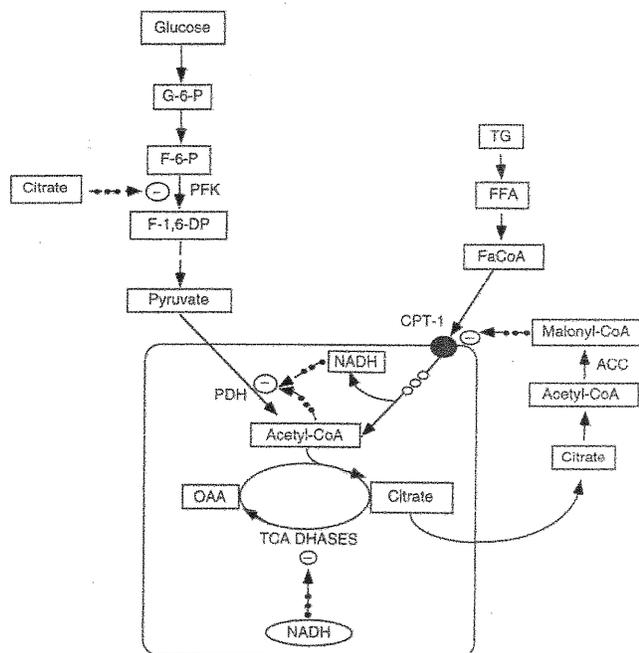
signaux cellulaires sont acylées (Schmidt, 1989). De plus, les LC-CoA stimulent l'activité enzymatique de l'ATPase calcique du réticulum endoplasmique (Prentki et al., 1992). Ils accélèrent aussi le transfert des protéines du *cis* au *trans* Golgi en augmentant le bourgeonnement des vésicules du *cis* Golgi et leur fusion avec le *trans* Golgi. Les LC-CoAs semblent moduler l'activité des canaux potassiques de la voie dépendante de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$  (Larsson et al., 1996). La régulation des «peroxisome proliferator activated receptors» (PPAR) par les acides gras libres plutôt que pour les LC-CoA modulerait l'expression de certains gènes (Keller et al., 1993). Enfin les LC-CoA inhibent divers enzymes du métabolisme

intermédiaire dont la GK, la glucose-6-phosphatase (Prentki et Corkey, 1996), l'adénine nucléotide transférase (ANT) et l'ACC (Brun et al., 1997).

## 7.2- EFFET À LONG TERME DES ACIDES GRAS SUR LA CELLULE $\beta$

Des études *in vitro* et *in vivo* (Mason et al., 1999) ont montré que si les acides gras à court terme stimulent la sécrétion d'insuline, en revanche ils inhibent à long terme la sécrétion d'insuline induite par le glucose (sur des périodes d'incubation excédant 6h). Normalement, la cellule  $\beta$  maintient un équilibre entre la sécrétion, la production et la dégradation d'insuline afin de conserver une concentration intracellulaire optimale de l'hormone. Cependant, on observe dans les îlots de rat et les cellules  $\beta$  MIN6 incubés pendant 24 h avec de l'oléate, une stimulation de la sécrétion d'insuline à basse concentration de glucose accompagnée d'une réduction de 50% de l'insuline totale et d'une inhibition de la biosynthèse de la proinsuline (Skelly et al., 1998; Bollheimer et al., 1998). La diminution du contenu total en insuline des îlots s'explique tout en moins en partie par une diminution de la prohormone convertase 2 (PC2) et 3 (PC3) responsable de la conversion de la proinsuline en insuline (Furukawa et al., 1999). Ces résultats expliquent aussi en partie la diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

En ce qui a trait au métabolisme de la cellule  $\beta$ , l'exposition à long terme de la lignée cellulaire  $\beta$ -pancréatique INS-1 aux acides gras diminue l'ARNm, la protéine et l'activité enzymatique de l'ACC (Brun et al., 1997) tandis que l'ARNm et l'activité enzymatique de la CPT-I augmentent (Assimacopoulos-Jannet et al., 1997). Ainsi, on observe une augmentation de l'oxydation des acides gras. En théorie, l'exposition prolongée de la cellule  $\beta$  aux acides gras pourrait entraîner une altération de l'oxydation du glucose tel que proposé par le cycle de Randle ou l'oxydation accrue des acides gras conduit à une inhibition de celle du glucose (Randle et al., 1988). Dans ce cycle glucose/acides gras proposé par Randle (Fig. 12), l'accélération de l'oxydation des acides gras résulte en une



**Figure 12. Le cycle de Randle.**

Le cycle glucose/acides gras proposé par Randle implique que l'augmentation de l'oxydation des acides gras inhibe l'oxydation du glucose. On observe une forte production de NADH et d'acétyl-CoA qui inhibent l'activité de la PDH causée par une augmentation de l'activité pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK). De plus, l'inhibition de la PFK-1 causée par une augmentation de la concentration cytosolique de citrate est associée à une augmentation du niveau de G-6-P. G-6-P, glucose 6-phosphate; F-6-P, fructose 6-phosphate; PFK (PFK-1), 6-phosphofructo-1-kinase; F-1,6-DP, fructose 1,6-diphosphate; PDH, pyruvate déshydrogénase; OAA, oxaloacétate; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide; ACC, acétyl-CoA carboxylase; CPT-1, carnitine palmitoyltransférase-1; FaCoA, acyl-CoA; FFA, acides gras libres; TG, triglycéride.

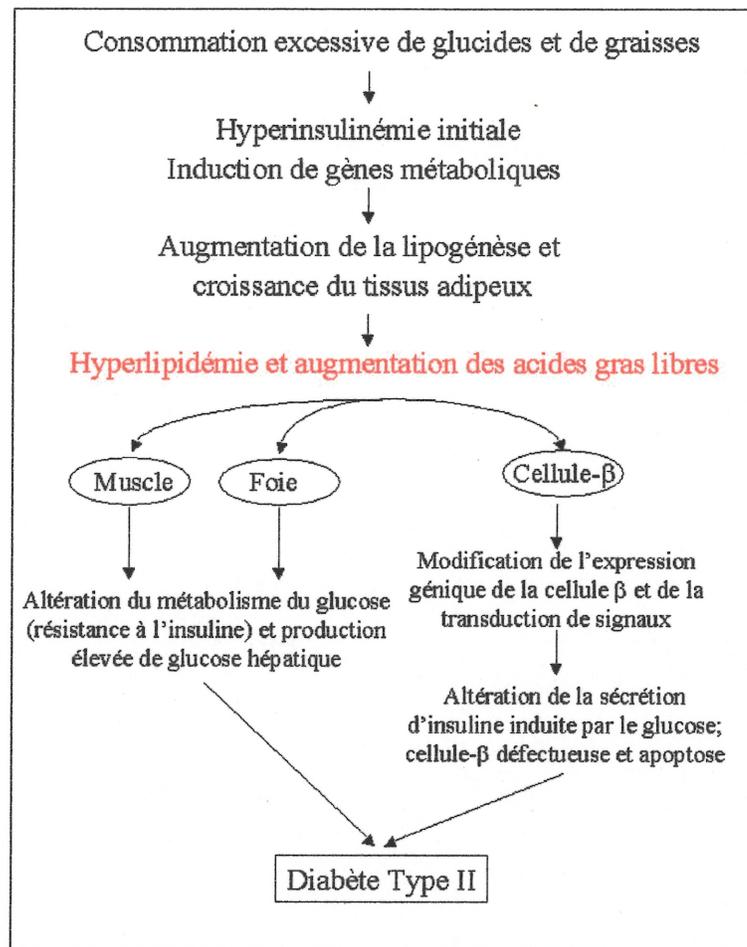
forte production de NADH, d'acétyl-CoA, ainsi qu'une augmentation des concentrations cytosolique de citrate et de G6P en association avec une inhibition de l'activité PDH causée par une augmentation de l'activité pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK) provoquée par l'élévation du citrate cytosolique et de la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) (Randle et al., 1988; Zhou et Grill, 1995). Cette théorie est néanmoins controversée car on observe dans les îlots préincubés pendant 48h en présence d'acides gras une diminution de l'oxydation du glucose

seulement à haute (27 mM) concentration de glucose (Segall et al., 1999). De plus, certains ont même observé une augmentation de l'oxydation du glucose dans les îlots traités aux acides gras (Hosokawa et al., 1997). Enfin, Segall et coll. (1999) ont noté une diminution de 25% de l'oxydation du glucose ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose lorsque les cellules  $\beta$  INS-1 ont été exposées à l'oléate pendant 48 h, mais n'ont pas observé les autres caractéristiques prédites par la théorie de Randle.

Le facteur de transcription PDX-1 pourrait être impliqué dans l'action à long terme des acides gras sur la sécrétion d'insuline. En effet, le palmitate diminue l'expression de PDX-1 et de certains gènes contenant des éléments de réponse pour ce facteur dont celui du transporteur de glucose GLUT-2, la GK, l'insuline et la somatostatine (Gremlich et al., 1997). D'autres hypothèses peuvent expliquer la diminution de la sécrétion d'insuline causée par les acides gras: une inhibition de la PKC (Thams et al., 1990), un effet stimulateur des LC-CoA sur les canaux K-ATP fermés par le glucose (Larsson et al., 1996), et une inhibition de l'augmentation de l'ATP induit par le glucose provoquée par une augmentation de la protéine découplante-2 (UCP-2) (Lameloise et al., 2001).

### 7.3- LE DIABÈTE ADIPOGÉNIQUE

Une forte association existe entre l'obésité et le diabète de type II. La concentration des acides gras circulants augmente dramatiquement dans le plasma des obèses. Ceux-ci semble jouer un rôle causal dans l'étiologie du diabète de type II ou adipogénique (Fig. 13). En effet, les acides gras causent une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques (muscle et foie) provoquant une augmentation de la production du glucose hépatique et une diminution de l'entrée et de l'oxydation du glucose dans le muscle (Schmitz-Peiffer et al., 1999; Bergman et Ader, 2000). Cette résistance est initialement compensée par une hyperinsulinémie. Dans la cellule  $\beta$ , on note plusieurs altérations causées par les acides gras aux niveaux de l'expression des gènes (mentionné ci-dessus). Après un



**Figure 13. Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète adipogénique.**

Chez des individus génétiquement prédisposés au diabète de type II, une diète riche en glucides et en graisse provoque initialement une hyperinsulinémie et l'induction des gènes de la lipogénèse. La croissance du tissu adipeux entraîne une augmentation des acides gras circulants. Ceux-ci causent une résistance à l'insuline dans les tissus périphériques. La résistance à l'insuline est initialement compensée par une sécrétion d'insuline accrue. L'entrée du glucose dans le muscle diminue et la production de glucose hépatique augmente. Les acides gras ont des effets progressivement néfastes pour la cellule  $\beta$ . On observe dans la cellule  $\beta$  une modification de l'expression de plusieurs gènes, et au cours du temps une altération de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, la mort des cellules  $\beta$  par apoptose et par conséquent le diabète de type II (NIDDM).

certaines temps qui peut s'étendre sur des années, on observe une diminution du nombre de cellule  $\beta$  dans le pancréas et la cellule  $\beta$  n'est plus capable de compenser la résistance à l'insuline (phase de décompensation). Il en résulte une

diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et conséquemment le NIDDM (Unger, 1995; Prentki et Corkey, 1996)

#### 7.4-LIPOTOXICITÉ DANS LA CELLULE PANCRÉATIQUE $\beta$

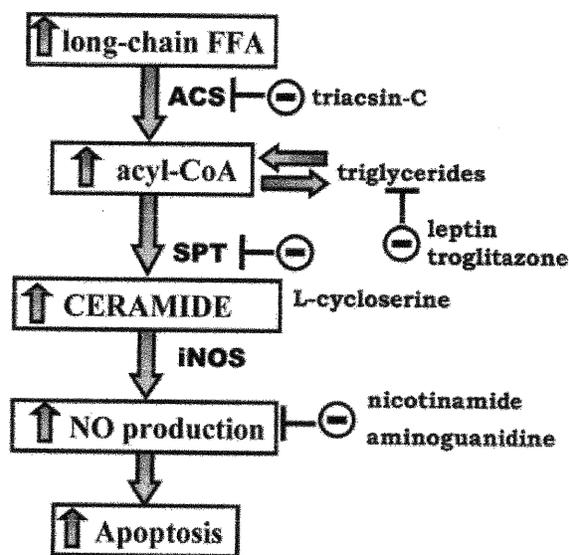
Depuis longtemps, on pense que les acides gras libres élevés dans le plasma contribue à la résistance à l'insuline, et plus récemment on les a associé aussi au défaut insulino-sécrétoire dans le diabète de type II (Prentki et Corkey, 1996). Néanmoins, il semble que le niveau de triglycérides (Liang et al., 1997) intracellulaires influence davantage soit la résistance à l'insuline ou la sécrétion de l'hormone. (Unger, 1997). L'obésité augmente la concentration de TG dans le muscle et le foie, mais aussi dans le pancréas endocrine *in vivo* et les îlots isolés (Unger, 1995; Zhou et al., 1996). Une accumulation massive des TGs pourrait causer une lipotoxicité et la mort des cellules  $\beta$  par un phénomène d'apoptose (Unger, 1997).

Un bon modèle animal de diabète adipogénique est le rat diabétique Zucker *fa/fa* (ZDF). Chez celui-ci, une mutation du récepteur de la leptine diminue la lipolyse et l'oxydation des acides gras de l'îlots (Shimabukuro et al., 1998b). Une phase pré-diabétique chez cet animal, caractérisée par une augmentation des AGL mène à un dépôt progressif de TG dans la cellule  $\beta$ . De la 9-11<sup>ème</sup> semaine, l'hyperglycémie apparaît et les îlots présentent une concentration 50 fois plus élevée en TG et une diminution de la masse des cellules  $\beta$  malgré un taux de prolifération plus élevé et une hyperplasie (Unger, 1995; Roche et al., 2000). Ces observations semblent démontrer que la cellule  $\beta$  essaie initialement de compenser la résistance à l'insuline des tissus périphériques. Finalement, arrive le point de non-retour où les cellules  $\beta$  ne sont plus capables de maintenir la demande en insuline et celles-ci meurent par apoptose. Les acides gras pourraient induire l'apoptose des îlots des rats ZDFs en augmentant la synthèse *de novo* des céramides via la céramide synthase ou via la voie de la sphingomyéline par la sphingomyélinase (Shimabukuro et al., 1998a; Shimabukuro et al., 1998c). Dans

ce modèle les acides gras, via les céramides, augmentent l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et par conséquent la production d'oxyde nitrique (NO) (Fig. 14). En accord avec cette hypothèse, des agents inhibiteurs (nicotinamide et aminoguanidine) de l'enzyme iNOS empêchent la formation de NO et l'apoptose des cellules  $\beta$  (Unger, 1997). Cette observation appuie celle de l'augmentation de l'activité du facteur de transcription protéine activatrice-1 (AP-1) par les acides gras (Roche et al., 1999) car ce facteur de transcription est nécessaire à l'expression du gène de la iNOS (Roche et al., 2000). Finalement, des évidences additionnelles favorisant l'idée selon laquelle l'excès de lipides est la cause principale des défauts de la cellule  $\beta$  dans le diabète adipogénique sont le fait qu'une diète pauvre en acides gras ou l'administration de thiazolidinediones (troglitazone), molécule qui empêchent l'accumulation de TG dans la cellule  $\beta$ , retardent l'apparition du diabète chez le rat ZDF (Shimabukuro et al., 1998b; Unger, 1997; Girard, 2000).

**Figure 14. Modèle de la lipotoxicité de la cellule  $\beta$  via la voie des céramides.**

ACS, acyl-CoA synthétase; SPT, sérine palmitoyltransférase; iNOS, oxyde nitrique synthétase inductible. (Tiré de Unger et al., 1999)



## 8-THÉMATIQUE ET BUT DU TRAVAIL DE MAÎTRISE

Le diabète de type II associé à l'obésité se caractérise par une hyperinsulinémie initiale afin de compenser la résistance à l'insuline des tissus périphériques. Des évidences démontrent que les acides gras à longue chaîne carbonée stimulent à court terme la sécrétion d'insuline induite par le glucose mais à long terme inhibent la sécrétion d'insuline.

