

Université de Montréal

Rôle de l'estérification des acides gras dans la régulation de la sécrétion
d'insuline et le stress métabolique induits par le glucose

Par

Annie Barbeau

Programme de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en biochimie

Avril 2012

©Annie Barbeau, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Rôle de l'estérification des acides gras dans la régulation de la sécrétion
d'insuline et le stress métabolique induits par le glucose

Présentée par :

Annie Barbeau

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Edgard Delvin, président-rapporteur

Dr Marc Prentki, directeur de recherche

Dre Sylvie Mader, membre du jury

Dr Ashok Srivastava, membre du jury

Dr André Tchernof, examinateur externe

Résumé

Le diabète est une maladie chronique de l'homéostasie du glucose caractérisée par une hyperglycémie non contrôlée qui est le résultat d'une défaillance de la sécrétion d'insuline en combinaison ou non avec une altération de l'action de l'insuline. La surnutrition et le manque d'activité physique chez des individus qui ont des prédispositions génétiques donnent lieu à la résistance à l'insuline. Pendant cette période dite de compensation où la concentration d'acides gras plasmatiques est élevée, l'hyperinsulinémie compense pleinement pour la résistance à l'insuline des tissus cibles et la glycémie est normale.

Le métabolisme du glucose par la cellule pancréatique β entraîne la sécrétion d'insuline. Selon le modèle classique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, l'augmentation du ratio ATP/ADP résultant de la glycolyse et de l'oxydation du glucose, induit la fermeture des canaux K_{ATP} -dépendant modifiant ainsi le potentiel membranaire suivi d'un influx de Ca^{2+} . Cet influx de Ca^{2+} permet l'exocytose des granules de sécrétion contenant l'insuline. Plusieurs nutriments comme les acides gras sont capables de potentialiser la sécrétion d'insuline. Cependant, le modèle classique ne permet pas d'expliquer cette potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

Pour expliquer l'effet potentialisateur des acides gras, notre laboratoire a proposé un modèle complémentaire où le malonyl-CoA dérivé du métabolisme anaplérotique du glucose inhibe la carnitine palmitoyltransférase-1, l'enzyme qui constitue l'étape limitante de l'oxydation des acides gras favorisant ainsi leur estérification et donc la formation de dérivés lipidiques signalétiques. Le modèle anaplérotique/lipidique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose prédit que le malonyl-CoA dérivé du métabolisme du glucose inhibe la β -oxydation des acides gras et augmente la disponibilité des acyl-CoA ou des acides gras non-estérifiés. Les molécules lipidiques agissant comme facteurs de couplage du métabolisme des acides gras à l'exocytose d'insuline sont encore inconnus.

Des travaux réalisés par notre laboratoire ont démontré qu'en augmentant la répartition des acides gras vers la β -oxydation, la sécrétion d'insuline induite par le glucose était réduite suggérant qu'un des dérivés de l'estérification des acides gras est important pour la potentialisation sur la sécrétion d'insuline. En effet, à des concentrations élevées de glucose, les acides gras peuvent être estérifiés d'abord en acide lysophosphatidique (LPA), en acide phosphatidique (PA) et en diacylglycérol (DAG) et subséquemment en triglycérides (TG).

La présente étude a établi l'importance relative du processus d'estérification des acides gras dans la production de facteurs potentialisant la sécrétion d'insuline. Nous avons émis l'hypothèse que des molécules dérivées des processus d'estérification des acides gras (ex : l'acide lysophosphatidique (LPA) et le diacylglycerol (DAG)) agissent comme signaux métaboliques et sont responsables de la modulation de la sécrétion d'insuline en présence d'acides gras. Afin de vérifier celle-ci, nous avons modifié le niveau d'expression des enzymes clés contrôlant le processus d'estérification par des approches de biologie moléculaire afin de changer la répartition des acides gras dans la cellule β . L'expression des différents isoformes de la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT), qui catalyse la première étape d'estérification des acides gras a été augmenté et inhibé. Les effets de la modulation de l'expression des isoenzymes de GPAT sur les processus d'estérifications, sur la β -oxydation et sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose ont été étudiés.

Les différentes approches que nous avons utilisées ont changé les niveaux de DAG et de TG sans toutefois altérer la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ainsi, les résultats de cette étude n'ont pas associé de rôle pour l'estérification *de novo* des acides gras dans leur potentialisation de la sécrétion d'insuline. Cependant, l'estérification des acides gras fait partie intégrante d'un cycle de TG/acides gras avec sa contrepartie lipolytique. D'ailleurs, des études parallèles à la mienne menées par des collègues du laboratoire ont démontré un rôle pour la lipolyse et un cycle TG/acides gras dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras.

Parallèlement à nos études des mécanismes de la sécrétion d'insuline impliquant les acides gras, notre laboratoire s'intéresse aussi aux effets négatifs des acides gras sur la cellule β . La glucolipotoxicité, résultant d'une exposition chronique aux acides gras saturés en présence d'une concentration élevée de glucose, est d'un intérêt particulier vu la prépondérance de l'obésité. L'isoforme microsomal de GPAT a aussi été utilisé comme outil moléculaire dans le contexte de la glucolipotoxicité afin d'étudier le rôle de la synthèse de novo de lipides complexes dans le contexte de décompensation où la fonction des cellules β diminue.

La surexpression de l'isoforme microsomal de la GPAT, menant à l'augmentation de l'estérification des acides gras et à une diminution de la β -oxydation, nous permet de conclure que cette modification métabolique est instrumentale dans la glucolipotoxicité.

Mots-clés : Sécrétion d'insuline, Cellules β pancréatiques, Métabolisme des acides gras, Facteurs de couplage métabolique, Glucolipotoxicité

Abstract

Diabetes is a chronic disease of glucose homeostasis characterized by hyperglycemia and the result of a failure of insulin secretion in combination or not with impaired insulin action. Overnutrition and lack of physical activity in individuals who have acquired or inherited genetic predispositions lead to insulin resistance. During the period of compensation where the concentration of plasma fatty acids is high, hyperinsulinemia fully compensates for the insulin resistance of target tissues and blood sugar is normal.

Glucose promotes insulin secretion through its metabolism by the pancreatic β cell. According to the classical model of glucose-induced insulin secretion, the increase in the ATP/ADP ratio resulting from glycolysis and glucose oxidation induces the closure of K_{ATP} channels thus changing membrane potential followed by an influx of Ca^{2+} . This influx of Ca^{2+} allows the exocytosis of secretory granules containing insulin. Several nutrients like fatty acids are capable of potentiating insulin secretion. However, the classical model does not explain the potentiation of insulin secretion by fatty acids.

To explain the potentiating effect of fatty acids, our laboratory has proposed a complementary model in which malonyl-CoA derived from glucose anaplerotic metabolism inhibits carnitine palmitoyltransferase 1, the enzyme catalyzing the limiting step of fatty acid oxidation, thereby promoting their esterification and thus the formation signaling derivatives. The anaplerotic model of insulin secretion predicts that malonyl-CoA derived from glucose metabolism inhibits β -oxidation of fatty acids and increases the availability of acyl-CoA or non esterified fatty acids. Thus, lipid molecules can act as coupling factors for insulin exocytosis. Fatty acid-derived signalling molecules that are active remain to be identified.

Work performed by our laboratory has shown that increasing the partition of fatty acids toward β -oxidation reduced glucose-induced insulin secretion, suggesting that derivatives of fatty acid esterification are important for the potentiation of insulin secretion. Indeed, at high concentrations of glucose, fatty acids are esterified into

lysophosphatidic acid (LPA), phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG) and subsequently in triglycerides (TG).

The present study established the relative importance fatty acid esterification in the production of factors potentiating insulin secretion. We hypothesized that molecules derived from the process of esterification of fatty acid (eg lysophosphatidic acid (LPA) and diacylglycerol (DAG)) act as metabolic signals and are responsible for the modulation of the secretion of insulin in the presence of fatty acids. Thus, the level of expression of key enzymes controlling the process of esterification has been altered by molecular biology approaches to increase distribution of fatty acids toward esterification in the β cell. The expression of various isoforms of glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), which catalyzes the first step of esterification of fatty acids was increased and inhibited. The effects of GPAT isoenzyme modulation on the esterification process, on β -oxidation and on glucose-induced insulin secretion were investigated.

The various approaches we used have changed the levels of DAG and TG without altering insulin secretion induced by glucose in the presence or absence of fatty acids. Thus, the results of this study do not suggest a role for de novo synthesis of glycerolipid intermediates via esterification of fatty acids in the potentiation of insulin secretion. However, the esterification of fatty acids is an integral part of a TG/fatty acid cycle with its counterpart lipolysis. Moreover, parallel studies conducted by colleagues of the laboratory have demonstrated a role for lipolysis and a cycle TG/fatty acid in the potentiation of insulin secretion by fatty acids.

In parallel with our studies of the mechanisms of insulin secretion involving fatty acids, our laboratory is also interested in the negative effects of fatty acids on the β cell. The glucolipotoxicity resulting from chronic exposure to saturated fatty acids in the presence of high glucose concentrations is of particular interest in the context of obesity rates. The microsomal isoform of GPAT was also used as a molecular tool under glucolipotoxicity conditions to study the role of de novo synthesis of complex lipids in the context of decompensation when β -cell function decreases.

Increased esterification of fatty acids by the overexpression of microsomal isoform of GPAT has increased the toxic effects of fatty acids in the context of glucolipotoxicity. Thus, our results allow us to conclude that the distribution of lipids toward esterification and a decrease in β -oxidation is instrumental in glucolipotoxicity.

Keywords : Insulin secretion, Pancreas β cells, Fatty acid metabolism, Metabolic coupling factors, Glucolipotoxicity

Table des matières

RESUME	V
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIERES.....	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES ABREVIATIONS	XXIII
REMERCIEMENTS	XXIX
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1. LE DIABÈTE.....	1
1.1 Historique, définitions et statistiques du diabète.....	1
1.2 Les différents types de diabète.....	3
2. LE PANCRÉAS	7
2.1 La structure du pancréas	7
2.2 Les fonctions du pancréas.....	7
2.3 La biosynthèse de l'insuline.....	8
2.4 Le potentiel sécrétoire de la cellule β pancréatique	9
3. LES MÉCANISMES DE LA SÉCRÉTION D'INSULINE.....	10
3.1 Les stimuli de la sécrétion d'insuline	10
3.2 Profil biphasique de la sécrétion d'insuline	11
3.3 Voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline	12
3.4 Voie d'amplification de la sécrétion d'insuline	14
4. LE MÉTABOLISME DE LA CELLULE β PANCRÉATIQUE.....	15
4.1 Le métabolisme du glucose par la cellule β	15
4.2 Le métabolisme des acides gras	18
5. LES ACIDES GRAS ET LA SÉCRÉTION D'INSULINE	26
5.1 Récepteurs membranaires des acides gras	27
5.2 Le métabolisme des acides gras et la sécrétion d'insuline.....	29

5.3 La β -oxydation des acides gras et la sécrétion d'insuline.....	29
5.4 La lipolyse dans la sécrétion d'insuline.....	30
5.5 Le cycle TG/acides gras.....	31
6. CIBLES POSSIBLES DES INTERMÉDIAIRES LIPIDIQUES PRODUITS LORS DE L'ESTÉRIFICATION DES ACIDES GRAS POUVANT POTENTIALISER LA SÉCRÉTION D'INSULINE	32
7. LA PREMIÈRE ÉTAPE DE LA SYNTHÈSE DE NOVO DES GLYCÉROLIPIDES CATALYSÉE PAR LA GLYCÉROL-3-PHOSPHATE ACYLTRANSFÉRASE	33
7.1 GPAT1	34
7.2 GPAT2.....	35
7.3 GPAT3	36
7.4 GPAT4.....	36
8. LA GLUCOLIPOTOXICITÉ DE LA CELLULE β PANCRÉATIQUE	37
8.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la glucolipotoxicité	37
9. MISE EN CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE, OBJECTIF ET THÉMATIQUE DE LA THÈSE	41
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	44
MATÉRIEL.....	44
MÉTHODES	44
Culture cellulaire des lignées de cellules β pancréatiques.....	44
Numération des cellules et évaluation de la viabilité par le test d'exclusion au bleu de trypan.....	45
Préparation du tampon bicarbonate de Krebs-Ringer (KRB) supplémenté avec de l'Hepes (KRBH).....	46
Préparation du palmitate couplé à l'albumine	46
β -oxydation du palmitate.....	46
Estérification du palmitate.....	49
Oxydation du glucose.....	51
Sécrétion d'insuline avec les cellules INS 832/13	52
Sécrétion d'insuline avec les cellules INSr β	52

