

2m11r2823.8

Université de Montréal

**Effets des acides gras sur l'induction de gènes à réponse précoce
et l'activation de voies de signalisation
dans la cellule pancréatique β (INS-1)**

Par

Jean Buteau

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

En biochimie

Avril 2000

©Jean Buteau, 2000



100-200-101

Department of Health

These are the only...
of this...
in the...

W
4
N58
2000
N. 101

...

...

...

...

...

...



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effets des acides gras sur l'induction de gènes à réponse précoce
et l'activation de voies de signalisation
dans la cellule pancréatique β (INS-1)**

Présenté par :

Jean Buteau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Tony Antakly (Président du jury)

Dr. Marc Prentki (Directeur de recherche)

Dr. Christine Desrosiers (Membre du jury)

Mémoire accepté le

25.09.2000

SOMMAIRE :

Le diabète de type 2 représente un problème socio-économique important dans le monde et particulièrement en Amérique du Nord où l'on estime que les dépenses des soins de santé pour le diabète seul se chiffrent à 100 milliard de dollars par année aux États-Unis. Le diabète de type 2 est souvent associé à l'obésité et l'incidence de ces deux désordres métaboliques n'a cessé de croître au cours des dernières années, tout en touchant de plus en plus de personnes en bas âge.

Le lien entre le diabète et l'obésité fait de plus en plus l'objet d'études. On sait que dans l'étiologie du diabète de type 2 associée à l'obésité, les acides gras à longues chaînes carbonées (AGLC) pourraient initialement participer au phénomène de compensation par la cellule pancréatique β de la résistance à l'insuline en augmentant d'une part la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et en stimulant d'autre part la prolifération des cellules pancréatiques β . En revanche, de hauts niveaux d'AGLC en circulation sur de plus longues périodes semblent être néfastes pour la cellule pancréatique β .

Afin de mieux comprendre les changements phénotypiques de la cellule pancréatique β induits par les AGLC, nous avons étudié dans la lignée cellulaire INS-1, l'effet de deux acides gras abondants de la diète (l'oléate et le palmitate) sur l'expression de certains gènes à réponse précoce ainsi que sur l'activité du facteur de transcription AP-1. Nous avons aussi essayé de déterminer si l'expression de *c-fos* corrèle avec la prolifération des cellules β (INS-1) afin de tester l'hypothèse selon laquelle ce gène à réponse précoce pourrait être impliqué dans un possible effet prolifératif des acides gras. Nous avons de plus étudié l'effet de l'oléate et du palmitate sur la voie de transduction de signaux de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), une cascade signalétique activée en réponse à de nombreux facteurs de croissance dans divers types cellulaires. Enfin, nous avons étudié l'effets des deux acides gras sur l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. PDX-1 est impliqué dans l'expression du gène de

l'insuline ainsi que de certains gènes importants pour le transport et le métabolisme du glucose dans la cellule pancréatique β .

Nous démontrons dans cette étude que l'oléate et le palmitate induisent les gènes à réponse précoce *c-fos* et *nur-77*. Les deux acides gras causent une accumulation de la protéine c-FOS et augmentent la liaison à l'ADN du complexe AP-1. Toutefois, seul l'oléate augmente la prolifération de la cellule INS-1. De plus, l'effet prolifératif de l'oléate corrèle avec l'activation de la PI-3K et l'augmentation de la liaison de PDX-1 à l'ADN.

Les résultats indiquent que l'induction de *c-fos* et l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1 en réponse à l'oléate et au palmitate ne corrèlent pas strictement avec les mesures de prolifération cellulaire. On peut émettre l'hypothèse que le palmitate pourrait avoir des actions distinctes de l'oléate, par exemple pro-apoptotique, ne permettant pas au complexe AP-1 actif de promouvoir la prolifération des cellules β (INS-1). Ces résultats suggèrent que les acides gras, en plus de jouer un rôle de substrats métaboliques et de réserve d'énergie, modulent l'activation de cascades de transduction de signaux et l'expression de gènes à réponse précoce pouvant à leur tour réguler l'expression de certains gènes cibles impliqués dans la pathogénèse du diabète de type 2.

TABLE DES MATIÈRES :

Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	x
Remerciements	xiii
Dédicace	xiv
Chapitre 1 : Introduction	
1- Le diabète	1
1.1- Statistiques	1
1.2- La pathologie	1
1.3- Les gènes du diabète ou diabétogènes	2
2-L'homéostasie du glucose	3
2.1- Définition	4
2.2- L'insuline	4
2.3- Le récepteur à l'insuline et la transduction du signal	5
2.3.1- Le récepteur à l'insuline et les insulin-receptor substrates 1-2 (IRS1-2)	5
2.3.2- La phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)	7
2.3.3- Une signalisation auto- ou paracrine de l'insuline sur la cellule pancréatique β	8
3- La cellule pancréatique β	8
3.1- La sécrétion d'insuline	8
3.1.1- Les mécanismes de la sécrétion d'insuline	9

3.1.2- Les sécrétagogues de la cellule pancréatique β	10
3.2- Prolifération et différenciation de la cellule β	11
3.2.1- Différenciation et néogénèse de la cellule β	12
3.2.2- Réplication de la cellule β	13
4- Facteurs de transcription impliqués dans la réponse mitogénique	16
4.1- AP-1	17
4.1.1- Fonctions biologiques de AP-1	17
4.1.2- Régulation de l'activité de AP-1	17
4.2- L'expression des gènes à réponse précoce composant le complexe AP-1	18
4.3- PDX-1	19
4.3.1- Fonctions biologiques de PDX-1	19
4.3.2- Régulation de l'expression de PDX-1	21
4.4- NUR-77	21
5- Acides gras et étiologie du diabète adipogénique de type II	22
5.1- Effets des acides gras sur la sécrétion d'insuline	23
5.2- Effets des acides gras sur l'expression génique de la cellule β et la conversion de la proinsuline en insuline	25
5.3- Lipotoxicité chez la cellule pancréatique β	28
6- Thématique et but du travail	31

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

- Matériel	33
- Culture cellulaire et incubation	33
- Préparation des solutions d'acides gras liés à l'albumine	33
- Isolation de l'ARN et analyse par northern blot	33
- Western blot (immunobuvardage)	34
- Préparation des extraits nucléaires et EMSA (« electrophoretic mobility shift assay »)	34
- Incorporation de thymidine tritiée	35

- Mesure de l'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)	36
- Statistiques	36

Chapitre 3 : Résultats

-L'oléate et le palmitate augmentent l'expression du gène <i>c-fos</i> dans les cellules INS-1	37
-L'oléate et le palmitate augmentent l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1	38
-L'oléate, mais pas le palmitate augmente l'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase et l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1	39
-L'oléate augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1	40

Chapitre 4 : Discussion	50
-------------------------	----

Bibliographie	60
---------------	----

Annexe : Sommaire de l'article

« Palmitate and Oleate Induce the Immediate-Early Response Genes <i>c-fos</i> and <i>nur-77</i> in the Pancreatic β -Cell Line INS-1 »	xv
---	----

LISTE DES FIGURES :

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Les voies de transduction de signaux activées en réponse à l'insuline	5
Figure 2 : Modèle pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans la cellule pancréatique β	9
Figure 3 : Principaux stimulateurs et inhibiteurs de la cellule β pour la sécrétion d'insuline	11
Figure 4 : Représentation schématique de la structure du facteur de transcription PDX-1	20
Figure 5 : Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète de type 2	22
Figure 6 : Principaux activateurs et mode d'action des PPARs	26
Figure 7 : Modèle de la lipotoxicité chez la cellule pancréatique β	28
Figure 8 : Biosynthèse <i>de novo</i> des céramides	30
Figure 9 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail	31

Chapitre 2 : Résultats

Figure 10 : Effet des acides gras sur l'induction de <i>c-fos</i> , <i>nur-77</i> et <i>junB</i>	42
Figure 11 : Effet de différents acides gras ou du clofibrate sur l'induction de <i>c-fos</i> et de <i>nur-77</i>	43
Figure 12 : L'oléate et le palmitate causent une accumulation de la protéine c-FOS dans les cellules INS-1	44
Figure 13 : L'oléate et la palmitate augmentent la liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 dans les cellules INS-1	45
Figure 14 : Effets du glucose, de l'oléate et du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1	46

- Figure 15 : L'oléate, mais pas le palmitate, augmente l'activité de
la PI-3K dans les cellules INS-1 47
- Figure 16 : L'oléate, mais pas le palmitate, augmente la liaison à l'ADN
du facteur de transcription PDX-1 dans les cellules INS-1 48

LISTE DES ABRÉVIATIONS :

ACC :	acétyl-CoA carboxylase
ACO :	acétyl-CoA oxydase
ACS :	acyl-CoA synthétase
AGLC :	acides gras à longue chaîne carbonée
AP-1 :	« activator protein-1 »
AR :	acide rétinoïque
ATF :	« activating transcription factor »
BHLH :	basic helix-loop-helix
BSA :	albumine du sérum de bœuf
CBP :	« CREB binding protein »
CCK :	cholécystokinine
CPT-1 :	carnitine palmitoyltransférase 1
CRE :	élément de réponse à l'AMPc
CREB :	« CRE binding protein »
DTT :	dithiotréitol
EGF :	« epidermal growth factor »
EMSA :	« electrophoretic mobility shift assay »
FAS :	acides gras synthétase
GIP :	« glucose-dependent insulintropic polypeptide »
GLP-1 :	« glucagon-like peptide-1 »
GLUT :	transporteur du glucose
GSK3 :	kinase 3 de la glycogène synthétase
HD :	homéodomaine
HNF :	« hepatocyte nuclear factor »
IBMX :	isobutyl-1-méthylxanthine
IDDM :	« insulin-dependent diabetes mellitus »
IGF :	« insulin-like growth factor »

IR :	récepteur à l'insuline
IRS :	« insulin receptor substrate »
JAB1 :	« jun activation domain binding protein 1 »
JAK :	janus kinase
JNK :	« c-terminal jun kinase »
L-PK :	pyruvate kinase du foie
LTB4 :	leucotriène B4
MAPK :	« mitogen-activated protein kinase »
MODY :	« maturity-onset diabetes of the young »
NF- κ B :	« nuclear factor- κ B »
NIDDM :	« non-insulin-dependent diabetes mellitus »
NLS :	site de localisation nucléaire
NO :	oxyde nitrique
NOS :	NO synthétase
PBS :	solution de tampon phosphate
PC :	prohormone convertase
PDGF :	« platelet-derived growth factor »
PDH :	pyruvate déshydrogénase
PDK :	« phosphoinositide-dependent protein kinase »
PDX-1 :	« pancreatic and duodenum homeobox protein 1 »
PFK :	phosphofructokinase
PGJ2 :	prostaglandine J2
PI-3K :	phosphatidylinositol-3 kinase
PKA :	protéine kinase A
PKB :	protéine kinase B
PKC :	protéine kinase C
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate
PMSF :	phénylméthylsulfonyl fluoride
PPARs :	« peroxisome proliferator activated receptors »
PPRE :	élément de réponse aux PPARs

PTEN :	« phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten »
PTP-1B :	protéine tyrosine phosphatase-1B
RXR :	récepteur X à l'acide rétinolique
SH :	« src homology domain »
SIE :	« sis-inducible enhancer »
SPT :	sérine palmitoyltransférase
SRE :	élément de réponse au sérum
SRF :	« serum-response factor »
STAT :	« signal transducer and activator of transcription »
TAD :	domaine de transactivation
TCF :	« ternary complex factors »
TNF :	« tumor necrosis factor »
TRE :	élément de réponse au PMA
TZD :	troglitazone
UCP :	protéine découplante
VIP :	« vasoactive intestinal peptide »
ZDF :	« Zucker diabetic fatty »

Remerciements

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Marc Prentki, pour son aide précieuse, son encouragement et son dévouement.

Je tiens aussi à remercier le Dr Enrique Roche qui m'a initié à la recherche lors d'un stage d'été entrepris dans le laboratoire du Dr Prentki. Je le remercie pour sa patience et sa contribution aux résultats de ce mémoire.

Je suis reconnaissant envers tous les gens du laboratoire que j'ai côtoyés au cours de ces années. Votre aide et vos conseils me sont précieux.

Enfin, je remercie tous les membres de ma famille ainsi que mes amis qui m'ont constamment encouragé tout au cours de ma maîtrise. Votre présence à vous tous est importante.

*Je dédicace ce mémoire de maîtrise
Au Dr Marc Prentki et au Dr Enrique Roche
Qui m'ont été tous deux d'une aide précieuse
Et qui ont stimulé mon intérêt pour la recherche,
En particulier sur la cellule pancréatique β*

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1- LE DIABÈTE

1.1- STATISTIQUES

Le diabète, un désordre métabolique connu depuis des centaines d'années, prédispose à une mort prématurée. Bien qu'il fasse l'objet de recherches de plus en plus intensives, la nature même de la maladie n'est pas entièrement connue. Le diabète, en particulier le diabète de type 2, prend maintenant des proportions épidémiques dans les pays industrialisés (Zimmet, 1995) et touche de plus en plus de nationalités partout à travers le monde (O'Dea, 1991; King, 1993). Alors que l'incidence de la maladie ne cesse de croître, on rapporte qu'elle atteint de plus en plus de personnes en bas âge. On compte actuellement plus de 120 millions de diabétiques dans le monde (type 1 et type 2 confondus) et on estime que ce nombre passera à près de 220 millions d'ici 10 ans (de Courten et Zimmet, 1997). Le traitement du diabète et de ses complications se fait à un coût extrêmement élevé représentant près de 10% du budget des soins de la santé en Amérique du Nord et ceci au désavantage évident des nations sous-développées et des minorités (Songer et Zimmet, 1995).

1.2- LA PATHOLOGIE

Le diabète est un désordre métabolique provoqué par l'absence, ou l'insuffisance relative et l'inefficacité de l'insuline. Suite à cette déficience relative en insuline, la concentration de glucose circulant demeure élevée chez le patient diabétique et peut mener au développement de plusieurs complications. Parmi celles-ci, on note les problèmes microvasculaires menant à la cécité, la néphropathie, la neuropathie et à une incapacité à cicatriser les blessures.

Selon plusieurs critères, on définit deux types de diabète que l'on nomme diabète de type 1 et 2. Le diabète de type 1 ne représente qu'environ 5% des cas de diabète à travers le monde. Il est causé par une destruction des cellules pancréatiques β , cellules ayant pour rôle la sécrétion d'insuline suite à une élévation de la glycémie. C'est pourquoi on le nomme IDDM (« insulin-dependent diabetes mellitus »), c'est-à-dire qu'il peut être corrigé par des injections d'insuline et le patient en sera dépendant durant toute sa vie. La destruction des cellules β peut être attribuable à une réaction auto-immune ou encore à différents agents toxiques (toxines, virus, etc.) (Hattersley, 1998).

Le diabète de type 2 (ou NIDDM pour « non-insulin-dependent diabetes mellitus ») ne peut être corrigé par une simple injection d'insuline. Il apparaît généralement plus tard chez les patients (après 40 ans). Le diabète de type II se caractérise initialement par une résistance à l'insuline qui sera compensée par une hyperinsulinémie. La glycémie est donc corrigée grâce à cet effet compensatoire des cellules pancréatiques β qui sécrètent une plus grande quantité d'insuline. Par la suite, lors d'une étape plus tardive, des désordres dans la sécrétion d'insuline et une destruction des cellules pancréatiques β empêcheront l'effet compensatoire de ces dernières. Outre l'hérédité, on dénombre de nombreux facteurs qui prédisposent au diabète de type II dont l'obésité auquel le diabète de type II semble être étroitement lié. Les facteurs de progression de la maladie sont tout aussi variés (sédentarité, diète, etc.) et on s'entend généralement pour dire que le diabète de type II est une maladie multifactorielle (DeFronzo, 1997; Hattersley, 1998).

1.3- LES GÈNES DU DIABÈTE OU DIABÉTOGÈNES

Dans certains cas, on a identifié des défauts uniques menant à l'apparition du diabète chez des individus. Entre autres, une mutation dans un gène primordial à certaines fonctions de la cellule β peut à lui seul causer un diabète précoce que l'on

nomme MODY (« maturity-onset diabetes of the young »). Sur les six formes de diabète MODY que l'on connaît à l'heure actuelle, cinq sont la conséquence d'une mutation dans un gène codant pour un facteur de transcription. En effet, une mutation causant l'inactivation du facteur de transcription HNF4 α (« hepatocyte nuclear factor-4 α ») causera le diabète de type MODY1; de HNF1 α , le type MODY3; de PDX-1 (« pancreatic and duodenal homeobox protein-1 »), le type MODY4 (Habener et Stoffers, 1998) et de HNF1 β , le type MODY5 (Froguel et Velho, 1999). Le sixième gène code pour la glucokinase, enzyme limitante pour la glycolyse dans la cellule pancréatique β et le foie (Habener et Stoffers, 1998).

De toutes récentes études portant sur l'inactivation de certains gènes chez des animaux ont déterminé de nouveaux candidats pour provoquer le diabète monogénique. C'est entre autres le cas de la protéine « insulin receptor substrate 2 » (IRS2). Des souris déficientes (ou « knock-out ») pour le gène IRS2 ont présenté une résistance à l'insuline, une masse de cellules pancréatiques β réduite, un mauvais fonctionnement de la cellule pancréatique β et une détérioration de l'homéostasie du glucose (Withers et al., 1998). Ce sont là des défauts similaires à ceux rencontrés chez un patient diabétique de type 2 et les résultats indiquent qu'un mauvais fonctionnement de la voie signalétique IR/IRS/PI-3K (Récepteur à l'insuline/ « insulin receptor substrate »/ phosphatidylinositol-3 kinase) pourrait contribuer à l'apparition ou à la progression de la pathologie du diabète de type 2. D'ailleurs, plusieurs études ont ciblé cette voie depuis afin de tenter d'expliquer les nombreuses altérations métaboliques provoquées par le diabète de type 2 (Kulkarni et al., 1999; Withers et al., 1999; Elchebly et al., 1999).

2- L'HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE

2.1- DÉFINITION

L'homéostasie du glucose peut être définie par le maintien d'une glycémie relativement stable dans une zone physiologique allant de 3.6 mM à 6.1 mM de glucose. Elle résulte d'un équilibre entre l'ingestion de glucose ou la production hépatique de glucose d'un côté et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques de l'autre. Elle est principalement contrôlée par l'action de deux hormones pancréatiques, soit l'insuline qui représente un signal d'abondance hypoglycémiant et le glucagon, un agent hyperglycémiant (Ashcroft, 1992; Guyton, 1996).

2.2- L'INSULINE

Le pancréas endocrine est constitué des îlots de Langerhans qui sont à leur tour composés d'une variété de 4 types cellulaires distincts. Les cellules β qui comptent pour 70 % de la masse cellulaire des îlots sont responsables de la sécrétion d'insuline. Les autres 30 % sont constitués des cellules α qui sécrètent le glucagon, des cellules δ qui sécrètent la somatostatine et des cellules PP qui sécrètent le polypeptide pancréatique (Greenspan, 1991).

L'insuline est une hormone composée de deux chaînes polypeptidiques liées par deux ponts disulfures. Elle est synthétisée sous la forme d'une préprohormone et elle subira une suite de modifications dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi avant d'être emmagasinée dans des granules de sécrétion sous forme d'hexamères (Ashcroft, 1992; Guyton, 1996).

L'insuline constitue un signal d'abondance en glucose pour l'organisme et possède donc une action hypoglycémiante. Elle a aussi un effet prolifératif (Rabinovitch et al., 1982; Romanus et al., 1985) et peut augmenter la survie de plusieurs types cellulaires par son action anti-apoptotique (Yenush et al., 1998; Navarro et al., 1998; Bertrand et al., 1999).