À ce jour, les mécanismes régulant la sécrétion d'insuline induite par le glucose ne sont pas entièrement compris, mais semblent impliquer des molécules lipidiques signalétiques. Dans la cellule  $\beta$ , une interaction importante existe entre le malonyl-CoA et la CPT-1. Cette interaction permet la régulation de l'oxydation mitochondriale des acides gras et pourrait jouer un rôle dans le système de transduction de la cellule  $\beta$  où le malonyl-CoA serait un facteur de couplage métabolique. La MCD régule la concentration de malonyl-CoA en utilisant celui-ci comme substrat. *À ce jour, le rôle et la régulation de l'expression génique de la MCD dans la cellule  $\beta$  ne sont pas bien compris. De plus, il reste à démontrer directement que le malonyl-CoA est impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose.*

Afin de mieux comprendre le rôle du malonyl-CoA et de la MCD dans la cellule  $\beta$ , nous avons d'une part étudié l'expression du gène de la MCD au niveau de l'ARNm, de la protéine ainsi que de son activité enzymatique dans la lignée cellulaire insulino-sécrétoire INS-832/13. Les actions à court et long terme du glucose et divers acides gras sur l'activité enzymatique et la régulation du gène de la MCD ont été examinées. La lignée clonale INS-832/13 (Hohmeier et al., 2000) dérive de la lignée INS-1 de cellules pancréatiques  $\beta$  provenant d'une tumeur induite chez le rat par irradiation aux rayons X (Asfari et al., 1992). Elle se caractérise par une très forte stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et possède la voie de signalisation indépendante des canaux K-ATP.

De plus, afin de tester le modèle selon lequel la sécrétion d'insuline implique la voie anaplérotique/malonyl-CoA, nous avons établi une lignée stable de cellules

pancréatique  $\beta$  INS pouvant surexprimer la MCD spécifiquement dans le cytosol. Diverses constructions codant pour la MCD ont été préparées et utilisées pour générer des adénovirus recombinants : une MCD originale et une MCD cytosolique dépourvue de ses séquences de localisation mitochondriale et peroxysomale. L'effet d'une surexpression de ces MCD originales et tronquées, grâce au système d'adénovirus, sur la sécrétion d'insuline a aussi été testé dans les îlots de Langerhans.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

**1. Matériel :** Les acides gras (acide oléique, palmitique et linoléique) ont été achetés chez Nu-Chek Prep Inc. (Elysian, MN). Le milieu RPMI 1640 et les suppléments (incluant le sérum de veau fœtal) ont été obtenus de chez GIBCO BRL (Burlington, ON). Les îlots de Langerhans ont été isolés en utilisant la collagénase (type IV) de Worthington (Lakewood, NJ) et le Ficoll DL-400 de chez Sigma (St-Louis, MS). La transcriptase inverse a été achetée chez Roche Molecular Biochemical (Laval, QC, Canada) et la TAQ polymérase chez Life Technologies (Rockville, MD). Les membranes de nitrocellulose pour l'analyse protéique proviennent de Schleicher & Schuell (Dassel, Germany) et l'acide bicinchoninique (BCA) pour le dosage protéique provient de Pierce (Rockford, IL). Le kit de détection par chemiluminescence pour Western blot (ECL), la T4 kinase, l'hexamère Pd(N)<sub>6</sub> et l' [<sup>14</sup>C]-acide aspartique ont été achetés chez Amersham/Pharmacia (Upsala, Suède). La glutamate-oxaloacétate transaminase et la citrate synthase pour mesurer l'activité enzymatique de la MCD ont été achetés chez Roche Molecular Biochemical (Laval, QC, Canada). L'anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapins couplé à la peroxydase de raifort et la membrane Zeta probe QT ont été obtenus de chez Bio-Rad (Hercules, CA). Le kit pour doser l'insuline provient de Linco Research, Inc. (St-Charles, Missouri, US)

**2. Rat hyperglycémique et hyperlipidique :** Des rattes Wistar de 220-240g ont été infusées, selon une méthode déjà publiée (Magnan et al., 1999), pendant 48 h avec une solution de glucose ou une émulsion de triglycérides 20% (Intralipid, Kabivitrum; Stockholm, Suède) grâce à un cathéter implanté dans l'atrium droit via la veine jugulaire. Les rattes contrôles ont été infusées de la même façon avec une solution saline.

**3. Isolation d'îlots de Langerhans pancréatique et culture cellulaire :** Les îlots de Langerhans sont isolés à partir de rats Wistar (Charles River, St-Constant, QC,

Canada) d'environ 200 g. Le pancréas total est digéré avec une solution de collagénase (2 mg/ml) et les séparations subséquentes se font par centrifugation sur un gradient discontinu de Ficoll DL-400 selon la méthode de Gotoh et al. (Gotoh et al., 1987). Les îlots et les cellules INS(832/13) (Hohmeier et al., 2000) sont gardés en culture à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub>. À la fin de l'isolation, les îlots sont maintenus à raison de 15-20 îlots/ml de milieu RPMI 1640 complet contenant 10% de sérum de veau fœtal, 10 mM d'Hepes (pH 7.4), 1 mM de sodium pyruvate, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 50 µM de β-mercaptoéthanol et 11 mM de glucose. Les cellules INS(832/13) (passages 33 à 60) sont cultivées dans des pétris de 60mm de diamètre (1 x 10<sup>6</sup> cellules/pétri) avec du milieu RPMI 1640 complet. Le jour suivant, les îlots et les cellules INS(832/13) sont préincubés pendant 24h avec du milieu de culture complet contenant 3 mM glucose. Finalement, les îlots et les les cellules sont incubés pour différents temps dans du milieu de culture complet contenant différent nutriments calorigéniques (glucose et acides gras).

**4. Préparation des solutions d'acides gras liés à l'albumine :** Les sels de palmitate, d'oléate ou de linoléate sont dissout à 37°C dans une solution contenant 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) sans acides gras (Sigma Fraction V). Une fois l'acide gras dissout, le pH est ajusté à 7.4 et la solution est filtrée sur un filtre de 0.22 µm. La concentration en acides gras est alors déterminée par un dosage enzymatique en utilisant le kit NEFA C (Wako Chemicals, Richmond, VA). La concentration d'acide gras est alors ajustée à 4 mM de manière à obtenir une solution 10 fois concentrée.

**5. Isolation de l'ARN et analyse par RT-PCR :** L'ARN total de 50 îlots et des cellules INS(832/13) est isolé par la méthode utilisant le mélange guanidine isothiocyanate/phénol/chloroforme (Chomczynski et Sacchi, 1987) en ajoutant 20 µg d'ARN de transfert (ARNt) de levure utilisé comme co-précipitant pour l'ARN des îlots. Le brin primaire d'ADNc a été généré à partir de l'ARN total des îlots ou 5 µg d'ARN des cellules INS(832/13) dans 50 µl (volume final) d'un tampon

contenant l'oligonucléotides Pd(N)<sub>6</sub>. 2 µl (MCD) et 1 µl (β-actine) du mélange de la transcription inverse ont été amplifiés dans un volume final de 50 µl avec des oligonucléotides spécifiques pour les ADNc des rats correspondant. MCD : 5'-AAYYTGGARCGGGTCACGTGGCA-3' (s); 5'-TAGYCNCGRTGCTTCTCNCRTA-3' (as) et β-actine : 5'-GTGCCCATCTATGAGGGTTACGCG-3' (s); 5'-GGAACCGCTCATTGCCGATAGTG-3'(as). La linéarité de chaque PCR a été testée par amplification de 500 ng d'ARN total/réaction. La PCR était linéaire de 30 à 40 cycles. Chaque échantillon est amplifié selon les paramètres suivants. (MCD) : 94°C pour 30 s, 55°C pour 1 min et 72°C pour 1 min pendant 35 cycles; (β-actine) : 94°C pour 30 s, 60°C pour 1 min et 72°C pour 1 min pendant 30 cycles. Ensuite, les échantillons sont analysés par buvardage Southern.

**6. Buvardage Southern :** Dix µl des produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon Zeta probe QT par capillarité et les signaux sont détectés par hybridation avec un des oligos spécifiques suivants marqués au P<sup>32</sup> : (MCD) 5'-TACARRTACCAGGCRCACARYCTCAT-3' et (β-actine) : 5'-TCATGCCATCTGCGTCTGGACCT-3'. Les signaux d'hybridations ont été quantifiés en mesurant l'intensité des signaux des autoradiogrammes.

**7. Génération des anticorps dirigés contre la MCD :** Les anticorps sont générés selon les méthodes décrites dans le chapitre 5 du manuel « ANTIBODIES, A Laboratory Manual » (Harlow et Lane, 1988). Deux peptides synthétiques dirigés sélectivement contre la partie N terminale : N-term -H-M-D-E-L-L-R-R-A-V-P-P-T-P-D-Y-OH- C-term et C terminale : N-term -H-Q-V-L-S-L-V-A-Q-F-Q-K-N-S-K-L-OH- C-term couplés à la protéine de transport hemacyanine de sangsue (KLH) (Sigma H-7017) ont été injectées dans deux lapins. Une première immunisation, par injection sous-cutanée, est faite avec 500 µg d'antigène resuspendu dans 1.5ml d'une émulsion de PBS et d'adjuvant de Freund complet 1 : 1 (Sigma F-5881). La solution est injectée à raison de 150 µl par site d'injection et ceci à cinq endroits différents de l'animal (aiguille 25G). Trois

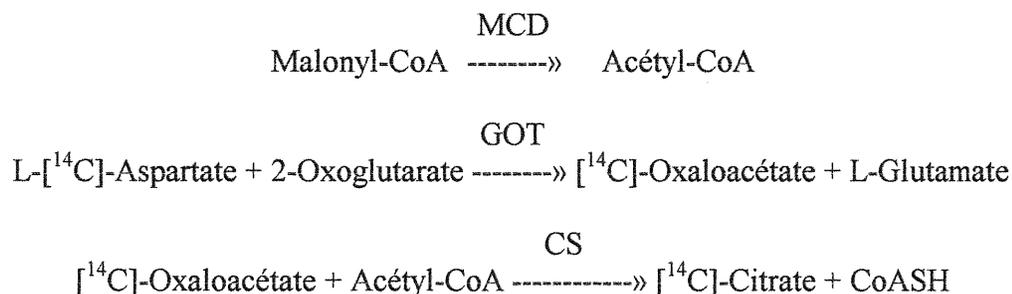
semaines plus tard, une deuxième immunisation avec la même quantité d'antigène émulsifié dans du PBS et de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma F-5506) est faite par injection sous-cutanée. Après une semaine, on récolte le sang de chaque lapin. On attend deux semaines avant l'immunisation suivante. Il est possible d'effectuer jusqu'à cinq immunisations avant de sacrifier l'animal sous anesthésie, en récupérant le maximum de sang. Le sérum est ensuite préparé par centrifugation (10min à 3500 rpm) du sang coagulé, lequel est aliquoté et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**8. Purification des IgG (immunoglobulines G) :** La préparation des fractions IgG est faite par absorption sur colonne de protéine A sépharose CL-4B (Amersham/Pharmacia, Uppsala, Suède). 2 ml de sérum sont dilués dans 10 ml de PBS et passés à trois ou quatre reprises sur la colonne de protéine A sépharose, préalablement équilibrée dans du PBS. La colonne est ensuite lavée successivement avec 10 ml de PBS 1X, 10 ml de PBS 1X contenant 2 M NaCl et enfin avec 10 ml de PBS 1X. Dès que la mesure de la densité optique à 280 nm est nulle, on élue les IgG avec une solution d'acide acétique (0.58%). Des fractions de 0.75 ml sont collectées et immédiatement neutralisées avec 82.5  $\mu\text{l}$  de Tris/base (1 M). Les fractions contenant les IgG sont alors mélangées et dialysées à  $4^{\circ}\text{C}$  contre 3 x 1L de PBS 1X. La concentration des IgG est estimée par densité optique à 280 nm ( $1.4 \text{ D.O.}_{280} = 1 \text{ mg/ml}$ ). Les anticorps sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence de 0.02%  $\text{NaN}_3$ .

**9. Immunobuvardage (Western Blot):** Les cellules INS(832/13) et les îlots de Langerhans cultivés dans des pétris de 60 mm de diamètre sont lavés avec du PBS, les cellules sont alors détachées des pétris puis centrifugées et enfin les protéines totales sont extraites en ajoutant aux culots de cellules ou des îlots 100  $\mu\text{l}$  d'un tampon de lyse contenant 100 mM Tris (pH 6.8), 2.5% SDS, 2.5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinine, 5  $\mu\text{M}$  leupeptine et 5  $\mu\text{M}$  pepstatine A. Les protéines totales des différents tissus de rats sont extraites en homogénéisant (Polytron) les tissus dans le même tampon de lyse ci-haut mentionné. 30  $\mu\text{g}$

d'extraits de protéines sont chargés sur un gel SDS-PAGE (10%) pour électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose. La protéine MCD est détectée à l'aide des anticorps générés chez le lapin dirigés sélectivement contre les parties N ou C terminales (4µg/ml d'IgG), ainsi qu'en utilisant un anticorps généré chez la chèvre contre les immunoglobulines de lapin, couplé à la peroxydase de raifort (dilution 1:10000). L'activité peroxydase est finalement révélée par chemiluminescence en utilisant un kit commercial (ECL).

**10. Mesure de l'activité enzymatique de la MCD :** L'activité enzymatique de la MCD est mesurée selon un protocole déjà publiée (Voilley et al., 1999). En résumé, les protéines totales sont récupérées après sonification (3 x 2 s) des cellules sur glace dans un tampon contenant 100 mM de Tris (pH 8.0), 2 mM de PMSF, 1 µg/ml d'aprotinine, 5 µM de leupeptine et 5 µM de pepstatine A. 50 µg de protéines du surnageant (1000 x g pendant 10 min) sont utilisés pour mesurer l'activité enzymatique de la MCD. Les extraits sont incubés pendant 10 min en présence de malonyl-CoA (0.5 mM). La réaction est arrêtée avec de l'acide perchlorique et les protéines sont précipitées par centrifugation. La transformation de l'acétyl-CoA, formé par la MCD contenue dans l'homogénat, en [<sup>14</sup>C]-citrate est obtenue grâce à un couplage de réactions enzymatiques décrit ci-dessous (Figure 15).



**Figure 15. Réactions enzymatiques couplées utilisées pour la mesure de l'activité enzymatique de la MCD.**

L' [<sup>14</sup>C]-acide aspartique est d'abord transformé en [<sup>14</sup>C]-oxaloacétate grâce à la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT). L' [<sup>14</sup>C]-oxaloacétate obtenu réagit avec l'acétyl-CoA pour former du [<sup>14</sup>C]-citrate grâce à la citrate synthase (CS). Finalement, l' [<sup>14</sup>C]-acide aspartique qui n'a pas réagi et le [<sup>14</sup>C]-citrate sont séparés en agitant pendant 30 min la solution dans une suspension 1 : 2 (p/v) de Dowex 50W-8X 9 (100-200 mesh) puis en centrifugeant les échantillons à 400 x g pendant 5min. Le [<sup>14</sup>C]-citrate contenu dans le surnageant est estimé avec un compteur à scintillation. L'activité de la MCD est quantifiée en utilisant une courbe standard d'acétyl-CoA. Les résultats sont exprimées en nmoles d'acétyl-CoA formés/min par mg de protéine.

**11. Productions des clones stables INSrtTA-3/MCDc :** Afin de produire un cDNA de la MCD sans préséquence de localisation mitochondriale et peroxysonale (MCDc), nous avons effectué une PCR à partir du cDNA de la MCD de rat contenu dans le vecteur pBK-CMV. Les oligos suivants ont été utilisés : 5'- GCTAGATCTATGGACGAGCTGCTA-3' (as) et 5'-TCCCTGTTT AAAGTAGTTGCTCTGGA-3' (s) et les conditions expérimentales étaient de 25 cycles et une température d'hybridation de 45°C. L'oligo antisens contient un site de restriction enzymatique pour Bgl II et l'oligo sens contient un site Pme I. Ainsi, on génère un cDNA MCDc contenant un site de restriction Bgl II en 5' et un site Pme I en 3'. Le cDNA de la MCDc a été inséré dans les sites Bgl II (NEB) et Pme I (NEB) du vecteur pADTR5-K7-GFPq (Massie et al., 1998) grâce à une digestion enzymatique selon le protocole du fournisseur et une ligation pendant 12 h à 16°C avec la T<sub>4</sub> DNA ligase (Gibco BRL). Le cDNA a été séquencé avec l'oligo 5'-GA CCGGTATGTGAACTCACTGTTA-3' par la technique des didésoxyribonucléotides de Sanger (Sequenase<sup>TM</sup> version 2.0 T7 DNA polymérase : USB Amersham&Pharmacia) afin de s'assurer de l'exactitude de la séquence. Le vecteur pADTR5-K7-GFPq/MCDc linéarisé avec l'enzyme Fse I (NEB) a été transfecté dans les cellules INSrtTA-3 (Wang et Iynedjian, 1997) par électroporation à onde carrée avec l'appareil BTX ECM 2001 (Genetronics, Inc.). Une cuvette de 0.4mm (BioRad) contenant 2x10<sup>6</sup> de cellules et 10µg de cDNA

dans un volume de 400  $\mu$ l a subi une impulsion de 180V pendant 50 ms. Les cellules ont été récupérées puis cultivées pour propagation dans du RPMI complet contenant 11 mM de glucose. La sélection des cellules qui expriment la protéine fluorescente verte (GFP) et probablement aussi la MCDc a été effectuée grâce à un appareil micromanipulateur de cellules Quixell<sup>TM</sup> (Caron et al., 2000). Les clones cellulaires ont été amplifiés dans du milieu RPMI complet contenant 11 mM de glucose et dont le sérum de bœuf ne contient pas de tétracycline (-tet) (Clonetech). Afin de confirmer l'expression de la MCDc dans les clones sélectionnés, la doxycycline a été ajoutée pendant 24 h au milieu de culture de chacun des clones et les protéines totales extraites ont été analysées par Western. Les clones (INSrTA-3/MCDc) ayant la meilleure expression ont été conservés pour des études ultérieures.