Dosage de l'insuline par essai radioimmunologique (RIA)	53
Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)	55
Surexpression de GPAT1-myc par adénovirus	56
Transfection d'ADN plasmidique dans les INS832/13 par la méthode d'Amaza	57
Transfection de duplexes d'ARNi	57
Préparation du plasmide pcDNA3.1-GPAT3-HA	57
Production d'ADN plasmidique	58
Transformation de bactéries par électroporation	58
Préparation des bactéries électrocompétentes	59
Extraction de l'ARN total	59
Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)	59
PCR quantitatif en temps réel	60
Analyse par buvardage de Western	60
Microscopie confocale	62
Analyses statistiques	63
CHAPITRE III : RESULTATS	64
INTRODUCTION	64
Les lignées cellulaires insulinosécrétrices	66
CORRÉLATION ENTRE L'ESTÉRIFICATION DES ACIDES GRAS ET LA SÉCRÉTION D'INSULINE INDUITE PAR LE GLUCOSE	70
CONSÉQUENCE DE LA SUREXPRESSION DE GPAT1-MYC ET DE L'AUGMENTATION DE L'ESTÉRIFICATION DES LIPIDES DANS LES INSRβ SUR LA SÉCRÉTION D'INSULINE INDUITE PAR LE GLUCOSE	76
CONSÉQUENCE DE LA SUREXPRESSION DE L'ISOFORME GPAT3 ET DE L'AUGMENTATION DE L'ESTÉRIFICATION DES LIPIDES DANS LES INS 832/13 SUR LA SÉCRÉTION D'INSULINE INDUITE PAR LE GLUCOSE	91
INHIBITION DE L'EXPRESSION DE GPAT1 PAR LES siRNA	96
INHIBITION SIMULTANÉE DE L'EXPRESSION DE GPAT1 ET GPAT4	101
RÔLE DE GPAT ET DE L'ESTÉRIFICATION DES ACIDES GRAS DANS LA GLUCOLIPOTOXICITÉ	108

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	113
RÉSULTATS PRINCIPAUX DE L'ÉTUDE	115
CONCLUSION DE NOTRE ÉTUDE	121
PERSPECTIVE	124
LIMITES DE NOTRE ÉTUDE.....	126
L'ESTÉRIFICATION DE NOVO DU PALMITATE ET LA GLUCOLIPOTOXICITÉ DE LA CELLULE β	128
BIBLIOGRAPHIE	135

Liste des tableaux

Tableau I. Amorces de PCR quantitatif en temps réel.....60

Tableau II. Anticorps utilisés pour les analyses par buvardage de Western.....62

Tableau III. Principales lignées cellulaires pancréatiques insulinosécrétoires.....67

Liste des figures

Figure 1. Profil biphasique de la sécrétion d'insuline.....	12
Figure 2. Voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline	13
Figure 3. Voie amplificatrice de la sécrétion d'insuline	14
Figure 4. Synthèse des TG et estérification des acyl-CoA.....	23
Figure 5. Isoformes des enzymes de la synthèse des TG et leur distribution sur les organelles	24
Figure 6. La lipolyse	26
Figure 7. Le cycle des TG/acides gras	31
Figure 8. Les cellules INSr β sécrètent l'insuline en réponse au glucose et les acides gras amplifient cette réponse.	70
Figure 9. Les cellules INS 832/13 sécrètent l'insuline en réponse au glucose en présence de palmitate.....	71
Figure 10. L'estérification du palmitate en glycérolipides et phospholipides est dépendante du glucose.	73
Figure 11. La corrélation entre la sécrétion d'insuline et le taux d'estérification du palmitate pour les différentes classes de lipides.	75
Figure 12. La surexpression de GPAT1-myc au moyen d'un adénovirus recombinant en utilisant le système Tet-ON dans les INSr β est dépendante de la M.O.I. et de la doxycycline.	78
Figure 13. La protéine de fusion GPAT1-myc colocalise avec les mitochondries.....	80
Figure 14. L'expression de GPAT1-myc augmente l'estérification du palmitate en lipides complexes dans les Insr β	82
Figure 15. Effet de l'expression de la GPAT1-myc sur la β -oxydation du palmitate dans les Insr β	84
Figure 16. L'expression de GPAT1-myc n'altère pas la sécrétion d'insuline en absence et en présence de palmitate dans les Insr β	85
Figure 17. L'oxydation du glucose n'est pas altérée par l'expression de GPAT1-myc dans les Insr β	87
Figure 18. La libération du glycérol est augmentée par la surexpression de GPAT1-myc.	88

Figure 19. La lipolyse induite par le glucose est augmentée dans les îlots des rats ZF.....	89
Figure 20. L'inhibition de la lipolyse dans les îlots pancréatiques isolés de rats ZF est accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de palmitate.....	90
Figure 21. Expression de la protéine de fusion GPAT3-HA dans les cellules INS 832/13.	92
Figure 22. La protéine de fusion GPAT3-HA colocalise avec les réticulum endoplasmiques.....	93
Figure 23. La surexpression de GPAT3-HA augmente les niveaux de DAG et de TG dans les cellules INS 832/13.....	94
Figure 24. La surexpression de GPAT3-HA ne modifie pas significativement la sécrétion d'insuline induite par le glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.....	95
Figure 25. Sélection des duplexes d'ARNi pour l'inhibition de l'expression de GPAT1 dans les cellules INS 832/13.....	97
Figure 26. Effet de l'inhibition de l'expression de GPAT1 par des siRNA sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.....	98
Figure 27. L'inhibition de l'expression de GPAT1 par des siRNA n'a pas diminué l'estérification du palmitate en LPA dans les cellules INS 832/13.....	100
Figure 28. Effet des duplexes d'ARN pour l'inhibition de l'expression de GPAT3 dans les cellules INS 832/13.....	101
Figure 29. Les isoformes 1 et 4 de GPAT sont les plus exprimés dans les cellules INS 832/13.....	103
Figure 30. L'estérification du palmitate en DAG est diminuée par l'inhibition de GPAT1 et GPAT4 dans les INS 832/13 à la concentration stimulatrice intermédiaire de 5 mM glucose.....	104
Figure 31. Effet de l'inhibition de l'expression de GPAT1 et de GPAT4 sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.....	106
Figure 32. Stress métabolique au cours de l'élévation chronique du glucose en présence de palmitate.....	110

Figure 33. La surexpression de GPAT3-HA augmente la glucolipotoxicité à une concentration intermédiaire de glucose en présence de palmitate.	111
Figure 34. Les changements d'expression génique des enzymes et leurs conséquences sur les voies métaboliques modulant la répartition des lipides lors de la glucolipotoxicité.	130

Liste des abréviations

(p/v) : poids/volume

(v/v) : volume/volume

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ACS : acyl-CoA synthétase

ADN : acide déoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGJ : anomalie de la glycémie à jeun

AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase;

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1 beta-riboside

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNi : ARN interférant

ARNm : ARN messenger

ASP : de l'anglais acid soluble products

ATP : adénosine triphosphate

BCA : de l'anglais bicinchoninic acid

BSA : albumine bovine sérique (de l'anglais bovine serum albumin)

Ca²⁺ : calcium

CaCl₂ : dichlorure de calcium

CCM : chromatographie sur couche mince

CE : cholestérol esters

CH₃CH₂OH : éthanol

CHCl₃ : chloroforme

CO₂ : gaz carbonique

CoA : coenzyme A

cpm : coups par minute

CPT-1 : carnitine-palmitoyl transférase 1

D.O. : densité optique

DAG : diacylglycérols
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGAT : diacylglycérol acyltransférase;
EC₅₀ : concentration efficace à 50%
EDTA : de l'anglais ethylenediaminetetraacetic acid
ES : erreur standard
FABP : de l'anglais fatty acid binding protein
FACS : de l'anglais fluorescence activated cell sorter
FAS : de l'anglais fatty acid synthase
FATP : de l'anglais fatty acid transport protein
FCCP : p-trifluoroéthoxy-carbonyl-cyanide-phényl hydrazone
G3P : glycérol-3-phosphate
GIP : de l'anglais gastric inhibitory polypeptide
GK : glucokinase
GLUT : glucose transporter
GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase
GTP : guanosine triphosphate
HA : hémagglutinine
HCl : acide chloridrique
HCO₃⁻ : bicarbonate
HRP : de l'anglais horse radish peroxidase
HSL : hormone sensitive lipase
IG : intolérance au glucose
IgG : immunoglobuline de type G
KCl : chlorure de potassium
KOH : hydroxyde de potassium
KRB : Krebs ringer buffer
KRBH : Krebs ringer buffer et Hepes
LDL : low density lipoprotein
LPA : acide lysophosphatidique
M.O.I. : de l'anglais multiplicity of infection

MAG : monoacylglycérol
MgSO₄ : sulfate de magnésium
MODY : de l'anglais Maturity-Onset Diabetes of the Young
NaCl : chlorure de sodium
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NaHCO₃ : bicarbonate de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium
NCEH : neutral cholesterol hydrolase
NE : non-estérifié
NEM : N-éthylmaléimide
PA : acide phosphatidique
PACAP : de l'anglais pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAPase : acide phosphatidique phosphatase
PBS : de l'anglais phosphate buffered saline
PC : pyruvate carboxylase
PCR : amplification en chaîne par polymérase (de l'anglais polymerase chain reaction)
PDH : pyruvate déshydrogénase
PEG : polyéthylène glycol
PL : phospholipides
RE : réticulum endoplasmique
ROS : de l'anglais reactive oxygen species
SCD-1 : stearoyl-CoA désaturase
TG : triacylglycérols
TGL : triglycéride lipase
vs : versus
ZF : Zucker fatty
ZL : Zucker lean

À mes parents, Louise et Charles,
et à ma sœur Marie-Josée, qui m'ont encouragée et supportée
pendant cette longue aventure.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr Marc Prentki, mon directeur de thèse, pour l'accueil qu'il m'a réservé et du temps qu'il m'a consacré lors de ma formation. Je suis très fière d'avoir eu l'opportunité de faire partie d'un laboratoire aussi prestigieux et reconnu. Le projet de recherche auquel j'ai été associée m'a vraiment permis de consolider mes connaissances et surtout d'en développer de nouvelles. Cette expérience dans le milieu académique sera très importante pour ma carrière.

Je dois saluer mes anciens patrons et collègues de BioSignal et PerkinElmer. Ils m'ont encouragée à faire un retour aux études pour réaliser une maîtrise et un doctorat.

Un merci tout particulier à Érik Joly, scientifique et mentor qui est un associé de recherche indispensable dans l'équipe du laboratoire Prentki. Je me sens privilégiée d'avoir été formée par un scientifique aussi rigoureux et passionné.

Je voudrais aussi dire merci à Chris Nolan et Marie-Line Peyot qui m'ont conseillée et guidée dans cette longue aventure.

Que seraient les étudiants dans un laboratoire sans des assistantes de recherche comme Roxanne Lussier, Johane Morin et Mélanie Guévremont ? Grâce à vous, mon environnement de travail était ordonné, efficace et agréable.

Bien sûr, la vie d'étudiante a été des plus agréable avec mes ami(e)s et collègues étudiants du laboratoire. Je me suis bien amusée à faire des expériences avec vous les copains !

Finalement, un merci des plus sincère à mes proches, mes parents, ma sœur et mes amis non-scientifiques. Merci de m'avoir encouragée à me rendre au bout de cette aventure. Je n'aurais pas vu la fin de ce projet si vous ne m'aviez pas encouragée. Parce que « l'éternité, c'est surtout long vers la fin » comme dirait Kafka...

Chapitre I : Introduction

1. Le diabète

Le diabète est une maladie chronique de l'homéostasie du glucose caractérisée par une hyperglycémie non contrôlée qui est le résultat d'une défaillance de la sécrétion d'insuline en combinaison ou non avec une altération de l'action de l'insuline. Il s'agit de la maladie endocrinienne la plus fréquente.