2.3- LE RÉCEPTEUR À L'INSULINE ET LA TRANSDUCTION DU SIGNAL

2.3.1- LE RÉCEPTEUR À L'INSULINE ET LES INSULIN-RECEPTOR SUBSTRATES 1-2 (IRS1-2)

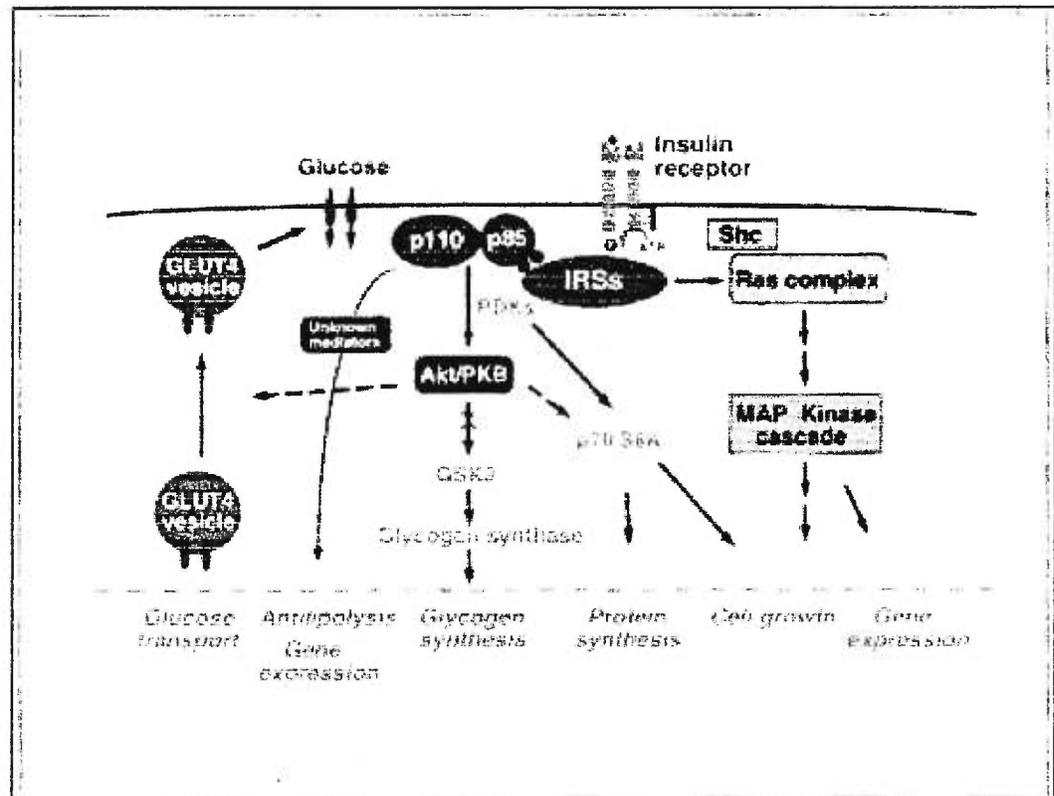


Figure 1 : Les voies de transduction de signaux activées en réponse à l'insuline. IRSs, « insulin receptor substrates »; PDKs, « phosphoinositide-dependent protein kinases »; GSK3, kinase 3 de la glycogène synthétase; Akt/PKB, protéine kinase B; p110 et p85, respectivement les sous-unité catalytique et régulatrice de la PI-3K. Les lignes pointillées représentent des actions présentement sous étude (d'après Kahn B., *Cell* (1998) 92 : 593-596).

Le récepteur à l'insuline (IR) est une glycoprotéine hétérotétramérique composée de deux chaînes α extracellulaires et de deux chaînes β transmembranaires. Les chaînes α et β sont reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne α est responsable de l'interaction avec le ligand. L'insuline s'y liera dans une région riche en cystéines, ce qui cause une autophosphorylation des chaînes β sur plusieurs résidus tyrosines. Cette autophosphorylation est nécessaire à l'activation de la voie de transduction du signal en réponse à l'insuline (Cheatham et Kahn, 1995). L'inactivation du récepteur à l'insuline implique sa déphosphorylation par la protéine tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) (Elchebly et al., 1999). Une récente étude sur des animaux déficients en PTP-1B a d'ailleurs démontré que cette protéine est impliquée dans la modulation de la sensibilité à l'insuline et dans le métabolisme énergétique (Elchebly et al., 1999).

La transduction du signal suite à la liaison de l'insuline à son récepteur s'effectue par une cascade de phosphorylations (Figure 1). En aval du récepteur à l'insuline, on retrouve premièrement les molécules IRS dont les membres IRS-1 et IRS-2 sont les plus étudiés. Elles sont exprimées dans de nombreux types cellulaires et sont activées en réponse à divers facteurs de croissance tel que l'EGF («epidermal growth factor») (Case et al., 1994; Holgado-Madruga et al., 1996), le PDGF («platelet-derived growth factor») (Case et al., 1994; Myers et al., 1995), l'IGF-1 («insulin-like growth factor») (Keller et al., 1993), etc. Alors que IRS-1 et IRS-2 participent tous deux à la transduction des mêmes signaux en réponse aux facteurs de croissance, IRS-1 jouerait un rôle prédominant par rapport à IRS-2 dans la transduction des signaux menant à la croissance embryonnaire et post-natale. D'un autre côté, IRS-2 aurait un rôle plus important que IRS-1 dans la transduction des signaux modulant le métabolisme des glucides (Withers et al., 1999).

Les molécules IRS possèdent de nombreux sites de phosphorylation et peuvent servir de substrats pour plusieurs kinases dont les tyrosines kinases, les sérine/thréonine kinases, la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). La phosphorylation des molécules IRS provoque leur association à diverses

protéines de liaison (« docking proteins ») possédant des domaines « src homology domain 2 » (SH 2) qui elles-mêmes recrutent d'autres protéines signalétiques telle la PI-3K et ras (Keller et al., 1993) par leur domaine SH3 (« src homology domain 3 »).

2.3.2- LA PHOSPHATIDYLINOSITOL-3 KINASE (PI-3K)

La PI-3K est une enzyme activée par de nombreux facteurs de croissance (Vanhaesebroeck et al., 1997) dans de multiples types cellulaires. Elle tire son nom du fait qu'elle phosphoryle l'anneau inositol du phosphatidylinositol (PI) en position 3 pour donner du PI-3,4 phosphate à partir du PI-4 phosphate et du PI-3,4,5 phosphate à partir du PI-4,5 phosphate (MacDougall et al., 1995). La réaction inverse est catalysée par la phosphatase PTEN (« phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten ») qui déphosphoryle les phosphatidylinositols à la position 3. L'intérêt grandissant pour PTEN provient du fait qu'elle supprime la formation de tumeurs (Machama et Dixon, 1998; Cantley et Neel, 1999).

On accorde à la PI-3K une importance capitale dans la signalisation induite par l'insuline de par son implication dans la grande majorité des effets biologiques provoqués par cette dernière. En effet, la PI-3K active la voie Raf/MAPK (« mitogen-activated protein kinase), ce qui mène subséquentement à des actions diverses dont la phosphorylation de facteurs de transcription modulant la réponse nucléaire (Castillo et al., 1998); l'activation de la P70S6Kinase pour augmenter la synthèse protéique (Thomas et Hall, 1997) et enfin, la phosphorylation des « phosphatidylinositol-dependent kinases» (PDKs) qui à leur tour activent les protéines kinase B (PKB) aussi appelées Akt (Anderson et al., 1998). La PKB a aussi une multitude d'effecteurs. Suite à son activation par la PI-3K en réponse à l'insuline, la PKB bloque l'apoptose et augmente la survie cellulaire via la phosphorylation de la protéine BAD (del Peso et al., 1997), active la synthèse du glycogène via la phosphorylation de la protéine « glycogen synthase kinase-3 » (GSK-3) (Cross et al., 1995), augmente l'expression d'une enzyme critique de la

lipogénèse, soit l'acides gras synthétase (FAS) (Wang et Sul, 1998) et stimule la translocation de vésicules contenant les transporteur du glucose GLUT4 à la surface cellulaire afin d'augmenter la capture du glucose dans les tissus périphériques (Cong et al., 1997).

2.3.3- UNE SIGNALISATION AUTO- OU PARACRINE DE L'INSULINE SUR LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

De nombreux groupes ont suggéré au cours des dernières années la présence et l'importance d'une signalisation auto- ou paracrine de l'insuline sur la cellule pancréatique β . Ainsi, Velloso *et al.* ont montré que l'insuline cause l'activation de son récepteur, la phosphorylation des molécules IRS-1/2, de même que leur association à la PI-3K dans la cellule pancréatique β (Velloso et al., 1995). Cette activation de la voie signalétique par l'insuline d'une manière auto- ou paracrine pourrait mener à l'expression du gène de l'insuline et à une augmentation du contenu en insuline dans la cellule pancréatique β (Xu et Rothenberg, 1998). En outre, l'inactivation spécifique du récepteur à l'insuline au niveau du pancréas endocrine (cellules β) chez la souris a créé un défaut de la sécrétion d'insuline similaire à celui rencontré dans le diabète de type 2 (Kulkarni et al., 1999). En effet, la réponse sécrétoire au glucose était altérée alors que celle induite par l'arginine restait normale. Enfin, une autre étude portant sur des animaux « knock-out » a permis de conclure que IRS-2 jouait un rôle majeur dans le développement de la cellule pancréatique β et dans la compensation à la résistance à l'insuline (Withers et al., 1999), mettant une fois de plus en évidence l'importance de la voie de transduction du signal IR/IRS/PI-3K dans la cellule pancréatique β .

3- LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

3.1- LA SÉCRÉTION D'INSULINE

3.1.1- LES MÉCANISMES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE

Malgré les nombreuses études et les efforts déployés par plusieurs groupes de recherche, le mécanisme précis par lequel le glucose stimule la sécrétion d'insuline n'a pas été entièrement élucidé. Un modèle largement admis lie étroitement la sécrétion d'insuline induite par le glucose à la glycolyse et à l'élévation des concentrations d'ATP et de Ca^{2+} intracellulaires (Figure 2).

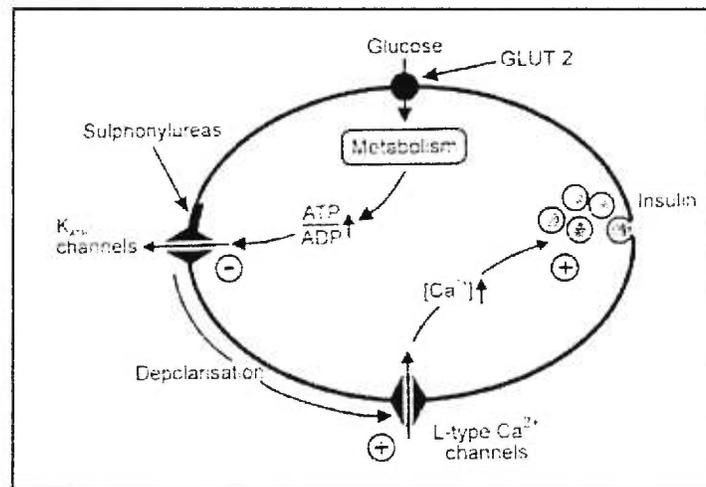


Figure 2 : Modèle pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans la cellule pancréatique β . GLUT2, Transporteur du glucose 2 (D'après Gromada J. *Eur J Physiol* (1998) 435 : 583-594).

Selon ce modèle, le glucose est transporté à l'intérieur de la cellule par la protéine membranaire GLUT2. Il est ensuite phosphorylé par la glucokinase, l'enzyme limitante de la glycolyse, avant d'entrer dans la voie glycolytique. Pour chaque molécule de glucose, deux molécules de pyruvate sont alors générées, lesquelles

sont transportées dans la mitochondrie où elles entrent dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA pour générer de l'ATP. La hausse du rapport ATP/ADP cytosolique a pour effet d'induire la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP, la dépolarisation de la membrane plasmique et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium dans le cytoplasme de la cellule β déclenche alors l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline.

Des études ultérieures ont démontré toutefois que le glucose pouvait induire la sécrétion d'insuline d'une manière dose-dépendante en présence de diazoxide (un agent pharmacologique qui empêche la fermeture des canaux potassiques) et d'une concentration cytosolique de Ca^{2+} élevée. La sécrétion d'insuline induite par le glucose fait donc appel à un mécanisme alternatif qui serait indépendant de son action sur les canaux potassiques. Ce mécanisme demeure encore inconnu à ce jour bien qu'une majorité de groupes de recherche se rallient à l'hypothèse selon laquelle l'anaplérose (une augmentation des intermédiaire du cycle de Krebs) pourrait être impliquée (Brun et al., 1996; Prentki et Corkey, 1996; Schuit et al., 1997).

3.1.2- LES SÉCRÉTAGOGUES DE LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

La sécrétion d'insuline peut être induite par deux catégories d'agents, soit les nutriments calorigéniques et les agents neurohormonaux (Figure 3).

Parmi les nutriments calorigéniques pouvant agir comme sécrétagogue, on retrouve bien entendu le glucose mais aussi les acides gras (tels que l'oléate et le palmitate) et les acides aminés (tels que la leucine et la glutamine). L'action sécrétagogue des nutriments calorigéniques nécessite obligatoirement qu'ils soient métabolisés.

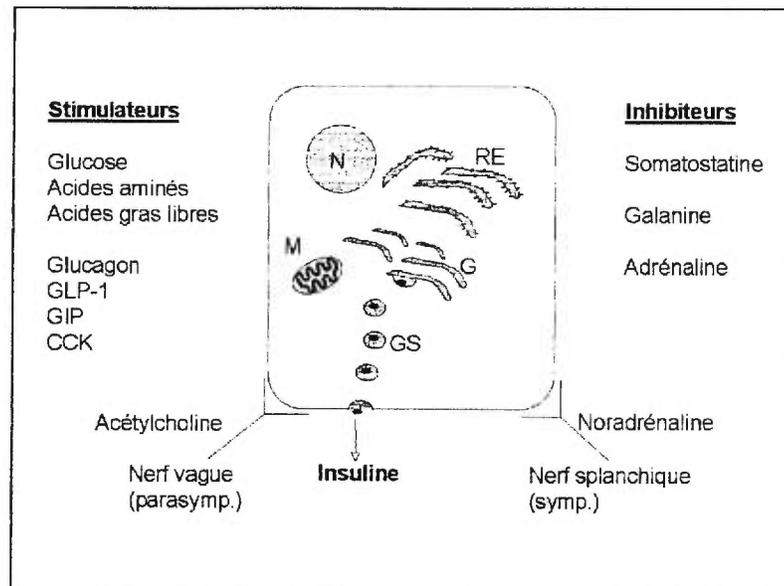


Figure 3 : Principaux stimulateurs et inhibiteurs de la cellule β pour la sécrétion d'insuline. GLP-1, glucagon-like peptide-1 ; GIP, glucose-dependent insulintropic polypeptide; CCK, cholécystokinine; parasymp., parasympatique; symp., sympathique.

Dans la catégories des agents neurohormonaux on retrouve majoritairement des hormones du tractus gastro-intestinal tels que le glucagon, le « glucose-dependent insulintropic polypeptide » (GIP), le « vasoactive intestinal peptide » (VIP) et le « glucagon-like peptide-1 » (GLP-1). L'effet de ces glucoincrétines sur la sécrétion d'insuline nécessite la liaison de l'agent à son récepteur et l'activation de voies de transduction de signaux.

3.2- PROLIFÉRATION ET DIFFÉRENTIATION DE LA CELLULE β

Tel que décrit plus haut, le diabète est caractérisé par une incapacité à produire suffisamment d'insuline pour répondre aux exigences de l'organisme. Cette

incapacité de la cellule β à compenser pour sa dysfonction peut s'expliquer en partie par une diminution de sa réplication (Hellerstrom, 1988) et par un dérèglement de la balance réplication/apoptose (Sjoholm, 1996; Tanigawa et al., 1996). Une capacité limitée à la régénération prédisposerait donc à la maladie (Swenne, 1992). D'ailleurs, on a observé que la masse de cellules β est diminuée chez un patient diabétique type 2 par rapport à un sujet sain de même poids (Kloppel et al., 1985). Pour ces raisons, les agents augmentant la prolifération de la cellule β et les mécanismes impliqués dans sa réplication font l'objet de nombreuses études.

L'augmentation de la masse de cellules β s'effectue par deux mécanismes distincts soit 1) par la différenciation de cellules β immatures en cellules β matures (appelée aussi néogénèse) et 2) par la réplication des cellules β déjà existantes (Scharfmann and Czernichow, 1996).

3.2.1- DIFFÉRENCIATION ET NÉOGÉNÈSE DE LA CELLULE β

La régénération de la masse de cellules β provient majoritairement de la différenciation de cellules précurseurs par un processus de néogénèse puisque la réplication des cellules β existantes est très faible. Deux hypothèses différentes divisent les groupes de recherche travaillant dans le domaine de la néogénèse de la cellule β , bien qu'elles ne soient pas forcément contradictoires.

Selon une première hypothèse, on pourrait retrouver une quantité de cellules souches toujours disponibles pour la différenciation dans le pancréas. Il est généralement admis qu'une quantité de cellules souches demeurent dans le canal pancréatique (Bonner-Weir et al., 1993) et dans les acini (Pour, 1994). Certains diront que la preuve que ces cellules peuvent se différencier en cellules β fonctionnelles n'a pas été démontrée hors de tout doute (Bouwens, 1998). Pour cela, il faudrait suivre une cellule souche unique et provoquer sa différenciation en

une cellule β mature fonctionnelle exprimant les marqueurs moléculaires propres à la cellule β , ce qui n'a pas été fait à ce jour. Un premier pas a toutefois été fait en cette direction. Une publication récente rapporte que des cellules sécrétant de l'insuline ont pu être obtenues à partir de cellules souches embryonnaires (Soria, 2000) et que leur transplantation dans des souris devenues diabétiques suite à des traitements à la streptozotocine a corrigé la glycémie.

Selon une deuxième hypothèse, la régénération de la cellule β impliquerait plutôt un mécanisme de transdifférenciation, c'est-à-dire une quantité de cellules différenciées aurait la possibilité de « revenir en arrière » vers un état moins différencié leur permettant de se convertir et se multiplier en cellules β fonctionnelles. Le travail de Wang au cours duquel on a suivi la transdifférenciation d'une cellule du canal pancréatique jusqu'à l'apparition de marqueurs moléculaires spécifiques à la cellule β (tel que le transporteur de glucose GLUT2) supporte cette hypothèse (Wang et al., 1995).

Enfin, une récente étude a démontré que l'hyperglycémie chronique provoque une hypertrophie et une dédifférenciation de la cellule β (Jonas et al., 1999). Ces changements morphologiques corrélerent avec une diminution de l'expression de certains facteurs de transcription et de gènes importants pour la sécrétion d'insuline (Jonas et al., 1999). Il a été suggéré que la dédifférenciation de la cellule β provoquée par son exposition prolongée à de hautes concentrations de glucose pourrait contribuer au défaut de sécrétion d'insuline dans la pathologie du diabète.

3.2.2- RÉPLICATION DE LA CELLULE β

On estime que la production de nouvelles cellules β par réplication équivaut à 3% par jour et décline avec l'âge. En fait, seulement 10% de la population de cellules β garderait sa capacité à se répliquer, les autres entrant dans une phase G_0 infinie (Swenne, 1983).

Le glucose est bien entendu un stimulateur connu et bien documenté de la prolifération des cellules β adultes et fœtales (Hellerstrom, 1988). Son métabolisme semble essentiel à ce processus puisque le fructose et le 3-O-méthylglucose sont sans effet sur la prolifération de la cellule β (King et Chick, 1976; King et al., 1978; Swenne et al., 1980). La mitogénèse des îlots de rats en réponse au glucose semble impliquer aussi l'activation de la voie de transduction de signaux de la protéine kinase C et des petites protéines G (Sjoholm, 1997). Parmi les nutriments ayant un effet prolifératif sur la cellule pancréatique β , on retrouve aussi les acides aminés (Swenne et al., 1980) et certains acides gras. En effet, certains acides gras, dont l'acide oléique et l'acide α -linoléique, induisent la prolifération des îlots néo-nataux d'une manière dose-dépendante contrairement aux acides palmitique, stéarique et linoléique qui n'ont aucun effet sur la prolifération de la cellule β (Roche et al., 1999).