### ***12. Production d'adénovirus recombinants et infection des îlots de Langerhans :***

La production des adénovirus recombinants, l'infection des îlots de Langerhans ainsi que les mesures de sécrétion d'insuline dans ceux-ci ont été réalisés par le groupe de C. J. Rhodes (Seattle, WA) en collaboration avec notre groupe. L'adénovirus codant pour la MCDn a été produit en utilisant la séquence complète de l'ADNc de la MCD contenue dans le vecteur pBK-CMV, tandis que l'adénovirus codant pour la MCDc a été préparé en utilisant la MCDc dont la préparation est décrite au paragraphe précédent.

***13. Expériences de sécrétion d'insuline :*** Les cellules INSr3-MCDc sont incubées dans du RPMI complet (-tet) pendant 48 h en présence ou en absence de 1  $\mu$ g/ml de doxycycline. L'incubation initiale s'effectue en présence de 11 mM de glucose pour les 24 premières heures, tandis que l'incubation suivante s'effectue en présence de 3 mM de glucose. Le jour de l'expérience, les cellules lavées une fois dans du tampon Krebs Ringer bicarbonate (135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>) additionné de 10mM Hepes (pH 7.4), 0.07% BSA (RIA Grade; Sigma) (KRBH) et 3 mM de glucose sont préincubées pendant 30 min dans le même milieu KRBH. Après 5 min, un

échantillon de 0.5 ml est prélevé pour la mesure d'insuline contaminante. Les cellules sont ensuite incubées pour une heure additionnelle. On récupère un échantillon de 0.5 ml qui sert à mesurer la sécrétion de base d'insuline à 3 mM de glucose. La concentration de glucose est ensuite ajustée à 20 mM en ajoutant 0.2 ml de KRBH contenant 105 mM de glucose et les cellules sont incubées pour une heure additionnelle. Un échantillon de 0.8 ml est alors récupéré pour la mesure de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose élevé (20 mM). Le milieu est aspiré et 1ml d'eau distillée est ajouté aux cellules attachées afin de lyser les cellules et mesurer l'insuline totale intracellulaire. Les cellules détachées à l'aide d'un gratteur (rubber policeman) sont soniquées deux fois pendant 5 s. Les échantillons prélevés sont centrifugés à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C et 85% du surnageant est récupéré pour les mesures d'insuline.

**14. Dosage de l'insuline par essai radioimmunologique :** Dans un premier temps, on ajoute dans chaque tube de polypropylène (12x75mm) 100 µl des échantillons (non dilués pour les échantillons correspondant aux incubations à 3 mM de glucose, tandis que les échantillons correspondants aux incubations à 20 mM de glucose et aux contenus totaux des cellules en insuline sont dilués 1/2 et 1/25, respectivement) et 100 µl d' $[^{125}\text{I}]$ -insuline (Linco Research). Une courbe standard variant entre 0 et 2 ng/ml d'insuline de rat (Linco Research) est préparée. À ces tubes sont ajoutés 100 µl d'anticorps de cochon d'Inde dirigé contre l'insuline du sérum de rat (Linco Research). Les tubes sont ensuite incubés 12 h à 4°C à l'abri de la lumière. Ensuite, on ajoute 800 µl de tampon phosphate contenant 3% de polyéthylène glycol (PEG), 200 µl de tampon phosphate contenant 1% de BSA (RIA Grade; Sigma), 100 µl de sérum de cochon d'Inde (Sigma) et 100 µl d'un anticorps de chèvre (Linco Research) dirigé contre les immunoglobulines de cochon d'Inde. Les échantillons sont incubés pendant 2 h à 4°C et centrifugés 15 min à 2500 rpm. Un tube contenant seulement 100 µl d' $[^{125}\text{I}]$ -insuline sert à mesurer la radioactivité totale et un tube contenant 100 µl d' $[^{125}\text{I}]$ -insuline, 800 µl de PEG, 200 µl de BSA, 100 µl de sérum de cochon d'Inde et 100 µl d'un anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de cochon d'Inde sert à

mesurer la liaison non-spécifique. La composition du tampon phosphate est la suivante : 25 mM EDTA, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.5), 0.01% de thimérosal (sensible à la lumière),.

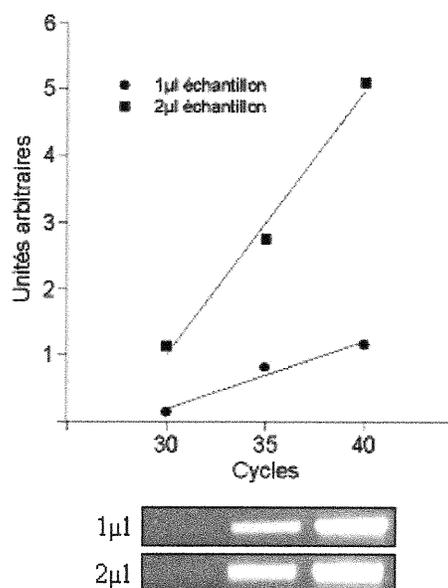
**15. Statistiques :** Les moyennes des résultats sont représentées  $\pm$  ESM. Les différences entre deux conditions sont évaluées selon le «Student's t-test» pour des échantillons comparables. Les différences sont jugées statistiquement significatives lorsque  $p$  est plus petit que 0.05.

### CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

#### 1. Étude *in vitro* de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de l'ARNm de la MCD.

L'effet du glucose sur la régulation du gène de la MCD a été étudié par RT-PCR dans la ligné cellulaire INS-832/13 et les îlots de Langerhans. Nous avons d'abord identifié les conditions de PCR. Ainsi nous avons déterminé la quantité de cDNA et le nombre de cycle à utiliser. Nous avons observé que la PCR est linéaire de 30 à 40 cycles en utilisant 1 ou 2 $\mu$ l de cDNA synthétisé à partir de 5 $\mu$ g d'ARN total (Fig. 16). De ce fait, nous avons utilisé pour les expériences subséquentes 1 $\mu$ l de cDNA et réalisé 35 cycles. On observe dans les cellules INS-832/13, après 48 h d'incubation à 20 mM de glucose, une légère diminution non significative du niveau d'ARNm de la MCD normalisé par rapport à l'ARNm de l'actine (Fig. 17A). Les îlots de Langerhans isolés à partir de rats Wistar ont été incubés pendant 48 h à 3 ou 20 mM glucose. Le rapport ARNm MCD/Actine à ces différentes concentrations de glucose est le même (Fig. 17B).

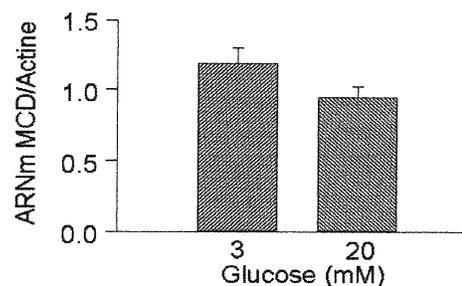
**Figure 16. Exemple de linéarité d'amplification de l'ARNm de la MCD lors d'une RT-PCR semi-quantitative.** Une PCR de 30 à 40 cycles a été réalisée à partir de 1 ou 2 $\mu$ l de cDNA, obtenus à partir de la transcription inverse de 5  $\mu$ g d'ARN total des cellules INS-832/13, et des oligonucléotides permettant l'amplification du cDNA de la MCD (voir la section Matériels et Méthodes).



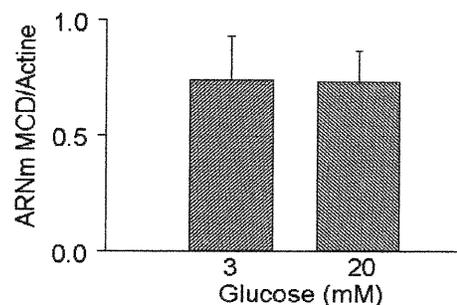
**Figure 17. Étude de l'action du glucose sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans la cellule pancréatique  $\beta$ .**

Les cellules INS-832/13 (A) ou les îlots de Langerhans (B) isolés à partir de rats Wistar normaux ont été pré-incubés pendant 24 h à 3 mM de glucose et ensuite incubés pendant 48 h à 3 ou 20 mM de glucose. Les moyennes  $\pm$  ESM de 4 expériences indépendantes sont représentées.

**A INS832/13**



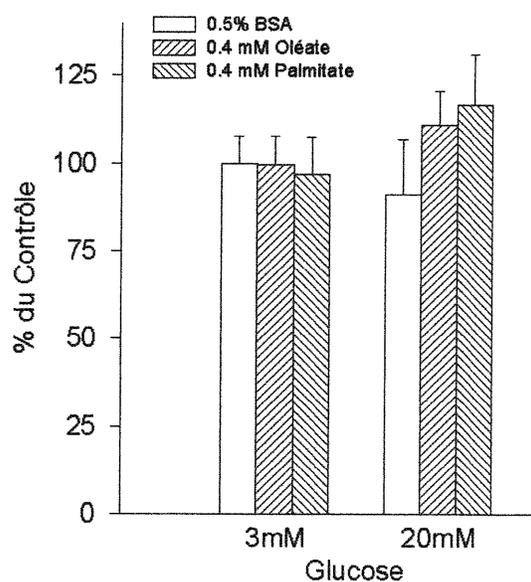
**B Îlots de Langerhans**



Afin de déterminer si les acides gras influencent l'expression de l'ARNm de la MCD, les cellules INS-832/13 ont été incubées pendant 48 h à basse ou haute concentration de glucose en présence ou en absence de 0.4 mM de palmitate ou d'oléate. La Figure 18 montre que les acides gras ne changent pas les niveaux d'ARNm de la MCD soit à bas ou haut glucose.

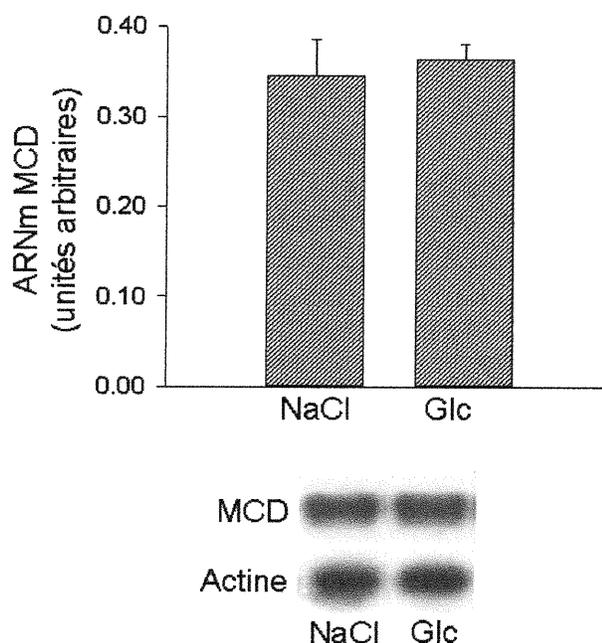
**Figure 18. Étude de l'action de l'oléate et du palmitate sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les cellules  $\beta$ (INS).**

Les cellules INS-832/13 ont été pré-incubées pendant 24 h à 3 mM glucose et par la suite incubées pendant 48 h à 3 ou 20 mM glucose en absence ou en présence de 0.4 mM d'acides gras liés à 0.5% BSA. L'expression de l'ARNm de la MCD a été analysé par RT-PCR à partir de l'ARN total des cellules. Les moyennes  $\pm$  ESM de 3 expériences indépendantes sont représentées.



## 2. Étude *in vivo* de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de l'ARNm de la MCD.

Un modèle de rats hyperglycémiques peut être obtenu grâce à l'infusion d'une solution de glucose concentrée via un cathéter implanté dans la veine jugulaire droite (Magnan et al., 1999). La glycémie peut être maintenue dans ces conditions à environ 20 mM pendant une période de 48 h. L'ARN des îlots de Langerhans isolés à partir de ces rats et ceux des rats contrôles ayant subi le même traitement mais avec une solution saline (NaCl) a été analysé par RT-PCR. On observe que le rapport de l'ARNm MCD/Actine ne diffère pas entre les rats hyperglycémiques et les rats contrôles (Fig. 19).

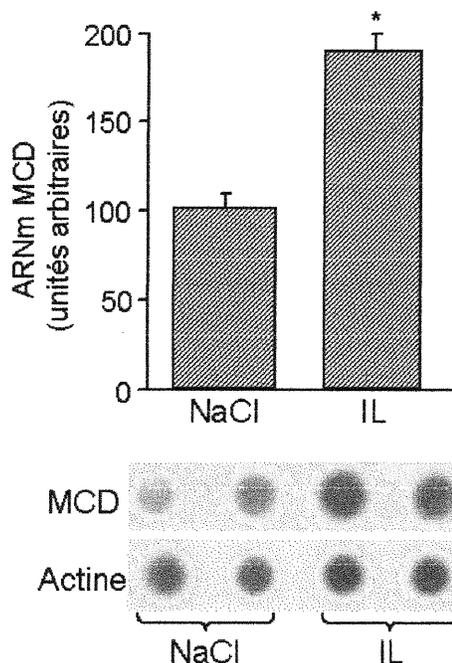


**Figure 19. Étude de l'action du glucose *in vivo* sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les îlots de Langerhans.**

Des rats normaux ont été infusés pendant une période de 48 h soit avec une solution saline (NaCl) ou une solution concentrée de glucose (Glc) via un cathéter implanté dans la veine jugulaire droite. La glycémie s'élève à environ 20 mM dans les rats infusés avec du glucose. Les moyennes  $\pm$  ESM de 6 (NaCl) et 6 (Glc) rats sont représentées.

Chez le rat ZDF, une augmentation des acides gras libres et des TG circulants précède l'apparition du diabète (Unger, 1997). De plus, les acides gras diminuent l'expression de l'ACC et augmentent celle de la CPT-1 dans la cellule pancréatique  $\beta$  (Brun et al., 1997; Assimakopoulos-Jeannet et al., 1997). Une étude récente a rapporté que les acides gras augmentent la transcription du gène MCD dans le cœur et le muscle squelettique (Young et al., 2001). Nous avons donc souhaité évaluer les effets des acides gras sur la régulation du gène de la MCD dans la cellule  $\beta$ -pancréatique. Nous avons étudié par RT-PCR l'expression de l'ARNm de la MCD chez des rats hyperlipidémiques. Des rats normaux infusés pendant 48 h avec une émulsion de triglycérides (Intralipid, Kabivitrum; Stockholm, Suède) démontrent une augmentation de 1.5 fois et 2.5 fois des niveaux circulants de triglycérides et d'acides gras libres, respectivement (Magnan et al., 1999). La sécrétion d'insuline en réponse au glucose paradoxalement augmente dans les rats hyperlipidémiques par rapport aux rats contrôles infusés avec une solution saline (Magnan et al., 1999). Ceci reflète probablement la nécessité de compenser la résistance à l'insuline induite par l'hyperlipidémie. Nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de la MCD dans les îlots de ces rats hyperlipidémiques et l'on constate qu'elle double par rapport aux rats contrôles (Fig. 20).