1.1 Historique, définitions et statistiques du diabète

Dès l'Antiquité, les Grecs et les Égyptiens reconnaissaient les symptômes du diabète. En grec, diabète signifie 'passer à travers' comme il est illustré dans une citation de Galien : 'Les reins et la vessie ne cessent d'émettre des urines. Il ne peut s'empêcher de boire et d'uriner.' En 1674, Willis trouve que l'urine des patients diabétiques a un goût sucré. En 1869, Paul Langerhans découvre que le pancréas contient deux types cellulaires, les acinis et les îlots dont il ignore la fonction et que Laguesse baptisera 'îlots de Langerhans' en 1893. Ce n'est qu'en 1921 que Banting, avec l'aide de Best, identifie et isole le peptide actif qu'est l'insuline à partir de pancréas de chien. Lorsque cette préparation est injectée à un chien préalablement rendu diabétique, la maladie est alors contrôlée.

Plus de 220 millions de personnes sont atteintes de diabète dans le monde et il est estimé que le nombre de décès dus à cette maladie doublera entre 2005 et 2030 (WHO *Fact sheet N°312 November 2009*). Il ne s'agit pourtant pas d'une maladie contagieuse mais bien d'une maladie métabolique chronique, avec une espérance de vie raisonnable lorsque la maladie est contrôlée et que les complications sont absentes. Au Canada, en 2005, le diabète a été diagnostiqué chez 1.8 millions d'adultes ce qui représente 5.5 % de la population. Les chercheurs estiment qu'en 2030 au moins 3.5 millions de personnes seront diabétiques au Canada (WHO).

La maladie représente de nos jours un problème considérable de santé publique. Pour le système de santé québécois, le coût des soins est estimé à trois milliards de dollars par an en frais directs et indirects. Un lit sur cinq à l'hôpital est occupé par une personne traitée pour cette maladie ou une de ses complications (Diabète Québec: Portrait du diabète au Québec. Mai 2009).

La glycémie normale varie de 3.5 à 6.1 mM glucose dépendamment des individus. Selon les guides de l'Association Canadienne du Diabète publiées en 2008, le diabète est diagnostiqué sur les bases cliniques suivantes:

- Une anomalie de la glycémie à jeun (AGJ) est détectée lorsque la glycémie après huit heures de jeûne est de 6.1 à 6.9 mM.
- Une intolérance au glucose (IG) est déterminée par une glycémie à jeun de 6.1 à 6.9 mM accompagnée d'une glycémie de 7.9 à 11 mM deux heures après une hyperglycémie provoquée par l'ingestion rapide de 75 g de glucose.
- Un diagnostic de diabète est posé lorsque la glycémie à jeun est égale ou plus grande que 7 mM, ou plus grande que 11 mM deux heures après une hyperglycémie provoquée par l'ingestion de 75 g de glucose.

Les symptômes cliniques les plus fréquents sont la polydipsie et la polyurie qui sont souvent accompagnés, dans le cas du diabète de type 1 surtout, d'une perte de poids inexplicée. Pour tous les types de diabète, les complications associées sont les néphropathies, les neuropathies, la rétinopathie, les maladies coronariennes et les amputations. De plus, les patients diabétiques ont deux fois plus de risques de mourir prématurément que les non diabétiques.

1.2 Les différents types de diabète

Le diabète est caractérisé par l'hyperglycémie mais c'est plutôt le résultat de différentes maladies aux étiologies distinctes. Il existe plusieurs types de diabète.

1.2.1 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 représente entre 90 à 95 % des cas de diabète. C'est donc le type le plus fréquent et celui qui est en augmentation fulgurante. Le diabète de type 2 est caractérisé par la résistance à l'insuline des tissus cible (muscle squelettique, foie, tissus adipeux) et une sécrétion d'insuline déficiente. Il s'agit d'une maladie chronique qui prend plusieurs années pour se développer. Le diabète de type 2 est le résultat du mode de vie sédentaire, de la « malbouffe » ou de la surnutrition en association avec des prédispositions génétiques. Il y a donc une étroite relation entre ce diabète et la surcharge pondérale (Nadler *et al.* 2000). Typiquement, ce type de diabète apparaissait chez les adultes de plus de 40 ans ayant accumulé avec les années un surplus de poids. Cependant, dû à l'environnement de plus en plus diabétogène (sédentarité et surnutrition) présent depuis les deux dernières décennies, des cas chez les adolescents sont maintenant répertoriés.

Comme nous venons de le voir, le diabète de type 2 est typiquement associé au contexte de l'obésité (Nadler *et al.* 2000). Environ 80 % des diabétiques de type 2 sont obèses, bien que seulement 10 % des obèses soient diabétiques de type 2 (Kushner et Sujak 2009). Le diabète de type 2 est aujourd'hui considéré comme étant au stade d'épidémie. Comme nous l'avons vu précédemment, les statistiques sont alarmantes et nous assistons à l'explosion du nombre de cas depuis les dernières années. Pour ce type de diabète, il est important de rappeler que la maladie serait évitée, ou du moins sa progression retardée, par une diète saine en conjonction avec de l'activité physique régulière. En effet, des études ont démontré que le suivi intensif des habitudes de vie prévenait le diabète de type 2 (Eriksson et Lindgrade 1991 ; Pan *et al.* 1997 ; Knowler *et al.* 2002 ; Ramachandran *et al.* 2006 ; Lindstrom *et al.* 2003, 2006 ; Wadden *et al.* 2011). Le maintien de la perte de poids est cependant difficile. Les prédispositions génétiques ne changent pas pour un individu au

cours de la vie, mais l'augmentation de la charge pondérale en concomitance avec le manque d'activité physique persistent au cours du temps.

Durant le développement du diabète de type 2, un état pré-diabétique est identifié la présence d'une anomalie de la glycémie à jeun et une intolérance au glucose. Le dépistage de ces deux conditions, mais surtout leur prévention, pourrait prévenir la progression vers le diabète. Les personnes pré-diabétiques sont exposées à long terme au diabète et à ses complications.

L'hérédité joue un rôle dans le développement du diabète de type 2. En effet, les enfants de parents diabétiques sont plus susceptibles de développer la maladie au cours de leur vie (Permutt *et al.* 2005). Récemment, des polymorphismes ou des mutations ont été identifiés par des études génomiques à grande échelle de type GWAS (de l'anglais Genome-Wide Association Studies). Une quarantaine de loci de susceptibilité ont été associés au diabète de type 2 (Ahlqvist *et al.* 2011). Cependant, ces loci comptent pour une faible fraction de l'ensemble des susceptibilités au diabète de type 2 (moins de 10%). Pour la plupart de ces loci, la cause de cette susceptibilité reste inconnue. En effet, des variants génétiques ont été identifiés dans les gènes suivants, aussi appelés gènes de susceptibilité: KCNJ11/ABCC8 (Nielsen *et al.* 2003; Florez *et al.* 2007), TCF7L2 (Sladek *et al.* 2007), PPARG (Altshuler *et al.* 2000), CAPN10 (Horikawa *et al.* 2000 ; Song *et al.* 2004), HHEX (Saxena *et al.* 2007). Un polymorphisme a aussi été identifié à proximité du gène de IRS1 (de l'anglais insulin receptor substrate 1). Ce polymorphisme entraîne une diminution de l'expression de la protéine de signalisation de l'action de l'insuline IRS1 et un défaut de signalisation de l'insuline pour activer la phosphatidylinositol-3-kinase (Rung *et al.* 2009).

1.2.1.1 Étiologie du diabète de type 2

L'étiologie de la maladie ne fait pas encore consensus. Le diabète de type 2 est une maladie très hétérogène et polygénique. Les rôles respectifs d'une diminution de la sécrétion de l'insuline en réponse à la demande de l'organisme et de la résistance à l'insuline sont encore source de débat dans la littérature. La surnutrition et le manque d'activité physique chez des individus qui ont des prédispositions génétiques donnent lieu

à la résistance à l'insuline. Cet état n'a pas de symptôme comme tel puisque l'hyperinsulinémie compense pleinement pour la résistance à l'insuline des tissus cible et la glycémie est normale. Dans la majorité des cas, la surnutrition et l'inactivité persistent sur une longue période et la cellule β se « fatigue » et ne peut compenser pleinement face à la résistance à l'insuline qui persiste puisqu'elle est maintenue par l'obésité. Les individus deviennent alors intolérants au glucose (IG) et entrent alors dans une phase nommée pré-diabétique (Stumvoll *et al.* 2005). Le signe clinique de l'IG est caractérisé par des excursions hyperglycémiques post-prandiales plus ou moins longues tel que décrits plus haut. Avec une intervention à ce stade, soit par des changements d'habitude de vie et d'activité physique conjointement avec ou sans traitement pharmacologique, la progression vers l'état diabétique serait évitée ou du moins ralentie.

Lors de la phase de décompensation, la sécrétion d'insuline devient insuffisante. Un diabète franc, caractérisé par une hyperglycémie à jeun, survient. La cause de la diminution de la sécrétion d'insuline est source de débat dans la communauté scientifique. La sécrétion d'insuline est peut-être diminuée parce que les cellules β ne peuvent plus sécréter assez d'insuline parce qu'elles deviennent non fonctionnelles ou/et parce que la population de cellules β diminue.

Des études récentes permettent de supposer que la défaillance de la sécrétion d'insuline serait l'étape instrumentale au développement du diabète de type 2 (Nolan *et al.* 2011 ; Prentki et Nolan 2006). L'étape de décompensation est associée à une perte de la fonction physiologique, soit une diminution de la capacité à sécréter de l'insuline en réponse au glucose (Leahy 2005), alors que la progression du diabète pourrait être associée à une destruction des cellules β par apoptose (Butler *et al.* 2003 ; Nolan *et al.* 2011).

1.2.2 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1, aussi dit insulino-dépendant, entraîne habituellement une carence insulinique absolue. Cette maladie résulte d'une défaillance de la sécrétion d'insuline parce que les cellules produisant l'insuline ont été détruites par une réaction

auto-immune (Devendra *et al.* 2004). Cette maladie représente seulement 5 à 10 % des cas de diabète. Elle se présente de façon subite et frappe généralement les enfants et les jeunes adultes. Cette maladie est d'origine immunitaire, et des prédispositions génétiques ont été identifiées par la présence de variants des gènes HLA, l'insuline, PTPN22, IL2Ra, et CTLA4 (van Belle *et al.* 2011). L'exposition à des virus est aussi présumée en être une cause (Ylipaasto *et al.* 2004 ; Williams *et al.* 2006 ; Dotta *et al.* 2007 ; Richardson *et al.* 2009). Le traitement du diabète de type 1 implique la prise quotidienne d'insuline tout au long de la vie du patient.

1.2.3 Les diabètes de type MODY

Il existe des types monogéniques de diabète. Ceux-ci sont causés par des polymorphismes ou des mutations dans des gènes regroupés en 3 groupes. De ces gènes, appelés diabétogènes, les plus connus sont ceux qui sont appelés MODY (de l'anglais Maturity-Onset Diabetes of the Young). Ces défauts génétiques affectent la fonction des cellules productrices d'insuline et le diabète se déclare généralement avant 25 ans. Ils représentent une faible proportion de tous les cas de diabète soit 2 à 5 % (Giuffrida et Reis 2005). Le mode de transmission est héréditaire de type autosomique dominant. Des mutations dans 7 gènes ont été identifiées : la glucokinase (MODY2) et les facteurs de transcription HNF4- α (MODY1), HNF1- α (MODY3), IPF-1/PDX-1 (MODY4), HNF1- β (MODY5), NeuroD1/b2 (MODY6) et KLF11 (MODY7), ce dernier étant un régulateur de PDX-1 (Fernandez-Zapico *et al.* 2009).

Des mutations causant le diabète ont aussi été associées au génome mitochondrial (van den Ouweland *et al.* 1992). De plus, des mutations causant un diabète néonatal permanent sont maintenant décrites dans la littérature (Malecki et Mlynarski 2008). Ces mutations causent l'apparition du diabète au cours des six premiers mois de vie du nourrisson.

1.2.4 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose prononcée qui se manifeste ou qui est dépistée pour la première fois pendant une grossesse, en général vers la fin du deuxième ou durant le troisième trimestre. En effet, les demandes physiologiques du fœtus sont normalement compensées par une augmentation de la sécrétion d'insuline de la mère. La dépendance à l'insuline disparaît dans 90 % des cas après l'accouchement (Di Cianni *et al.* 2003 ; Ben-Haroush *et al.* 2004). Les nourrissons de mère diabétique ont un poids à la naissance plus élevé que la normale. Le diabète gestationnel a pour conséquence une prédisposition accrue à développer le diabète de type 2 pour la mère et le nourrisson (Buchanan et Xiang 2005 ; Kaaja et Ronnema 2008) plus tard dans la vie. Au Canada, il est estimé que le diabète gestationnel a une incidence de 3.7 % (Metzger et Coustan 1998).