Parmi les hormones prolifératives les plus étudiées, on retrouve l'hormone de croissance et la prolactine. L'hormone de croissance et la prolactine augmentent toutes deux la prolifération de la cellule β par un mécanisme impliquant la voie Janus kinase 2 (JAK2)/ « signal transducer and activator of transcription » (STAT) et plus précisément STAT 1 et 3 (Sekine et al., 1996) ou encore STAT5 (Cousin et al., 1999). L'insuline et « l'insulin-like growth factor-1 » (IGF-1), qui sont deux hormones sécrétées par la cellule β , exercent aussi une action proliférative sur la cellule β par un mécanisme auto- ou paracrine (Rabinovitch et al., 1982; Romanus et al., 1985). Les travaux du groupe du Dr Rhodes ont permis de démontrer l'implication de la voie IRS/PI-3K dans l'action proliférative de l'IGF-1 sur la cellule pancréatique β (Schuppin et al., 1998; Hugl et al., 1998). L'action proliférative de l'IGF-1 est glucose-dépendante (Hugl et al., 1998).

Enfin, certaines hormones ont un effet inhibiteur sur la réplication de la cellule β et c'est le cas par exemple des agonistes α -adrénergiques qui causent non seulement

une inhibition de la prolifération mais aussi une inhibition de la sécrétion d'insuline (Sjoholm, 1996). Certaines cytokines, entre autres l'interleukine-1 β , le TNF (« tumor necrosis factor ») et l'interféron- γ causent aussi une inhibition de la prolifération de la cellule β et promeuvent l'apoptose (Southern et al., 1990; Eizirik et al., 1991)

Plusieurs études ont démontré que la mitogénèse de la cellule β pouvait impliquer la synthèse d'AMPc et l'activation de la voie de transduction du signal AMPc/PKA. Toutefois, l'implication de l'AMPc demeure un sujet de discordance dans la littérature puisque certains défendent son action proliférative alors que d'autres rapportent un effet inhibiteur de l'AMPc sur la prolifération de la cellule pancréatique β .

Ainsi, la forskoline (un agent activateur de l'adénylate cyclase) et le Sp-cAMP (un analogue de l'AMPc) augmentent tous deux la prolifération de la cellule β néonatale en culture (Sjoholm, 1991; Sjoholm, 1992). Par contre, la forskoline diminue la prolifération de la lignée cellulaire β TC1 (Lavergne et al., 1992). Un autre analogue de l'AMPc, le 8-Br-cAMP augmente la réplication de la cellule β néo-natale (Rabinovitch et al., 1980). On a rapporté que le dibutyryl-cAMP augmente (Rabinovitch et al., 1980; Logothetopoulos et al., 1983) ou diminue (Swenne, 1982) la prolifération de la cellule β . La théophylline qui est un inhibiteur de la phosphodiesterase (enzyme responsable de la dégradation de l'AMPc) diminue la réplication de la cellule β en culture (Nielsen, 1985). Toutefois, l'usage d'un autre inhibiteur de la phosphodiesterase, soit l'isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) à de faibles doses, a augmenté la réplication (Rabinovitch et al., 1980; Nielsen, 1985) alors qu'il l'a diminuée à de hautes concentrations (Rabinovitch et al., 1980).

On voit donc qu'il y a mésentente quant à l'effet du cAMP sur la prolifération de la cellule β . Toutefois, il faut être prudent lors de l'analyse de ces résultats car les

agents employés ne sont pas tous spécifiques. Ainsi, l'emploi du dibutyryl-cAMP, par exemple, produit du butyrate qui est connu pour être un inhibiteur de la prolifération (Sjoholm, 1992). Le conflit peut donc provenir de plusieurs facteurs dont 1) le type cellulaire utilisé (lignées cellulaires, îlots de rats adultes ou pré-nataux), 2) le choix des agents pharmacologiques et 3) la concentration utilisée.

Un constat très intéressant vient du fait que la réplication de la cellule β semble corrélée avec la biosynthèse d'insuline. Bien que l'hypothèse selon laquelle ces deux processus qui se suivent en parallèle pourraient être liés ait été déjà énoncée (Sjoholm, 1992), elle n'a pas fait l'objet de recherches approfondies.

4- FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE MITOGÉNIQUE

La réponse précoce aux divers agents mitogènes implique des voies de transduction de signaux menant ultimement à l'activation, souvent par phosphorylation, de facteurs de transcription. La phosphorylation d'un facteur de transcription peut en effet changer sa localisation cellulaire, augmenter ou diminuer sa liaison à l'ADN et moduler son activité transcriptionnelle (Hunter, 1991). Le champ des facteurs de transcription est extrêmement étendu. Dans cette introduction, nous nous limiterons à la description de deux facteurs de transcription étudiés au cours de notre travail de maîtrise.

4.1- AP-1

4.1.1- FONCTIONS BIOLOGIQUES DE AP-1

AP-1 (« activating protein-1 ») est un ensemble de facteurs de transcription composés d'homodimères entre les membres de la famille de gènes à réponse précoce JUN ou ATF (« Activating transcription factor ») et encore d'hétérodimères entre celles de JUN (c-jun, junB et junD) et FOS (c-fos, v-fos, fosB, Fra-1 et Fra-2) d'une part ou ATF (ATF2, ATF3 et B-ATF) d'autre part. Le complexe AP-1 génère un motif « leucine-zipper » qui lui permet de se lier à son élément de réponse nommé TRE pour « élément de réponse au PMA » et qui consiste en une séquence palindromique : TGA^C/G^TTCA. On a nommé ainsi l'élément de réponse à AP-1 puisque ce dernier est impliqué dans la modulation de l'expression de certains gènes induits par l'ester de phorbol 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA). Toutefois, les complexes composés des membres ATF-JUN et ATF-ATF lient avec une affinité plus grande l'élément de réponse à l'AMPc (CRE) dont la séquence consensus est proche de celle du TRE : TGACGTCA (Karin, 1992; Karin et al., 1997). L'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 est essentielle à la réponse à certains signaux mitogéniques (Piechaczyk et Blanchard, 1994; Schreiber et al., 1999), à la réponse cellulaire à plusieurs stress (Ausserer et al., 1994), à l'induction de l'apoptose (Bossy-Wetzel et al., 1997) et au développement (Lian et al., 1991). Un mauvais contrôle de l'activité transcriptionnelle de AP-1 peut mener à une croissance aberrante et à des transformations oncogéniques.

4.1.2- RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE AP-1

En plus de la régulation effectuée au niveau de l'hétérodimérisation des membres du complexe AP-1, les membres des familles FOS, JUN et ATF peuvent être la

cible de plusieurs voies de transduction de signaux dont les voies MAPK, P38 et JNK (Jun Kinases) (Karin, 1995). La phosphorylation de certains résidus peut favoriser ou inhiber la liaison à l'ADN ou encore modifier l'activité transcriptionnelle de AP-1. L'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 est aussi modulée par les interactions du complexe avec une variété de coactivateurs/corépresseurs (tels que JAB1 (« jun activation domain binding protein 1 »), CBP (« CREB binding protein ») et p202).

4.2- L'EXPRESSION DES GÈNES À RÉPONSE PRÉCOCE COMPOSANT LE COMPLEXE AP-1

Le promoteur du gène *c-fos* comporte un CRE qui permet une modulation de l'expression du gène en réponse aux augmentations des niveaux intracellulaires de cAMP et de Ca^{2+} induites par les neurotransmetteurs et les hormones polypeptidiques (Sheng et al., 1991). On y retrouve aussi un site SIE (« sis-inducible enhancer ») reconnaissant les facteurs de transcription STAT et un SRE (élément de réponse au sérum) reconnaissant un dimère SRF/TCF (« serum-response factor/ternary complex factors ») (Treisman, 1992; Darnell, 1996). Quant à *c-jun*, il est induit rapidement par plusieurs stimuli dont les facteurs de croissances, les cytokines et les irradiations aux UV (Karin, 1995). Son expression est généralement modulée via un TRE reconnu par les dimères c-jun /ATF2 (van Dam et al., 1993). Contrairement aux membres des familles FOS et JUN, ATF2 est exprimé constitutivement et sa régulation se situe donc au niveau post-translational par phosphorylation (Karin, 1995).

L'activité de AP-1 et l'expression des membres des familles FOS et JUN peuvent être modulées par divers stimuli nutritionnels. Premièrement, leur expression est augmentée par plusieurs agents provoquant des élévations de calcium dans divers types cellulaires (Roche et Prentki, 1994). La régulation transcriptionnelle de *c-fos* s'effectue non seulement au niveau de son promoteur mais aussi en partie au niveau du site d'un bloc à l'élongation, situé dans le premier intron du gène

(Mechti et al., 1991; Collart et al., 1991; Werlen et al., 1993). L'arrêt de la transcription pourrait être causée par des modifications au niveau du complexe transcriptionnelle de l'ARN polymérase II (Spencer et Groudine, 1990) et serait supprimé par la transduction du signal induit par le calcium (Coulon et al., 1999). De récentes études effectuées par notre groupe de recherche sur la lignée cellulaire pancréatique β INS-1 ont démontré que le glucose et le GLP-1 agissent en synergie pour augmenter l'expression de certaines composantes de AP-1 (tels que *c-fos*, *c-jun* et *junB*) (Susini et al., 1998). La forte induction de l'expression de *c-fos* par le glucose et le GLP-1 implique les voies de transduction de signaux AMPc/PKA et Ca^{2+} / « calmodulin dependent protein kinases » dirigées toutes deux vers le CRE du promoteur et vers un élément de réponse situé dans le premier intron du gène en aval du site du bloc à l'élongation (Susini et al., 2000). Les acides gras (tels que l'oléate et le palmitate) induisent aussi l'expression de *c-fos* dans les cellules INS-1 via l'activation de certaines isoformes de la PKC. Cette action des acides gras nécessite une concentration cytosolique de Ca^{2+} élevée (Roche et al., 1999). Une étude antérieure a déjà démontré que les acides gras induisent *Fral* (un autre membre de la famille FOS) dans les préadipocytes et les fibroblastes (Distel et al., 1992).

4.3- PDX-1

4.3.1- FONCTIONS BIOLOGIQUES DE PDX-1

Le gène PDX-1 (aussi appelé IDX-1 pour « islets and duodenum homeobox protein 1 ») code pour une protéine qui fait partie du groupe des « homeobox proteins » (Figure 4). Les protéines « homeobox » jouent un rôle crucial lors du développement et régulent l'expression de gènes clés conférant à un type cellulaire un phénotype spécifique. PDX-1 régule donc des gènes nécessaires au développement du pancréas endocrine mais qui n'ont toujours pas été identifiés à ce jour. L'invalidation (knock-out) du gène PDX-1 chez la souris a complètement

inhibé le développement du pancréas (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). Aussi, les souris hétérozygotes (+/-) pour une mutation inactivatrice de PDX-1 se développent normalement mais présentent une masse de cellules β réduite. D'ailleurs, un tel phénotype existe chez l'humain où un pancréas absent est associé avec une mutation dans le gène PDX-1 pour un individu homozygote alors que les individus hétérozygotes développent un diabète précoce (Stoffers et al., 1997). Une autre évidence de l'implication de PDX-1 dans le développement du pancréas provient du fait que des altérations telles les pancréatectomies (Sharma et al., 1999) ou des traitements à la streptozotocine (Fernandes et al., 1997) induisent une expression de PDX-1 qui corrèle avec la régénération des cellules β .

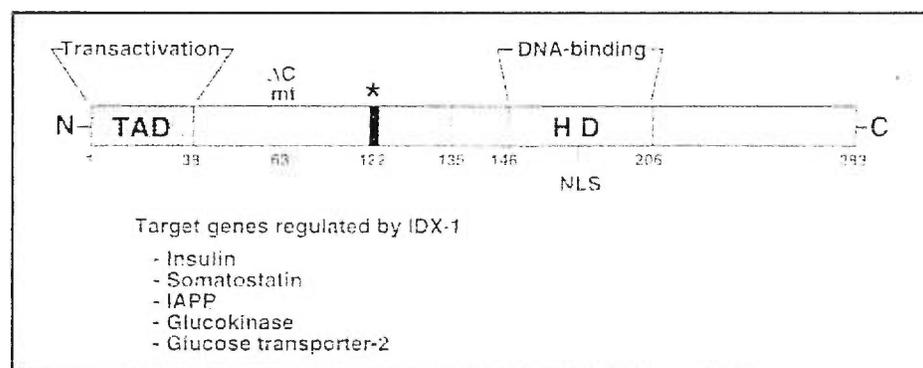


Figure 4 : Représentation schématique de la structure du facteur de transcription PDX-1. Les gènes cibles reconnus par PDX-1 sont énumérés. La délétion de la cytosine (Cmt) au codon 63 est responsable de l'apparition du diabète de type MODY4 en provoquant un déphasage du cadre de lecture qui génère un codon « stop » (représenté par l'astérisque au codon 122). TAD, domaine de transactivation; HD, homéodomaine; NLS, site de localisation nucléaire; (D'après Habener J. *Proc Assoc Am Physicians* (1998) 110 : 12-21)

Le grand intérêt que suscite PDX-1 provient aussi du fait qu'il régule l'expression du gène de l'insuline. On retrouve en effet des sites de liaison pour PDX-1 dans le promoteur des gènes de l'insuline I et II chez le rat et du gène de l'insuline chez l'humain sur lesquels PDX-1 agit de concert avec les protéines «basic helix-loop-helix» (bHLH) (Habener et Stoffers, 1998). Ainsi, chacun des promoteurs contiennent des « enhancers » eux-mêmes constitués de sites adjacents de liaison pour PDX-1 et pour les protéines bHLH (E2A, et beta2/neuroD) (Habener et Stoffers, 1998) qui agiront en synergie pour augmenter l'expression du gène de l'insuline. On sait aussi que l'hyperglycémie ou l'exposition prolongée de la cellule pancréatique β à de hautes concentrations en glucose diminue l'expression des gènes de PDX-1 et de l'insuline (Olson et al., 1995; Sharma et al., 1995; Marshak et al., 1999). Cette observation fournit une explication plausible à la glucotoxicité de la cellule pancréatique β , c'est-à-dire une production et une sécrétion d'insuline déficientes suite à l'hyperglycémie chronique (Yki-Jarvinen, 1992).

4.3.2- RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE PDX-1

L'activité et l'expression de PDX-1 semblent être sous le contrôle de stimuli nutritionnels. En effet, une concentration de glucose élevée active la liaison de PDX-1 à l'ADN par un mécanisme impliquant la PI-3K et P38 (Macfarlane et al., 1997) alors que le palmitate diminue l'expression et l'activité de PDX-1, réduisant par conséquent les niveaux de GLUT2, de la glucokinase et de l'insuline (Gremlich et al., 1997). Il est à noter que les gènes de GLUT2 et de la glucokinase contiennent, de même que celui de l'insuline, des éléments de réponse à PDX-1 dont la séquence consensus est : TAATT/G. Cette activation par le glucose de la voie PI-3K menant à l'activation de PDX-1 peut expliquer l'effet insulino-tropique du glucose tel que suggéré par le groupe de Docherty (Macfarlane et al., 1997).

4.4- NUR-77

NUR-77 est un récepteur nucléaire qui est induit lors de l'apoptose des cellules T (Lee et al., 1995). Il y a contradiction dans la littérature sur le fait que NUR-77 pourrait agir sous la forme d'un monomère (Wahli et Martinez, 1991; Parker, 1993) ou dimère (Wu et al., 1997; Maira et al., 1999) pour lier l'ADN. Une publication récente de notre groupe de recherche a montré que le glucose agit en synergie avec l'AMPc pour augmenter l'expression de NUR-77 (Susini et al., 1998). NUR-77 constitue un paradigme pour l'étude des gènes à réponse précoce induit par le Ca^{2+} (Roche et Prentki, 1994).

5- ACIDES GRAS ET ÉTIOLOGIE DU DIABÈTE ADIPOGÉNIQUE DE TYPE 2

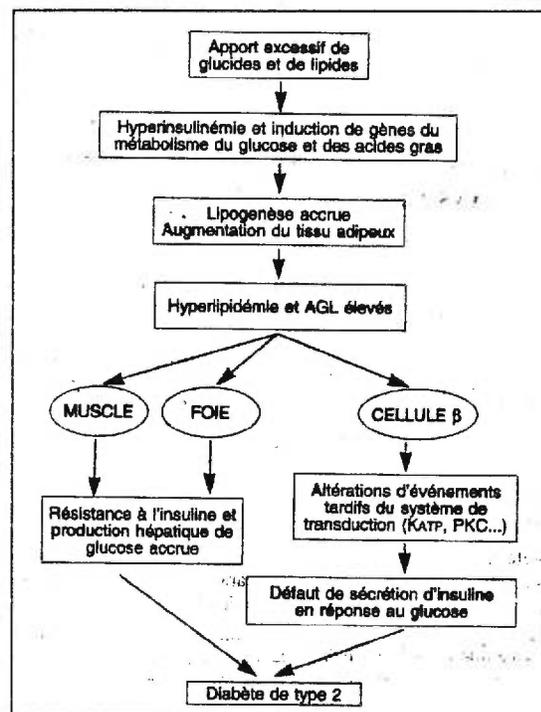


Figure 5 : Modèle nutritionnel de la pathogénèse du diabète de type 2.

Une relation possible existante entre le diabète et l'obésité est illustrée. Selon une hypothèse généralement admise, les hauts niveaux d'acides gras circulants associés à des épisodes hyperglycémiques pourraient modifier le système de transduction métabolique de la cellule pancréatique β .

L'obésité représente un facteur de risque pour le développement du diabète de type 2 et il est généralement admis que l'hyperlipidémie pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse du diabète de type II en altérant d'une part la réponse à l'insuline des tissus cibles de l'hormone et d'autre part la réponse au glucose de la cellule pancréatique β . On sait qu'au cours du développement de la maladie, la résistance à l'insuline accompagne l'obésité mais qu'une glycémie normale est maintenue grâce à un effet compensatoire de la cellule β . Cette dernière sécrète plus d'insuline, jusqu'au point où elle ne pourra plus compenser la demande et à ce stade débute le NIDDM (Rahier et al., 1983). C'est ce qu'on appelle alors la phase de décompensation. Les patients obèses présentent donc généralement une insulïnémie élevée à jeun et une faible sécrétion d'insuline post-prandiale (Unger, 1995; Prentki et Corkey, 1996).

5.1- EFFETS DES ACIDES GRAS SUR LA SÉCRÉTION D'INSULINE

Les effets des acides gras sur la cellule pancréatique β et en particulier sur la sécrétion d'insuline ne sont pas totalement élucidés. *In vivo*, une élévation chronique des niveaux d'acides gras, suite à une infusion d'une émulsion d'intralipides, augmente la sécrétion d'insuline (Boden et al., 1995; Unger, 1995). Cet effet pourrait être dû tout au moins en partie à l'action de facteurs extrapancréatiques tels qu'une inhibition du système nerveux sympathique (Magnan et al., 1999).

En revanche, une infusion de l'acide gras monoinsaturé oléate diminue la réponse insulínique au glucose (Mason et al., 1999). Les intralipides contiennent en grande partie l'acide gras polyinsaturé α -linoléique (C18:2). Ces résultats en apparence

contradictoires peuvent être expliqués par le fait que des acides gras de types différents ont été infusés dans ces deux types d'étude.

In vitro, par contre, les effets des acides gras (oléate, palmitate et linoléate) sur la sécrétion d'insuline sont divergents en fonction du temps d'incubation des cellules pancréatiques β en leur présence. À court terme, les acides gras augmentent la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Crespin et al., 1973). À long terme, une exposition des cellules β à de hautes concentrations d'acides gras a pour effet d'augmenter le niveau basal d'insuline sécrétée, de diminuer les niveaux d'insuline emmagasinée et de diminuer d'une manière dose-dépendante la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (Sako and Grill, 1990; Brun et al., 1996; Brun et al., 1997; Bollheimer et al., 1998; Segall et al., 1999).