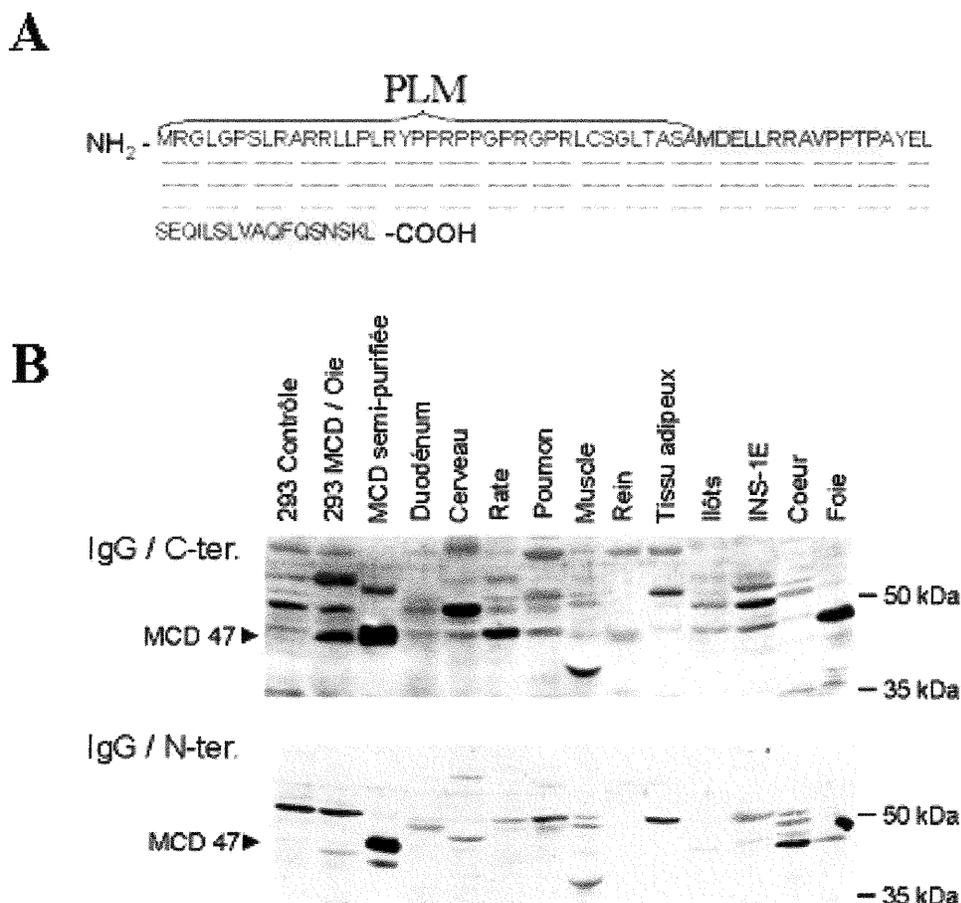
**Figure 20. Effet d'une infusion d'intralipides dans des rats sur l'expression de l'ARNm de la MCD dans les îlots de Langerhans.** Les rats contrôles ont été infusés avec une solution saline (NaCl), tandis que les rats hyperlipidémiques ont été infusés pendant 48 h avec une émulsion de TG (intralipides) (IL) via un cathéter implanté dans la veine jugulaire droite. Les niveaux de TG et d'acides gras libres augmentent de 1.5 et 2.5 fois, respectivement (Magnan et al., 1999). Une RT-PCR suivie d'un Dot Blot avec un oligo interne a été effectué. \*,  $p < 0.05$  par rapport au contrôle NaCl. Les moyennes  $\pm$  ESM de 4 (NaCl) et 7 (IL) rats sont représentées.



### **3. Étude *in vitro* de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'expression de la protéine MCD.**

Afin de savoir si le glucose influence l'expression de la protéine MCD, nous avons généré des anticorps chez le lapin dirigés sélectivement contre les parties N- et C-terminale de la protéine MCD (Fig. 21A). La figure 21B montre la distribution tissulaire de la protéine MCD examinée par immunobuvardage. On remarque avec l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale (Fig. 21B, panneau du haut), une bande majeure de 47 kDa dans la plupart des tissus. Des cellules 293 infectées avec un adénovirus contenant la MCD de l'oie (Antinozzi et al., 1998) nous ont servi de contrôle. On note que le foie et la rate expriment fortement la protéine MCD d'un poids moléculaire de 47 kDa. Le muscle montre une bande majeure à 38 kDa dont on ne sait pas pour l'instant si elle correspond à une isoforme de la MCD, un produit de dégradation de la MCD ou une autre protéine. Les îlots de Langerhans et la lignée cellulaire INS-832/13 de mêmes que d'autres tissus expriment une bande supplémentaire à 50 kDa. Un autre groupe a aussi constaté comme nous la présence de bandes à 47, 50 et 52 kDa en utilisant un autre anticorps anti-MCD (Dyck et al., 2000). Quant au cerveau, il montre une bande majeure de 50 kDa. Pour rappel, la MCD contient des séquences de localisation mitochondriales et peroxysonales (Voilley et al., 1999), et est régulée par un processus de phosphorylation et contient deux sites potentiels d'initiation de la traduction (Kolattukudy et al., 1987). Cette complexité pourrait expliquer la différence des résultats dans les différents tissus. Nous reparlerons de ceci dans la discussion. L'incubation de la membrane avec l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine révèle aussi des bandes dans les différents tissus. Le cœur exprime fortement une protéine de 47kDa comparativement aux autres tissus (Fig. 21B, panneau du bas). L'anticorps N-terminal ne dévoile pas la protéine MCD de l'oie. On remarque aussi que les intensités des bandes allant de 47 à 52

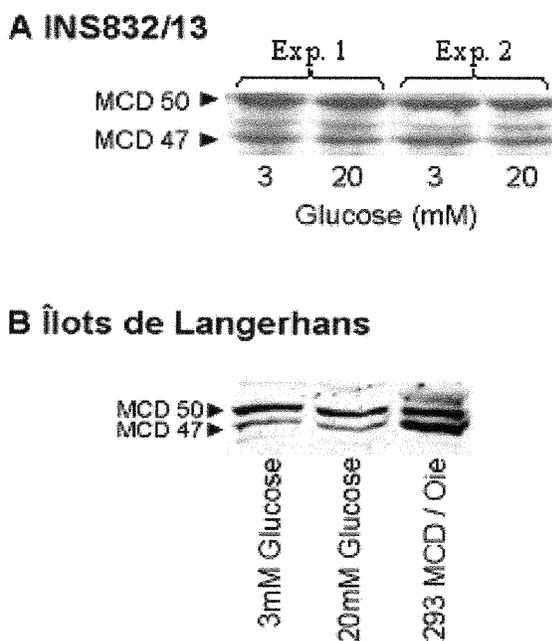
KDa révélées par les anticorps C- et N-terminal sont variables dans les différents tissus.



**Figure 21. Distribution tissulaire de la protéine MCD de rat.**

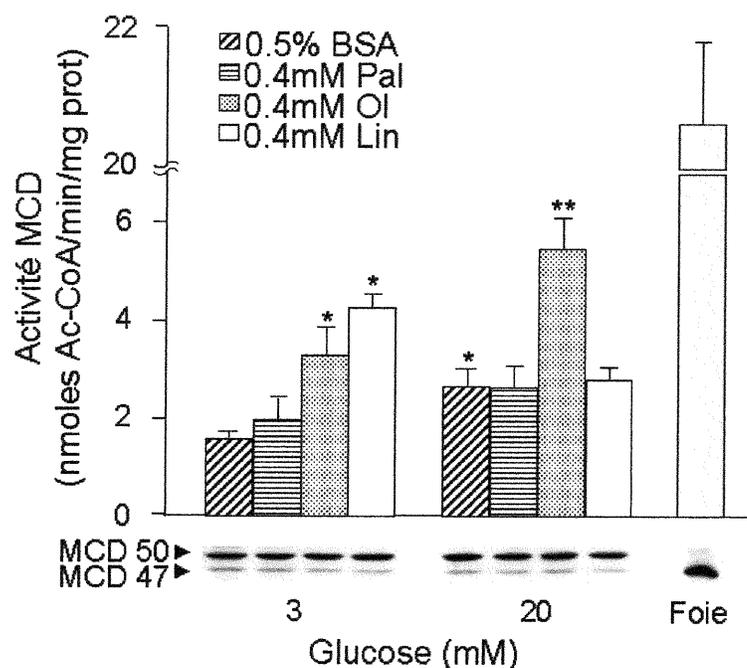
Les séquences des peptides synthétiques utilisées afin de produire des anticorps dirigés sélectivement contre les parties C-terminale ou N-terminale de la protéine MCD sont indiquées en ombragé (A). 50 µg de protéines totales isolées à partir des tissus d'un rat Wistar ont été analysées par Western (B). Des cellules 293 infectées avec un adénovirus recombinant produisant la MCD de l'oie dépourvue de sa séquence de localisation mitochondriale (293 MCD/Oie) et de la MCD hépatique semi-purifiée ont servi de contrôles positifs. Les membranes ont été incubées avec des immunoglobulines G (IgG) de lapin purifiées dirigées sélectivement contre la partie C-terminale (panneau du haut) ou N-terminale (panneau du bas) de la MCD et par la suite avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort. PLM, préséquence de localisation mitochondriale; C-ter., carboxy-terminale; N-ter., amino-terminale; MCD 47, MCD de 47KDa.

L'anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la protéine a été utilisé afin d'étudier l'effet *in vitro* du glucose sur la régulation de l'expression de la protéine MCD. Les cellules INS-832/13 (Fig. 22A) et les îlots de Langerhans de rats Wistar (Fig. 22B) montrent deux bandes majeures de 47 kDa et 50 kDa par immunobuvardage. L'exposition des cellules pendant 48 h à 20 mM de glucose n'influencent pas le niveau de la protéine MCD comparativement à la situation contrôle (glucose 3 mM). Nous avons aussi cherché à savoir si les acides gras influencent l'expression de la protéine MCD dans les cellules INS-832/13. Les résultats montrés au bas de la Figure 23 indiquent que le palmitate, l'oléate et le linoléate ne changent pas l'expression de la protéine MCD quelque soit la concentration de glucose.



**Figure 22. Étude de l'action du glucose sur l'expression de la protéine MCD dans la cellule pancréatique  $\beta$ .**

Des cellules INS-832/13 (A) ou des îlots de Langerhans (B) isolés à partir de rats Wistar normaux ont été pré-incubés pendant 24 h à 3 mM glucose et ensuite incubés pendant 48 h à 3 ou 20 mM glucose. L'immunobuvardage a été réalisé avec l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la MCD. Des cellules 293 infectées avec un adénovirus recombinants permettant l'expression de la MCD d'oie ont servi comme contrôle positif (B).



**Figure 23. Effet à long terme du glucose et de divers acides gras sur l'expression de la protéine et l'activité enzymatique de la MCD dans les cellules INS-832/13.**

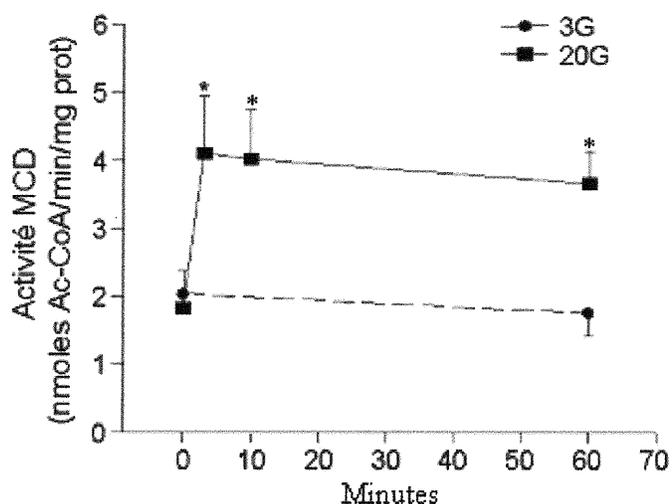
Les cellules INS-832/13 ont été incubées pendant 48 h à 3 ou 20 mM de glucose en présence ou en absence de 0.4 mM d'acides gras liés à 0.5% BSA. Les protéines extraites ont servi à des analyses par Western ou à une étude d'activité enzymatique. Les protéines du foie servent de contrôle positif. Les activités enzymatiques représentent les moyennes de 3 expériences  $\pm$  ESM. \*,  $p < 0.01$  par rapport au contrôle (glucose 3 mM, 0.5% BSA) ; \*\*,  $p < 0.001$  par rapport au contrôle (glucose 20 mM, 0.5% BSA). Ol, oléate ; Pal, palmitate ; Lin, linoléate.

#### 4. Étude *in vitro* de l'action à long terme du glucose et des acides gras sur l'activité enzymatique de la MCD.

Étant donné que le glucose n'a pas d'effet sur les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine MCD dans la lignée cellulaire INS-832/13, nous avons examiné l'effet à long terme du glucose sur l'activité enzymatique de la MCD. Après 24 h d'incubation à 3 mM de glucose, on observe une légère augmentation de l'activité enzymatique dans les cellules INS-832/13 lorsqu'on élève la

concentration de 3 à 20 mM de glucose pendant 48 h (Fig. 23). L'oléate, un acide gras monoinsaturé (C18: 1,  $\omega$ 9), et le linoléate, un acide gras polyinsaturé (C18: 2,  $\omega$ 6), augmentent l'activité enzymatique de la MCD par un facteur de 2-3 environ à bas glucose, alors que le palmitate, un acide gras saturé (C16:0), est sans effet. À haut glucose, seul l'oléate stimule l'activité enzymatique de la MCD (Fig. 23). Toutefois, peu importe le traitement que les cellules reçoivent, le niveau de la protéine ne change pas. Le foie, notre contrôle, démontre une grande quantité de protéines et d'activité enzymatique.

##### 5. Effet *in vitro* à court terme du glucose et de l'oléate sur l'activité enzymatique de la MCD.

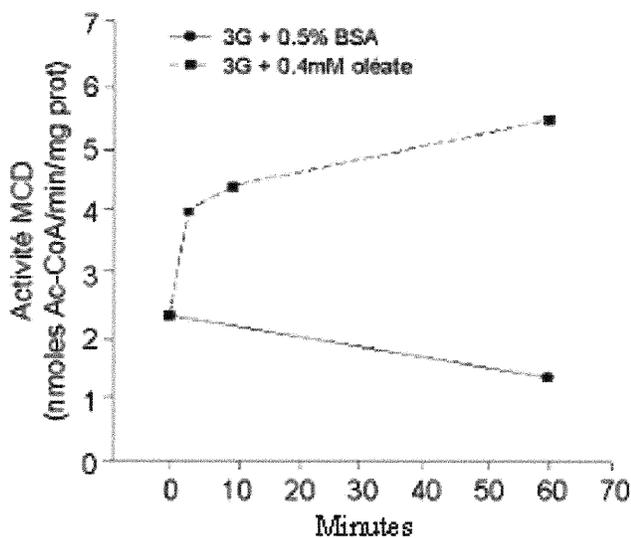


**Figure 24. Étude de la dépendance en fonction du temps de l'action du glucose sur l'activité enzymatique de la MCD.**

L'activité enzymatique de la MCD a été mesurée après différents temps d'incubation des cellules INS-832/13 en présence de 3 ou 20 mM glucose. On observe une augmentation rapide suivie d'une stabilisation de l'activité enzymatique de la MCD à un niveau lorsque les cellules sont incubées en présence de 20 mM de glucose. Les activités enzymatiques représentent les moyennes de 3 expériences  $\pm$  ESM. \*,  $p < 0.03$  par rapport au contrôle (0 min à 20 mM glucose).

Nous avons évalué les effets à court terme du glucose et de l'oléate sur l'activité enzymatique de la MCD. L'activité basale à 3 mM de glucose demeure constante

pendant 60 min (Fig. 24). Cependant, l'activité enzymatique des cellules INS-832/13 incubées à 20 mM de glucose augmente rapidement après 3 min et se maintient à un niveau élevé par la suite. Pour l'oléate, nous avons observé un effet à basse concentration de glucose (Fig. 25). L'activité enzymatique basale demeure constante pendant 60 min. Par contre, l'ajout de 0.4 mM d'oléate augmente l'activité de la MCD rapidement dans les trois premières minutes et progresse graduellement par la suite.

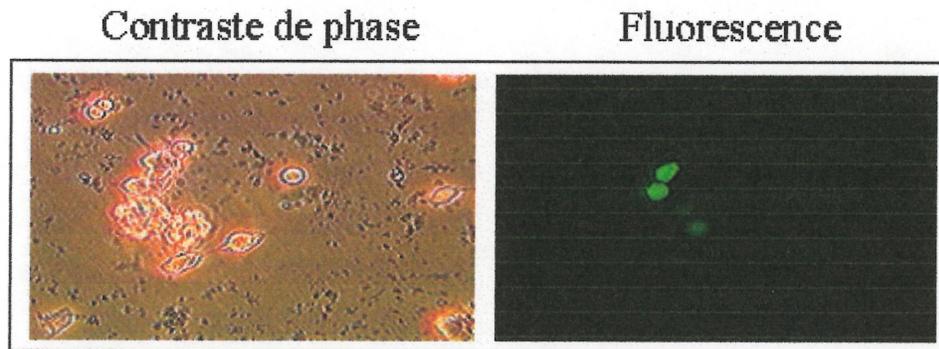


**Figure 25. Étude de la dépendance en fonction du temps de l'action de l'oléate sur l'activité enzymatique de la MCD.**

L'activité enzymatique de la MCD a été mesurée après différents temps d'incubation des cellules INS-832/13 à 3 mM de glucose en absence ou en présence de 0.4 mM d'oléate lié à 0.5% BSA. On observe une augmentation rapide de l'activité enzymatique de la MCD lorsque les cellules sont incubées en présence d'oléate. Les activités enzymatiques représentent les moyennes de 2 expériences séparées par rapport au contrôle (0 min à 3 mM glucose + 0.4 mM Oléate).