2. Le pancréas

2.1 La structure du pancréas

Le pancréas est une glande mixte constituée de cellules exocrines et de cellules endocrines organisées en îlot enfoncés dans une masse de cellules acineuses. Les îlots de Langerhans, nommés ainsi en l'honneur du scientifique qui les a décrits pour la première fois en 1869, sont constitués de grappes d'environ 400 à 2000 cellules endocrines qui ont une irrigation sanguine élevée (Motta *et al.* 1997). La structure est particulièrement innervée. Un humain adulte possède une masse d'environ 1 g de tissus pancréatique constitué de 1 à 2 millions d'îlots de Langerhans qui représente seulement 1 à 2 % de la masse du pancréas.

2.2 Les fonctions du pancréas

Les fonctions du pancréas exocrine sont les suivantes: premièrement, il permet la digestion par la constitution du suc pancréatique. Les enzymes contenues dans le suc pancréatique, synthétisées par les cellules acineuses, sont sécrétées dans les canaux pancréatiques se déversant dans le duodénum. Les enzymes sont sécrétées sous forme de pro-enzymes qui deviennent actives par clivage protéolytique dans le tube digestif. Les

enzymes sécrétées permettent la digestion de différents macronutriments. Il s'agit d'enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine, la carboxypeptidase et la proélastase. Il y a aussi des enzymes lipolytiques : la lipase, les phospholipases A₁ et A₂, des estérases, l'amylase et aussi des nucléases, la ribonucléase et la désoxyribonucléase. Deuxièmement, le suc pancréatique permet de neutraliser l'acidité gastrique par son contenu alcalin riche en bicarbonate.

Les fonctions endocrines du pancréas associées aux îlots de Langerhans sont assurées par les cellules α , β , δ , PP (aussi appelé cellules F) qui constituent respectivement 25, 60, 10 et 5 % de la masse totale des îlots chez le rongeur. Ces cellules sécrètent, dans l'ordre, le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

L'insuline est l'hormone hypoglycémisante qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la glycémie. La sécrétion de l'insuline par les cellules β diminue la glycémie en opposition au glucagon sécrété par les cellules α qui joue le rôle d'hormone hyperglycémisante. La somatostatine agit en inhibant l'action de l'insuline et du glucagon. Le pancréas endocrinien assure le maintien d'une glycémie constante pour une utilisation et un stockage appropriés de l'énergie suite à un repas par les différents types cellulaires sensibles à l'insuline. Il assure la mobilisation des réserves d'énergie contenues dans les dépôts graisseux comme substrat énergétique en période de jeûne. La sécrétion inappropriée du glucagon ou de l'insuline altère profondément l'utilisation et le métabolisme des nutriments tels les sucres, les protéines et le gras dans les différents tissus. L'homéostasie du glucose implique donc un contrôle fin entre la sécrétion d'hormones hypo et hyperglycémisante.

2.3 La biosynthèse de l'insuline

La conservation du gène de l'insuline au cours de l'évolution est remarquable puisqu'on la retrouve non seulement chez les mammifères mais aussi chez les reptiles, les amphibiens, les insectes, les oiseaux et les poissons.

La biosynthèse de l'insuline par la cellule β se fait en plusieurs étapes. Chez l'humain, l'hormone biologiquement active et mature est d'abord synthétisée sous la forme d'un précurseur de 110 acides aminés appelé prépro-insuline. La molécule immature entre dans le réticulum endoplasmique rugueux et le peptide signal de 24 acides aminés est clivé. Le précurseur est ensuite empaqueté dans le Golgi sous forme de pro-insuline dans les granules immatures de sécrétion. Le précurseur est une chaîne polypeptidique unique avec trois ponts disulfures. La maturation des granules se fait avec leur progression dans le réseau trans-Golgi pour être acheminé vers les vésicules destinées à la sécrétion.

La conversion en la forme biologiquement active est catalysée par la prohormone convertase (PC1/2) (Davidson *et al.* 1988) et l'exoprotéase CPH pour produire l'insuline mature et le C-peptide (Goodge et Hutton 2000). Une fois mature, l'insuline est emmagasinée dans les granules de sécrétion en attente d'être sécrétée. L'insuline mature est constituée de deux chaînes polypeptidique, de 30 et de 21 acides aminés, qui sont liées par deux 2 ponts disulfures. Le C-peptide, correspondant à la portion centrale clivée du peptide pré-proinsuline, est aussi emmagasiné dans les granules matures et il est sécrété conjointement avec l'insuline de façon équimolaire.

2.4 Le potentiel sécrétoire de la cellule β pancréatique

La cellule β emmagasine une grande quantité d'insuline et le largage de l'hormone doit être finement contrôlé. La cellule β possède plusieurs caractéristiques similaires aux neurones qui lui confèrent une excitabilité électrique, ce qui rend possible la sécrétion d'insuline de façon réglée. En effet, comme les neurones, les cellules β possèdent plusieurs protéines de la famille SNARE (de l'anglais soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein factor) qui constituent une des composantes critiques de la fusion membranaire. Les protéines de la famille des t-SNAREs exprimées dans la cellule β sont la syntaxin 1 et SNAP-25 ainsi que la v-SNARE synaptobrevin/VAMP-2 (Gerber et Sudhof 2002 ; Duman et Forte 2003). Les cellules β expriment aussi Rab3 (Regazzi *et al.* 1996) et les canaux calcium de type L (Iwashima *et al.* 1993).

Les étapes principales de l'exocytose sont constituées du transport des vésicules vers la membrane, qui implique le cytosquelette, et de la fusion membranaire des vésicules avec la membrane plasmique. Cette dernière étape est dépendante du calcium (Straub et Sharp 2002).

3. Les mécanismes de la sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline est finement reliée à la concentration plasmatique du glucose dans une gamme de concentration physiologique. Les mécanismes impliqués dans la perception des variations de concentration plasmatique du glucose et des autres nutriments modulant la sécrétion par la cellule β ont été un centre d'intérêt majeur des recherches des dernières années.

La cellule β peut répondre aux variations de l'environnement plasmatique puisqu'elle peut sentir la présence de différents substrats énergétiques et réagir en fonction de leur concentration plasmatique. La cellule β peut ajuster son débit de sécrétion d'insuline par des systèmes de reconnaissance et de transduction divers et complexes qui ne sont pas tous élucidés à ce jour.

3.1 Les stimuli de la sécrétion d'insuline

Les agents qui stimulent la sécrétion d'insuline peuvent être classés en deux catégories, les stimuli primaires et amplificateurs.

Les stimuli primaires, sont ceux qui ont la capacité à eux seuls de déclencher la sécrétion d'insuline. Le glucose exerce un effet dans une gamme de concentration physiologique, ce qui en fait le seul vrai stimulus primaire. À des concentrations supra physiologiques telles qu'utilisées dans les expériences *in vitro*, la leucine en présence de glutamine, le mannose, le glycéraldéhyde, l'alpha-ketoisocaproate, les sulphonylurées et les glinides déclenchent la sécrétion d'insuline en absence de glucose (Magnan et Ktorza 2005).

D'autre part, les stimuli amplificateurs sont ceux qui potentialisent la sécrétion d'insuline seulement en présence du stimulus primaire, le glucose. Le métabolisme du glucose est nécessaire pour la sécrétion d'insuline et plusieurs agents comme les acides aminés (Newsholme *et al.* 2007) ainsi que les acides gras (McGarry et Dobbins 1999) peuvent stimuler la sécrétion d'insuline mais seulement en présence d'une concentration permissive de glucose (3-5 mM et plus). En plus de ces stimuli, il y a aussi d'autres agents stimulateurs comme les neurotransmetteurs et les facteurs entériques comme le GLP-1 (de l'anglais glucagon-like peptide), le GIP (de l'anglais gastric inhibitory peptide) et le PACAP (de l'anglais pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide). Ces molécules agissent par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G qui déclenchent une cascade signalétique par des seconds messagers comme l'AMPc et le Ca²⁺ (Rutter 2001).

3.2 Profil biphasique de la sécrétion d'insuline

En réponse à une exposition des cellules β à une concentration stimulatrice et stable de glucose, le profil de la sécrétion d'insuline est biphasique (Curry *et al.* 1968 ; Straub et Sharp 2002). La première phase de la sécrétion d'insuline (Figure 1) est le résultat du largage rapide des granules matures immédiatement mobilisables (Daniel *et al.* 1999 ; Rorsman et Renström 2003). Ces granules sont accolées à la membrane. La sécrétion augmente rapidement et le pic est atteint en moins de 5 minutes.

Au cours de la deuxième phase, la sécrétion d'insuline atteint un plateau qui demeure soutenu pendant plusieurs minutes. La première phase implique la voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline alors que la deuxième phase est occasionnée par la voie amplificatrice (voir plus bas). Malgré l'amplitude de la première phase, la quantité absolue d'insuline relâchée au cours de la deuxième phase est plus importante. Il est possible d'observer les deux phases de la sécrétion dans des expériences de perfusion d'îlots de Langerhans isolés et aussi *in vivo* dans des clamps hyperglycémiques. Chez les patients diabétiques de type 2, la disparition de la première phase de sécrétion constitue le signe le plus précoce et distinctif de l'altération de la fonction de la cellule β .

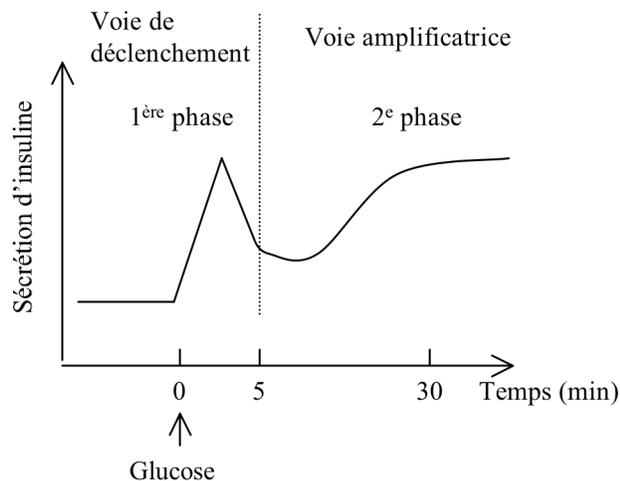


Figure 1. Profil biphasique de la sécrétion d'insuline.

Depuis les premières études de la transduction des signaux responsables de la sécrétion d'insuline, trois faits sont bien établis : le métabolisme du glucose est nécessaire pour la sécrétion d'insuline, l'ion calcium y joue un rôle essentiel pour promouvoir l'exocytose des granules de sécrétion et les cellules β sont électriquement excitables. La stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose implique deux voies : la voie déclenchante qui est dépendante des canaux K^+ sensibles à l'ATP et la voie amplificatrice moins comprise.

3.3 Voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline

La voie « classique » fait intervenir la production d'un facteur de couplage, l'ATP (Figure 2). Celui-ci agit comme courroie de transmission qui relie le métabolisme du glucose à l'exocytose des vésicules d'insuline (Ashcroft *et al.* 1984 ; Aguilar-Bryan *et al.* 1995 ; Straub et Sharp 2002).