Comment expliquer cette diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose causée par les acides gras? Des études antérieures ont rapporté que les acides gras diminuent l'oxydation du glucose (Zhou et Grill, 1994; Liang et al., 1997; Hosokawa et al., 1997). Il était ainsi attirant de tenter d'expliquer l'effet inhibiteur des acides gras sur la sécrétion d'insuline par cette diminution du métabolisme du glucose. Toutefois, on a pu montrer récemment que cette légère diminution de l'oxydation du glucose n'est pas impliquée dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline par les acides gras (Liang et al., 1997; Segall et al., 1999). On a aussi tenté d'expliquer l'effet des acides gras sur la sécrétion d'insuline par la présence d'un cycle de Randle. Le cycle de Randle prédit qu'une inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) causée par une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA, et une inhibition de la phosphofructokinase (PFK) causée par de hauts niveaux de citrate contribuent à la diminution du métabolisme du glucose (Randle, 1998). En effet, une oxydation accrue des acides gras devrait augmenter la production mitochondriale d'acétyl-CoA et, par un effet de masse, favoriser la synthèse du citrate par la citrate synthase. Deux publications récentes démontrent cependant qu'un tel cycle ne peut expliquer l'effet complexe des acides gras sur la sécrétion d'insuline (Liang et al., 1997; Segall et al., 1999). D'autres hypothèses

proposent que l'effet inhibiteur des acides gras sur la sécrétion d'insuline pourrait impliquer 1) l'accumulation dans la cellule pancréatique β de triglycérides qui corrèle avec le défaut sécrétoire (Zhou et al., 1996); 2) une diminution de l'activité de la PKC causée par les acides gras à long terme comme c'est le cas avec l'ester de phorbol PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) (Thams et al., 1990). En effet, tout comme le PMA, les acides gras à longues chaînes (AGLC) peuvent activer la PKC dans la cellule β (Alcazar et al., 1997); 3) une inhibition de la fermeture par le glucose des canaux potassiques ATP-dépendants qui pourrait être provoquée par les acyl-CoA à longue chaîne carbonée qui sont réputés pour les ouvrir (Larsson et al., 1996); 4) une induction de la protéine découplante UCP2 (protéine découplante 2) résultant en une inhibition de l'augmentation de la production d'ATP en réponse au glucose (Lameloise, N., Prentki, M., et Assimacopoulos-Jeannet, F., soumis pour publication); 5) une diminution de la conversion de la proinsuline en insuline et une diminution de l'insuline emmagasinée (Bjorklund et Grill, 1999; Furukawa et al., 1999); et enfin 6) une cytotoxicité des acides gras sur la cellule pancréatique β . Il faut souligner que ces différents effets ne sont pas exclusifs en raison d'une action supposément pléiotropique des acides gras sur la cellule pancréatique β .

Enfin, il est clairement établi que les acides gras jouent un rôle essentiel pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose ou d'autres stimuli car une diminution majeure de la lipolyse supprime l'action à court terme de tous les sécrétagogues (Stein et al., 1996; Dobbins et al., 1998)

5.2- EFFETS DES ACIDES GRAS SUR L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE LA CELLULE β ET LA CONVERSION DE LA PROINSULINE EN INSULINE

Le mécanisme par lequel les acides gras modulent l'expression de certains gènes commence à susciter l'intérêt de nombreux groupes de recherche. En effet, on sait maintenant que les acides gras peuvent directement moduler l'expression génique et non pas seulement indirectement via des changements hormonaux comme on le

pensait auparavant. L'activation des facteurs de transcription tels que les PPARs par les acides gras a été rapportée (voir figure 6) (Lemberger et al., 1996) mais bien peu d'études portent sur la cellule β . Les PPARs forment des complexes dimériques avec RXR pour se lier à leur élément de réponse, le PPRE (« PPAR responsive element »). La famille des PPARs comprend les isoformes α , β et γ qui ont chacune des fonctions distinctes et une distribution tissulaire différente (Schoonjans et al., 1996). Alors que la fonction de PPAR β est inconnue, on sait que PPAR α et PPAR γ sont impliqués dans le métabolisme lipidique ainsi que dans la prolifération et la différenciation cellulaire, la carcinogénèse et enfin l'apoptose (Brun et Spiegelman, 1997; Desvergne et al., 1998). Il a été proposé que les PPARs agiraient donc comme des senseurs des niveaux physiologiques d'acides gras afin de réguler le métabolisme des lipides (Forman et al., 1997). Il est donc attrayant d'émettre l'hypothèse selon laquelle une modulation de l'activité de liaison à l'ADN des PPARs par les acides gras pourrait modifier l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme, de la prolifération et de l'apoptose pouvant ainsi expliquer l'effet pléiotropique des acides gras sur la cellule pancréatique β .

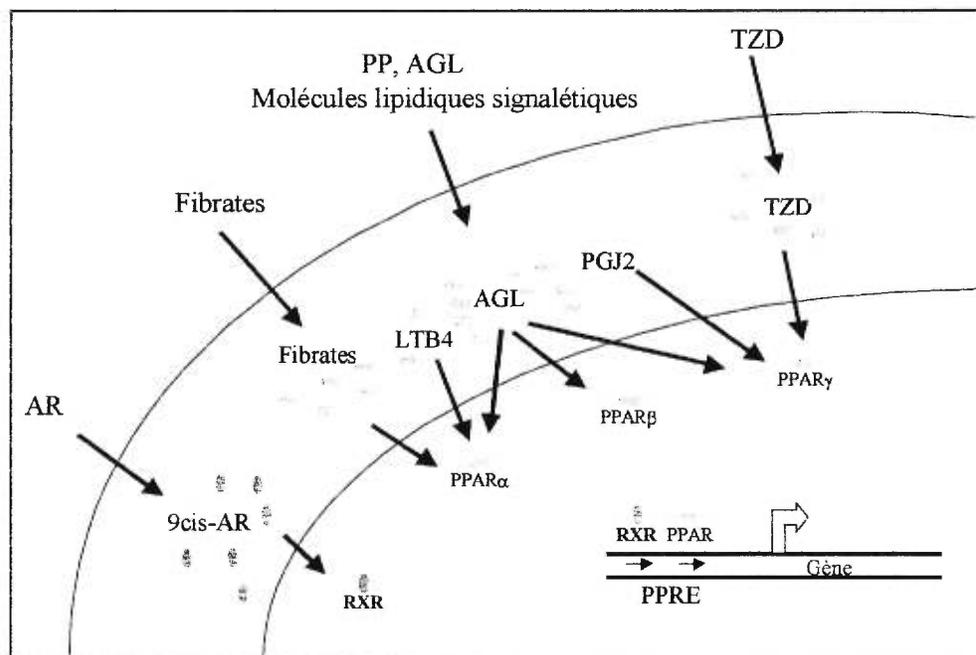


Figure 6 : Principaux activateurs et mode d'action des PPARs (« peroxisome proliferator-activated receptors »). AR, acide rétinoïque; AGL, acides gras libres; PP, polypeptides; TZD, troglitazone; LTB₄, leucotriène B₄; PGJ₂, prostaglandine J₂; PPRE, élément de réponse aux PPARs; RXR, récepteur X à l'acide rétinoïque.

Il a été montré que le palmitate diminue l'expression du gène de l'insuline, du transporteur du glucose GLUT2 et de la glucokinase dans la cellule pancréatique β via une diminution de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription PDX-1 (Gremlich et al., 1997). Toutefois, on ne sait toujours pas si cet effet du palmitate lui est propre ou s'il est partagé par les acides gras en général. Les acides gras induisent considérablement, dans la cellule β (INS), le gène de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1) qui catalyse l'étape limitante de l'oxydation des graisses (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997). De plus, les acides gras diminuent l'expression de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme qui synthétise le malonyl-CoA, un métabolite clé régulant l'oxydation des graisses via son action inhibitrice sur la CPT-1 (Brun et al., 1997). Ces actions combinées pourraient contribuer à la sécrétion élevée d'insuline à bas glucose (Segall et al., 1999) en accroissant l'oxydation des acides gras et ainsi la production d'ATP, un facteur de couplage pour la cellule pancréatique β .

Une exposition prolongée des cellules β aux acides gras augmente le niveau de proinsuline mais diminue les concentrations intracellulaires d'insuline de même que la conversion de la proinsuline en insuline (Furukawa et al., 1999). Il en résulte une élévation du rapport proinsuline/insuline intracellulaire. Les acides gras semblent en effet diminuer les niveaux des « prohormones convertases » (PC) PC2 et PC3, de même que celui d'une protéine activatrice de PC2, 7B2 (Furukawa et al., 1999), ce qui pourrait expliquer la diminution de la conversion de la proinsuline en insuline. Une autre étude a démontré que le palmitate combiné à de hautes concentrations en glucose diminue les niveaux de proinsuline et d'insuline,

en plus d'augmenter de près de 5 fois le rapport proinsuline/insuline dans les îlots (Bjorklund et Grill, 1999).

5.3- LIPOTOXICITÉ CHEZ LA CELLULE PANCRÉATIQUE β

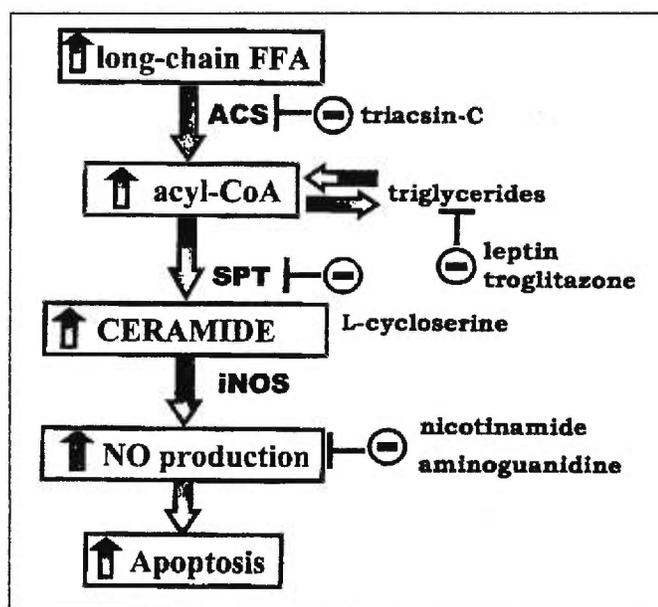


Figure 7: Modèle de la lipotoxicité chez la cellule pancréatique β . Une relation possible existante entre les hauts niveaux d'acides gras libres (FFA) ou de triglycérides et la mort des cellules β par apoptose est illustrée. SPT, sérine palmitoyltransférase; ACS, acyl-CoA synthétase; iNOS, oxyde nitrique synthétase inducible. (D'après Unger R. *Proc Natl Sci USA* (1999) 96 : 2327-2332)

Le rat ZDF (« Zucker diabetic Fatty rat ») constitue un modèle utile pour l'étude de la pathogénèse du diabète de type 2 associée à l'obésité (appelé diabète adipogénique). Les rats ZDF deviennent obèses en raison d'une mutation homozygote dans le gène codant pour le récepteur à la leptine (Iida et al., 1996; Phillips et al., 1996). Alors que la leptine prévient normalement l'accumulation

exagérée de gras, les rats ZDF démontrent des dépôts adipeux dans les îlots et les autres tissus non-adipocytaires. Ces dépôts sont associés à de hauts niveaux d'acides gras libres et de triglycérides intracellulaires dans la cellule pancréatique β . La présence de tels dépôts adipeux pourrait jouer un rôle central dans l'induction du diabète progressif impliquant une décompensation de la cellule β par un phénomène de lipotoxicité (Lee et al., 1994; Unger, 1995). Au cours de la progression de la maladie, les rats ZDF traversent un stade prédiabétique (à partir de la 7^e semaine) et diabétique (à partir de la 14^e semaine) marqués par l'accumulation progressive de triglycérides dans les îlots (Lee et al., 1994; Shimabukuro et al., 1998b). Ainsi, au stade diabétique, on croit que des dépôts adipeux et des contenus en triglycérides de plus de 500 ng/îlot (soit 50 fois le niveau normal) causent une dysfonction de la cellule β , une réduction du nombre de cellules β par apoptose et le diabète (voir figure 7) (Shimabukuro et al., 1998b).

Chez le rat ZDF, l'apoptose de la cellule β est donc probablement induite par les niveaux élevés d'acides gras circulants et intracellulaires, par la formation de céramides et par une augmentation de la production de NO dans les cellules β (voir figure 7) (Shimabukuro et al., 1998b; Shimabukuro et al., 1998a). Les niveaux de céramides sont en effet augmentés dans les îlots de rats ZDF prédiabétiques et diabétiques (Shimabukuro et al., 1998b). Ils peuvent être générés soit à partir de la voie de la sphingomyéline par la sphingomyélinase ou encore par la synthèse *de novo* via la sérine palmitoyltransférase (SPT) et la céramide synthétase (voir figure 8 ci-dessus). Les hauts niveaux de triglycérides contenus dans les îlots de rats ZDF constituent une source probable de palmitoyl-CoA nécessaire à la formation *de novo* des céramides (Shimabukuro et al., 1998a). Les cibles de la voie des céramides connues à ce jour comprennent la « ceramide-activated protein phosphatase » (Wolff et al., 1994) et la PKC ζ (Lozano et al., 1994), une isoforme atypique de PKC. La voie des céramides peut induire la différenciation cellulaire (Alessenko et al., 1999), la prolifération (Olivera et al., 1999) ou encore l'arrêt de prolifération (Kondo et al., 2000) selon la nature du stimulus et le type cellulaire.

Par contre, l'activation de cette voie constitue généralement un signal apoptotique dans plusieurs types cellulaires (Mathias et al., 1998).

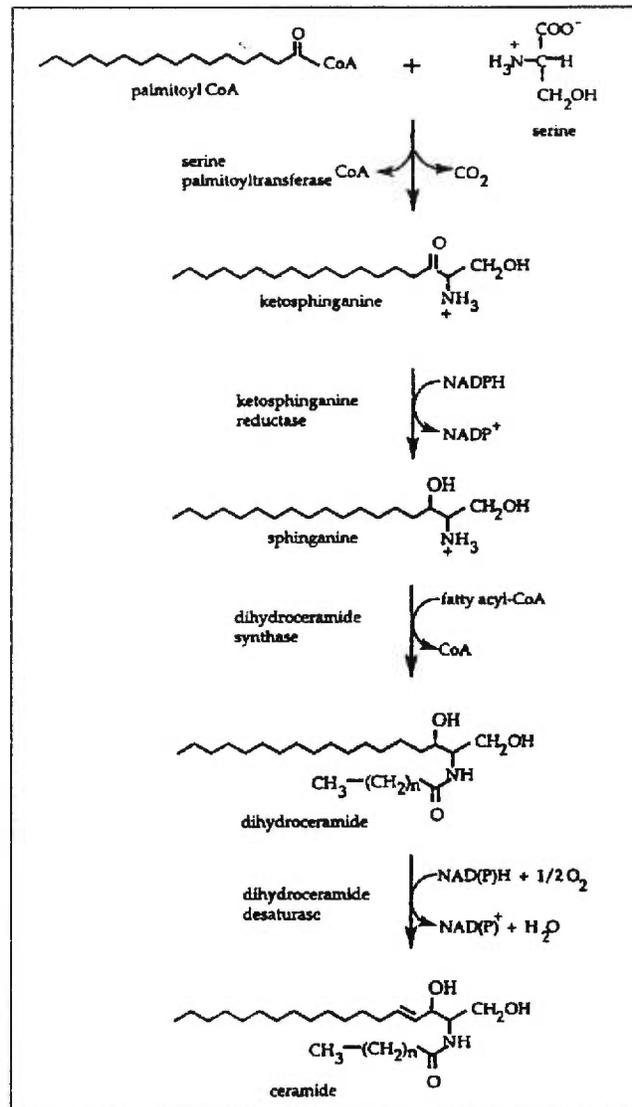


Figure 8 : Biosynthèse *de novo* des céramides. (D'après Perry D. *J. Biol. Chem.* (2000) 275 : 9078-9084)

6- THÉMATIQUE ET BUT DU TRAVAIL DE MAÎTRISE

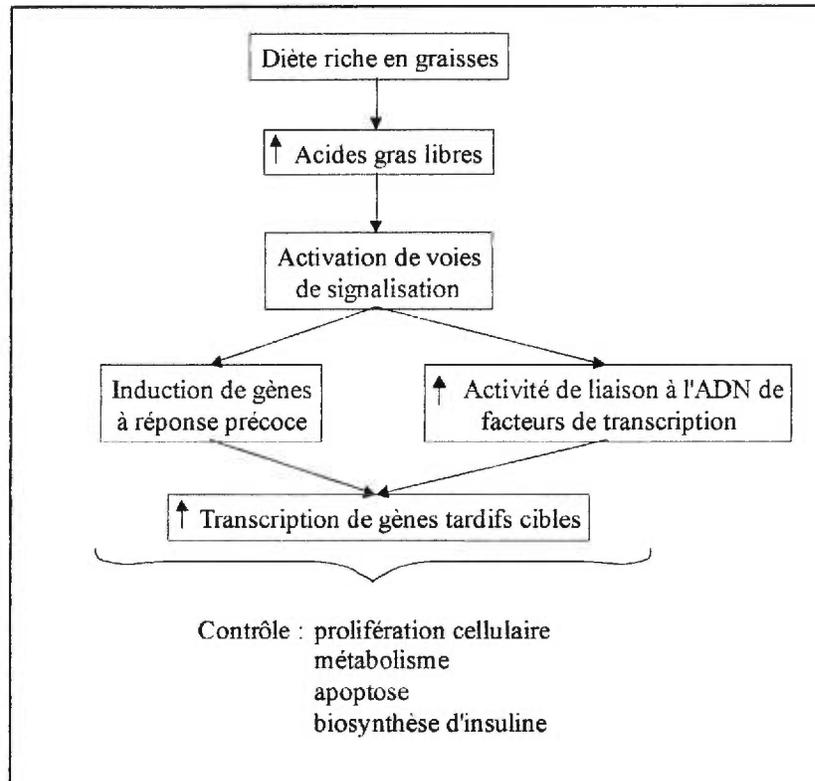


Figure 9 : Représentation schématique de l'hypothèse de travail.

L'hypothèse de travail, expliquant comment de hauts niveaux d'acides gras circulants pourraient modifier le système de transduction métabolique de la cellule pancréatique β et participer à la pathogénèse du diabète de type 2, est illustrée.

Dans l'étiologie du diabète de type 2 associé à l'obésité, les acides gras à longues chaînes (AGLC) pourraient initialement participer au phénomène de compensation par la cellule pancréatique β de la résistance à l'insuline en augmentant la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et en augmentant la prolifération des cellules pancréatiques β . Toutefois, de hauts niveaux de AGLC en circulation sur de plus longues périodes semblent être néfastes pour la cellule pancréatique β .

Afin de comprendre les changements phénotypiques de la cellule pancréatique β induits par les AGLC, nous avons étudié l'effet de deux acides gras abondants de la diète (soit l'oléate et le palmitate) sur l'expression de *c-fos* et d'autres gènes à réponse précoce. Ces gènes représentent des candidats intéressants puisqu'ils sont connus pour être activés par le calcium et les nutriments (Roche et Prentki, 1994; Distel et al., 1992) et ils sont impliqués dans l'expression de différents gènes tardifs régulant le métabolisme, la différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Karin, 1992; Karin et al., 1997) (fig. 9). Nous avons aussi évalué l'activité du facteur de transcription AP-1, qui est composé de dimères des membres des familles JUN, FOS et ATF, par retard sur gel. L'hypothèse selon laquelle l'expression de *c-fos* pourrait corrélérer avec la prolifération de la cellule pancréatique β a été testée afin de savoir s'il pouvait être impliqué dans un possible effet prolifératif des acides gras. Nous avons de plus étudié l'effet de l'oléate et du palmitate sur la voie de transduction de signaux de la PI-3K, une cascade signalétique intéressante puisqu'elle est activée en réponse à de nombreux facteurs de croissance dans divers types cellulaires (Vanhaesebroeck et al., 1997). Enfin, nous avons aussi étudié l'effets des deux acides gras sur l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. Ce facteur de transcription, dont des mutations causent un diabète de type 2, est situé en aval de la PI-3K et il est impliqué dans l'expression du gène de l'insuline ainsi que de gènes importants pour le transport et le métabolisme du glucose dans la cellule pancréatique β .