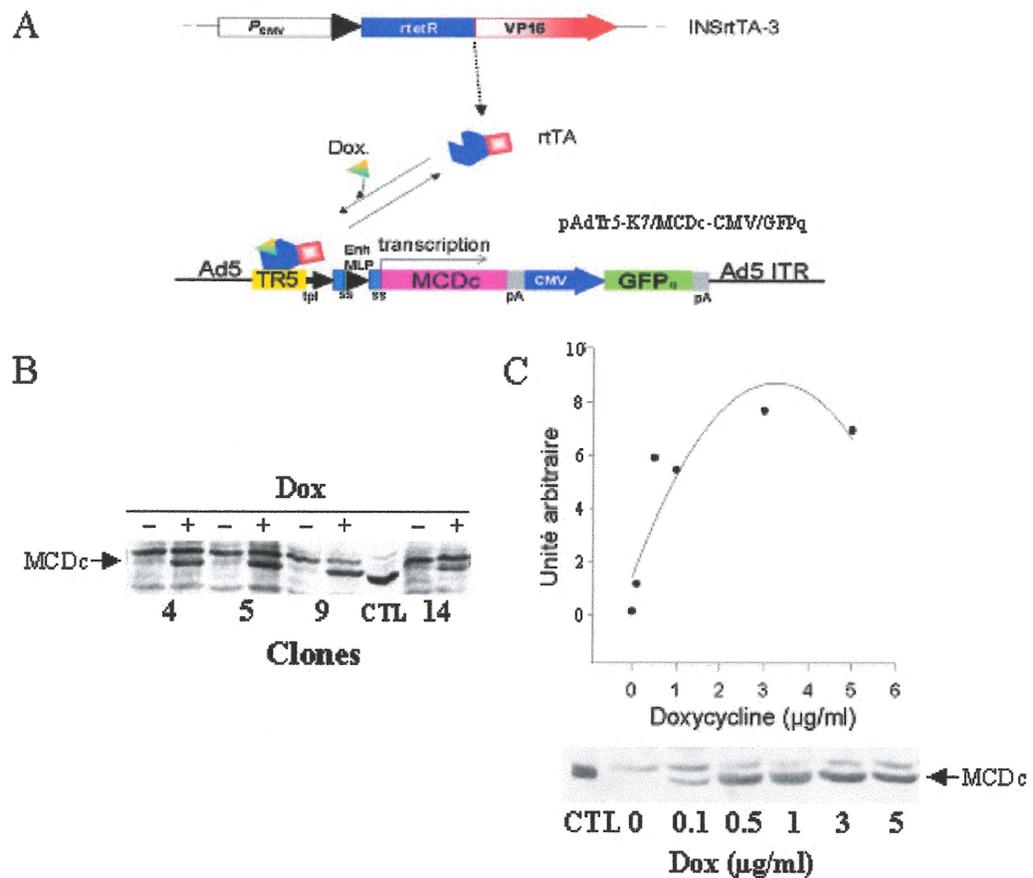
## 6. Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline.

L'interaction entre le malonyl-CoA et la CPT-1 semble être importante dans la cellule  $\beta$  (Prentki et Corkey, 1996). Afin d'évaluer l'importance de cette interaction dans le contrôle de la sécrétion d'insuline, nous avons établi une lignée cellulaire pouvant surexprimer la MCD localisée dans le cytoplasme (MCDc). Pour ce faire, la lignée cellulaire INSrtTA-3 (Wang et Iynedjian, 1997) exprimant constitutivement la protéine transactivatrice inversée dépendante de la tétracycline (rtTA) a été transfectée avec le vecteur codant pour la protéine MCDc (pADTR5-K7/MCDc-CMV/GFPq) dépourvue des séquences de localisation mitochondriale et peroxysomale. Les clones sélectionnés et amplifiés expriment la GFP par fluorescence et aussi très probablement la MCDc (Fig. 26). La liaison de la



**Figure 26. Transfection de la construction codant pour la MCD cytosolique dans les cellules INSrtTA-3 et expression de la GFP.** Visualisation par microscopie à contraste de phase et à fluorescence des cellules transfectées afin d'identifier, d'isoler et cloner les cellules qui expriment la GFP et probablement aussi la MCD cytosolique.

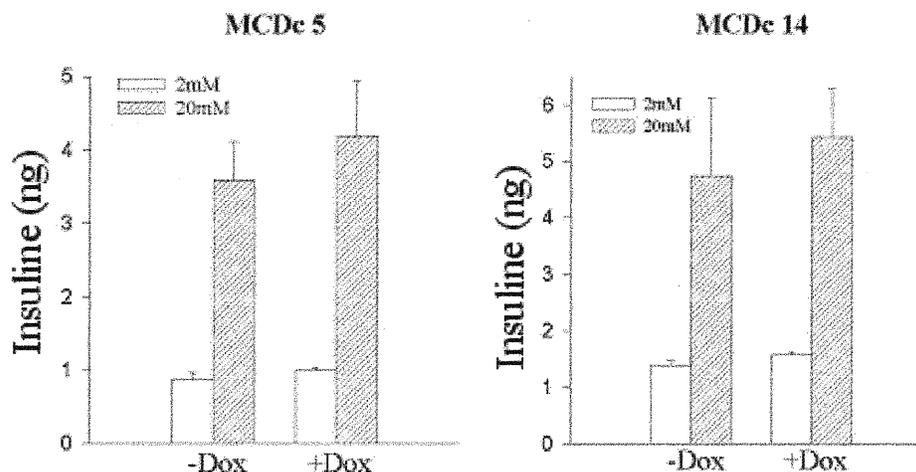
doxycycline à la protéine rtTA permet la surexpression de la MCDc grâce à l'interaction de la protéine rtTA avec son élément de réponse (Fig. 27A). Plusieurs clones ont été testés et nous avons identifié 4 clones qui surexpriment efficacement la protéine MCDc (Fig. 27B). L'expression de la MCDc augmente de 20 fois environ dans le clone 5 proportionnellement à la dose de doxycycline présente dans le milieu de culture (Fig. 27C). L'effet de la surexpression de la



**Figure 27. Surexpression de la MCD cytosolique dans les cellules INSrtTA-3 grâce à un système régulé par la tétracycline.**

Le cDNA codant pour la MCD cytosolique (MCDc) est sous le contrôle du promoteur régulé par la tétracycline. L'ajout de la doxycycline (Dox), un analogue de la tétracycline, permet la liaison du facteur de transcription rtTA à son élément de réponse et la transcription du gène de la MCDc (A). Un Western blot nous a permis d'identifier 4 clones positifs; INSrtTA-3/MCDc 4, 5, 9 et 14. L'induction de la MCDc a été effectuée avec 1 µg/ml de Dox. Un lysat de protéines totales purifié à partir de cellules 293 infectées avec un adénovirus codant pour la protéine MCDc sert de contrôle (CTL) (B). Le clone INSrtTA-3/MCDc5 exprime la protéine MCDc de façon doxycycline-dépendante et maximale en présence de 1 µg/ml de Dox comme révélé par immunobuvardage (C). PCMV et CMV, promoteur du cytomégalovirus; rtetR, tétracycline répressive inversée; VP16, domaine activateur de la protéine VP16 du virus de l'herpès simplex; rtTA, protéine transactivatrice inversée dépendante de la tétracycline; Ad5 et Ad5 ITR, séquences de recombinaison homologue pour produire un adénovirus recombinant; TR5, promoteur dépendant de la tétracycline; tpl, «tripartite leader sequence»; Enh MLP, séquence enhancer du «major late promoter»; ss, site pour l'épissage alternatif; pA, signal de polyadénylation; GFPQ, mutant de la protéine fluorescente verte.

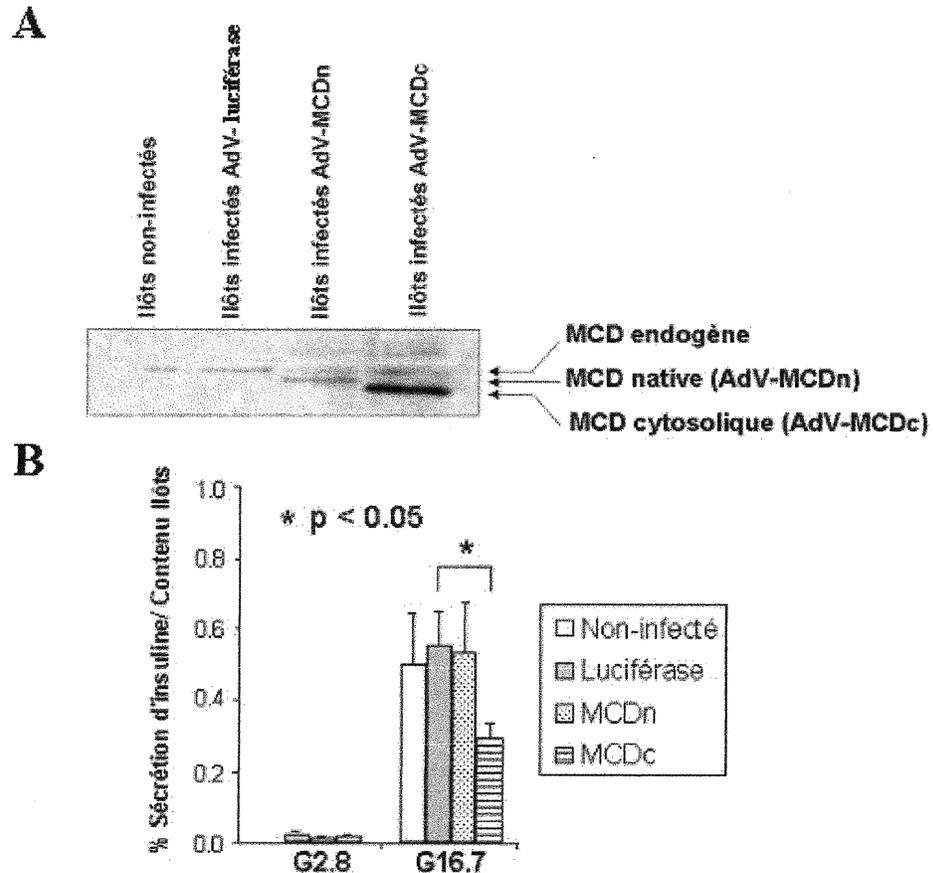
MCDc sur la sécrétion d'insuline a été étudié dans les clones 5 et 14. On observe que la surexpression de la MCDc lors de l'ajout de 1  $\mu\text{g/ml}$  de doxycycline n'a pas d'effet sur la sécrétion d'insuline basale (2 mM) et la sécrétion d'insuline induite par le glucose (20 mM) dans ces deux clones (Fig. 28). Ces résultats concordent avec ceux observés par Antinozzi et al. (1998) ainsi que par Mudler et al. (2000).



**Figure 28. Sécrétion d'insuline dans les clones qui surexpriment la MCD.** Les clones MCDc5 et MCDc14 ont été préincubés pendant 48 heures en présence ou en absence de 1  $\mu\text{g/ml}$  doxycycline (Dox) dont les 24 premières heures en présence de 11 mM glucose et les 24 heures suivantes en présence de 3 mM de glucose. Par la suite, la sécrétion d'insuline a été mesurée après une heure d'incubation à 2 ou 20 mM de glucose. Les moyennes de 2 expériences (en triplicata)  $\pm$  ESM sont représentées.

Ceux-ci n'ont observé aucun changement de la sécrétion d'insuline dans les lignées cellulaires INS-1 et INS-832/13 lors de la surexpression de la MCDc consécutive à l'infection avec un adénovirus recombinant. Par contre, des résultats obtenus avec nos constructions par un de nos collaborateurs (C.J. Rhodes) démontrent que la surexpression de la protéine MCDc (Fig. 29A), dépourvue de ses séquences de localisation mitochondriale et peroxysomale, diminue significativement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose lors de l'infection des îlots de Langerhans avec un adénovirus (Fig. 29B). En revanche, la surexpression de la protéine MCD de type sauvage (MCDn) (Fig. 29A) dans les îlots de Langerhans n'altère pas la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Fig.

29B). De plus, l'infection des îlots avec un adénovirus codant pour la luciférase (contrôle) ne change pas la stimulation de la sécrétion d'insuline par rapport aux cellules non-infectées.



**Figure 29. Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline dans les îlots de Langerhans (A).**

Des adénovirus codant soit pour la MCDc ou la MCDn ont servi pour infecter les îlots de Langerhans. Les protéines MCDc et MCDn présentent des masses moléculaires différentes de la MCD endogène. L'infection des îlots avec différents adénovirus ne change pas la sécrétion d'insuline basale, c'est-à-dire à 2.8 mM de glucose (G2.8), par contre la surexpression de la MCDc diminue la sécrétion d'insuline induite par 16.7 mM de glucose (G16.7). Un adénovirus codant pour la luciférase sert de contrôle. AdV, adénovirus; GFP, protéine fluorescente verte; MCDn, MCD de type sauvage; MCDc, MCD cytosolique. Les moyennes de 6 expériences  $\pm$  ESM sont représentées. (Résultats obtenus en collaboration avec le groupe de C. J. Rhodes).

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Le rôle du malonyl-CoA dans le métabolisme suscite de plus en plus d'intérêt. Notons son implication comme signal énergétique dans divers tissus, dans le contrôle de l'appétit et dans les maladies telles le cancer, l'ischémie cardiaque, le diabète et l'obésité (Dyck et al., 1998; Ruderman et al., 1999; Corkey et al., 2000; Dyck et al., 2000; McGarry, 2000; Pizer et al., 2000).

Le diabète adipogénique implique des changements au niveau du métabolisme du glucose et des lipides (Prentki et Corkey, 1996). Ce déséquilibre semble entraîner une hyperinsulinémie initiale afin de compenser la résistance à l'insuline des tissus périphériques, suivie d'une phase de décompensation accompagnée d'un phénomène de glucolipotoxicité provoquant un défaut de sécrétion d'insuline par la cellule pancréatique  $\beta$  (Kahn et al., 1996). Le glucose et les acides gras chroniquement élevés altèrent la fonction de la cellule  $\beta$ . En effet, le glucose augmente l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse, l'anaplerose et la lipogénèse (Roche et al., 1998). Les acides gras modifient aussi l'expression de certains gènes et s'accumulent dans le pancréas sous forme de TGs. L'accumulation des TGs pourrait provoquer une lipotoxicité détruisant la cellule  $\beta$  par apoptose selon les observations faites chez le rat ZDF (Unger, 1997). Afin de mieux comprendre d'une part la toxicité du glucose et des lipides sur la cellule  $\beta$ , et d'autre part le rôle du malonyl-CoA et de la MCD dans le contrôle de la sécrétion d'insuline, nous avons étudié l'action du glucose et des acides gras sur la régulation du gène de la MCD au niveau de son ARNm, sa protéine et son activité enzymatique.

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose implique des voies de transductions de signaux dans la cellule pancréatique  $\beta$  qui ne sont pas encore clairement définies. La voie traditionnelle, dépendante de l'ATP et du  $\text{Ca}^{2+}$ , nécessaire à la sécrétion d'insuline n'est pas suffisante tel que démontré par le groupe de Gembal

et al. à l'aide d'agents pharmacologiques (Gembal et al., 1992). Notre hypothèse suggère une voie dite anaplérotique agissant en synergie avec la voie dépendante de l'ATP et du  $Ca^{2+}$  (Prentki et Corkey, 1996). Elle inclut le malonyl-CoA et les LC-CoA cytosoliques. Le malonyl-CoA et les LC-CoA pourraient jouer un rôle de facteurs de couplage métabolique régulateur et effecteur, respectivement, dans le contrôle de la sécrétion. Une interaction importante est celle entre le malonyl-CoA et la CPT-1, l'enzyme catalysant l'étape limitante de la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras. Suite à la stimulation des cellules  $\beta$  par le glucose, une augmentation de la concentration du malonyl-CoA inhibe la CPT-1 ainsi que l'oxydation des acides gras (Roche et al., 1998). Par conséquent, on observe une élévation du niveau des LC-CoA dans le cytoplasme, ceux-ci stimulant la sécrétion d'insuline directement ou indirectement (Prentki et Corkey, 1996). Afin de valider cette hypothèse, nous avons établi une lignée cellulaire stable pouvant surexprimer la MCDc, l'enzyme utilisant le malonyl-CoA comme substrat pour le dégrader.