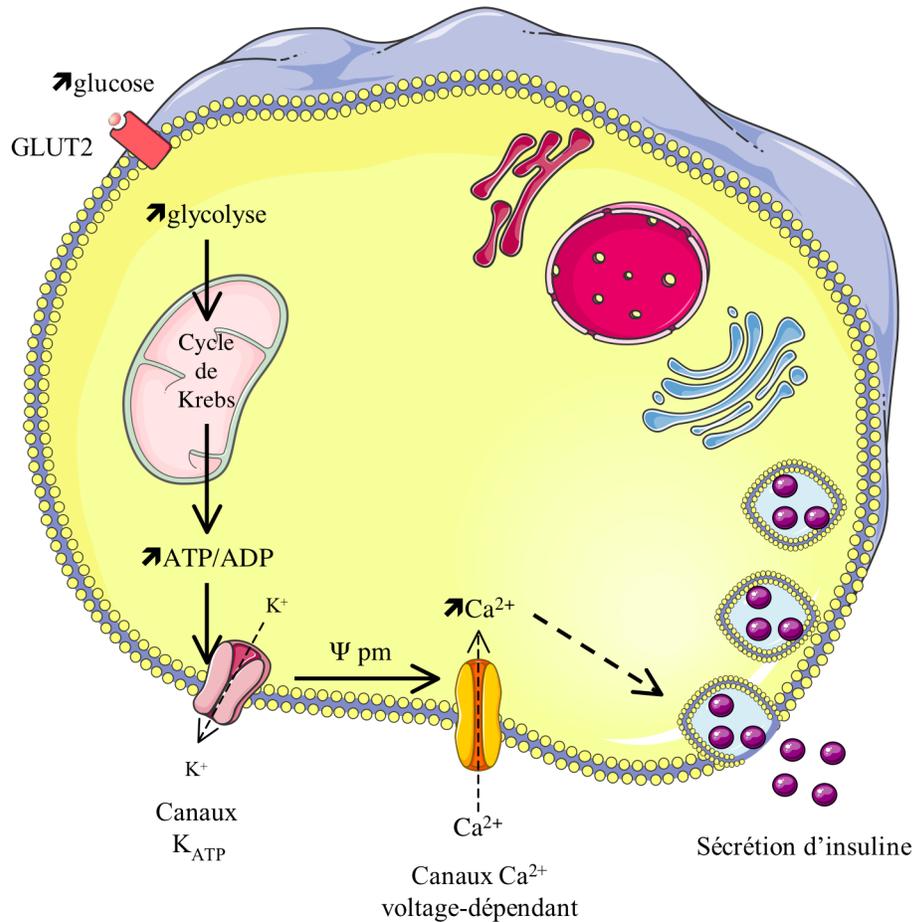


Figure 2. Voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline

La voie de déclenchement est aussi dite dépendante des canaux K^+ sensibles à l'ATP. En effet, l'ATP produit suite au métabolisme du glucose par la glycolyse et le cycle de Krebs augmente le rapport ATP/ADP entraînant la fermeture des canaux K^+ sensibles à l'ATP (canaux K_{ATP}). Ceux-ci sont constitués de 4 sous-unités Kir6.2, qui forment un pore ionique, et de 4 sous-unités régulatrices SUR1. La fermeture des canaux K_{ATP} entraîne une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage de type L qui cause un influx de calcium vers l'intérieur de la cellule. L'influx de calcium conduit à l'exocytose des vésicules d'insuline.

La voie classique ne peut cependant expliquer l'effet amplificateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline.

3.4 Voie d'amplification de la sécrétion d'insuline

En complément à la voie classique, la voie dite amplificatrice de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été proposée pour expliquer l'effet amplificateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline. La suggestion d'une voie parallèle à la voie de déclenchement par le groupe de Henquin (Gembal *et al.* 1993) a été proposée suite à la démonstration que des concentrations croissantes de glucose pouvaient augmenter la sécrétion d'insuline indépendamment des canaux potassiques dépendant de l'ATP (dit canaux K_{ATP}) à condition que la concentration intracellulaire de calcium soit permissive. Cette voie implique probablement, comme suggéré par le groupe du Dr Prentki, l'anaplérose et le cycle triglycéride/acide gras que nous décrivons plus bas (Figure 3).

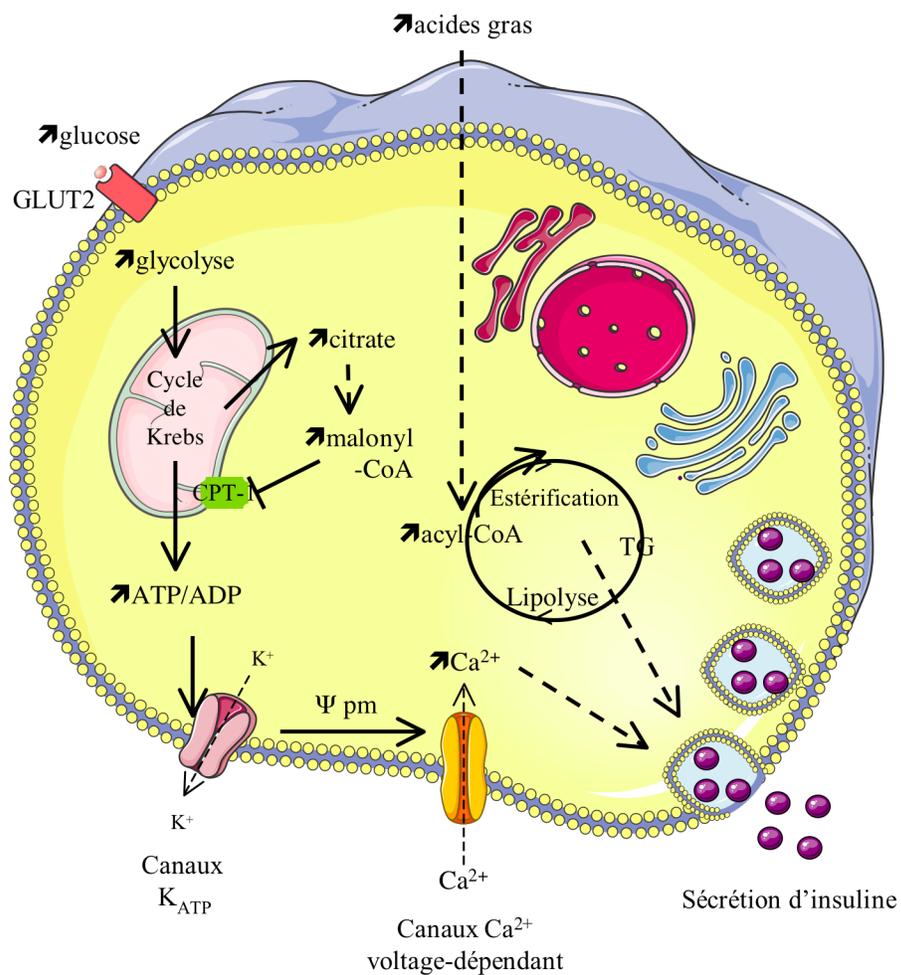


Figure 3. Voie amplificatrice de la sécrétion d'insuline

4. Le métabolisme de la cellule β pancréatique

Plusieurs particularités de la cellule β assurent sa capacité de promouvoir une sécrétion d'insuline appropriée à la glycémie. Bien que la majorité des voies métaboliques soient communes à l'ensemble des cellules, la cellule β pancréatique possède certaines particularités qui encouragent le métabolisme du glucose vers la production d'ATP et d'autres facteurs de couplage métabolique.

4.1 Le métabolisme du glucose par la cellule β

Le métabolisme du glucose est nécessaire pour la production d'ATP et l'influx de calcium permissif à la sécrétion d'insuline (Malaisse *et al.* 1990 ; Ascroft et Rorsman 1990).

4.1.1 Le transport du glucose

Le glucose est d'abord transporté à l'intérieur de la cellule β par un transporteur qui n'est pas saturable aux concentrations plasmatiques de glucose. Ce transporteur appelé GLUT2 chez les rongeurs est exprimé par les cellules β et les hépatocytes. Cet isoforme permet l'équilibration rapide des concentrations de glucose extra et intracellulaires grâce à des caractéristiques cinétiques de ce transporteur, lequel possède un très haut K_m de 17 mM et un V_{max} élevé. Le GLUT2 est nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose tel que démontré par les études où l'expression de GLUT2 a été réduite et une altération de la sécrétion d'insuline a été observée (Valera 1994 ; Guillam *et al.* 1997). Le transporteur GLUT2 est nécessaire à la sécrétion d'insuline, mais ne contrôle pas le métabolisme du glucose de la cellule β et n'est pas limitant pour la sécrétion de l'insuline.

4.1.2 La glycolyse

Après son entrée dans le cytoplasme, le glucose est phosphorylé et emprunte la voie de la glycolyse, la voie catabolique où le glucose est clivé en 2 molécules de pyruvate avec la production nette de 2 ATP et 2 NADH+H⁺. Dans la cellule β pancréatique, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P) par un isoforme de l'hexokinase, la

glucokinase (GK), qui a comme particularité d'avoir un K_M relativement élevé de 8 mM pour son substrat le glucose. De plus, contrairement à l'hexokinase, la GK n'est pas inhibée par son produit, le glucose-6-phosphate, ou le glucose-1,6-bisphosphate. Cette particularité permet de coupler linéairement les concentrations plasmatiques de glucose à la glycolyse (Malaisse *et al.* 1979 ; Meglasson et Matschinsky 1986). La glycolyse augmente donc en parallèle avec la concentration extracellulaire de glucose dans un grand intervalle soit de 3 à 20 mM.

L'étape de la phosphorylation du glucose par la GK est considérée comme une étape limitante dans le métabolisme du glucose (Malaisse 1985). En effet, une mutation rare de la GK observée chez l'humain réduit son activité et est associée à une sécrétion d'insuline altérée et au développement du diabète de type MODY2 (Froguel *et al.* 1993), le premier gène du diabète qui a été découvert.

4.1.3 Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative

Dans la cellule β pancréatique, une très grande proportion des carbones dérivés du glucose est oxydé dans la mitochondrie. En effet, le métabolisme du glucose est particulièrement aérobic dans ces cellules: plus de 80 % des carbones sont convertis en CO_2 (Schuit *et al.* 1997). Le pyruvate produit par la glycolyse traverse la membrane mitochondriale couplé à un proton H^+ par un système transport constitué d'une pyruvate translocase (Halestrap 1975). Ceci est dû au fait que l'expression de la lactate deshydrogénase est très faible dans la cellule β . Ainsi le pyruvate n'est pas transformé en lactate mais il est métabolisé dans la mitochondrie (Nolan et Prentki 2008).

Dans la matrice mitochondriale, la pyruvate deshydrogénase (PDH), constituée d'un complexe multienzymatique, décarboxyle le pyruvate pour produire l'acétyl-CoA, le substrat du cycle de Krebs. L'acétyl-CoA est alors oxydé dans ce cycle. Le cycle de Krebs est de nature amphibolique, c'est-à-dire qu'il contient des réactions cataboliques et anaboliques. Ainsi, il est le lieu ultime de l'oxydation de la majeure partie des sucres, des

acides gras et des acides aminés mais aussi impliqué dans de nombreuses voies de biosynthèse.

La condensation de l'oxaloacétate avec l'acétyl-CoA produit le citrate, le substrat tricarboxylé qui a donné son nom de cycle de l'acide tricarboxylique aussi appelé cycle de l'acide citrique et cycle de Krebs. Le cycle est constitué de huit réactions qui mènent à l'oxydation en CO₂ de deux carbones correspondant à l'entrée d'un groupement acétyle de l'acétyl-CoA (Voet et Voet 1995). Le cycle produit un bilan net des équivalents énergétiques suivants : une molécule de GTP, trois molécules de NADH + H⁺ et une molécule d'ubiquinone sous sa forme réduite pour chaque molécule de pyruvate.

4.1.4 L'anaplérose et la cataplérose

Le terme anaplérose a été utilisé par Kornberg en 1966 pour décrire une réaction ou une voie métabolique qui 'recharge' le cycle de Krebs en produisant un de ses intermédiaires (Ashworth et Kornberg 1966). Suite à l'entrée d'intermédiaires dans le cycle de Krebs, la mitochondrie doit disposer des intermédiaires supplémentaires par des réactions de cataplérose, soit la sortie de la mitochondrie d'intermédiaires. Bien que le rôle premier du cycle de Krebs soit l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO₂, le cycle est aussi à l'origine d'intermédiaire nécessaire à la biosynthèse du glucose, des acides gras et des acides aminés. Dans la cellule β normale cependant, la synthèse d'acides gras de novo est très faible (Brun *et al.* 1996) et elle est incapable de gluconéogénèse (MacDonald *et al.* 1992) parce que la cellule β possède très peu de glucose-6-phosphatase (van de Werve *et al.* 2000) et de phosphoenolpyruvate-carboxy-kinase (MacDonald *et al.* 1992). Plusieurs études ont montré que les réactions d'anaplérose/cataplérose étaient impliquées dans le couplage du métabolisme du glucose avec la sécrétion d'insuline (Prentki 1996). D'autres particularités de la cellule β lui permettent de coupler la presque totalité de l'entrée du glucose dans le cytoplasme au cycle de Krebs pour produire de l'ATP et d'autres facteurs de couplage. En effet, la voie des pentoses phosphates responsable de la synthèse du ribose-5-phosphate, nécessaire pour la biosynthèse des nucléotides, est très faible dans les cellules β avec pour résultat que la presque totalité du glucose est converti en pyruvate

(Schuit *et al.* 1997). De plus, comme nous l'avons mentionné plus haut l'activité de la lactate déshydrogénase est très faible et le pyruvate provenant de la glycolyse n'est pas converti en lactate.