Pour ce faire, nous avons utilisé la lignée cellulaire insulino-sécrétoire INS-1 dérivée de cellules pancréatiques β provenant d'une tumeur induite chez le rat par irradiation aux rayons X (Asfari et al., 1992). Ces cellules représentent un bon modèle de cellules pancréatiques β puisqu'elles sécrètent l'insuline en réponse aux concentrations physiologiques de glucose d'une manière similaire aux cellules normales.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel : Les acides gras (acides oléique et palmitique) ont été achetés chez Sigma (St-Louis, MO). Le milieu RPMI 1640 et les suppléments (incluant le sérum de veau fœtal) ont été obtenus chez Gibco BRL (Burlington, ON). La thymidine tritiée a été achetée chez ICN (Costa Mesa, CA).

Culture cellulaire et incubation : Les cellules INS-1 (passages 36 à 70) sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 contenant 10 mM HEPES, 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 50 μ M β -mercaptoéthanol, 100 IU/mL pénicilline et 100 μ g /mL streptomycine à 37 °C dans une atmosphère humide (5% CO₂, 95% air). Lorsqu'elles atteignent une confluence de 80% (environ 7 jours), les cellules sont lavées avec du PBS (solution de tampon phosphate) et préincubées pour 48 h dans un milieu RPMI contenant seulement 5 mM glucose. Les cellules sont par la suite lavées au PBS et incubées pour différents temps dans un milieu RPMI sans sérum contenant 0,5% BSA (albumine de bœuf) et différents nutriments calorigéniques (glucose et acides gras).

Préparation des solutions d'acides gras liés à l'albumine : Le sel de palmitate ou d'oléate est dissout à 37 °C dans une solution de BSA 5%. Une fois l'acide gras dissout, le pH est ajusté à 7,4 et la solution est filtrée sur un filtre de 0,45 μ m. La concentration en acide gras est ensuite déterminée par un dosage enzymatique utilisant le kit NEFA C (Wako Chemicals, Richmond, VA). La concentration d'acide gras est ajustée à 4 mM d'une manière à obtenir une solution 10 fois concentrée.

Isolation de l'ARN et analyse par northern blot : L'ARN total des cellules INS, incubées pendant 1 h dans du RPMI sans sérum contenant 0,5% de BSA et 5 mM glucose en présence ou en absence d'acides gras, est isolé par la méthode guanidine isothiocyanate/phénol/chloroforme. 15 μ g d'ARN dénaturé dans du

glyoxal et du diméthylsulphoxide est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2%. L'ARN est transféré sur une membrane de nylon par capillarité et détecté par hybridation avec une sonde ADNc marquée au P³². Un fragment α -actine humaine (PstI 1-720 PvuII) dans le plasmide pSP65 et une coloration au bleu de méthylène sont utilisés pour normaliser les niveaux d'ARNm.

Western blot (immunobuvardage) : Les cellules INS-1 cultivées dans des pétris de 10 cm de diamètre ont été lavées au PBS et les protéines totales extraites en ajoutant 0,5 ml d'un tampon de lyse contenant 50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 100 μ g/ml PMSF, 1 μ g/ml aprotinine et 1% Triton X-100. 60 mg d'extraits sont chargés sur un gel SDS-PAGE 10% pour électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose (BioRad, Richmond, CA). La protéine c-Fos est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique obtenu chez Calbiochem (Toronto, ON).

Préparation des extraits nucléaires et EMSA (« electrophoretic mobility shift assay ») : Les extraits nucléaires sont isolés selon une méthode déjà publiée (Han et al., 1991). En bref, les cellules (40×10^6 par condition) incubées pendant 2 h en présence des différents acides gras dans un milieu RPMI sans sérum contenant 0,5% BSA et 5 mM glucose sont recueillies, lavées dans du PBS froid, sédimentées à 3 500 g pendant 4 min et lysées dans un tampon A (15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH 7,4), 0.1% phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 0.5% Nonidet P-40). Les noyaux sont alors centrifugés (100g pendant 5 min) et lavés dans du tampon A sans Nonidet P-40. La lyse s'effectue ensuite en ajoutant 10 μ l d'un tampon contenant 2 mM KCl, 25 mM HEPES (pH 7,4), 0.1% EDTA et 1 mM dithiothreitol (DTT). Après une incubation de 15 min sur glace, on ajoute 300 μ l d'un tampon contenant containing 25 mM HEPES, 1 mM DTT,

0.1% PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 0.1 mM EDTA et 11% glycerol. Les échantillons sont alors centrifugés à 16 000 g pendant 20 min et le surnageant contenant les protéines nucléaires est conservé à -80 °C avant l'analyse. Les oligonucléotides utilisés pour les essais de retard sur gel (méthode EMSA) ont été achetés chez ACGT (Toronto, ON). Un oligonucléotide de 30 paires de bases contenant une séquence de la boîte A1 du promoteur de l'insuline 1 de rat a été utilisé pour mesurer l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 (Macfarlane et al., 1994). Un oligonucléotide de 28 paires de bases contenant une séquence consensus de reconnaissance pour AP-1 (Ausserer et al., 1994) a été utilisé pour mesurer l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1. Un oligonucléotide de 23 paires de bases contenant une séquence consensus de reconnaissance pour HNF-4 (Geneka, Montréal, PQ) a été utilisé pour mesurer l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription HNF-4. Les oligonucléotides double-brins sont marqués avec du [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP en utilisant le « DNA 5'-end-labeling kit » de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Les essais de retard sur gel sont réalisés selon une méthode déjà publiée (Fried et Crothers, 1981). En bref, 5 µg de protéines d'extraits nucléaires sont incubés avec la sonde marquées (20 000 cpm par échantillon) pendant 20 min à la température de la pièce dans un tampon contenant 25 mM HEPES (pH 7,4), 10% glycerol, 50 mM NaCl, 0.05% Nonidet P-40 et 1 mM DTT. Un excès de 50 X d'oligonucléotides non-marqués a été ajouté au mélange réactionnel pour démontrer la spécificité de la liaison à l'ADN pour les différents facteurs de transcription. Les échantillons sont chargés sur un gel de polyacrylamide 4% non-dénaturant.

Incorporation de thymidine tritiée : Les cellules ont étéensemencées 48 h avant utilisation dans des plaques de 96 puits à raison de 80,000 cellules par puits et

cultivées dans du milieu RPMI régulier tel que décrit plus haut. Les cellules sont alors lavées dans du PBS et préincubées pour une période de 24 h dans un milieu RPMI minimal (sans sérum, sans glucose et contenant 0,1% BSA). Les cellules sont ensuite incubées pour 24 h en présence de différents agents (oléate, palmitate et glucose) dans le milieu RPMI minimal. La prolifération est déterminée par des mesures d'incorporation de thymidine tritiée (1 μ Ci/puits) pendant les 4 dernières heures de l'incubation de 24 h. Les cellules sont ensuite recueillies à l'aide d'un « PHD cell harvester » de Cambridge Technology (Watertown, MA) et la radioactivité retenue sur des filtres de fibre de verre est mesurée.

Mesure de l'activité de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K) : La PI-3K est immunoprécipitée à partir de 2 à 3 mg de protéines totales et resuspendue dans 50 μ l d'un tampon contenant 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl et 100 mM EGTA. Après une préincubation de 10 min avec 10 μ g de L- α -phosphatidylinositol, 10 μ Ci de [γ 32P]-ATP est ajouté avec 10 mM MgCl₂. Les réactions effectuées à température ambiante sont alors arrêtées après 4 min avec 0.15 ml d'un mélange de CHCl₃-MeOH-HCl (100:200:2). Les lipides sont extraits et déposés sur des plaques de silice pour chromatographie sur couche mince (Sun et al., 1991).

Statistiques : Les moyennes des résultats sont représentées \pm ESM. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le programme SPSS pour Windows. 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

L'oléate et le palmitate augmentent l'expression du gène c-fos dans les cellules INS-1.

L'effet des acides gras sur les niveaux d'ARNm de différents gènes à réponse précoce a été étudié par northern blot. La figure 10 démontre que deux acides gras parmi les plus abondants de la diète, soit l'oléate (C18:1, ω 9) et le palmitate (C16:0), causent une accumulation du transcrite de *c-fos* après 60 min. Le glucose, un autre nutriment calorigénique et un puissant sécrétagogue de la cellule pancréatique β , n'a pas d'effet sur l'expression de *c-fos*. Les résultats révèlent que les agents pharmacologiques PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate), un ester de phorbol activant la voie de signalisation de la PKC et un agent inducteur de tumeur, et la forskoline, un activateur de la voie de transduction de signaux AMPc/PKA, produisent une forte induction de *c-fos*. De plus, la dépolarisation de la cellule par une haute concentration de KCl causant un influx de Ca^{2+} dans la cellule augmente le niveau du transcrite de *c-fos*.

Nous avons aussi vérifié l'effet des acides gras sur d'autres gènes à réponse précoce pouvant être impliqués dans l'effet pléiotropique des acides gras. Ainsi, l'oléate et le palmitate augmentent l'expression du gène à réponse précoce *nur-77* mais n'ont pas influencé les niveaux de *junB*, un membre de la famille JUN (fig. 10).

La figure 11 démontre que l'induction des gènes à réponse précoce *c-fos* et *nur-77* semble spécifique aux acides gras saturés à longue chaîne (myristate (C14:0) et palmitate (C16:0)) et monoinsaturés (oléate (C18:1, ω 9)). En effet, les acides gras saturés à courte chaîne (decanoate (C10:0) et octanoate (C8:0)) et polyinsaturés (linoléate (C18:2, ω 6), linoléate (C18:3, ω 3), docosahexaénoate (C22:6, ω 3), et

arachidonate (C20:4, ω 6)) n'ont pas influencé les niveaux des transcrits *c-fos* et *nur-77*. Le 2-bromo-palmitate, un analogue non-métabolisable du palmitate, n'a pas eu d'effet sur l'expression de *c-fos* et *nur-77* tandis que le clofibrate, un agoniste de PPAR- α , a augmenté légèrement le niveau du transcrit de *nur-77*.

Afin de savoir si l'induction de *c-fos* par les acides gras cause une accumulation de la protéine c-FOS, nous avons extrait les protéines totales de cellules INS-1 incubées en absence ou en présence d'acides gras pendant 2 h puis analysé les niveaux de c-FOS par western blot. La figure 12 montre que l'oléate et le palmitate augmentent les niveaux de la protéine c-FOS par un facteur d'environ 30% et 80% respectivement. Bien que les résultats s'avèrent statistiquement significatifs par le test de Student, l'effet de l'oléate ne l'est pas lorsque analysé à l'aide du test ANOVA (Analysis of variance). L'effet de l'oléate deviendrait significatif selon cette méthode avec la compilation d'un plus grand nombre de données. Ces résultats indiquent que l'induction du transcrit de *c-fos* est accompagnée par une augmentation de sa protéine correspondante.

L'oléate et le palmitate augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1.

Afin de savoir si l'augmentation du niveau de la protéine c-FOS corrèle avec une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1, un facteur de transcription composé de dimères des membres des familles JUN, FOS et ATF (Karin, 1992; Karin et al., 1997), nous avons effectué des essais de retard sur gel (méthode EMSA). Le complexe AP-1 lie son élément de réponse grâce aux domaines de liaison à l'ADN des facteurs de transcription dont il est composé (Karin, 1992; Karin et al., 1997). L'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 est essentielle à la réponse à certains signaux mitogéniques (Piechaczyk et Blanchard, 1994; Schreiber et al., 1999), à la réponse cellulaire à plusieurs stress (Ausserer et

al., 1994), à l'induction de l'apoptose (Bossy-Wetzell et al., 1997) et au développement (Lian et al., 1991).

Les protéines nucléaires des cellules INS-1 ont été extraites après 2 h d'incubation en absence ou en présence d'acides gras. La figure 13 montre que la liaison à l'ADN du complexe AP-1 est augmentée de près de 30% par l'oléate et de 40% par le palmitate. Encore une fois, les résultats s'avèrent statistiquement significatifs par le test de Student mais l'effet de l'oléate ne l'est pas lorsque analysé à l'aide du test ANOVA. L'effet de l'oléate deviendrait significatif selon cette méthode avec la compilation d'un plus grand nombre de données. Ce résultat indique que l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1 corrèle avec l'expression du gène *c-fos* et l'accumulation de la protéine (voir les figures 10 et 12).

L'oléate, mais pas le palmitate, augmente l'activité de la PI-3K et l'incorporation de la thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1.

Nous avons par la suite évalué la prolifération cellulaire par des mesures d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1 afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de *c-fos* par les acides gras pouvait induire un tel changement phénotypique. Ainsi, les cellules INS-1 ont été incubées pendant 24 h dans un milieu RPMI sans sérum contenant 0,5% BSA et 5mM glucose en absence ou en présence de BSA. Une concentration élevée en glucose (25 mM) a été utilisée comme contrôle positif puisqu'il a déjà été montré que le glucose augmente la prolifération des cellules pancréatique β d'une manière dose-dépendante (Hellerstrom, 1988). Les résultats indiquent que l'oléate augmente l'incorporation de thymidine tritiée d'un facteur 2 tout comme le glucose, un agent prolifératif connu pour la cellule pancréatique β (fig. 14). Contrairement à l'oléate, le palmitate n'a pas d'effet sur l'incorporation de thymidine tritiée. Ces effets divergent de ceux obtenus pour l'expression du gène à réponse précoce *c-fos* et pour les essais de retard sur gel (méthode EMSA) du facteur de transcription AP-1.

Les cellules étaient viables dans les conditions expérimentales utilisées au-delà de 48 h .

Afin de mieux comprendre comment l'oléate et le palmitate exercent des actions différentes sur la prolifération cellulaire, nous avons étudié l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K), une kinase impliquée dans la transduction de signaux mitogéniques et anti-apoptotiques. La PI-3K phosphoryle l'anneau inositol des phosphatidylinositols (PI) en position 3 pour donner des PI-P3 (MacDougall et al., 1995). La PI-3K active la voie Raf/MAPK pour moduler l'activité de divers facteurs de transcription (Wang et al., 1998; Castillo et al., 1998), augmente la synthèse protéique (Thomas et Hall, 1997), et active la PKB/Akt via l'enzyme PDK (Anderson et al., 1998). La PKB active l'isoforme atypique ζ de la PKC (Le Good et al., 1998), bloque l'apoptose et augmente la survie cellulaire via la phosphorylation de la protéine BAD (del Peso et al., 1997). La PKB active aussi la synthèse du glycogène via la phosphorylation de la GSK-3 (Cross et al., 1995), augmente l'expression d'une enzyme critique de la lipogénèse, soit la FAS (273) et stimule la translocation de vésicules contenant les transporteur du glucose GLUT4 à la surface cellulaire afin d'augmenter la capture du glucose dans les tissus périphériques (Cong et al., 1997). Une autre cible de la voie PI-3K est la MAPK P38 qui semble être impliquée dans la prolifération de la cellule β induite par le sérum (Burns et al., 2000) et dans l'expression du gène de l'insuline en réponse au glucose (Macfarlane et al., 1997).

La PI-3K a été immunoprécipitée à partir de 2 à 3 mg de protéines totales et son activité mesurée *in vitro*. L'oléate augmente l'activité de la PI-3K dans les cellules INS-1 après une incubation de 5 min, contrairement au palmitate qui n'a pas d'effet (fig. 15). Le glucose cause aussi une activation de la PI-3K (résultat non-montré). Ces résultats indiquent que l'activité de la PI-3K semble corrélérer avec les mesures d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1.

L'oléate augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1.

L'action des acides gras oléate et palmitate sur l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 par retard sur gel (EMSA) a été étudiée. PDX-1 est un facteur de transcription spécifique à la cellule pancréatique β , situé en aval de la PI-3K et impliqué dans la régulation par le glucose du gène de l'insuline ainsi que divers gènes du métabolisme intermédiaire (Habener et Stoffers, 1998). La figure 16 montre que l'oléate, mais pas le palmitate, augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 dans la cellule INS-1 après une incubation de 2 h. Les résultats indiquent que l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 corrèle avec les mesures d'incorporation de thymidine tritiée et avec l'activité de la PI-3K, contrairement aux mesures du transcrit *c-fos* et la liaison à l'ADN de AP-1.

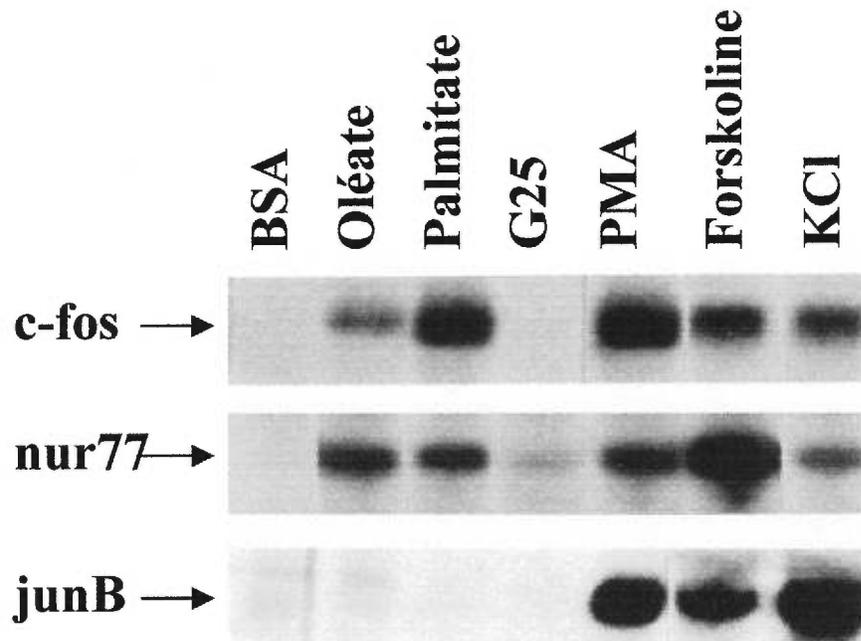


Figure 10 : Effet des acides gras sur l'induction de *c-fos*, *nur77* et *junB*. Analyse par northern blot de 15 μ g d'ARN total de cellules INS-1 incubées pendant 1 h en présence d'acides gras, de différentes concentrations de glucose et de différents agents. BSA: 5 mM glucose et 0,5% BSA; Oléate: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 0,5 % BSA; Palmitate: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 0,5% BSA; G25: 25 mM glucose; PMA: 2 μ M PMA; Forskolin: 4 μ M Forskoline; KCl: 30 mM KCl.

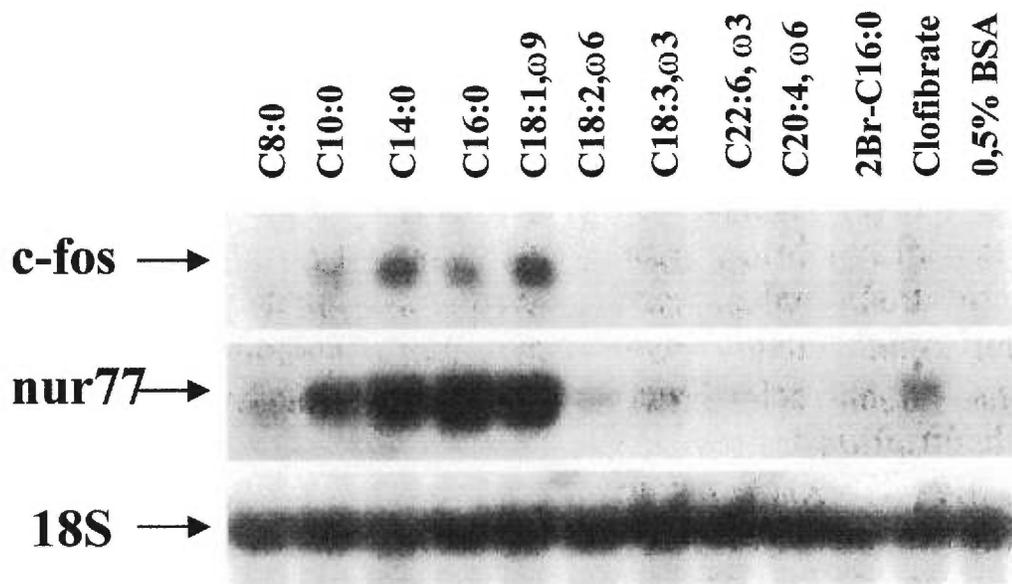


Figure 11 : Effet de différents acides gras ou du clofibrate sur l'induction de *c-fos* et de *nur-77*. Analyse par northern blot de 15 μ g d'ARN total de cellules INS-1 incubées pendant 1 h en présence de 0,5% BSA et de différents agents soit: C8:0, 2,5 mM octanoate; C10:0, 2,5 mM décanoate; C14:0, 0,4 mM myristate; C16:0, 0,4 mM palmitate; C18:1, ω 9, 0,4 mM oléate; C18:2, ω 6, 0,4 mM linoléate; C18:3, ω 3, 0,4 mM linoléate; C22:6, ω 3, 0,3 mM docosahexaénoate; C20:4, ω 6, 0,25 mM arachidonate; 2Br-C16:0, 0,4 mM 2-Br-palmitate; et 0,5 mM clofibrate.