### ***1. Effet à long terme du glucose sur la régulation du gène et de l'activité enzymatique de la MCD***

Une augmentation chronique de la glycémie entraîne une hypertrophie et une hyperplasie de la cellule  $\beta$  ainsi qu'une augmentation de la synthèse de proinsuline de même qu'une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Jonas et al., 1999; Roche et al., 2000). Les mécanismes impliqués dans l'adaptation de la cellule  $\beta$  à l'hyperglycémie sont peu connus. Le glucose est métabolisé afin de permettre la sécrétion d'insuline. Il a été démontré que les gènes codant pour la GK, GLUT2, la PFK, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et la pyruvate kinase sont induits par le glucose dans les cellules  $\beta$ (INS) (Roche et al., 1997). De plus, le glucose augmente l'expression d'enzymes impliquées dans l'anaplérose et la lipogénèse, tels l'enzyme malique (ME), l'ACC et la FAS (Roche et al., 1998). Toutes ces enzymes, sauf la GK et la ME, sont régulées au niveau transcriptionnel dans la cellule  $\beta$ . Plusieurs facteurs de transcriptions

connus modulent l'expression de ces gènes en réponse au glucose; soit Sp1, «upstream stimulatory factor/major late transcription factor» (USF/MLTF), PDX-1 et «chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII) (Girard et al., 1997; Vaulont et al., 2000). USF se lie à une séquence palindromique 5'-CACGTG-3' (E-Box) tandis que Sp1 se lie à la séquence 5'-GGGCGGG-3' contenue dans un élément de réponse au glucose (GRE) du gène de l'ACC (Girard et al., 1997). COUP-TFII se lie aussi au E-box mais il inhibe l'action de USF (Vaulont et al., 2000). Le glucose inhibe l'expression de certains gènes. Jusqu'à présent, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et PPAR $\alpha$  sont deux protéines dont l'expression est inhibées par le glucose au niveau transcriptionnel (Cournarie et al., 1999; Roduit et al., 2000). Un fait intéressant, PPAR $\alpha$  est un facteur de transcription régulant l'expression de la UCP-2 et de l'acyl-CoA oxydase (ACO) impliquées dans l'oxydation peroxysomale des acides gras et la détoxification lipidique (Roduit et al., 2000). Ainsi les effets importants du glucose sur le métabolisme lipidique suscitent l'intérêt d'étudier la régulation du gène de la MCD dans la cellule pancréatique  $\beta$ .

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression du gène de la MCD au niveau transcriptionnel par RT-PCR. Afin d'être dans les bonnes conditions expérimentales, nous avons étudié les conditions pour la PCR, telles que la quantité de cDNA et le nombre de cycle. On observe que la PCR pour amplifier le cDNA de la MCD est linéaire de 30 à 40 cycles en utilisant 1 ou 2  $\mu$ l de cDNA synthétisé à partir de 5  $\mu$ g d'ARN total (Fig. 16). De ce fait, nous avons utilisé pour les expériences subséquentes 1  $\mu$ l de cDNA et réalisé 35 cycles. L'étude primaire s'est effectuée dans la lignée cellulaire INS-832/13 (Hohmeier et al., 2000). Ces cellules purifiées de la lignée cellulaire INS-1 démontrent des traits semblables à ceux de la cellule pancréatique  $\beta$  normale. C'est-à-dire une forte stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose ainsi qu'une implication élevée de la voie indépendante de l'ATP et du Ca<sup>2+</sup>. Après une incubation de 48 h à 3 ou 20 mM de glucose, l'ARN total des cellules INS-832/13 a été purifié et analysé par RT-PCR. Le glucose élevé n'a pas changé l'expression

de l'ARNm de la MCD dans les cellules INS-832/13 (Fig. 17A). Des résultats semblables ont été obtenus avec des îlots de Langerhans mis en culture (Fig. 17 B). Afin de valider les résultats obtenus *in vitro*, nous avons étudié l'expression de la MCD par le glucose *in vivo*. Des rats hyperglycémiques produits grâce à l'injection d'une solution de glucose par la veine jugulaire droite nous ont servi de modèle (Magnan et al., 1999). La glycémie de ces rats augmente à environ 20 mM. L'abondance de l'ARNm de la MCD était la même que soit la concentration plasmatique de glucose (Fig. 19). L'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que le glucose ne régule pas la MCD au niveau de la transcription dans la cellule  $\beta$ -pancréatique.

Certains gènes sont régulés au niveau de la traduction. Ainsi leur niveau de protéines peut varier dans différentes situations sans toutefois que le niveau de leur ARN correspondant ne change. Par exemple, les niveaux de lipoprotéine lipase (LPL) augmentent dans l'hyperthyroïdisme (Kern et al., 1996) et diminuent dans le diabète de type I (Ranganathan et al., 2000). Cet effet est causé par la présence ou l'absence d'une protéine répressive qui se lie à la région 3' non-traduite de l'ARNm de la LPL. Nous avons étudié la possibilité que l'expression génique de la MCD soit régulée au niveau de la traduction et/ou dégradation de la protéine. Des anticorps dirigés sélectivement contre les parties N- et C-terminales de la MCD ont été obtenus chez le lapin afin d'étudier la régulation de l'abondance de la protéine MCD. On observe par immunobuvardage une distribution ubiquitaire de la protéine de rat ayant une masse moléculaire de 47kDa lorsque l'on utilise un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'enzyme (Fig. 21B, panneau du haut). Des cellules 293 infectés avec un adénovirus contenant la MCD de l'oie (Antinozzi et al., 1998) et la MCD semi-purifiée à partir d'extraits de foie de rat (Dyck et al., 2000) ont servi de contrôles. On observe plusieurs bandes supérieures à 47kDa. Une ou plusieurs coupures dans la préséquence de localisation mitochondriale (PLM) sont effectuées suite au transport des protéines dans la mitochondrie. La MCD contient une PLM en position N-terminale. Il est donc possible que ceci explique les diverses bandes

supérieures à 47kDa. On remarque que le muscle exprime également une protéine d'environ 40kDa. Nous ne savons pas à présent si cette bande représente une MCD active d'un poids moléculaire plus faible, une autre protéine réagissant avec l'anticorps ou un fragment inactif de la MCD. Diverses études ont proposés que la MCD se trouve dans diverses cellules sous forme d'un tétramère d'environ 190kDa (Kolattukudy et al., 1981). Notre étude décrivant le clonage de la MCD de la cellule  $\beta$  de rat (Voilley et al., 1999) appuie la possibilité d'un monomère d'environ 50kDa sans toutefois démontrer que la MCD peut prendre la forme d'un tétramère. Les immunobuvardages avec l'anticorps dirigé contre la partie N-terminale (Fig. 21B, panneau du bas) donne un patron de protéines dans divers tissus différent de celui révélé par l'anticorps C-terminal. Par exemple, une protéine de 47 kDa est fortement abondante dans le cœur et faible dans le foie alors que l'anticorps C-terminal a produit des résultats inverses. Comment peut-on expliquer ces résultats antinomiques ? La région sélectionnée chez le rat afin de produire les anticorps contient un site possible de coupure de la PLM (deux arginines : R-R) et diffère énormément de la protéine de l'oie (Fig. 10 et 21A). Il est possible que les protéines MCD du foie et du cœur diffèrent à la fois dans leurs parties N- et C-terminales. Des études plus approfondies en particulier le clonage de la MCD du cœur permettra d'élucider ce dilemme. En revanche, nos résultats correspondent avec ceux démontrant que l'activité enzymatique de la MCD est forte dans ces deux tissus (Voilley et al., 1999). Les îlots de Langerhans et les cellules  $\beta$ (INS) expriment deux isoformes de la MCD de masse moléculaire de 47kDa et 50kDa tout au moins certainement avec l'anticorps C-terminal. Étant donné que nous obtenons de meilleurs signaux dans la cellule pancréatique  $\beta$  avec l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale, nous avons utilisé celui-ci pour les analyses ultérieures.

Nous avons évalué la régulation du gène de la MCD au niveau de la traduction et/ou dégradation de la protéine. Les protéines totales extraites des cellules INS-832/13 traitées pendant 48 h à 3 ou 20 mM de glucose ont été analysées par la méthode de Western sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Les niveaux

d'expression des protéines MCD de 47 kDa et de 50 kDa ne varient pas en fonction de la concentration de glucose (Fig. 22A). Des résultats semblables ont été obtenus dans des îlots de Langerhans isolés à partir de rats Wistar normaux ayant subis les mêmes conditions de culture (Fig. 22B).

Nous avons ensuite étudié l'effet du glucose sur l'activité enzymatique de la MCD. L'activité de la MCD augmente d'environ 40% lorsque l'on traite les cellules INS-832/13 à haute concentration de glucose pendant 48 h (Fig. 23). L'action du glucose semble s'effectuer de façon post-traductionnelle dans la mesure où l'abondance des protéines MCD ne varient pas dans ces conditions. Cette conclusion est en accord avec le fait que le glucose stimule à court terme (sur une période de 2 min ou moins) l'activité enzymatique de la MCD. La phosphorylation, la glycosylation et l'acylation peuvent toutes modifier l'activité enzymatique d'une protéine. On ne dénote aucun site de glycosylation et d'acylation lors de l'analyse de la séquence protéique en utilisant les programmes PSORT et PROSITE (Voilley et al., 1999). La phosphorylation semble être le moyen de régulation de l'activité enzymatique de la MCD, car des études ont suggéré que l'AMPK augmente l'activité de la MCD dans le muscle squelettique et que la protéine phosphatase 2A inhibe cet effet (Saha et al., 2000). Cependant, l'activité enzymatique de l'AMPK varie de façon inversement proportionnelle avec la concentration de glucose dans la cellule  $\beta$  (Salt et al., 1998). Il est donc improbable que l'AMPK augmente directement l'activité de la MCD à haute concentration de glucose dans les cellules INS. Néanmoins, on peut considérer un effet indirect de l'AMPK. Une MCD-kinase inhibée par la présence de l'AMPK et active lorsque l'activité AMPK est faible permettrait par exemple un contrôle de l'activité enzymatique de la MCD par le glucose. Cette hypothèse nécessite des études additionnelles. On observe plusieurs sites de phosphorylation pour la PKC et la CKII dans la séquence protéique de la MCD (Voilley et al., 1999). Par contre, des études dans le foie démontrent que la PKC, la CKII, la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et l'AMPK n'influencent pas l'activité enzymatique de la MCD (Dyck et al., 2000). De plus, la déphosphorylation de la MCD par l'alcaline

phosphatase, mais pas les protéine phosphatase 2A (PP2A) et 2C (PP2C), augmente l'activité enzymatique de la MCD dans le foie et dans le cœur (Dyck et al., 1998; Dyck et al., 2000). On conclut que l'activité enzymatique de la MCD semble être régulée différemment selon les tissus par des mécanismes de phosphorylation. Des études plus approfondies sont nécessaires afin de comprendre comment le glucose change l'activité MCD dans la cellule  $\beta$ .

Notre groupe a démontré que l'activité enzymatique de l'ACC augmente lorsque la cellule INS- $\beta$  est exposée à de hautes concentrations de glucose pendant trois jours (Roche et al., 1998). Ceci permet des augmentations soutenues du malonyl-CoA, des acyl-CoA et des TG accompagnées d'une inhibition de l'oxydation des acides gras. Ces changements contribuent à l'adaptation de la cellule  $\beta$  afin d'augmenter la sécrétion d'insuline dans la mesure où le malonyl-CoA et les acyl-CoA sont des facteurs de couplage métabolique. Une augmentation de l'activité MCD à haute concentration de glucose va à l'encontre de ces résultats car ceci implique une diminution du malonyl-CoA et de la sécrétion d'insuline. Comment expliquer ces résultats apparemment contradictoires ? La MCD contient une préséquence de localisation mitochondriale en N-terminale et une séquence de localisation peroxysomale en position C-terminale (Voilley et al., 1999). Plusieurs études ont suggéré des localisations possibles de la MCD à la fois dans la mitochondrie, le cytosol et les peroxysomes. Dans la glande uropygiale de l'oie, la MCD se situe dans le cytoplasme et la mitochondrie (Courchesne-Smith et al., 1992). Dans le foie de rat, un groupe localise la MCD dans la mitochondrie et les peroxysomes tandis qu'un autre la localise dans le cytosol et les peroxysomes (FitzPatrick et al., 1999; Sacksteder et al., 1999). La MCD mitochondriale protègerait l'inhibition d'enzymes clés tel la PC par le malonyl-CoA généré à partir d'acétyl-CoA carboxylé par la propionyl-CoA carboxylase utilisant l'acétyl-CoA comme faux substrat (Voilley et al., 1999). Les peroxysomes oxydent les acides gras dicarboxyliques (AGD). La  $\beta$ -oxydation des AGD à chaîne carbonée impaire génère possiblement du malonyl-CoA (Sacksteder et al., 1999). Ainsi, la MCD éliminerait le malonyl-CoA produit dans les peroxysomes à partir des AGD

à chaîne carbonée impaire. Les patients ayant une absence de MCD ou une mutation dans le gène de la MCD ont des phénotypes associés à des défauts d'oxydation mitochondriales et peroxysomales des acides gras (FitzPatrick et al., 1999; Sacksteder et al., 1999). Ainsi, l'augmentation de l'activité enzymatique de la MCD observée dans la cellule  $\beta$  pourrait correspondre à des activités mitochondriale et peroxysomale accrues sans que l'activité ne change dans le cytoplasme. En ce cas, il n'y aurait pas de contradiction entre des augmentations induites par le glucose de l'ACC dans le cytosol et de la MCD dans d'autres compartiments cellulaires. Des études de fractionnement cellulaire ultérieures devraient nous permettre d'éclaircir ce problème.

## ***2. Effet des acides gras sur la régulation du gène et l'activité enzymatique de la MCD***

Le diabète de type II est étroitement associé à l'obésité. Des évidences chez le rat obèse et diabétique ZDF suggèrent que les acides gras circulants et les TG chroniquement élevés dans la cellule  $\beta$  jouent un rôle causal dans l'étiologie du diabète de ce modèle animal (Unger, 1997). Diverses études ont montré que l'exposition à long terme des cellules à des niveaux d'acides gras élevés provoquent des altérations du métabolisme des lipides et du glucose, et ceci en modifiant l'expression de gènes (Segall et al., 1999). Les acides gras diminuent l'expression de la GK et de GLUT-2, probablement via une réduction du niveau de PDX-1 dans la cellule  $\beta$  (Gremlich et al., 1997). Ils induisent l'expression de la CPT-1 (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997) et diminuent celle de l'ACC (Brun et al., 1997). De récentes études montrent que dans des conditions où les acides gras circulants sont élevés (jeûne et diète riche en acide gras), les niveaux d'ARNm de la MCD dans le cœur et le muscle squelettique augmentent (Young et al., 2001). De plus, dans les rats diabétiques de type I, on observe une augmentation de l'oxydation des acides gras et une diminution du malonyl-CoA dans le cœur et le foie (Dyck et al., 2000; Sakamoto et al., 2000). Une augmentation de la protéine et de l'activité enzymatique de la MCD semble

expliquer ces changements. Toutefois, les mécanismes moléculaires de la régulation de l'expression du gène de la MCD ne sont pas connus.

Afin de savoir si les acides gras régulent le gène de la MCD dans la cellule  $\beta$ , des cellules INS-832/13 ont été incubées pendant 48 h à 3 ou 20 mM de glucose en présence ou en absence de 0.4 mM d'oléate ou de palmitate liés à la BSA. L'oléate, un acides gras monoinsaturé (C18:1), et la palmitate, un acides gras insaturé (C16:0), sont les deux acides gras les plus abondants de la diète. Les deux types d'acides gras étaient sans effet sur l'expression de l'ARNm de la MCD soit à haut ou bas glucose (Fig. 18). Les niveaux d'ARNm de la MCD ont aussi été étudiés dans les îlots de Langerans de rats hyperlipidiques. Des rats Wistar normaux injectés pendant 48 h avec une émulsion de triglycérides (Intralipid, Kabivitrum; Stockholm, Suède) ont des niveaux de triglycérides et d'acides gras libres circulants augmentés de 1.5 et 2.5 fois, respectivement (Magnan et al., 1999). L'expression de l'ARNm de la MCD dans ces rats augmente de deux fois environ par rapport aux rats contrôles (Fig. 20). Au moins trois interprétations possibles permettent d'expliquer le fait d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de la MCD observée *in vivo* et non pas *in vitro* par les acides gras et/ou TG élevés. D'une part, l'effet observé *in vivo* peut-être causé indirectement par la variation d'une ou plusieurs hormones. D'autre part, l'émulsion de TG contient de l'huile de soya dont les composantes principales sont le linoléate (C18:2 $\omega$ 6; 53.5%), l'oléate (22.6%), le palmitate (10.1%), le linoléate (C18:3 $\omega$ 3; 7.85%) et le stéarate (C18:0; 4.7%). D'autres acides gras dont la chaîne carbonée varie entre 14 et 22 carbones sont présents mais en quantité minime (Smuts et al., 1998). Ainsi des acides gras autres que le palmitate et l'oléate pourraient réguler le gène de la MCD. Enfin, les acides gras pourraient réguler l'expression du gène de la MCD dans un tissu normal (îlots de Langerhans) et non pas tumoral (lignée cellulaire INS).