Dans la cellule β , la principale réaction anaplérotique est catalysée par la pyruvate carboxylase (PC), qui produit l'oxaloacétate à partir du pyruvate. L'expression de la PC est très élevée dans la cellule β (MacDonald 1995). La proportion des carbones dérivés du métabolisme du glucose qui passent par la PC est grande dans la cellule β pour un tissu qui n'est pas gluconéogénique. En effet, les niveaux de PC sont similaires à ceux du foie. La présence des navettes pyruvate/malate, pyruvate/citrate qui produisent, en plus du malonyl-CoA, le NADPH sont des caractéristiques importantes de la cellule β qui couplent le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline (Guay *et al.* 2007 ; Ronnebaum *et al.* 2006 ; Joseph *et al.* 2006 ; Pongratz *et al.* 2007 ; Macdonald 1995). La dose-dépendance de l'anaplérose en réponse au glucose dans la cellule β , liée à l'accumulation du citrate, du malate et du malonyl-CoA, corrèle avec la sécrétion d'insuline (Farfari *et al.* 2000 ; Schuit *et al.* 1997).

En résumé, la cellule β possède plusieurs particularités qui permettent de produire des facteurs de couplage pour assurer la sécrétion d'insuline appropriée à la glycémie : le transport du glucose via GLUT2, la présence de la GK et le couplage efficace de la glycolyse au cycle de Krebs par la production d'ATP, et enfin une anaplérose élevée.

4.2 Le métabolisme des acides gras

Les acides gras constituent la source d'énergie principale de plusieurs organes, entre autre du foie, des muscles et du coeur. Les acides gras peuvent provenir de l'extérieur (source exogène) ou de l'intérieur de la cellule (source endogène). D'un côté, les sources d'acides gras que voit la cellule β proviennent principalement de l'extérieur de la cellule via la circulation sanguine. Les acides gras plasmatiques peuvent provenir du flux post-prandial, des réserves lipidiques des tissus adipeux ou de la synthèse des triglycérides par le foie. Le plasma transporte ainsi des acides gras non-estérifiés liés à l'albumine et des

triglycérides qui sont contenus dans les lipoprotéines circulantes. Les cellules β peuvent aussi capter les acides gras charriés par les LDL (de l'anglais low density lipoprotein) suite à l'action de la lipoprotéine lipase (Gruppung *et al.* 1997). En effet, les cellules β expriment bien cet enzyme ce qui permet l'accès aux triglycérides circulants (Cruz *et al.* 2001 ; Pappan *et al.* 2005).

D'un autre côté, les sources d'acides gras peuvent être endogènes. Une réserve de gras intracellulaire est disponible par l'intermédiaire des gouttelettes lipidiques dans de nombreuses cellules. Abondantes dans les adipocytes, ces gouttelettes sont constituées d'un centre de triglycérides et d'esters de cholestérols entouré par une monocouche de phospholipides. Des protéines spécifiques aux lipoprotéines y sont associées (Brasaemle 2007).

La concentration d'acides gras qui entre en contact avec les cellules β est inconnue. Les acides gras sont, en conditions physiologiques, liés à une protéine plasmatique comme l'albumine. Les concentrations effectives des acides gras sont dépendantes de la concentration libre (non liée à l'albumine) par rapport à la concentration liée. Les concentrations plasmatiques totales d'acides gras à jeun varient de 200 à 600 μM et peuvent être augmentées de quatre fois chez un individu obèse.

4.2.1 Le transport et l'activation métabolique des acides gras

La première étape nécessaire au métabolisme des acides gras est leur capture par la membrane cellulaire. Les acides gras franchissent la membrane plasmique à l'aide de protéines qui facilitent le transport (Van Nieuwenhoven *et al.* 1996) et par un processus passif nommé flip-flop (Hamilton et Kamp 1999). Les acides gras sont capturés par l'intermédiaire de la translocase FAT/CD36, de la FABP (de l'anglais fatty acid binding protein) et de la FATP (de l'anglais fatty acid transport protein). Dans le cytoplasme, les acides gras sont liés dans un rapport équimolaire aux protéines de type FABP qui sont présentes en grande quantité (Bernlohr *et al.* 1997 ; Binas *et al.* 1999). Malgré de nombreuses études, la proportion d'acides gras qui entrent dans la cellule par récepteur ou

par flip-flop reste indéterminée. En effet, certaines études semblent montrer que le transport passif flip-flop n'est qu'un artefact expérimental alors que d'autres suggèrent le contraire.

Les acides gras, qu'ils soient endogènes ou exogènes, sont métaboliquement activés en acyl-CoA en entrant dans la cellule par l'estérification de leur groupement carboxylique par un lien thioester avec la coenzyme A (Voet et Voet 1995). Cette étape est catalysée par la famille des acyl-CoA synthétases (ACS). Des études récentes démontrent que les différents isoformes d'ACS sont exprimés à des sites intracellulaires différents et ceux-ci influencent la voie métabolique qu'emprunte les acides gras activés (Mashek *et al.* 2007). Il est encore incertain et source de débat dans la littérature à savoir si les ACS ont uniquement une fonction enzymatique ou si certains isoformes font aussi office de protéines de transport.

Chez les mammifères, cinq gènes codant pour les ACS ont été identifiés et chacun de ces gènes encode au moins cinq isoformes différents issus de sites d'épissage alternatif (Mashek *et al.* 2006). Les séquences d'acides nucléiques disponibles permettent de prédire que les différents isoformes sont probablement des protéines membranaires mais peu d'information sont connues au sujet de leur localisation cellulaire. La fonction spécifique des différents isoformes et la manière dont leur structure affecte leur localisation est aussi source de débat dans la littérature. Il est aussi probable que ces protéines forment des homo ou des hétérodimères.

De plus, des études dans les adipocytes suggèrent que les ACS pourraient avoir une influence sur le ratio cellulaire AMP/ATP (Revue par Ellis *et al.* 2010). En effet, la réaction d'activation des acyl-CoA utilise deux ATP et produit un AMP lequel active l'AMPK. L'activité d'AMPK augmenterait ainsi l'oxydation des acides gras tout en arrêtant la synthèse de TG. Ce schéma est attirant dans le cas du jeûne où les acides gras sont élevés et le glucose bas. En revanche il serait cependant surprenant, à l'état postprandial, que l'activation des acides gras en acyl-CoA augmente l'activité d'un

indicateur de déficit énergétique comme l'AMPK. Surtout que la synthèse de TG est importante quand la disponibilité du glucose et des acides gras augmente.

4.2.2 La β -oxydation des acides gras

Les signaux générés par le métabolisme du glucose modulent les taux relatifs d'oxydation du glucose et d'oxydation des acides gras. À faible concentration de glucose, les mitochondries utilisent la β -oxydation des acides gras pour fournir l'énergie. Quand la concentration de glucose augmente, l'oxydation des acides gras diminue et l'oxydation du glucose augmente remplaçant ainsi les acides gras comme substrat énergétique. L'inhibition de l'oxydation des acides gras par le glucose est initiée par l'élévation des intermédiaires du cycle de Krebs. L'augmentation du glucose provoque une augmentation du citrate mitochondrial puis cytoplasmique (par anaplérose/cataplérose) avant d'être transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Le malonyl-CoA est un inhibiteur allostérique de la carnitine-palmitoyltransférase 1 (CPT-1), l'enzyme responsable de la réaction limitante du transport des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie. (Figure 3). Le malonyl-CoA agit comme un aiguilleur entre l'estérification la β -oxydation des acides gras à longue chaîne (Prentki *et al.* 1992). Lorsque le taux de glucose est faible, les niveaux de malonyl-CoA sont bas et n'inhibent pas la β -oxydation des lipides. Lorsque le taux de glucose est élevé, les niveaux de malonyl-CoA sont élevés ce qui inhibe la CPT -1 et l'oxydation des acides gras favorisant ainsi leur estérification en lipides complexes. Le malonyl-CoA dérivant du métabolisme du glucose agit donc comme un signal métabolique d'abondance influençant le métabolisme des acides gras.

Pour traverser la membrane mitochondriale, le groupement acyl des acides gras activés est transféré à une carnitine par la carnitine palmitoyl transférase (CPT). L'acyl-carnitine traverse la membrane mitochondriale par un système antiport acyl-carnitine/carnitine en échange de carnitine libre. Les acides gras sont oxydés dans la matrice mitochondriale par plusieurs rondes d'un cycle enzymatique qui produit une molécule d'acétyl-CoA qui peut ensuite être utilisée par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie. Il est à noter que les acides gras à courte chaîne (chaîne aliphatique de moins de

14 carbones) entrent librement dans la mitochondrie et ceux-ci ne requièrent pas la présence d'un groupement carnitine (Voet et Voet 1995).

4.2.3 L'estérification des acides gras

Comme nous venons de le voir, le métabolisme du glucose augmente les niveaux de malonyl-CoA ce qui inhibe la CPT-1. Les acyl-CoA sont alors estérifiés en lipides complexes sur le squelette de carbone constitué par le glycérol-3-phosphate (G3P). Les différentes étapes de la synthèse des glycérolipides sont illustrées dans la figure 4.

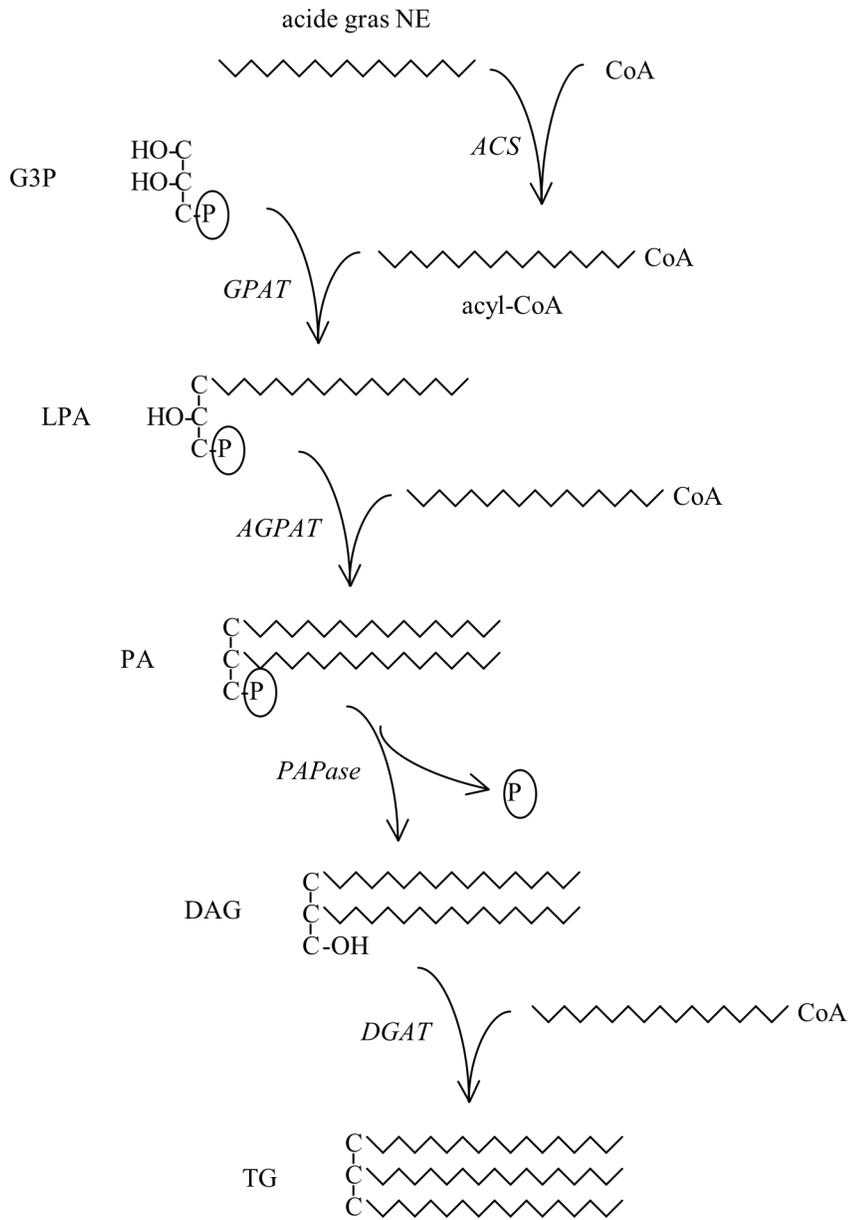


Figure 4. Synthèse des TG et estérification des acyl-CoA

Les abréviations utilisées sont : NE, non-estérifié ; G3P, glycérol-3-phosphate; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase; LPA, acide lysophosphatidique; AGPAT, 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase; PA, acide phosphatidique; PAPase, acide phosphatidique phosphatase; DAG, diacylglycérol; DGAT, diacylglycérol acyltransférase; TG, triacylglycérol. Légende des symboles: C-C-C = glycérol; ~~~~~ = chaîne aliphatique

L'estérification des acyl-CoA menant à la synthèse *de novo* des glycérolipides se fait par la condensation d'acides gras métaboliquement activés en acyl-CoA sur le squelette des carbones du glycérol-3-phosphate. Ce dernier est généré à partir du dihydroxyacétone-3-phosphate, un intermédiaire de la glycolyse, par la glycérol-3-phosphate déhydrogénase.