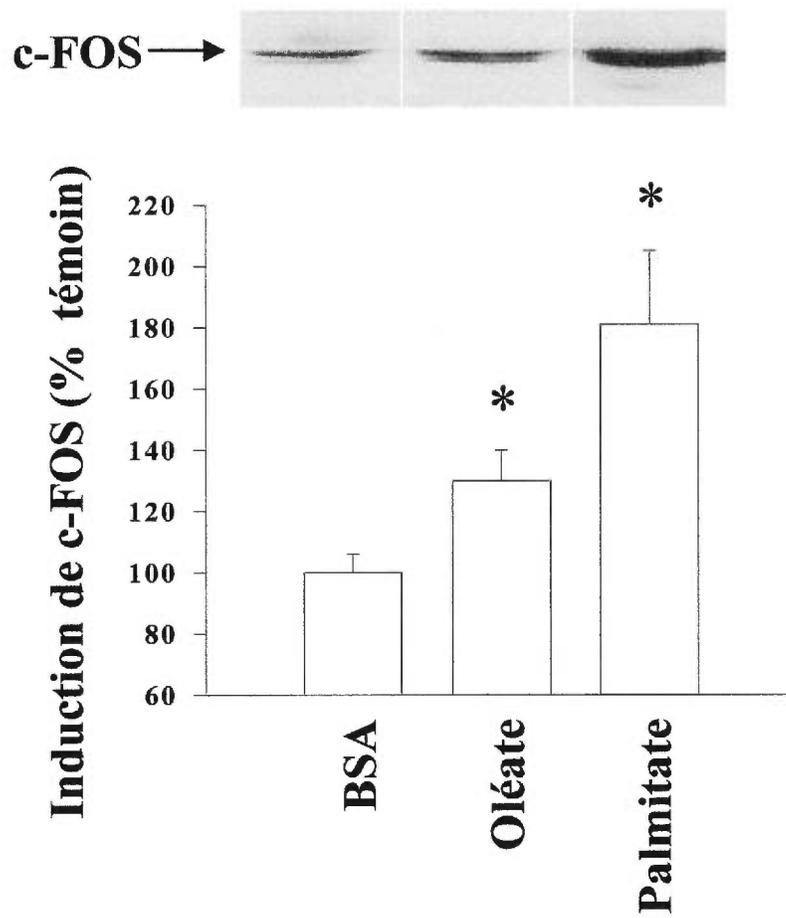


Figure 12 : L'oléate et le palmitate causent une accumulation de la protéine c-FOS dans les cellules INS-1. Analyse par western blot de 60 μ g de protéines totales extraites de cellules INS-1 incubées pendant 2 h à 5 mM glucose en absence ou en présence d'acides gras. La figure montre un résultat représentatif. BSA: 5 mM glucose et 0,5% BSA; Oléate: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 0,5 % BSA; Palmitate: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 0,5% BSA. Les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes sont représentées.

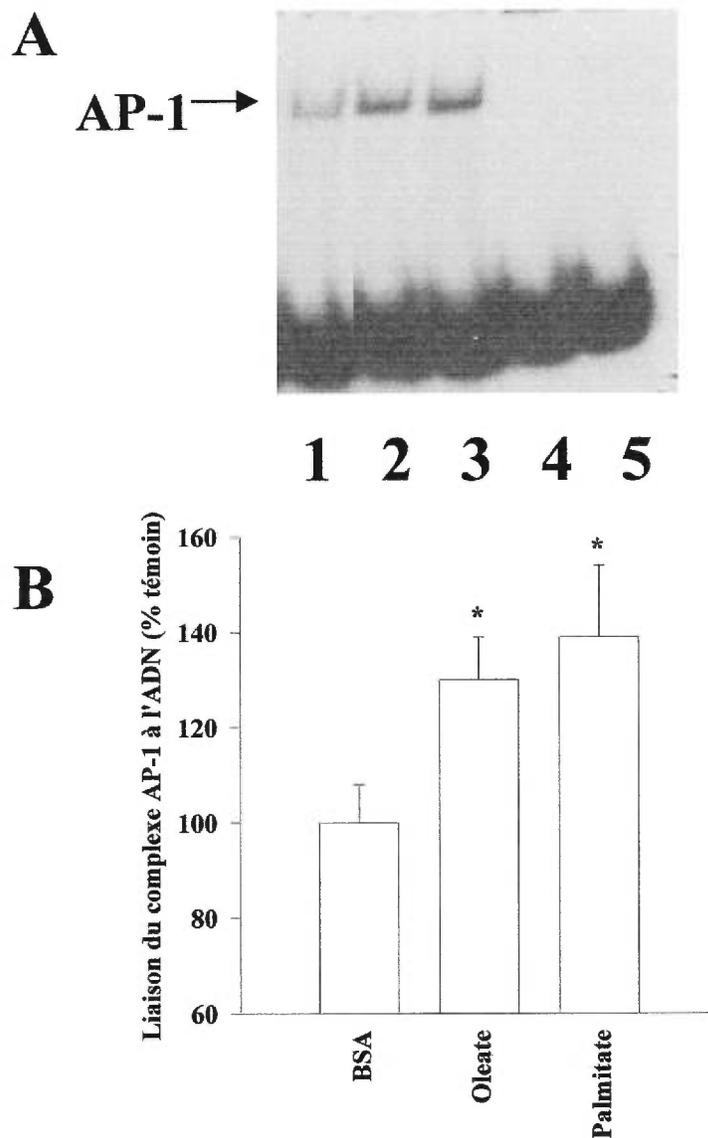


Figure 13 : L'oléate et le palmitate augmentent la liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1 dans les cellules INS-1. A: Retard sur gel (EMSA) représentatif réalisé avec des extraits nucléaires de cellules INS-1 incubées pendant 2 h à 5 mM glucose en absence ou en présence d'acides gras. Ligne 1: 5 mM glucose et 0,5% BSA; ligne 2: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 0,5% BSA; ligne 3: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 0,5% BSA; ligne 4: sans extrait nucléaire ajouté; ligne 5: comme ligne 3 avec un excès de sonde non-marquée.

B: Quantification des différents essais. Les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes sont représentées.

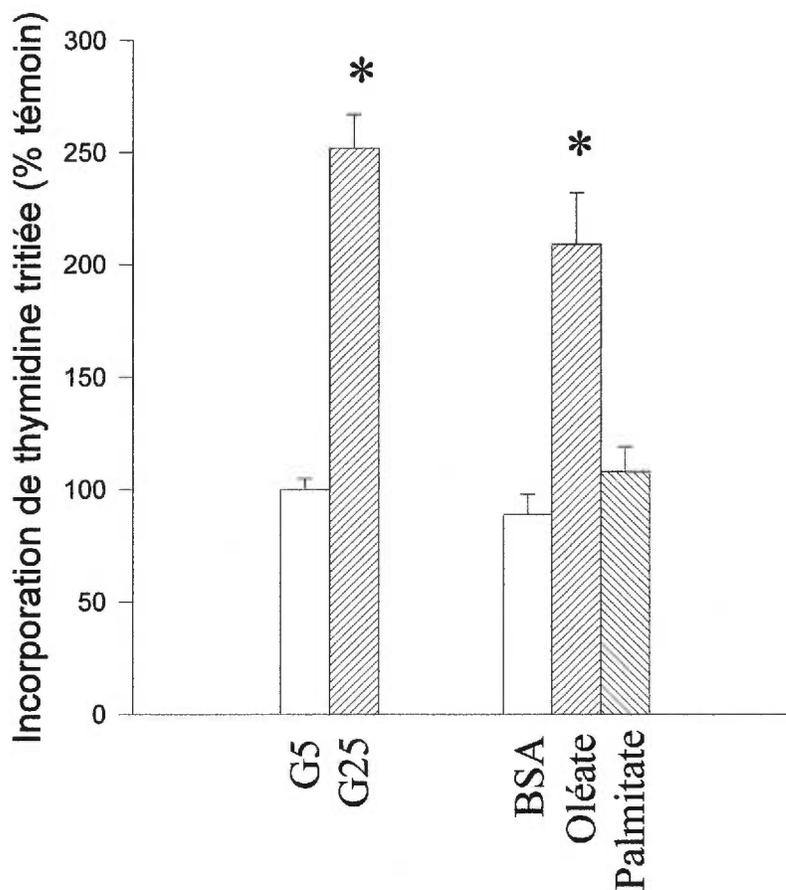


Figure 14 : Effets du glucose, de l'oléate et du palmitate sur l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1. Les cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI sans sérum contenant 5 mM ou 25 mM glucose et 0,5 mM des différents acides gras liés à la BSA. La thymidine tritiée a été ajoutée pour les 4 dernières heures d'une incubation de 24 h. G5: 5 mM glucose; G25: 25 mM glucose; BSA: 5 mM glucose et 0,5% BSA; Oléate: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 0,5 % BSA; Palmitate: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 0,5% BSA; Les moyennes \pm ESM de trois expériences indépendantes, chacune contenant des quadruplicats, sont représentées.

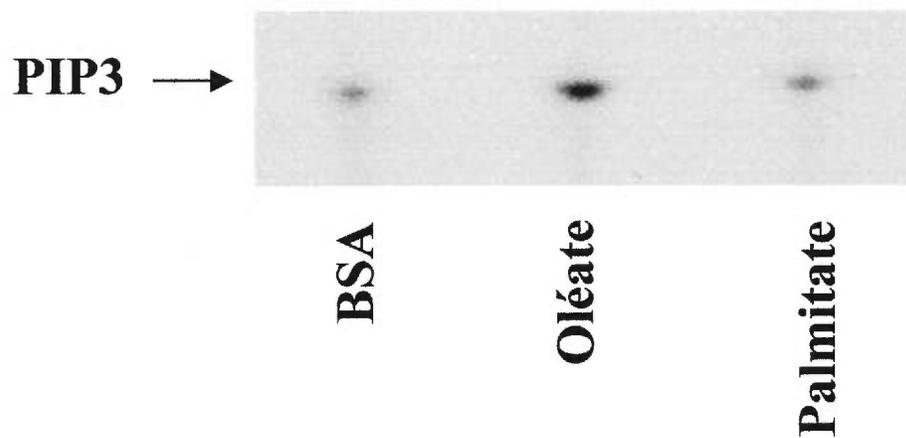


Figure 15 : L'oléate, mais pas le palmitate, augmente l'activité de la PI-3K dans les cellules INS-1. Les cellules INS-1 ont été incubées pendant 5 min à 5 mM glucose en absence ou en présence d'acides gras liés à la BSA. BSA: 5 mM glucose et 0,5% BSA; Oléate: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 0,5 % BSA; Palmitate: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 0,5% BSA.

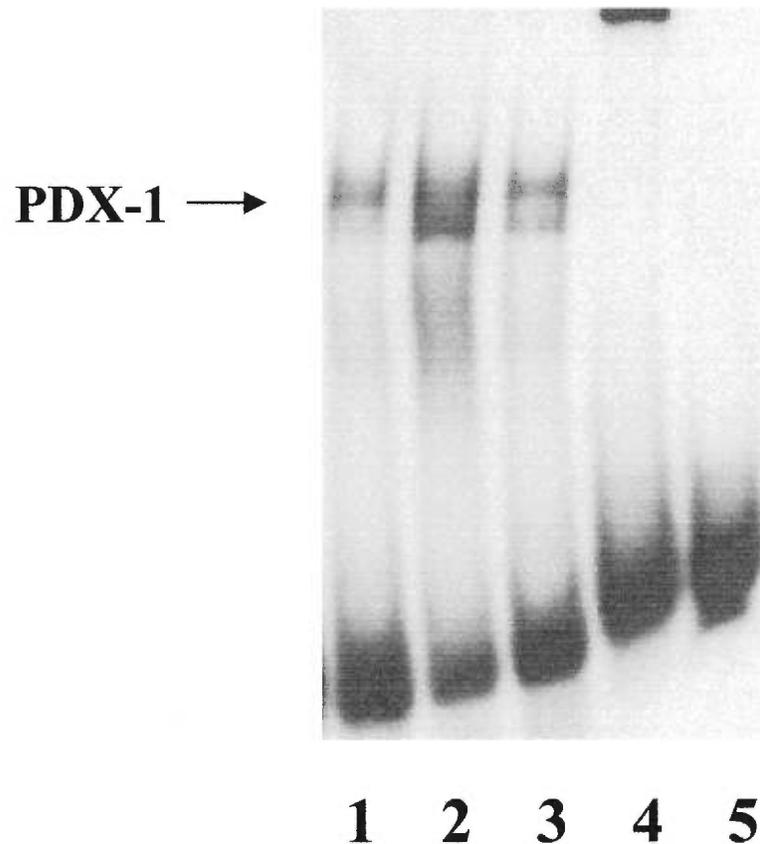


Figure 16 : L'oléate, mais pas le palmitate, augmente la liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 dans les cellules INS-1. Retard sur gel (EMSA) représentatif de deux expériences indépendantes réalisé avec des extraits nucléaires de cellules INS-1 incubées pendant 2 h à 5 mM glucose en absence ou en présence d'acides gras. Ligne 1: 5 mM glucose et 5% BSA; ligne 2: 0,5 mM oléate, 5 mM glucose et 5% BSA; ligne 3: 0,5 mM palmitate, 5 mM glucose et 5% BSA; ligne 4: sans extrait nucléaire ajouté; ligne 5: comme ligne 3 avec un excès de sonde non-marquée.

NOTE : *La plupart des résultats décrits dans ce mémoire ont été intégrés à une publication parue dans la revue Diabetes :*

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.

(Voir sommaire de l'article en annexe).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Les acides gras peuvent être impliqués dans la progression d'une multitude de pathologies dont le cancer, l'hyperlipidémie, l'hypertension et le diabète. Leurs différents effets peuvent dépendre de la longueur de la chaîne carbonée et du degré d'insaturation (Hertz et al., 1998). Afin de mieux comprendre les effets des acides gras sur la cellule pancréatique β dans la pathogénèse du diabète liée à l'obésité, différentes études se sont intéressées à la modulation de l'expression de certains gènes du métabolisme des acides gras. Ainsi, il a été montré que les acides gras induisent l'expression des gènes de la CPT-1 (Assimacopoulos-Jeannet et al., 1997) et de l'acétyl-CoA oxydase (ACO) (Intrasuksri et al., 1998), deux enzymes impliquées dans l'oxydation des graisses. De plus, les acides gras diminuent l'expression de l'ACC, l'enzyme qui synthétise le malonyl-CoA, un métabolite clé régulant l'oxydation des graisses via son action inhibitrice sur la CPT-1 (Brun et al., 1997). Ces observations permettent de suggérer que l'augmentation de l'expression de l'ACO et la de la CPT1 dans la cellule pancréatique β en réponse aux acides gras pourrait jouer un rôle dans la sécrétion d'insuline ou encore servir à la détoxification lipidique de la cellule en augmentant l'oxydation des graisses afin de diminuer leurs concentrations intracellulaires.

Lors de cette étude, nous avons étudié l'effet des acides gras sur l'expression de certains gènes à réponse précoce (dont le gène *c-fos*), sur la prolifération de la cellule β (INS-1), et sur l'activité de certains facteurs de transcription importants (soit AP-1 et PDX-1) pour la cellule pancréatique β afin de mieux définir les voies participant à l'effet pléiotropique de ces nutriments (voir l'hypothèse de travail à la figure 9). La possibilité que les acides gras puissent moduler d'autres facteurs de transcription (soit HNF-4 et les PPARs) non étudiés au cours de ce travail est aussi discutée. La détermination de l'effet à court terme sur les gènes à réponse précoce et sur divers facteurs de transcription constitue une approche complémentaire à la précédente qui étudie l'effet des acides gras sur les gènes du métabolisme.

Induction de gènes à réponse précoce

Les résultats démontrent que l'oléate (un acide gras mono-insaturé) et le palmitate (un acide gras saturé), augmentent l'expression de *c-fos* et de *nur-77*, deux gènes à réponse précoce impliqués dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose. La littérature est contradictoire en ce qui a trait aux concentrations physiologiques d'acides gras circulants non-liés à l'albumine. Certains l'estime à 7,5 nM (Richieri et Kleinfeld, 1995), une concentration reproduite par nos conditions expérimentales puisque l'on estime que la concentration d'acides gras non-liés à l'albumine résultante est de l'ordre du nanomolaire (résultats non-publiés). Toutefois, les conditions expérimentales de cette étude ne reproduisent pas fidèlement la physiologie étant donné que la concentration sanguine d'albumine se situe entre 3% et 5%. Aussi, on sait que le palmitate se lie avec une plus grande affinité à l'albumine bovine que l'oléate (Richieri et al., 1993) et il en résulte donc que la concentration d'oléate libre était plus importante que celle du palmitate.

Il est intéressant de noter que l'action de l'oléate et du palmitate, deux acides gras abondants dans la diète, sur l'expression des gènes à réponse précoce semble leur être spécifique puisque les acides gras à courte chaîne ou poly-insaturés n'ont pas eu d'effet inductif sur les gènes *c-fos* et *nur-77*. L'induction de *c-fos* et de *nur-77* après seulement une heure d'incubation en présence d'oléate et de palmitate démontre que ce sont bien des gènes à réponse précoce induits par les acides gras dans les cellules INS-1.

Le mécanisme précis par lequel l'oléate et le palmitate induisent *c-fos* et *nur-77* demeure toutefois inconnu. Des évidences nous indiquent que l'effet des acides gras sur l'induction de *c-fos* et *nur-77* dépend de leur métabolisme puisque le bromo-palmitate, un dérivé non métabolisable du palmitate, est sans effet sur l'expression de *c-fos* et que les voies de transduction de signaux impliquant la PKC et le Ca^{2+} semblent être impliquées (Roche et al., 1999). En effet, une diminution

de la régulation de la voie de la PKC induite par une incubation des cellules INS-1 pendant 10 h en présence de PMA et une inhibition de la voie du Ca^{2+} par la nifédipine (un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants de type L) ont toutes deux supprimé l'effet des acides gras sur *c-fos* (Roche et al., 1999). Ces observations sont en accord avec le fait que le palmitate cause une translocation de la PKC du cytoplasme à la membrane dans les îlots suite à son métabolisme (Alcazar et al., 1997). Les acides gras, suite à leur transformation en lipides complexes, tel que le diacylglycérol, pourraient activer certaines isoformes de PKC, soit les PKC typiques α , β et γ . En ce qui concerne l'implication de la voie du Ca^{2+} , les acides gras sont reconnus pour augmenter l'influx de Ca^{2+} via les canaux calciques de type L dans les îlots (Warnotte et al., 1994). Nos résultats démontrent que la nifédipine supprime l'action des acides gras sur *c-fos* (Roche et al., 1999). Ceci favorise l'hypothèse selon laquelle un influx de Ca^{2+} via les canaux calciques de type L participe à l'induction de *c-fos* par l'oléate ou le palmitate.

Corrélant avec l'expression de *c-fos*, les résultats indiquent qu'une incubation des cellules INS-1 pour une période de 2 h en présence d'oléate et de palmitate cause une accumulation de la protéine c-FOS et une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription AP-1. On sait que le complexe AP-1 augmente l'expression de plusieurs gènes à réponse tardive qui exercent différentes fonctions dans la cellule pancréatique β . En effet, ces gènes peuvent être impliqués dans la prolifération, l'apoptose et l'induction de gènes du métabolisme (Karin, 1992; Karin et al., 1997).