Par la suite, nous avons aussi étudié la régulation traductionnelle de la MCD par les acides gras dans la lignée cellulaire INS-832/13. Cependant, nous avons de

plus testé l'effet du linoléate (0.4 mM) en raison de sa haute concentration dans les Intralipid qui induisent le gène de la MCD dans les îlots *in vivo*. Les protéines extraites et analysées par la méthode de Western n'ont révélé aucun changement des niveaux de protéines MCD en présence de palmitate, oléate ou linoléate (Fig. 23, panneau du bas). Ainsi les acides gras ne semblent pas réguler l'expression du gène de la MCD tout au moins dans les cellules INS.

Comme discuté plus haut, nous avons observé une augmentation de l'activité enzymatique de la MCD dans des cellules INS exposées chroniquement à des concentrations élevées de glucose sans toutefois observer des changements au niveau de l'ARNm ou de la protéine MCD. Nous avons donc aussi évalué l'action des acides gras chroniquement élevés dans les cellules INS-832/13. Une incubation de 48 h des cellules avec 0.4 mM d'oléate lié à la BSA augmente l'activité enzymatique de la MCD de deux fois à 3 et 20 mM de glucose (Fig. 23). Cette conclusion est en accord avec le fait que l'oléate a aussi un effet stimulant à court terme (sur une période de 2 min ou moins) sur l'activité enzymatique de la MCD. Le linoléate augmente l'activité enzymatique seulement à basse concentration de glucose tandis que le palmitate ne manifeste aucun effet quelle que soit la concentration de glucose. Le fait que des acides gras différents ont des effets différents sur l'activité de la MCD n'est pas entièrement surprenant. En effet, différents acides gras ont des effets distincts sur divers processus biologiques selon leur degré d'insaturation (Duplus et al., 2000). Par exemple, l'oléate mais pas le palmitate stimule la prolifération de la cellule  $\beta$  (Roche et al., 1999). Des études de notre laboratoire montrent que l'oléate mais pas le palmitate augmente l'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) dans une lignée cancéreuse du sein (Hardy et al., 2000). Ainsi, certains acides gras semblent réguler la MCD à un niveau post-traductionnel dans la cellule  $\beta$ .

Pouvons nous relier cette action des acides gras sur la MCD à un effet biologique dans la cellule  $\beta$ ? À long terme (6-24 h), les acides gras élevés augmentent la sécrétion d'insuline basale mais diminuent la sécrétion d'insuline en réponse au

glucose. Les résultats sur l'effet des acides gras sur l'activité enzymatique de la MCD concordent avec ceux obtenus concernant les effets des acides gras sur la régulation des gènes de l'ACC et de la CPT-1. Notre groupe a démontré en effet que les acides gras diminuent l'activité enzymatique de l'ACC (Brun et al., 1997) et augmentent celle de la CPT-1 (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997). Une diminution de l'ACC et une augmentation de l'activité enzymatique de la MCD contribueraient toutes deux à une réduction des niveaux de malonyl-CoA, permettant ainsi une augmentation de la  $\beta$ -oxydation des acyl-CoA (voir Fig. 8). Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse selon laquelle les acyl-CoAs sont des facteurs de couplage métabolique dans la transduction de signaux de la cellule pancréatique- $\beta$ . Ainsi, à basse concentration de glucose, la sécrétion d'insuline basale augmente dans les cellules chroniquement exposées à des niveaux élevés d'acides gras car d'une part la production d'ATP nécessaire à la voie dépendante de l'ATP et du  $Ca^{2+}$  est accrue via la  $\beta$ -oxydation et d'autre part la voie des LC-CoA est augmentée due à la mobilisation des TG endogènes produisant directement des LC-CoA via la lipolyse. Quant à la stimulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, elle est altérée dans ces conditions car la concentration nette de malonyl-CoA diminue, ce qui entraîne une diminution de l'inhibition de la CPT-1, et ainsi manque d'augmentation des acyl-CoAs cytosoliques en réponse au glucose.

### ***3. Effet de la surexpression de la MCD sur la sécrétion d'insuline.***

Afin de valider le modèle de la sécrétion d'insuline selon lequel la voie anaplérotique/malonyl-CoA agit en synergie avec la voie dépendante de l'ATP et du  $Ca^{2+}$ , nous avons produit des clones stables pouvant surexprimer la MCD dépourvue de ses séquences de localisation mitochondriale et peroxysomale. Ainsi, la MCD tronquée devrait s'exprimer dans le cytosol uniquement. La production des clones a été réalisée grâce à la transfection d'un vecteur codant pour les cDNA de la MCDc et de la GFP dans les cellules INSrtTA-3 (Wang et Iynedjian, 1997). L'expression de la GFP sous le contrôle du promoteur du

cytomégalo virus (CMV) constitutivement actif permet la visualisation (sous un microscope à fluorescence) et la sélection des clones qui ont intégré le cDNA et qui expriment possiblement la MCDc (Fig. 26). Ensuite, l'analyse des clones par la méthode de Western permet l'étude de l'expression de la protéine MCD. Les cellules INSrtTA-3 expriment constitutivement la protéine rtTA. Ainsi, l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture permet la liaison de la rtTA à son élément de réponse et la transcription du gène de la MCDc (Fig. 27A). Parmi, toutes les cellules exprimant la GFP, nous avons isolé quatre clones qui expriment efficacement la protéine MCDc. En effet, les clones 4,5,9 et 14 expriment de 10-20 fois plus que les cellules contrôles une protéine immunoréactive de 47 kDa (probablement la protéine MCDc lors de l'incubation des cellules pendant 48 h à 3 mM de glucose en présence de 1 µg/ml de doxycycline (Fig. 27B). L'expression de la protéine MCDc dans le clone 5 (MCDc5) augmente de façon doxycycline-dépendante et est maximale à 1 µg/ml de doxycycline (Fig. 27C).

Nous avons étudié l'effet de la surexpression de la MCDc sur la sécrétion d'insuline dans les clones 5 et 14. On ne dénote aucun changement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans ces clones (Fig. 28). Les résultats obtenus dans les clones MCDc5 et 14 appuient ceux déjà publiés par les groupes d'Antinozzi et al. (1998) dans la lignée INS-1 originale ainsi que ceux de Mulder et al. (2001) dans la lignée clonale INS-832/13.

En ce qui concerne l'étude de Antinozzi et al., ces auteurs ont remarqué aucun changement de la sécrétion d'insuline induite par le glucose lorsque les cellules INS-1 ont été infectées avec un adénovirus codant pour la MCD de l'oie (Antinozzi et al., 1998). Toutefois, le niveau de malonyl-CoA total diminuait et l'oxydation des acides gras augmentait. Néanmoins, cette étude n'était pas expérimentalement optimale dans la mesure où l'adénovirus utilisé pour leurs expériences contenait la séquence de localisation peroxysomale. En effet, leur adénovirus recombinant utilisé dans les hépatocytes induisait une surexpression de la protéine MCD dans les peroxysomes (Newgard, communication personnelle).

De plus, les cellules utilisées par ce groupe dans cette publication étaient de passages élevés (plus de 200) et répondaient que faiblement au glucose. Mulder et al. ont alors répété ces expériences en considérant les critiques mentionnées ci-dessus. L'infection de la lignée cellulaire INS-832/13 (répondant considérablement au glucose) avec un adénovirus codant pour la MCD humaine dépourvue de ses séquences de localisation mitochondriale et peroxysomale n'a pas altéré la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Mulder et al., 2001). Ces auteurs ont noté une activité enzymatique de la MCD augmentée de deux fois dans le cytosol et n'ont pas observé d'augmentation du niveau de malonyl-CoA induite par le glucose dans ces cellules surexprimant la MCDc. Notons que l'augmentation de l'oxydation des acides gras observée lors de la surexpression de la MCDc n'était que partielle. De plus, malgré une augmentation de l'oxydation des acides gras, l'estérification du palmitate ne changeait pas suite à la stimulation par le glucose. La vitesse d'estérification des acides gras dans cette cellule est 30 fois plus élevée que celle de leur oxydation (Mulder et al., 2001). Ainsi, même un changement considérable de l'oxydation des acides gras ne devrait pas influencer de façon importante le taux d'estérification des acides gras dans cette lignée cellulaire. De ce fait, nous concluons que cette lignée cellulaire n'est pas optimale pour tester notre modèle dans la mesure où celui-ci propose qu'une augmentation de l'estérification des acides gras est essentielle au système de couplage métabolique impliqué dans le processus de sécrétion d'insuline induit par le glucose.

Nous avons donc effectué des expériences *in vitro* sur des îlots de Langerhans. L'infection des îlots de Langerhans avec un adénovirus codant pour la MCDn induisait une augmentation de la protéine MCDn (Fig. 29A) sans toutefois altérer la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Fig. 29B). En revanche, la surexpression de la protéine MCDc, tel que démontré à la Fig. 29A a diminué la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Fig. 29B). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle les LC-CoA cytosoliques régulent la sécrétion d'insuline induite par le glucose. De plus, l'effet différent observé lors de la

surexpression de la MCDc dans les clones stables MCDc5 et 14 semble indiquer que l'hypothèse que la lignée cellulaire INS n'est pas un modèle optimal pour étudier l'implication de la voie anaplerotique/malonyl-CoA dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Notre groupe a récemment réalisé une étude *in vitro* sur des îlots de Langerhans de souris déficientes pour la lipase hormono-sensible (HSL). Les îlots des souris déficientes en HSL ne répondent pas au glucose en ce qui a trait à la sécrétion d'insuline (Roduit et al., 2001). La HSL produit des acides gras libres à partir des TG endogènes. Ainsi, les TG emmagasinés dans la cellule  $\beta$  serviraient, via la lipolyse, de source d'acides gras endogène pour la production de différentes molécules lipidiques signalétiques comme le diacylglycérol (DAG), certains phospholipides (PL) ou les LC-CoA. De ce fait, les études ultérieures nécessitent l'utilisation des îlots de Langerhans *in vitro* et *in vivo* plutôt que des lignées cellulaires  $\beta$  tumorales.

**CHAPITRE 5 : BIBLIOGRAPHIE**

ADQ. [www.diabete.qc.ca](http://www.diabete.qc.ca) . 2001.

Antinozzi, P.A., Segall, L., Prentki, M., McGarry, J.D., et 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, 16146-16154.

Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., et Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130, 167-178.

Ashcroft, F.M. et Ashcroft, S.J. (1992). *Insulin: molecular biology to pathology.*, Oxford University Press, New York.

Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Roche, E., Esser, V., McGarry, J.D., et Prentki, M. (1997). Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase I gene in the pancreatic beta-cell line INS-1. *J. Biol. Chem.* 272, 1659-1664.

Bavenholm, P.N., Pigon, J., Saha, A.K., Ruderman, N.B., et Efendic, S. (2000). Fatty acid oxidation and the regulation of malonyl-CoA in human muscle. *Diabetes* 49, 1078-1083.

Bedoya, F.J., Ramirez, R., Arilla, E., et Goberna, R. (1984). Effect of 2-bromostearate on glucose-phosphorylating activities and the dynamics of insulin secretion in islets of Langerhans during fasting. *Diabetes* 33, 858-863.

Bergman, R.N. et Ader, M. (2000). Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11, 351-356.

Bliss, C.R. et Sharp, G.W. (1992). Glucose-induced insulin release in islets of young rats: time-dependent potentiation and effects of 2-bromostearate. *Am. J. Physiol.* 263, E890-E896.

Bollheimer, L.C., Skelly, R.H., Chester, M.W., McGarry, J.D., et Rhodes, C.J. (1998). Chronic exposure to free fatty acid reduces pancreatic beta cell insulin content by increasing basal insulin secretion that is not compensated for by a corresponding increase in proinsulin biosynthesis translation. *J. Clin. Invest.* 101, 1094-1101.

Brownlee, M. (2000). Negative consequences of glycation. *Metabolism* 49, 9-13.

Brun, T., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., et Prentki, M. (1997). Long-chain fatty acids inhibit acetyl-CoA carboxylase gene expression in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 46, 393-400.

Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B.E., Kim, K.H., et Prentki, M. (1996). Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* 45, 190-198.

Caron, A.W., Massie, B., et Mosser, D.D. (2000). Use of a micromanipulator for high-efficiency cloning of cells co-expressing fluorescent proteins. *Methods Cell Sci.* 22, 137-145.

Chen, S., Ogawa, A., Ohneda, M., Unger, R.H., Foster, D.W., et McGarry, J.D. (1994). More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes* 43, 878-883.

Chien, D., Dean, D., Saha, A.K., Flatt, J.P., et Ruderman, N.B. (2000). Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E259-E265.

Chomczynski, P. et Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Congressionally-Established Diabetes Research Working Group (CEDRW). *Conquering Diabetes: A strategic plan for the 21st century.* (1999). NIH Publication No. 99-4398.

Corkey, B.E., Deeney, J.T., Yaney, G.C., Tornheim, K., et Prentki, M. (2000). The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J. Nutr.* 130, 299S-304S.

Corkey, B.E., Glennon, M.C., Chen, K.S., Deeney, J.T., Matschinsky, F.M., et Prentki, M. (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21608-21612.

Courchesne-Smith, C., Jang, S.H., Shi, Q., DeWille, J., Sasaki, G., et Kolattukudy, P.E. (1992). Cytoplasmic accumulation of a normally mitochondrial malonyl-CoA decarboxylase by the use of an alternate transcription start site. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 576-586.

Cournarie, F., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., et Foufelle, F. (1999). The inhibitory effect of glucose on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured hepatocytes is transcriptional and requires glucose metabolism. *FEBS Lett.* 460, 527-532.

Darnell, J., Lodish, H., et Baltimore, D. (1993). *Biologie moléculaire de la cellule.* 2ième ed., De Boeck-Wesmael, Bruxelles.

Dehning, I. et Schink, B. (1994). Anaerobic degradation of malonate via malonyl-CoA by *Sporomusa malonica*, *Klebsiella oxytoca*, and *Rhodobacter capsulatus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66, 343-350.

Dickson, A.C., McEvoy, J.A., et Koeppen, A.H. (1994). The cellular localization of malonyl-coenzyme A decarboxylase in rat brain. *Neurochem. Res.* *19*, 1271-1276.

Dobbins, R.L., Chester, M.W., Daniels, M.B., McGarry, J.D., et Stein, D.T. (1998a). Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* *47*, 1613-1618.

Dobbins, R.L., Chester, M.W., Stevenson, B.E., Daniels, M.B., Stein, D.T., et McGarry, J.D. (1998b). A fatty acid- dependent step is critically important for both glucose- and non-glucose-stimulated insulin secretion. *J. Clin. Invest.* *101*, 2370-2376.

Duplus, E., Glorian, M., et Forest, C. (2000). Fatty acid regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* *275*, 30749-30752.

Dyck, J.R., Barr, A.J., Barr, R.L., Kolattukudy, P.E., et Lopaschuk, G.D. (1998). Characterization of cardiac malonyl-CoA decarboxylase and its putative role in regulating fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol.* *275*, H2122-H2129.

Dyck, J.R., Berthiaume, L.G., Thomas, P.D., Kantor, P.F., Barr, A.J., Barr, R., Singh, D., Hopkins, T.A., Voilley, N., Prentki, M., et Lopaschuk, G.D. (2000). Characterization of rat liver malonyl-CoA decarboxylase and the study of its role in regulating fatty acid metabolism. *Biochem. J.* *350*, 599-608.

Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., et Prentki, M. (2000). Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* *49*, 718-726.

FitzPatrick, D.R., Hill, A., Tolmie, J.L., Thorburn, D.R., et Christodoulou, J. (1999). The molecular basis of malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.* *65*, 318-326.

Furukawa, H., Carroll, R.J., Swift, H.H., et Steiner, D.F. (1999). Long-term elevation of free fatty acids leads to delayed processing of proinsulin and prohormone convertases 2 and 3 in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* *48*, 1395-1401.

Gao, J., Waber, L., Bennett, M.J., Gibson, K.M., et Cohen, J.C. (1999). Cloning and mutational analysis of human malonyl-coenzyme A decarboxylase. *J. Lipid Res.* *40*, 178-182.