La première étape de la synthèse *de novo* des TG consiste en une condensation d'un acyl-CoA en position *sn*-1 du G3P par la GPAT pour former du LPA. La GPAT catalyse l'étape limitante de l'estérification *de novo* des lipides (Coleman et Lee 2004). Le LPA est ensuite transformé en PA par l'estérification d'un acyl-CoA à la position *sn*-2 par la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT). Le PA est transformé en DAG par l'acide phosphatidique phosphatase (PAPase), aussi appelée lipin. Le TG est enfin produit par la condensation d'un acyl-CoA à la position *sn*-3 par la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (Figure 5).

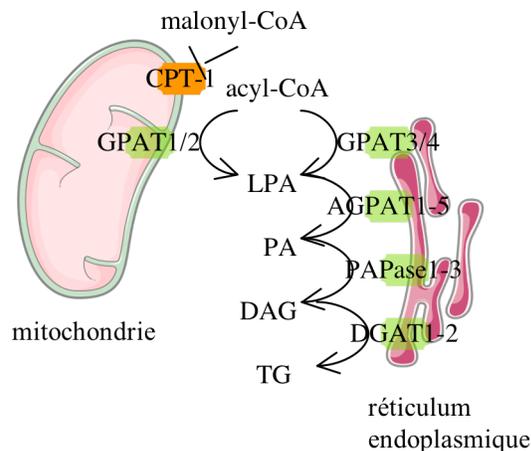


Figure 5. Isoformes des enzymes de la synthèse des TG et leur distribution sur les organelles

Les enzymes responsables de l'estérification des acides gras sont situées sur deux organelles distinctes, le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie. La première étape catalysée par les isoformes de GPAT peut avoir lieu au RE et à la mitochondrie. Comme illustré à la Figure 5, les intermédiaires formés sur la mitochondrie doivent donc

être transportés vers le RE pour compléter la synthèse des TG. En effet, les enzymes responsables des dernières étapes, AGPAT, PAPase et DGAT, se retrouvent uniquement sur le RE (Bell et Coleman 1980).

Il existe donc plusieurs isoformes des enzymes responsables de la synthèse des TG. La redondance des isoformes a certainement une signification au niveau physiologique, mais plusieurs de ces rôles restent à être identifiés.

Les intermédiaires générés par les nombreuses étapes de la voie de synthèse *de novo* des glycérolipides sur les deux organelles pourraient être à l'origine de la génération de métabolites pouvant agir comme facteurs de couplage qui modulent la sécrétion d'insuline. En effet comme nous le verrons, plusieurs études ont mis de l'avant un rôle pour certains intermédiaires du métabolisme des lipides dans la sécrétion d'insuline.

4.2.4 La lipolyse

La lipolyse est le processus par lequel une molécule de TG est hydrolysée en glycérol et trois molécules d'acide gras (Voet et Voet 1995). Les acides gras peuvent alors être utilisés comme substrats énergétiques ou être réactivés en acyl-CoA pour être oxydés ou ré-estérifiés. Les différents intermédiaires produits lors de la lipolyse peuvent avoir un potentiel signalétique.

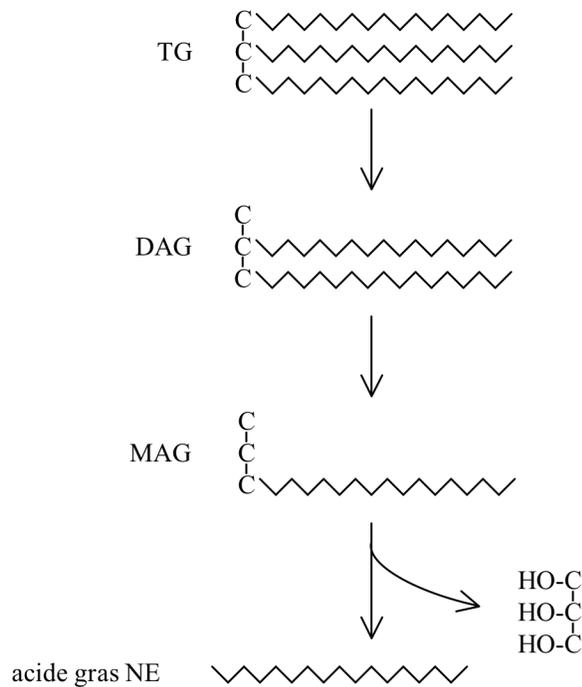


Figure 6. La lipolyse

Les abréviations utilisées sont : NE, non-estérifié ; G3P, glycérol-3-phosphate; LPA, acide lysophosphatidique; PA, acide phosphatidique; DAG, diacylglycérol; TG, triacylglycérol; MAG, monoacylglycérol. Légende des symboles: C-C-C = glycérol; ~~~~~ = chaîne aliphatique

5. Les acides gras et la sécrétion d'insuline

Dans la cellule β , l'augmentation de la concentration de glucose conduit à l'élévation du malonyl-CoA qui inhibe la CPT-1 et oriente les acyl-CoA vers l'estérification.

Plusieurs données suggèrent un rôle des acides gras dans la modulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'exposition à court terme d'îlots isolés à des acides gras augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Une hausse de la concentration en acides gras circulant dans le sang augmente la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation par le glucose (Seyffert et Madison 1967; Stein *et al*, 1997). L'absence d'acides gras circulants entrave la sécrétion d'insuline induite par le glucose ce

qui tend à montrer que les acides gras seraient essentiels à la sécrétion basale d'insuline (Stein *et al.*, 1996).

L'infusion continue d'acides gras directement dans l'artère pancréatique chez le chien a augmenté la sécrétion d'insuline (Crespin *et al.* 1973). Chez le rat où l'élévation des acides gras libres lors du jeûne est prévenue par un agent antilipolytique, l'acide nicotinique, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est abolie *in vivo* (Stein *et al.* 1996). La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est restaurée quand la concentration en acides gras libres est maintenue artificiellement par la perfusion de triglycérides et d'héparine.

Dans d'autres études, il a été montré que l'effet à court terme des acides gras sur la sécrétion d'insuline est influencé par la longueur de la chaîne aliphatique et leur degré de saturation. L'amplitude de l'effet de potentialisation des acides gras augmente avec leur degré de saturation (Stein *et al.* 1997). Par exemple, dans des expériences de perfusion de pancréas de rats, le palmitate potentialise la sécrétion d'insuline deux fois plus que l'oléate.

5.1 Récepteurs membranaires des acides gras

Il existerait environ 865 gènes codant pour des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) chez l'humain (Heilker *et al.* 2009). Une centaine de ces récepteurs sont toujours orphelins, c'est-à-dire que leur(s) ligand(s) sont encore inconnus. Des récepteurs membranaires pour les acides gras de la famille des GPCR ont récemment été identifiés dans plusieurs types cellulaires (Milligan *et al.*, 2006). De ces récepteurs, le GPR40 (aussi nommé FFAR1) est d'un intérêt particulier puisqu'il est fortement et relativement spécifiquement exprimé par les cellules β du pancréas.

Le GPR40 a été identifié en 2003 simultanément et indépendamment par trois groupes (Briscoe *et al.*, 2003; Itoh *et al.*, 2003; Kotarsky *et al.*, 2003). L'expression de ce récepteur est particulièrement élevée dans les cellules β du pancréas et son rôle dans la sécrétion d'insuline a été le centre de plusieurs études. Dans la cellule β pancréatique, il a

été montré que le GPR40 pouvait moduler la sécrétion d'insuline (Itoh *et al.* 2003 ; Briscoe *et al.* 2003 ; Kotarsky *et al.* 2003 ; Latour *et al.* 2007).

Dans certaines études réalisées *in vitro*, l'activation de GPR40 a produit un influx de calcium, déterminant que celui-ci est couplé à la petite protéine G α q. Cependant le récepteur semble aussi être couplé à la petite protéine G α i/o. En effet, le traitement à la toxine de pertussis empêche l'activation du récepteur (Fujiwara *et al.* 2005; Hardy *et al.* 2005; Yonezawa *et al.* 2004).

Une quarantaine d'acides gras à longue chaîne, saturés et insaturés, utilisés dans des concentrations de l'ordre du micromolaire ont été identifiés comme ligands de GPR40. D'autre part, ce récepteur peut aussi être activé par des agonistes du récepteur PPAR γ utilisés dans le traitement du diabète (Kotarsky *et al.* 2003). Au niveau de l'effet à court terme des acides gras sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, il a été observé que l'inhibition de l'expression de GPR40 dans les lignées MIN6 et INS-1E a causé une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence d'acides gras (Itoh *et al.* 2003; Salehi *et al.* 2005; Shapiro *et al.* 2005; Schnell *et al.* 2007). Des expériences dans des îlots pancréatiques isolés à partir de souris déficientes en GPR40 ont confirmé cet effet (Latour *et al.* 2007; Steneberg *et al.* 2005; Tan *et al.* 2008). D'un autre côté, l'administration d'agoniste synthétique de GPR40 ou une surexpression transgénique du récepteur augmente la sécrétion d'insuline dans les souris (Doshi *et al.* 2009; Nagasumi *et al.* 2009; Tan *et al.* 2008).

Bien que les acides gras soient capables de moduler la sécrétion d'insuline via un récepteur, ils ont aussi un effet via leur métabolisme (voir la prochaine section). En effet, des études utilisant des souris déficientes en GPR40 (Latour *et al.* 2007 ; Alquier *et al.* 2009) et des inhibiteurs spécifiques du métabolisme des lipides, ont montré l'importance du métabolisme des lipides dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras.

5.2 Le métabolisme des acides gras et la sécrétion d'insuline

Plusieurs études ont montré que des dérivés des acides gras résultant du métabolisme des lipides pouvaient influencer la sécrétion d'insuline. Par exemple, dans des cellules perméabilisées par la saponine et exposées à des esters d'acyl-CoA une augmentation de l'exocytose d'insuline a été observée (Deeney *et al.* 1992). Les acyl-CoA peuvent constituer des substrats pour la palmitoylation des protéines. Cette modification post-traductionnelle pourrait augmenter l'activité et l'ancrage à la membrane des canaux calcium de type L. Dans une autre étude, l'inhibition de l'acyl-CoA synthétase (ACS) par la triacsin C dans les cellules INS 832/13 et les îlots isolés a diminué les niveaux des acyl-CoA et la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras (Roduit *et al.* 2004).

5.3 La β -oxydation des acides gras et la sécrétion d'insuline

Il y a une forte corrélation inverse entre le taux de β -oxydation et la sécrétion d'insuline. En 1989, Corkey *et al.* a montré qu'une augmentation du malonyl-CoA suite à une augmentation du glucose précède et persiste pendant la sécrétion d'insuline dans la lignée HIT de cellules de hamster (Corkey *et al.* 1989). Ceci est associé à une inhibition de la β -oxydation des acides gras endogènes et à une augmentation de la synthèse *de novo* des lipides.

La surexpression de la CPT-1 native augmente la β -oxydation des acides gras exogènes et diminue la sécrétion d'insuline, l'inhibition de CPT-1 par l'etomoxir restaure la sécrétion d'insuline (Rubi *et al.* 2002). La surexpression d'une CPT-1 mutée insensible au malonyl-CoA dans les INS 832/13 a aussi augmenté la β -oxydation et diminué la sécrétion d'insuline (Herrero *et al.* 2005). Dans une étude de Roduit et collègues, la surexpression d'une isoforme de la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) a diminué la sécrétion d'insuline en réponse au glucose seulement en présence d'acides gras exogènes (Roduit *et al.* 2004).

Ainsi, l'ensemble de ces études suggère un rôle important du malonyl-CoA, de la CPT-I et d'une diminution de l'oxydation des acides gras dans le contrôle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence d'acides gras.