Prolifération cellulaire

Afin de savoir si l'induction de *c-fos* par l'oléate ou le palmitate pourrait jouer un rôle dans la régulation de la prolifération par les acides gras, nous avons évalué la prolifération des cellules INS-1 par des mesures d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN. Un possible effet prolifératif des acides gras pourrait être impliqué dans la phase de compensation de la résistance à l'insuline dans l'étiologie du diabète de type 2. Les résultats démontrent que l'oléate, mais pas le

palmitate, augmente la prolifération cellulaire. De plus, l'effet de l'oléate est comparable à celui du glucose, un agent prolifératif connu pour la cellule pancréatique β qui exerce une action proliférative d'une manière dose-dépendante (Hellerstrom, 1988). Ceci suggère donc que l'oléate pourrait agir comme un facteur de croissance pour la cellule pancréatique β . Néanmoins, ces résultats ne corrélaient pas avec ceux obtenus en ce qui a trait aux mesures d'expression du gène *c-fos*, des niveaux de la protéine c-FOS et de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1. Ceci peut indiquer d'une part que l'augmentation de l'expression de *c-fos* induite par les acides gras ne semble pas participer à un possible effet prolifératif. La divergence entre les effets de l'oléate et du palmitate au niveau de la prolifération de la cellule INS-1 peut aussi s'expliquer par le fait que le palmitate, et non l'oléate, augmente la formation *de novo* des céramides, ce qui pourrait constituer un signal apoptotique pour la cellule pancréatique β (Mathias et al., 1998). Ainsi, l'incorporation de thymidine tritiée pourrait représenter la balance des processus apoptotiques et prolifératifs, les deux s'annulant en ce qui concerne le palmitate. Une autre façon d'expliquer l'effet différent de l'oléate et du palmitate sur la prolifération de la cellule INS-1 serait par la modulation différente de l'activité de certaines kinases pouvant participer à divers systèmes de transduction de signaux.

AP-1

Tel que mentionné plus haut, AP-1 pourrait aussi être impliqué dans la régulation de l'apoptose. Les études effectuées chez le rat ZDF qui est un modèle utile pour l'étude de la pathogénèse du diabète adipogénique ont suggéré que la destruction des cellules pancréatiques β par apoptose impliquait une production accrue de NO et une induction du gène de la NOS (« nitric oxide synthase ») (Shimabukuro et al., 1998). Or, le gène de la NOS contient un élément de réponse à AP-1 et à NF- κ B (« nuclear factor- κ B ») (Marks-Konczalik et al., 1998). Ainsi, une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1 combinée à celle de NF- κ B pourrait causer une augmentation de l'apoptose des cellules pancréatiques β . Il

serait donc intéressant d'étudier la translocation au noyau de NF- κ B par les acides gras et de corrélérer ces études avec des mesures d'apoptose afin de vérifier si l'induction de *c-fos* pourrait être impliquée dans la régulation de l'apoptose. D'ailleurs, une autre étude a montré que le processus d'apoptose pouvait être précédée par une induction de *c-fos* (Smeyne et al., 1993). On peut émettre l'hypothèse selon laquelle une induction de *c-fos* pourrait constituer un signal apoptotique pour la cellule β lorsque combinée avec certains facteurs et un signal prolifératif en d'autres circonstances. Il serait alors intéressant de vérifier en premier lieu quels proto-oncogènes composent le complexe AP-1 en réponse à l'oléate et au palmitate puisqu'on peut supposer que la divergence entre l'effet de l'oléate et du palmitate se situe à ce niveau. En effet, on sait que le complexe AP-1 peut être composé d'homodimères des membres de la famille JUN ou ATF et encore d'hétérodimères entre les membres des familles JUN et FOS d'une part ou JUN et ATF d'autre part (Karin, 1992; Karin et al., 1997). Une manière simple d'étudier la composition du complexe AP-1 serait la méthode du « supershift » qui consiste à utiliser des anticorps spécifiques pour un proto-oncogène en EMSA afin d'éliminer la liaison du complexe à l'ADN ou de retarder sa migration sur gel.

La voie PI-3K / PDX-1

L'effet des acides gras sur l'activité de la PI-3K, une enzyme impliquée dans la transduction de signaux prolifératifs et anti-apoptotiques en réponse à divers facteurs de croissance dans une variété de types cellulaires (Vanhaesebroeck et al., 1997), a été étudié. Les résultats indiquent que l'oléate, contrairement au palmitate, augmente l'activité de la PI-3K dans les cellules INS-1. Cette observation révèle que l'activité de la PI-3K semble corrélérer avec les mesures de prolifération cellulaire. Afin d'avoir plus d'évidences de l'implication de la PI-3K dans la transduction du signal prolifératif induit par l'oléate, il serait utile d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques de cette voie (tels que le LY 294002 et la wortmannin) et de surexprimer un dominant négatif PI-3K afin de voir si une modulation de son activité pourrait avoir des effets sur la prolifération induite par

l'oléate. Le mécanisme par lequel l'oléate pourrait activer la PI-3K dans la cellule pancréatique β demeure à ce jour inconnu. Toutefois, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle l'oléate pourrait activer la PI-3K via la transactivation du récepteur à l'EGF. En effet, une récente publication démontre que les acides gras insaturés, dont l'oléate, peuvent induire une autophosphorylation et une activation du récepteur à l'EGF (Vacaresse et al., 1999). On peut supposer que le récepteur à l'EGF pourrait ensuite activer la voie IRS/PI-3K. Cette transactivation du récepteur à l'EGF induite par les acides gras insaturés pourrait être due à des changements dans la fluidité membranaire ou à un récepteur extracellulaire à l'oléate (Vacaresse et al., 1999). Aussi, il est intéressant de remarquer que les acides gras saturés n'ont pu induire l'autophosphorylation du récepteur à l'EGF et ceci pourrait expliquer la divergence entre l'effet de l'oléate et du palmitate sur l'activation de la PI-3K.

On sait que la PI-3K active plusieurs autres voies ou kinases en fonction du stimulus ou du type cellulaire. En effet, la PI-3K active la voie Raf/MAPK pour moduler l'activité de divers facteurs de transcription (Wang et al., 1998; Castillo et al., 1998), active la P70^{s6k} pour augmenter la synthèse protéique (Thomas et Hall, 1997), augmente l'activité de la MAPK P38 qui est impliqué dans l'expression du gène de l'insuline en réponse au glucose (Macfarlane et al., 1997), et active PKB/Akt via PDK (Anderson et al., 1998). PKB exerce aussi une action sur plusieurs cibles : il active l'isoforme atypique ζ de la PKC (Le Good et al., 1998), bloque l'apoptose et augmente la survie cellulaire via la phosphorylation de la protéine BAD (del Peso et al., 1997), active la synthèse du glycogène via la phosphorylation de GSK-3 (Cross et al., 1995), augmente l'expression d'une enzyme critique de la lipogénèse, soit la FAS (Wang et al., 1998), et stimule la translocation de vésicules contenant les transporteur du glucose GLUT4 à la surface cellulaire afin d'augmenter la prise de glucose dans les tissus périphériques (Cong et al., 1997). En supposant que la PI-3K participe à la transduction du signal prolifératif induit par l'oléate, il serait intéressant d'étudier les voies de transduction de signaux située en aval de la PI-3K afin de déterminer quelle(s)

voie(s) est(sont) essentielle(s) à l'effet de l'acide gras. On sait déjà que les MAPK 1/2 et la MAPK P38 sont nécessaires à l'action proliférative induite par le sérum sur la cellule pancréatique β (Burns et al., 2000). PKB est une autre cible de la PI-3K qui se révèle tout aussi intéressante étant donné son action sur le transport du glucose, sur la lipogénèse, la synthèse du glycogène et sur l'activation de voies anti-apoptotiques.

PDX-1 est un facteur de transcription impliqué dans le développement du pancréas endocrine (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996) de même que dans l'expression des gènes de l'insuline, de la glucokinase et du transporteur de glucose GLUT2 (Gremlich et al., 1997). Une mutation homozygote dans le gène codant pour PDX-1 cause le diabète de type MODY4 (Habener et Stoffers, 1998). PDX-1 pourrait aussi être impliqué dans la prolifération de la cellule pancréatique β puisqu'on a rapporté que l'expression de PDX-1 corrélait avec une régénération des cellules pancréatiques β suite à une pancréatectomie (Sharma et al., 1999). De plus, une étude du groupe de K. Docherty a permis de démontrer que PDX-1 est situé en aval de la PI-3K pour l'augmentation de l'expression du gène de l'insuline et sa biosynthèse en réponse au glucose (Macfarlane et al., 1997). Notre étude montre que tout comme pour la modulation de l'activité de la PI-3K, seul l'oléate a pu augmenter la liaison de PDX-1 à l'ADN. Ces résultats permettent de croire que l'oléate pourrait exercer une action insulinothrompique sur la cellule pancréatique β . Toutefois, pour le prouver, il faudrait étudier l'effet des acides gras sur l'expression du gène de l'insuline. Aussi, il est intéressant de remarquer qu'une étude a démontré que le palmitate diminuait l'activité de liaison de PDX-1 à l'ADN induites par de hautes concentrations de glucose (Gremlich et al., 1997). Nos résultats indiquent que le palmitate n'influence pas le niveau basal de liaison de PDX-1 à l'ADN mais il serait intéressant de voir si le palmitate peut antagoniser l'effet de l'oléate. Encore une fois, ces observations démontrent que deux acides gras différents causent des effets divergents et que la consommation de différents types d'acides gras pourrait influencer de manières différentes le

métabolisme, l'expression génique de la cellule pancréatique β , et par conséquent la pathogénèse du diabète de type 2.

Autres facteurs de transcription

On ne peut exclure l'hypothèse selon laquelle l'oléate pourrait moduler l'activité de certains autres facteurs de transcription afin de promouvoir la prolifération de la cellule pancréatique β . Le facteur HNF-4 appartenant à la famille des facteurs de transcription orphelins et des récepteurs nucléaires pourrait être un candidat de choix. HNF-4, dont des mutations cause le diabète de type MODY1, contrôle l'expression de gènes impliqués dans la pathogénèse de plusieurs maladies. HNF-4 est impliqué dans l'expression de la GAPDH, de la L-PK et du transporteur de glucose GLUT2 (Stoffel et Duncan, 1997). De plus, une publication a démontré que les acides gras à longues chaînes pouvaient moduler l'activité transcriptionnelle de HNF-4 α en s'y liant sous leur forme acyl-CoA (Hertz et al., 1998). Cette liaison des acides gras au site de liaison du ligand de HNF-4 α dépend de la longueur de la chaîne carbonnée de du degré d'insaturation (Hertz et al., 1998). HNF-1 α , qui présente un élément de réponse à HNF-4 dans son promoteur, pourrait être impliqué dans l'expression du gène de l'insuline (Habener et Stoffers, 1998). Il a donc été proposé qu'une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de HNF-4 pourrait augmenter l'expression de HNF-1 α qui induirait à son tour l'expression du gène de l'insuline et la biosynthèse de proinsuline.

Une autre publication a aussi démontré que HNF-4 pouvait compétitionner pour certains sites de liaison à l'ADN avec d'autres facteurs de transcription tel que les PPARs (Rodriguez et al., 1998). Les PPARs appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires et ils ont la capacité de lier les acides gras à des concentrations physiologiques (Krey et al., 1997). La famille des PPARs comprend les isoformes α , β et γ qui ont chacune des fonctions distinctes et une distribution tissulaire différente (Schoonjans et al., 1996). Alors que la fonction de PPAR β est inconnue, on sait que PPAR α et PPAR γ sont impliqués dans la régulation du

métabolisme des lipides, la prolifération, la différenciation cellulaire, la carcinogénèse et l'apoptose (Brun et Spiegelman, 1997; Desvergne et al., 1998). Il est alors attrayant d'émettre l'hypothèse selon laquelle une modulation de l'activité de liaison à l'ADN des PPARs par les acides gras pourrait modifier l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme, de la prolifération et de l'apoptose pouvant ainsi expliquer l'effet pléiotropique des acides gras.

En plus de leurs rôles de substrats métaboliques, de réserves d'énergie et de constituants de la membrane, il est probable que les acides gras abondants dans la diète puissent moduler l'activation de cascades de transduction de signaux et l'expression de gènes impliqués dans plusieurs maladie et en particulier dans la pathogénèse du diabète adipogénique.

Conclusion

En conclusion, l'oléate et le palmitate, à des concentrations physiologiques, causent une accumulation des transcrits de *c-fos* et de *nur-77*, de la protéine c-FOS et de l'activité de liaison à l'ADN du complexe AP-1. Toutefois, seul l'oléate augmente l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules INS-1. Cet effet prolifératif de l'oléate corrèle avec une augmentation de l'activité de la PI-3K et de la liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1. Les résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité de la PI-3K et de la liaison à l'ADN du facteur de transcription PDX-1 induite par l'oléate pourrait jouer un rôle dans l'effet pléiotropique (prolifération cellulaire, expression d'enzyme du métabolisme, biosynthèse d'insuline) de l'acide gras. Ainsi, dans la pathogénèse du diabète de type 2, une augmentation des concentrations circulantes d'oléate pourrait initialement aider à la compensation de la résistance à l'insuline en favorisant la production et la sécrétion d'insuline de même qu'en augmentant la prolifération de la cellule pancréatique β . Néanmoins, à des concentrations plus élevées et sur une plus grande durée de temps, l'hyperlipidémie et les acides gras libres élevés dans le sang pourraient s'avérer toxiques pour la cellule pancréatique β . Enfin, cette

étude vient renforcer l'hypothèse selon laquelle la nutrition et en particulier une diète riche en graisses pourrait constituer un risque ou un facteur de progression dans le développement de certaines pathologies dont le diabète de type 2, l'obésité et le cancer.

Perspectives future

Nos résultats ont un intérêt nutritionnel et peuvent être reliés à l'étiologie de même qu'à la progression de certaines pathologies dont le diabète de type 2, l'obésité et le cancer. En effet, dans la mesure où différents acides gras peuvent avoir des effets divergents sur la prolifération et l'expression génique en fonction de la longueur de la chaîne carbonnée ou du degré d'insaturation, on peut penser que la surconsommation de graisses, et en particulier de certains types d'acides gras, pourrait être impliquée dans ces pathologies diverses. Il serait donc particulièrement intéressant d'étudier plus en détail l'effet des différents acides gras sur la prolifération cellulaire en fonction de la longueur de la chaîne carbonnée et du degré d'insaturation. Il serait aussi intéressant d'essayer de comprendre comment l'oléate peut activer la voie signalétique de la PI-3K puisque cette voie est généralement activée en réponse aux facteurs de croissance via des récepteurs tyrosine kinases. Enfin, un possible effet de différents acides gras sur l'apoptose dans la cellule pancréatique β reste à être évalué et pourrait constituer une perspective à plus long terme. On pense en effet que l'exposition prolongée de la cellule pancréatique β à de hautes concentrations d'acides gras pourrait induire la mort cellulaire par apoptose. Expérimentalement, ces hypothèses pourraient être évaluées en utilisant la lignée cellulaire β INS et in vivo dans des animaux sous perfusion.

BIBLIOGRAPHIE

- Alcazar, O., Qiu-yue, Z., Gine, E., et Tamarit-Rodriguez, J. (1997). Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes* *46*, 1153-1158.
- Alessenko, A.V., Platonova, L.V., Sakevarashvili, G.R., Khrenov, A.V., Shingarova, L.N., Shono, N.I., and Galperin, E.I. (1999). Role of endogenous TNF-alpha and sphingosine in induced DNA synthesis in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochemistry* *64*, 890-895.
- Anderson, K.E., Coadwell, J., Stephens, L.R., et Hawkins, P.T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr.Biol.* *8*, 684-691.
- 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.H. (1992). *Insulin: molecular biology to pathology*. Oxford University Press, NewYork.
- 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.
- Ausserer, W.A., Bourrat-Floek, B., Green, C.J., Laderoute, K.R., et Sutherland, R.M. (1994). Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol.Cell Biol.* *14*, 5032-5042.
- Bertrand, F., Desbois-Mouthon, C., Cadoret, A., Prunier, C., Robin, H., Capeau, J., Atfi, A., et Cherqui, G. (1999). Insulin antiapoptotic signaling involves insulin activation of the nuclear factor kappaB-dependent survival genes encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and manganese-superoxide dismutase. *J.Biol.Chem.* *274*, 30596-30602.
- Bjorklund, A. et Grill, V. (1999). Enhancing effects of long-term elevated glucose and palmitate on stored and secreted proinsulin-to-insulin ratios in human pancreatic islets. *Diabetes* *48*, 1409-1414.
- Boden, G., Chen, X., Rosner, J., et Barton, M. (1995). Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* *44*, 1239-1242.

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.

Bonner-Weir, S., Baxter, L.A., Schuppin, G.T., et Smith, F.E. (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* *42*, 1715-1720.

Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L., et Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J.* *16*, 1695-1709.

Bouwens, L. (1998). Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc.Res.Tech.* *43*, 332-336.

Brun, R.P. et Spiegelman, B.M. (1997). PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. *J.Endocrinol.* *155*, 217-218.

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.

Burns, C.J., Squires, P.E., et Persaud, S.J. Signaling through the p38 and p42/44 mitogen-activated families of protein kinases in pancreatic beta-cell proliferation. (2000). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 541-546.

Cantley, L.C. et Neel, B.G. (1999). New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *96*, 4240-4245.

Case, R.D., Piccione, E., Wolf, G., Benett, A.M., Lechleider, R.J., Neel, B.G., et Shoelson, S.E. (1994). SH-PTP2/Syp SH2 domain binding specificity is defined by direct interactions with platelet-derived growth factor beta-receptor, epidermal growth factor receptor, and insulin receptor substrate-1-derived phosphopeptides. *J.Biol.Chem.* *269*, 10467-10474.

Castillo, A.I., Tolon, R.M., et Aranda, A. (1998). Insulin-like growth factor-1 stimulates rat prolactin gene expression by a Ras, ETS and phosphatidylinositol 3-kinase dependent mechanism. *Oncogene* 16, 1981-1991.

Cheatham, B. et Kahn, C.R. (1995). Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr.Rev.* 16, 117-142.

Collart, M.A., Tourkine, N., Belin, D., Vassalli, P., Jeanteur, P., et Blanchard, J.M. (1991). c-fos gene transcription in murine macrophages is modulated by a calcium-dependent block to elongation in intron 1. *Mol.Cell Biol.* 11, 2826-2831.

Cong, L.N., Chen, H., Li, Y., Zhou, L., McGibbon, M.A., Taylor, S.I., et Quon, M.J. (1997). Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol.Endocrinol.* 11, 1881-1890.

Coulon, V., Veyrune, J.L., Tourkine, N., Vie, A., Hipskind, R.A., et Blanchard, J.M. (1999). A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J.Biol.Chem.* 274, 30439-30446.

Cousin, S.P., Hugl, S.R., Myers, J.M., White, M.F., Reifel-Miller, A., et Rhodes, C.J. (1999). Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling. *Biochem.J.* 344 Pt 3:649-58, 649-658.

Crespin, S.R., Greenough, W.B., et Steinberg, D. (1973). Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids. A direct pancreatic effect. *J.Clin.Invest.* 52, 1979-1984.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., et Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

Darnell, J.E.J. (1996). Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 6221-6224.

de Courten, M. et Zimmet, P. (1997). Screening for non-insulin-dependent diabetes mellitus: where to draw the line? *Diabet.Med.* 14, 95-98.