Gembal, M., Gilon, P., et Henquin, J.C. (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B cells. *J. Clin. Invest.* *89*, 1288-1295.

Girard, J. (2000). Fatty acids and beta cells. *Diabetes Metab* *26*, 6-9.

Girard, J., Ferre, P., et Foufelle, F. (1997). Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 325-352.

Goodwin, G.W. et Taegtmeyer, H. (1999). Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am. J. Physiol.* 277, E772-E777.

Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C.J., et Monaco, A.P. (1987). Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43, 725-730.

Greenspan, F.S. (1991). Basic and clinical endocrinology: Pancreatic hormones and diabetes mellitus. 3rd ed., Lange Medical Book, Appleton & Lange.

Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G., et Thorens, B. (1997). Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J. Biol. Chem.* 272, 30261-30269.

Guyton, A.C. et Hall, J.E. (1996). Textbook of medical physiology. 9th ed. (Philadelphia: W. B. Saunders company).

Haffner, S.M. (1995). Risk factors for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Hypertens. Suppl.* 13, S73-S76.

Hamilton, C. et Saggerson, E.D. (2000). Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem. J.* 350, 61-67.

Hardy, S., Langelier, Y., et Prentki, M. (2000). Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* 60, 6353-6358.

Harlow, E. et Lane, D. (1988). Antibodies: A Laboratory Manual. (New York, United State: Cold Spring Harbor Laboratory).

Hedeskov, C.J. (1980). Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev.* 60, 442-509.

Hohmeier, H.E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., et Newgard, C.B. (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49, 424-430.

Hosokawa, H., Corkey, B.E., et Leahy, J.L. (1997). Beta-cell hypersensitivity to glucose following 24-h exposure of rat islets to fatty acids. *Diabetologia* 40, 392-397.

Jang, S.H., Cheesbrough, T.M., et Kolattukudy, P.E. (1989). Molecular cloning, nucleotide sequence, and tissue distribution of malonyl-CoA decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 264, 3500-3505.

Jonas, J.C., Sharma, A., Hasenkamp, W., Ilkova, H., Patane, G., Laybutt, R., Bonner-Weir, S., et Weir, G.C. (1999). Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J. Biol. Chem.* 274, 14112-14121.

Kahn, C.R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066-1084.

Kahn, C.R., Vicent, D., et Doria, A. (1996). Genetics of non-insulin-dependent (type-II) diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* 47:509-31, 509-531.

Keller, H., Mahfoudi, A., Dreyer, C., Hihi, A.K., Medin, J., Ozato, K., et Wahli, W. (1993). Peroxisome proliferator-activated receptors and lipid metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 684, 157-173.

Kern, P.A., Ranganathan, G., Yukht, A., Ong, J.M., et Davis, R.C. (1996). Translational regulation of lipoprotein lipase by thyroid hormone is via a cytoplasmic repressor that interacts with the 3' untranslated region. *J. Lipid Res.* 37, 2332-2340.

Kim, Y.S. et Kolattukudy, P.E. (1978). Purification and properties of malonyl-CoA decarboxylase from rat liver mitochondria and its immunological comparison with the enzymes from rat brain, heart, and mammary gland. *Arch. Biochem Biophys.* 190, 234-246.

Kolattukudy, P.E., Poulouse, A.J., et Kim, Y.S. (1981). Malonyl-CoA decarboxylase from avian, mammalian, and microbial sources. *Methods Enzymol.* 71 Pt C:150-63, 150-163.

Kolattukudy, P.E., Rogers, L.M., Poulouse, A.J., Jang, S.H., Kim, Y.S., Cheesbrough, T.M., et Liggitt, D.H. (1987). Developmental pattern of the expression of malonyl-CoA decarboxylase gene and the production of unique lipids in the goose uropygial glands. *Arch. Biochem. Biophys.* 256, 446-454.

Komatsu, M. et Sharp, G.W. (1998). Palmitate and myristate selectively mimic the effect of glucose in augmenting insulin release in the absence of extracellular  $Ca^{2+}$ . *Diabetes* 47, 352-357.

Komatsu, M., Yajima, H., Yamada, S., Kaneko, T., Sato, Y., Yamauchi, K., Hashizume, K., et Aizawa, T. (1999). Augmentation of  $Ca^{2+}$ -stimulated insulin release by glucose and long-chain fatty acids in rat pancreatic islets: free fatty acids mimic ATP-sensitive  $K^{+}$  channel-independent insulinotropic action of glucose. *Diabetes* 48, 1543-1549.

La grande encyclopédie de la médecine. (1980). vol. 18, Atlas, Grolier Limitée, Montréal, Canada.

Lameloise, N., Muzzin, P., Prentki, M., et Assimacopoulos-Jeannet, F. (2001). Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? *Diabetes* 50, 803-809.

Landriscina, C., Gnoni, G.V., et Quagliariello, E. (1971). Properties of malonyl-CoA decarboxylase and its relation with malonyl-CoA incorporation into fatty acids by rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 19, 573-580.

Larsson, O., Deeney, J.T., Branstrom, R., Berggren, P.O., et Corkey, B.E. (1996). Activation of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J. Biol. Chem.* 271, 10623-10626.

Liang, Y., Buettger, C., Berner, D.K., et Matschinsky, F.M. (1997). Chronic effect of fatty acids on insulin release is not through the alteration of glucose metabolism in a pancreatic beta-cell line (beta HC9). *Diabetologia* 40, 1018-1027.

Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W.H., et van Blitterswijk, W.J. (1994). Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids. *Biochem J.* 304, 1001-1008.

Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., et Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381.

MacDonald, M.J. (1995). Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 270, 20051-20058.

Magnan, C., Collins, S., Berthault, M.F., Kassis, N., Vincent, M., Gilbert, M., Penicaud, L., Ktorza, A., et Assimacopoulos-Jeannet, F. (1999). Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose. *J. Clin. Invest.* 103, 413-419.

Mason, T.M., Goh, T., Tchipashvili, V., Sandhu, H., Gupta, N., Lewis, G.F., et Giacca, A. (1999). Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48, 524-530.

Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D.D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F., et Langelier, Y. (1998). Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J. Virol.* 72, 2289-2296.

McCormack, J.G. et Denton, R.M. (1990). The role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  transport and matrix  $\text{Ca}^{2+}$  in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1018, 287-291.

McGarry, J.D. (2000). Malonyl-CoA and Satiety? Food for Thought. *Trends Endocrinol Metab* 11, 399-400.

McGarry, J.D. et Dobbins, R.L. (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42, 128-138.

Mulder, H., Lu, D., Finley, J., An, J., Cohen, J., Antinozzi, P.A., McGarry, J.D., et Newgard, C.B. (2001). Overexpression of a modified human malonyl-CoA decarboxylase blocks the glucose-induced increase in malonyl-CoA level but has no impact on insulin secretion in INS-1-derived (832/13) beta-cells. *J. Biol. Chem.* 276, 6479-6484.

Peter-Riesch, B., Fathi, M., Schlegel, W., et Wollheim, C.B. (1988). Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets. *J. Clin. Invest* 81, 1154-1161.

Pinhas-Hamiel, O. et Zeitler, P. (2000). "Who is the wise man?--The one who foresees consequences:". Childhood obesity, new associated comorbidity and prevention. *Prev. Med.* 31, 702-705.

Pizer, E.S., Thupari, J., Han, W.F., Pinn, M.L., Chrest, F.J., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., et Kuhajda, F.P. (2000). Malonyl-coenzyme-A is a potential mediator of cytotoxicity induced by fatty-acid synthase inhibition in human breast cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 60, 213-218.

Pralong, W.F., Bartley, C., et Wollheim, C.B. (1990). Single islet beta-cell stimulation by nutrients: relationship between pyridine nucleotides, cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and secretion. *EMBO J.* 9, 53-60.

Pralong, W.F., Spat, A., et Wollheim, C.B. (1994). Dynamic pacing of cell metabolism by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients. *J. Biol. Chem.* 269, 27310-27314.

Prentki, M. et Corkey, B.E. (1996). Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45, 273-283.

Prentki, M. et Matschinsky, F.M. (1987).  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67, 1185-1248.

Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M.C., Regazzi, R., Deeney, J.T., et 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, 5802-5810.

Prentki, M., Brun, T., et Roche, E. (1994). Nutriments, insulin secretion and gene expression in the pancreatic beta cell. *Journ. Annu. Diabetol. Hotel. Dieu.* 1-11.

Randle, P.J., Kerbey, A.L., et Espinal, J. (1988). Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. *Diabetes Metab Rev.* 4, 623-638.

Ranganathan, G., Li, C., et Kern, P.A. (2000). The translational regulation of lipoprotein lipase in diabetic rats involves the 3'-untranslated region of the lipoprotein lipase mRNA. *J. Biol. Chem.* 275, 40986-40991.

Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Witters, L.A., Perruchoud, B., Yaney, G., Corkey, B., Asfari, M., et Prentki, M. (1997). Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *J. Biol. Chem.* 272, 3091-3098.

Roche, E., Buteau, J., Aniento, I., Reig, J.A., Soria, B., et Prentki, M. (1999). Palmitate and oleate induce the immediate-early response genes c-fos and nur-77 in the pancreatic beta-cell line INS-1. *Diabetes* 48, 2007-2014.

Roche, E., Farfari, S., Witters, L.A., Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Brun, T., Corkey, B.E., Saha, A.K., et Prentki, M. (1998). Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47, 1086-1094.

Roche, E., Maestre, I., Martin, F., Fuentes, E., Casero, J., Reig, J.A., et Soria, B. (2000). Nutrient toxicity in pancreatic beta-cell dysfunction. *J. Physiol. Biochem.* 56, 119-128.

Roduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C.B., Assimacopoulos-Jeannet, F., et Prentki, M. (2000). Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha gene in the pancreatic beta -cell. *J. Biol. Chem.* 275, 35799-35806.

Roduit, R., Masiello, P., Wang, S.P., Li, H., Mitchell, G.A., et Prentki, M. (2001). A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 50, 1970-1975.

Ruderman, N.B., Saha, A.K., Vavvas, D., et Witters, L.A. (1999). Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 276, E1-E18.

Sacksteder, K.A., Morrell, J.C., Wanders, R.J., Matalon, R., et Gould, S.J. (1999). MCD encodes peroxisomal and cytoplasmic forms of malonyl-CoA decarboxylase and is mutated in malonyl-CoA decarboxylase deficiency. *J. Biol. Chem.* 274, 24461-24468.

Saha, A.K., Laybutt, D.R., Dean, D., Vavvas, D., Sebokova, E., Ellis, B., Klimes, I., Kraegen, E.W., Shafir, E., et Ruderman, N.B. (1999). Cytosolic citrate and malonyl-CoA regulation in rat muscle in vivo. *Am. J. Physiol.* 276, E1030-E1037.

Saha, A.K., Schwarsin, A.J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., Prentki, M., et Ruderman, N.B. (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside. *J. Biol. Chem.* 275, 24279-24283.

Sakamoto, J., Barr, R.L., Kavanagh, K.M., et Lopaschuk, G.D. (2000). Contribution of malonyl-CoA decarboxylase to the high fatty acid oxidation rates seen in the diabetic heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1196-H1204.

Salt, I.P., Johnson, G., Ashcroft, S.J., et Hardie, D.G. (1998). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. *Biochem. J.* 335, 533-539.

Schmidt, M.F. (1989). Fatty acylation of proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 411-426.

Schmitz-Peiffer, C., Craig, D.L., et Biden, T.J. (1999). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J. Biol. Chem.* 274, 24202-24210.

Schuit, F., De, V.A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., et Prentki, M. (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J. Biol. Chem.* 272, 18572-18579.

Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B.E., et Prentki, M. (1999). Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *Am. J. Physiol.* 277, E521-E528.

Shimabukuro, M., Higa, M., Zhou, Y.T., Wang, M.Y., Newgard, C.B., et Unger, R.H. (1998a). Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J. Biol. Chem.* 273, 32487-32490.

Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Lee, Y., et Unger, R.H. (1998b). Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem.* 273, 3547-3550.

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

Skelly, R.H., Bollheimer, L.C., Wicksteed, B.L., Corkey, B.E., et Rhodes, C.J. (1998). A distinct difference in the metabolic stimulus-response coupling pathways for regulating proinsulin biosynthesis and insulin secretion that lies at the level of a requirement for fatty acyl moieties. *Biochem. J.* 331, 553-561.

Smuts, C.M., Tichelaar, H.Y., Kirsten, G.F., Dhansay, M.A., Faber, M., Jaarsveld, P.J.v., et Spinnler Benadé, A.J. (1998). The Effect of Parenteral Nutrition with Lipovenous or Intralipid on the Fatty Acid Composition of Plasma and Erythrocyte Membrane Lipids in Very Low Birthweight (VLBW) Infants. *S. A. J. Clin. Nutr.* 89, 687-694.

So, W.Y., Ng, M.C., Lee, S.C., Sanke, T., Lee, H.K., et Chan, J.C. (2000). Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Hong Kong Med. J.* 6, 69-76.

Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S., et McGarry, J.D. (1996). Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J. Clin. Invest.* 97, 2728-2735.

Stein, D.T., Stevenson, B.E., Chester, M.W., Basit, M., Daniels, M.B., Turley, S.D., et McGarry, J.D. (1997). The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J. Clin. Invest.* 100, 398-403.

Straub, S.G., James, R.F., Dunne, M.J., et Sharp, G.W. (1998). Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets. *Diabetes* 47, 758-763.

Thams, P., Capito, K., Hedekov, C.J., et Kofod, H. (1990). Phorbol-ester-induced down-regulation of protein kinase C in mouse pancreatic islets. Potentiation of phase 1 and inhibition of phase 2 of glucose-induced insulin secretion. *Biochem. J.* 265, 777-787.

Tisch, R. et McDevitt, H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297.

Unger, R.H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44, 863-870.

Unger, R.H. (1997). How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Elsevier Science* 8, 276-281.

Unger, R.H., Zhou, Y.T., et Orci, L. (1999). Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2327-2332.

Vara, E., Fernandez-Martin, O., Garcia, C., et Tamarit-Rodriguez, J. (1988). Palmitate dependence of insulin secretion, "de novo" phospholipid synthesis and  $45\text{Ca}^{2+}$ -turnover in glucose stimulated rat islets. *Diabetologia* 31, 687-693.

Vaulont, S., Vasseur-Cognet, M., et Kahn, A. Glucose Regulation of Gene Transcription. *J.Biol.Chem.* 275[41], 31555-31558. 10-13-2000.

Voilley, N., Roduit, R., Vicaretti, R., Bonny, C., Waeber, G., Dyck, J.R., Lopaschuk, G.D., et Prentki, M. (1999). Cloning and expression of rat pancreatic beta-cell malonyl-CoA decarboxylase. *Biochem. J.* 340, 213-217.

Wang, H. et Iynedjian, P.B. (1997). Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4372-4377.

Warnotte, C., Gilon, P., Nenquin, M., et Henquin, J.C. (1994). Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. A study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes* 43, 703-711.

Warnotte, C., Nenquin, M., et Henquin, J.C. (1999). Unbound rather than total concentration and saturation rather than unsaturation determine the potency of fatty acids on insulin secretion. *Mol. Cell Endocrinol.* 153, 147-153.

Wollheim, C.B. et Regazzi, R. (1990). Protein kinase C in insulin releasing cells. Putative role in stimulus secretion coupling. *FEBS Lett.* 268, 376-380.

Wollheim, C.B. et Sharp, G.W. (1981). Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev.* 61, 914-973.

Yaney, G.C., Korchak, H.M., et Corkey, B.E. (2000). Long-chain acyl CoA regulation of protein kinase C and fatty acid potentiation of glucose-stimulated insulin secretion in clonal beta-cells. *Endocrinology* 141, 1989-1998.

Young, M.E., Goodwin, G.W., Ying, J., Guthrie, P., Wilson, C.R., Laws, F.A., et Taegtmeyer, H. (2001). Regulation of cardiac and skeletal muscle malonyl-CoA decarboxylase by fatty acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 280, E471-E479.

Zammit, V.A. (1999). The malonyl-CoA-long-chain acyl-CoA axis in the maintenance of mammalian cell function. *Biochem. J.* 343 Pt 3:505-15, 505-515.

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

Zhou, Y.P. et Grill, V.E. (1995). Palmitate-induced beta-cell insensitivity to glucose is coupled to decreased pyruvate dehydrogenase activity and enhanced kinase activity in rat pancreatic islets. *Diabetes* 44, 394-399.

Zhou, Y.P., Ling, Z.C., et Grill, V.E. (1996). Inhibitory effects of fatty acids on glucose-regulated B-cell function: association with increased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxidation on glucose metabolism. *Metabolism* 45, 981-986.