- DeFronzo, R.A. (1997). Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth.J.Med.* 50, 191-197.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., et Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Desvergne, B., Ijpenberg, A., Devchand, P.R., et Wahli, W. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptors at the cross-road of diet and hormonal signalling. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 65, 65-74.
- Distel, R.J., Robinson, G.S., et Spiegelman, B.M. (1992). Fatty acid regulation of gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J.Biol.Chem.* 267, 5937-5941.
- Dobbins, R.L., Chester, M.W., Daniels, M.B., McGarry, J.D., et Stein, D.T. (1998). Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* 47, 1613-1618.
- Eizirik, D.L., Bendtzen, K., et Sandler, S. (1991). Short exposure of rat pancreatic islets to interleukin-1 beta induces a sustained but reversible impairment in beta-cell function: influence of protease activation, gene transcription, and protein synthesis. *Endocrinology* 128, 1611-1616.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L., et Kennedy, B.P. (1999). Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 283, 1544-1548.
- Fernandes, A., King, L.C., Guz, Y., Stein, R., Wright, C.V., et Teitelman, G. (1997). Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 138, 1750-1762.
- Forman, B.M., Chen, J., et Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 4312-4317.
- Fried, M. et Crothers, D.M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic.Acids.Res.* 9, 6505-6525.

- Froguel, P. et Velho, G. (1999). Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *Trends.Endocrinol.Metab.* 10, 142-146.
- 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.
- 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. W.B. Saunders company, Philadelphia.
- Habener, J.F. et Stoffers, D.A. (1998). A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc.Assoc.Am.Physicians.* 110, 12-21.
- Han, J.H., Beutler, B., et Huez, G. (1991). Complex regulation of tumor necrosis factor mRNA turnover in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Biochim.Biophys.Acta* 1090, 22-28.
- Hattersley, A.T. (1998). Maturity-onset diabetes of the young: clinical heterogeneity explained by genetic heterogeneity. *Diabet.Med.* 15, 15-24.
- Hellerstrom, C., Anderson, A., Swenne, I., Welsh, N., et Sjöholm, A. (1988). Pathogenesis of NIDDM. Ravens Press. New York. pp. 79-91.
- Hertz, R., Magenheim, J., Berman, I., et Bar-Tana, J. (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* 392, 512-516.
- Holgado-Madruga, M., Emler, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., et Wong, A.J. (1996). A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature* 379, 560-564.
- 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.

Hugl, S.R., White, M.F., et Rhodes, C.J. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J.Biol.Chem.* 273, 17771-17779.

Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods Enzymol.* 200:3-37, 3-37.

Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A., Kuwajima, M., et Shima, K. (1996). Substitution at codon 269 (glutamine --> proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 224, 597-604.

Intrasuksri, U., Rangwala, S.M., O'Brien, M., Noonan, D.J., et Feller, D.R. (1998). Mechanisms of peroxisome proliferation by perfluorooctanoic acid and endogenous fatty acids. *Gen.Pharmacol.* 31, 187-197.

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.

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., et Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.

Karin, M. (1992). Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.* 6, 2581-2590.

Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J.Biol.Chem.* 270, 16483-16486.

Karin, M., Liu, Z., et Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 240-246.

Keller, S.R., Lamphere, L., Lavan, B.E., Kuhne, M.R., et Lienhard, G.E. (1993). Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1. *Mol.Reprod.Dev.* 35, 346-351.

King, D.L. et Chick, W.L. (1976). Pancreatic beta cell replication: effects of hexose sugars. *Endocrinology* 99, 1003-1009.

- King, D.L., Kitchen, K.C., et Chick, W.L. (1978). Pancreatic beta-cell replication: relation to insulin secretion. *Endocrinology* *103*, 1321-1327.
- King, H. (1993). Diabetes and the World Health Organization. Progress towards prevention and control. *Diabetes Care* *16*, 387-390.
- Kloppel, G., Lohr, M., Habich, K., Oberholzer, M., et Heitz, P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv.Synth.Pathol.Res.* *4*, 110-125.
- Kondo, T., Matsuda, T., Kitano, T., Takahashi, A., Tashima, M., Ishikura, H., Umehara, H., Domae, N., Uchiyama, T., et Okazaki, T. (2000). Role of c-jun expression increased by heat shock- and ceramide-activated caspase-3 in HL-60 cell apoptosis. Possible involvement of ceramide in heat shock-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* *275*, 7668-7676.
- Krey, G., Braissant, O., Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M.G., et Wahli, W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol.Endocrinol.* *11*, 779-791.
- Kulkarni, R.N., Winnay, J.N., Daniels, M., Bruning, J.C., Flier, S.N., Hanahan, D., et Kahn, C.R. (1999). Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. *J.Clin.Invest.* *104*, R69-R75
- Larsson, O., Deeney, J.T., Branstrom, R., Berggren, P.O., et Corkey, B.E. (1996). Activation of the ATP-sensitive K⁺ channel by long chain acyl-CoA. A role in modulation of pancreatic beta-cell glucose sensitivity. *J.Biol.Chem.* *271*, 10623-10626.
- Lavergne, C., Breant, B., et Rosselin, G. (1992). Modulation of growth-related gene expression and growth inhibition by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-elevating agents in the insulin-producing cell line beta TC1. *Endocrinology* *131*, 2351-2356.
- Le Good, J., Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Alessi, D.R., Cohen, P., et Parker, P.J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* *281*, 2042-2045.
- Lee, S.L., Wesselschmidt, R.L., Linette, G.P., Kanagawa, O., Russell, J.H., et Milbrandt, J. (1995). Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77). *Science* *269*, 532-535.

Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., et Unger, R.H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *91*, 10878-10882.

Lemberger, T., Braissant, O., Juge-Aubry, C., Keller, H., Saladin, R., Staels, B., Auwerx, J., Burger, A.G., Meier, C.A., et Wahli, W. (1996). PPAR tissue distribution and interactions with other hormone-signaling pathways. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *804:231-51*, 231-251.

Lian, J.B., Stein, G.S., Bortell, R., et Owen, T.A. (1991). Phenotype suppression: a postulated molecular mechanism for mediating the relationship of proliferation and differentiation by Fos/Jun interactions at AP-1 sites in steroid responsive promoter elements of tissue-specific genes. *J.Cell Biochem.* *45*, 9-14.

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.

Logothetopoulos, J., Valiquette, N., et Cvet, D. (1983). Glucose stimulation of beta-cell DNA replication in the intact rat and in pancreatic islets in suspension culture. Effects of alpha-ketoisocaproic acid, dibutyryl cyclic AMP, and 3-isobutyl-1-methylxanthine in the in vitro system. *Diabetes* *32*, 1172-1176.

Lozano, J., Berra, E., Municio, M.M., Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., et Moscat, J. (1994). Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* *269*, 19200-19202.

MacDougall, L.K., Domin, J., et Waterfield, M.D. (1995). A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr.Biol.* *5*, 1404-1415.

Macfarlane, W.M., Read, M.L., Gilligan, M., Bujalska, I., et Docherty, K. (1994). Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochem.J.* *303*, 625-631.

Macfarlane, W.M., Smith, S.B., James, R.F., Clifton, A.D., Doza, Y.N., Cohen, P., et Docherty, K. (1997). The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription

factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J.Biol.Chem.* 272, 20936-20944.

Maehama, T. et Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J.Biol.Chem.* 273, 13375-13378.

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.

Maira, M., Martens, C., Philips, A., et Drouin, J. (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol.Cell Biol.* 19, 7549-7557.

Marks-Konczalik, J., Chu, S.C., et Moss, J. (1998). Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J.Biol.Chem.* 273, 22201-22208.

Marshak, S., Leibowitz, G., Bertuzzi, F., Socci, C., Kaiser, N., Gross, D.J., Cerasi, E., et Melloul, D. (1999). Impaired beta-cell functions induced by chronic exposure of cultured human pancreatic islets to high glucose. *Diabetes* 48, 1230-1236.

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.

Mathias, S., Pena, L.A., et Kolesnick, R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem.J.* 335, 465-480.

Mechti, N., Piechaczyk, M., Blanchard, J.M., Jeanteur, P., et Lebleu, B. (1991). Sequence requirements for premature transcription arrest within the first intron of the mouse c-fos gene. *Mol.Cell Biol.* 11, 2832-2841.

Myers, M.G.J., Cheatham, B., Fisher, T.L., Jachna, B.R., Kahn, C.R., Backer, J.M., et White, M.F. (1995). Common and distinct elements in insulin and PDGF signaling. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 766:369-87, 369-387.

Navarro, P., Valverde, A.M., Benito, M., et Lorenzo, M. (1998). Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase- and map kinase-dependent manner. *Exp.Cell Res.* *243*, 213-221.

Nielsen, J.H. (1985). Dissociation between insulin secretion and DNA synthesis in cultured pancreatic islets. *Biomed.Biochim.Acta* *44*, 161-166.

O'Dea, K. (1991). Westernisation, insulin resistance and diabetes in Australian aborigines. *Med.J.Aust.* *155*, 258-264.

Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., et Wright, C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* *122*, 983-995.

Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S., et Spiegel, S. (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J.Cell Biol.* *147*, 545-558.

Olson, L.K., Sharma, A., Peshavaria, M., Wright, C.V., Towle, H.C., Rodertson, R.P., et Stein, R. (1995). Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *92*, 9127-9131.

Parker, M.G. (1993). Steroid and related receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* *5*, 499-504.

Phillips, M.S., Liu, Q., Hammond, H.A., Dugan, V., Hey, P.J., Caskey, C.J., et Hess, J.F. (1996). Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat.Genet.* *13*, 18-19.

Piechaczyk, M. et Blanchard, J.M. (1994). c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit.Rev.Oncol.Hematol.* *17*, 93-131.

Pour, P.M. (1994). Pancreatic centroacinar cells. The regulator of both exocrine and endocrine function. *Int.J.Pancreatol.* *15*, 51-64.

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

Rabinovitch, A., Blondel, B., Murray, T., et Mintz, D.H. (1980). Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate stimulates islet B cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *J.Clin.Invest.* *66*, 1065-1071.

Rabinovitch, A., Quigley, C., Russell, T., Patel, Y., et Mintz, D.H. (1982). Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet (beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes* *31*, 160-164.

Rahier, J., Goebbels, R.M., et Henquin, J.C. (1983). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* *24*, 366-371.

Randle, P.J. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab.Rev.* *14*, 263-283.

Richieri, G., Anel, A., et Kleinfeld, A. (1993). Interactions of long-chains fatty acids and albumin : determination of free fatty acid levels using the fluorescent probe ADIFAB. *Biochemistry* *32*, 7574-7580.

Richieri, G., et Kleinfeld, A. (1995). Unbound free fatty acid levels in human serum. *J. Lip. Res.* *36*, 229-240.

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. et Prentki, M. (1994). Calcium regulation of immediate-early response genes. *Cell Calcium* *16*, 331-338.

Rodriguez, J.C., Ortiz, J.A., Hegardt, F.G., et Haro, D. (1998). The hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4) represses the mitochondrial HMG-CoA synthase gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* *242*, 692-696.

Romanus, J.A., Rabinovitch, A., et Rechler, M.M. (1985). Neonatal rat islet cell cultures synthesize insulin-like growth factor I. *Diabetes* *34*, 696-702.

Sako, Y. et Grill, V.E. (1990). A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology* *127*, 1580-1589.

Scharfmann, R. et Czernichow, P. (1996). Differentiation and growth of pancreatic beta cells. *Diabetes Metab.* *22*, 223-228.

Schoonjans, K., Staels, B., et Auwerx, J. (1996). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim.Biophys.Acta* 1302, 93-109.

Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P., et Wagner, E.F. (1999). Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev.* 13, 607-619.

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.

Schuppin, G.T., Pons, S., Hugl, S., Aiello, L.P., King, G.L., White, M., et Rhodes, C.J. (1998). A specific increased expression of insulin receptor substrate 2 in pancreatic beta-cell lines is involved in mediating serum-stimulated beta-cell growth. *Diabetes* 47, 1074-1085.

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

Sekine, N., Ullrich, S., Regazzi, R., Pralong, W.F., et Wollheim, C.B. (1996). Postreceptor signalling of growth hormone and prolactin and their effects in the differentiated insulin-secreting cell line, INS-1. *Endocrinology* 137, 1841-1850.

Sharma, A., Olson, L.K., Robertson, R.P., et Stein, R. (1995). The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol.Endocrinol.* 9, 1127-1134.

Sharma, A., Zangen, D.H., Reitz, P., Taneja, M., Lissauer, M.E., Miller, C.P., Weir, G.C., Habener, J.F., et Bonner-Weir, S. (1999). The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48, 507-513.

Sheng, M., Thompson, M.A., et Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* 252, 1427-1430.

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

Sjoholm, A. (1991). Alpha-adrenergic inhibition of rat pancreatic beta-cell replication and insulin secretion is mediated through a pertussis toxin-sensitive G-protein regulating islet cAMP content. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 180, 152-155.

Sjoholm, A. (1992). Intracellular signal transduction pathways that control pancreatic beta-cell proliferation. *FEBS Lett.* 311, 85-90.

Sjoholm, A. (1996). Diabetes mellitus and impaired pancreatic beta-cell proliferation. *J.Intern.Med.* 239, 211-220.

Sjoholm, A. (1997). Glucose stimulates islet beta-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and by protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes* 46, 1141-1147.

Smeyne, R.J., Vendrell, M., Hayward, M., Baker, S.J., Miao, G.G., Schilling, K., Robertson, L.M., Curran, T., et Morgan, J.I. (1993). Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* 363, 166-169.

Songer, T.J. et Zimmet, P.Z. (1995). Epidemiology of type II diabetes: an international perspective. *Pharmacoeconomics.* 8 *Suppl 1:1-11*, 1-11.

Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., et Martin, F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49:157-162

Southern, C., Schulster, D., et Green, I.C. (1990). Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.* 276, 42-44.

Spencer, C.A. et Groudine, M. (1990). Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene* 5, 777-785.

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.

Stoffel, M. et Duncan, S.A. (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4 α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 13209-13214.

Stoffers, D.A., Ferrer, J., Clarke, W.L., et Habener, J.F. (1997). Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat.Genet.* 17, 138-139.

Sun, X.J., Rothenberg, P., Kahn, C.R., Backer, J.M., Araki, E., Wilden, P.A., Cahill, D.A., Goldstein, B.J., et White, M.F. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77.

Susini, S., Roche, E., Prentki, M., et Schlegel, W. (1998). Glucose and glucoincretin peptides synergize to induce c-fos, c-jun, junB, zif-268, and nur-77 gene expression in pancreatic beta(INS-1) cells. *FASEB J.* 12, 1173-1182.

Susini, S., Van, H.G., Li, S., Prentki, M., et Schlegel, W. Essentiality of intron control in the induction of c-fos by glucose and glucoincretin peptides in INS-1 beta-cells. *FASEB J.* 14, 128-136.

Swenne, I. (1982). Effects of cyclic AMP on DNA replication and protein biosynthesis in fetal rat islets of Langerhans maintained in tissue culture. *Biosci.Rep.* 2, 867-876.

Swenne, I. (1983). Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes* 32, 14-19.

Swenne, I. (1992). Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 35, 193-201.

Swenne, I., Bone, A.J., Howell, S.L., et Hellerstrom, C. (1980). Effects of glucose and amino acids on the biosynthesis of DNA and insulin in fetal rat islets maintained in tissue culture. *Diabetes* 29, 686-692.

Tanigawa, K., Xu, G., Nakamura, S., Tamura, K., et Kawaguchi, M. (1996). Pancreatic B-cell replication in an animal model of insulin-resistant non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pancreas* 13, 326-327.

- 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.
- Thomas, G. et Hall, M.N. (1997). TOR signalling and control of cell growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, 782-787.
- Treisman, R. (1992). The serum response element. *Trends.Biochem.Sci.* 17, 423-426.
- Unger, R.H. (1995). Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44, 863-870.
- Vacaresse, N., Lajoie-Mazenc, I., Auge, N., Suc, I., Frisach, M.F., Salvayre, R., et Negre-Salvayre, A. (1999). Activation of epithelial growth factor receptor pathway by unsaturated fatty acids. *Circ.Res.* 85, 892-899.
- van Dam, H., Duyndam, M., Rottier, R., Bosch, A., de Vries-Smits, L., Herrlich, P., Zantema, A., Angel, P., et van der Eb AJ (1993). Heterodimer formation of cJun and ATF-2 is responsible for induction of c-jun by the 243 amino acid adenovirus E1A protein. *EMBO J.* 12, 479-487.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Panayotou, G., et Waterfield, M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends.Biochem.Sci.* 22, 267-272.
- Velloso, L.A., Carneiro, E.M., Crepaldi, S.C., Boschero, A.C., et Saad, M.J. (1995). Glucose- and insulin-induced phosphorylation of the insulin receptor and its primary substrates IRS-1 and IRS-2 in rat pancreatic islets. *FEBS Lett.* 377, 353-357.
- Wahli, W. et Martinez, E. (1991). Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression. *FASEB J.* 5, 2243-2249.
- Wang, D. et Sul, H.S. (1998). Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt. *J.Biol.Chem.* 273, 25420-25426.
- Wang, R.N., Kloppel, G., et Bouwens, L. (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38, 1405-1411.

Wang, Y., Falasca, M., Schlessinger, J., Malstrom, S., Tschlis, P., Settleman, J., Hu, W., Lim, B., et Prywes, R. (1998). Activation of the c-fos serum response element by phosphatidyl inositol 3-kinase and rho pathways in HeLa cells. *Cell Growth Differ.* 9, 513-522.

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.

Werlen, G., Belin, D., Conne, B., Roche, E., Lew, D.P., et Prentki, M. (1993). Intracellular Ca²⁺ and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J.Biol.Chem.* 268, 16596-16601.

Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., et White, M.F. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat.Genet.* 23, 32-40.

Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S., et White, M.F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.

Wolff, R.A., Dobrowsky, R.T., Bielawska, A., Obeid, L.M., et Hannun, Y.A. (1994). Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J.Biol.Chem.* 269, 19605-19609.

Wu, Q., Li, Y., Liu, R., Agadir, A., Lee, M.O., Liu, Y., et Zhang, X. (1997). Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J.* 16, 1656-1669.

Xu, G.G. et Rothenberg, P.L. (1998). Insulin receptor signaling in the beta-cell influences insulin gene expression and insulin content: evidence for autocrine beta-cell regulation. *Diabetes* 47, 1243-1252.

Yenush, L., Zanella, C., Uchida, T., Bernal, D., et White, M.F. (1998). The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin. *Mol.Cell Biol.* 18, 6784-6794.

Yki-Jarvinen, H. (1992). Glucose toxicity. *Endocr.Rev.* 13, 415-431.

Zhou, Y.P. et Grill, V.E. (1994). Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J.Clin.Invest.* 93, 870-876.

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.

Zimmet, P.Z. (1995). The pathogenesis and prevention of diabetes in adults. Genes, autoimmunity, and demography. *Diabetes Care* 18, 1050-1064.

ANNEXE

Sommaire de l'article:

PALMITATE AND OLEATE INDUCE THE IMMEDIATE-EARLY RESPONSE GENES *c-fos* AND *nur-77* IN THE PANCREATIC β -CELL LINE INS-1

Enrique Roche, Jean Buteau, Inmaculada Aniento, Juan Antonio Reig, Bernat Soria, and Marc Prentki

To better understand the link between fatty acid signaling and their pleiotropic effects in the pancreatic β -cell we have investigated whether fatty acids regulate immediate early response genes coding for transcription factors implicated in cell proliferation, differentiation and apoptosis. Palmitate and oleate but not long chain polyunsaturated fatty acids cause a pronounced accumulation of *c-fos* and *nur-77* mRNAs in β (INS)-cells to an extent similar to that produced by the C-kinase activator PMA. The effect is dose dependent and occurs between 0.1 to 0.5 mM in the presence of 0.5% albumin. The action of the fatty acid occurs at the transcriptional level and the mRNA accumulation displays a bell shape kinetic with a maximal effect at 1 h. 2-bromopalmitate is ineffective indicating that fatty acids must be metabolized to cause their effect. Both fatty acids are unable to induce *c-fos* and *nur-77* in either PKC-downregulated cells or in cells incubated in the presence of the Ca^{2+} channel blocker nifedipine or the Ca^{2+} chelator EGTA, suggesting an implication of the C-kinase and Ca^{2+} signaling pathways. Palmitate and oleate also increase the DNA binding activity of the transcription factor(s) AP-1. Finally, oleate but not palmitate increases [^3H]-thymidine incorporation in INS cells. It is suggested that IEG induction by the most abundant circulating fatty acids play a role in the adaptive process of the β -cell to hyperlipidemia. These results should have implication for our understanding of obesity-associated diabetes and the link between fatty acids and tumorigenesis.