5.4 La lipolyse dans la sécrétion d'insuline

Plusieurs études ont montré que la lipolyse serait impliquée dans la sécrétion d'insuline, particulièrement en générant des molécules lipidiques comme les DAG (Masiello *et al.* 2002 ; Mulder *et al.* 2004; Peyot *et al.* 2004). Chez des souris déficientes pour HSL (de l'anglais hormone-sensitive lipase), la sécrétion d'insuline basale est élevée et il y a une diminution de l'induction de celle-ci par le glucose (Roduit *et al.* 2001). Dans ce modèle, l'ajout d'acides gras exogènes ou de GLP-1 entraîne une restauration de la sécrétion d'insuline (Peyot *et al.* 2004).

Dans une autre étude de Peyot et collègues, la lipase ATGL a été diminuée par ARNi en culture cellulaire ainsi que dans des souris rendues génétiquement déficientes en ATGL (Peyot *et al.* 2009). Dans les deux cas, la lipolyse a été diminuée et la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence d'acides gras exogènes a été diminuée.

Le modèle de rat ZF, qui est déficient génétiquement pour le récepteur de la leptine avec comme conséquence de générer une hyperphagie, l'obésité, l'hyperlipidémie et une résistance à l'insuline sans toutefois développer un diabète a aussi été utilisé dans le laboratoire. Dans ces animaux, la résistance à l'insuline est compensée par une hyperinsulinémie. Dans le modèle de rats ZF, l'estérification *de novo* du palmitate et le relâchement glycérol sont augmentés. Le relâchement du glycérol est ici considéré comme le reflet de la lipolyse, et celui-ci corrèle avec la sécrétion d'insuline. Cette étude a suggéré l'existence d'un cycle TG/acides gras où les voies d'estérification et/ou lipolytique pourraient jouer un rôle dans la sécrétion de l'insuline (Nolan *et al.* 2006).

5.5 Le cycle TG/acides gras

Les études mentionnées précédemment nous permettent de conclure en la dégradation par la β -oxydation d'une molécule lipidique responsable d'un signal positif pour la sécrétion d'insuline. En effet, une relation a été établie entre la β -oxydation du palmitate, les niveaux d'acyl-CoA et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Prentki *et al.* 1992). Lorsque la β -oxydation est inhibée par le glucose, une augmentation de la sécrétion d'insuline est observée. Parallèlement, les cellules estérifient davantage les acides gras en lipides complexes comme les TG, DAG, etc. Notre laboratoire a mis en évidence récemment l'existence d'un cycle TG/acides gras dans les cellules β (Nolan *et al.* 2006a).

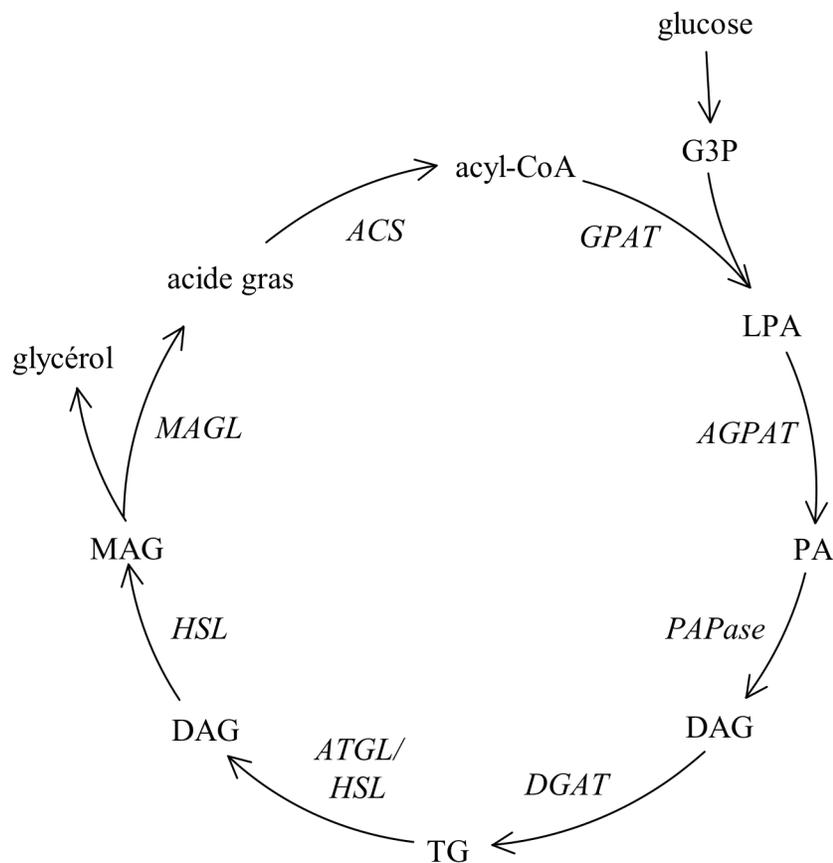


Figure 7. Le cycle des TG/acides gras

Comme illustré à la Figure 7, le cycle TG/acides gras fait intervenir une succession de réactions de lipolyse et de ré-estérification des acides gras. Les TG sont hydrolysés en position sn-1 par l'ATGL et/ou la HSL pour produire du DAG. Ce DAG peut être

hydrolysé ensuite par HSL pour produire du MAG. La monoacylglycérol lipase (MAGL) hydrolyse le MAG en glycérol et en acides gras libres. Une fraction significative des acides gras produits par la lipolyse sont ré-estérifiés.

Les études du laboratoire du Dr Prentki nous permettent de penser que le cycle TG/acides gras est impliqué dans la sécrétion d'insuline via la production de molécules lipidiques signalétiques (Prentki et Madiraju 2008). Dans cette thèse, nous avons cherché spécifiquement à savoir si le bras estérification des acides gras, du cycle TG/acides gras, étape primordiale à la synthèse des TG, pouvait constituer un signal positif pour la sécrétion d'insuline via la production de molécules signalétiques lipidiques tels le DAG, le LPA ou PA. Alternativement, il est possible que la voie lipolytique du cycle produise les signaux lipidiques (DAG, MAG, acide gras libres) impliqués dans le signalement lipidique de la sécrétion de l'insuline induite par le glucose.

6. Cibles possibles des intermédiaires lipidiques produits lors de l'estérification des acides gras pouvant potentialiser la sécrétion d'insuline

Plusieurs protéines impliquées dans le processus de l'exocytose pourraient être les cibles de molécules lipidiques produites par le métabolisme des acides gras. L'exocytose de l'insuline est un processus complexe qui implique plusieurs étapes et de nombreux partenaires : le transport des vésicules, l'accostage membranaire (*docking*), le *priming* et la fusion avec la membrane plasmique. La machinerie minimale de l'exocytose est constituée de protéines de la famille des t-SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein attachment receptor): la synaptobrévine, la syntaxine et SNAP-25 (de l'anglais 25kDa synaptosome associated protein). Plusieurs protéines responsables de l'exocytose sont sujettes à des modifications post-traductionnelles, particulièrement la palmitoylation. L'acylation de ces protéines est essentielle pour leur ancrage membranaire. Par exemple, les acyl-CoA sont les substrats utilisés pour acyler des protéines comme la SNAP-25 et la synaptogamin (Gonzalo et Linder 1998 ; Liu *et al.* 2007). Il est intéressant de noter que les acyl-CoA à longue chaîne ont induit l'exocytose de l'insuline dans des cellules β

perméabilisées (Deeney *et al.* 1992), ou sont en mesure de moduler l'activité des canaux K_{ATP} (Larsson *et al.* 1996 ; Gribble *et al.* 1998).

Les protéines impliquées dans l'excitabilité des cellules β comme la syntaxin1 et la SNAP-25 sont présentes sous la forme de clusters dans des régions membranaires appelées rafts lipidiques. Des variations au niveau de métabolites lipidiques dans ces structures pourraient influencer la sécrétion d'insuline. Aussi, la fluidité membranaire peut être influencée par la nature des acides gras qui constituent la membrane plasmique et les différents rafts de lipides.

La protéine Munc-13 est une composante importante de la machinerie de sécrétion des vésicules d'insuline (Kwan *et al.* 2006) et elle constitue un récepteur intracellulaire sensible qui peut lier le DAG et qui mène à la translocation membranaire (Betz *et al.* 1998 ; Rhee *et al.* 2002). Des souris déficientes en Munc13-1a ont montré une réduction de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (Kwan *et al.* 2006). Enfin, les enzymes PKC sont activées par le DAG et pourraient participer au processus de sécrétion de l'insuline (Schmitz-Peiffer et Biden 2008).

7. La première étape de la synthèse *de novo* des glycérolipides catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase

La première étape de la synthèse des phospholipides (PL) et des triglycérides (TG) a été identifiée en 1961 par Kennedy *et al.* Elle consiste en l'estérification du glycérol-3-phosphate avec une molécule d'acyl-CoA par une activité acyltransférase, laquelle est effectuée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). Les études enzymatiques ont d'abord distingué l'activité GPAT dans deux fractions cellulaires distinctes : mitochondriale et microsomale. Cette activité est présente sur deux organelles distinctes, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE). L'existence d'activités GPAT distinctes sur le RE et la mitochondrie a été démontrée par des expériences *in vitro* (Pullman *et al.* 1973) via l'utilisation du *N*-éthyl-maleimide (NEM). Une activité acyltransférase résistante au NEM est mesurée uniquement dans la fraction mitochondriale et cette activité est plus

grande pour les acides gras de C :16 et C :18 saturés comparativement à leur contre-partie insaturée. Une autre activité a été observée dans la fraction du RE. L'activité acyltransférase retrouvée sur le RE est sensible au NEM et n'a pas de préférence pour le degré de saturation de l'acide gras-CoA.

Différents modèles animaux et cellulaires d'inhibition et de surexpression de différents isoformes de GPAT sont maintenant décrits. À ce jour, 4 isoformes de GPAT ont été identifiées. Les différents isoformes sont encodés par des gènes distincts et les enzymes sont localisés sur la mitochondrie ou le RE. Les différents isoformes de GPAT sont décrits dans les sections suivantes.

7.1 GPAT1

L'isoforme GPAT1 est le premier à avoir été cloné (Yet *et al.* 1993 ; Bhat *et al.* 1993) et était le seul connu quand j'ai commencé ma thèse de doctorat. Des quatre isoformes connus de GPAT, il est l'isoforme le plus documenté et étudié. Tel que vu précédemment, l'activité des isoformes mitochondriaux est insensible au NEM, et GPAT1 ne fait pas exception.

En 1994, l'isoforme de rat a été purifié jusqu'à homogénéité à partir de foie (Vancura *et al.* 1994). Lors d'expériences avec différents substrats, les données biochimiques montrent une préférence deux fois plus grande pour les acides gras saturés en comparaison avec ceux qui sont insaturés.

La protéine GPAT1 est exprimée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Elle a une structure tertiaire en forme de fer à cheval avec le site actif localisé dans le cytosol (Gonzalez-Baro *et al.*, 2001). Certaines études ont montré une interaction entre les activités de CPT-1 et de GPAT1. En effet, les deux enzymes partagent les mêmes substrats et seraient en compétition pour les acyl-CoA (Hammond *et al.* 2005). De plus, ces deux activités sont régulées réciproquement par l'AMPK (Muoio *et al.* 1999; Park *et al.* 2002). Dans une étude utilisant des rats à jeun puis nourris, l'activité GPAT de

la fraction mitochondriale a été augmentée de 2 fois dans le foie (Dircks *et al.* 1997) alors que l'activité microsomale n'a pas été changée, suggérant un rôle pour GPAT1 dans la synthèse des TG. Il faut toutefois souligner que les niveaux d'ARNm et l'activité de la protéine ne sont pas concordants dans tous les tissus (Lewin *et al.* 2001). La mesure des niveaux de protéines de GPAT1 est incertaine vu l'absence d'anticorps spécifique.

Les souris déficientes en GPAT1 ont un plus petit poids corporel et ont des TG et une sécrétion de VLDL diminuée. Les niveaux de cholestérol et de TG plasmatiques sont aussi diminués. Les TG hépatiques totaux contiennent 40 % moins de palmitate en *sn*-1 et les PL en contiennent 35 % moins. Ceci constitue une autre donnée suggérant une préférence de GPAT1 pour le palmitate dans un contexte *in vivo*. De plus, leur foie contient des niveaux réduits de palmitate dans les phosphatidylcholines et les phosphatidylethanolamines et des niveaux augmentés d'oléate en position *sn*-1 (Hammond *et al.* 2002). Inversement, la surexpression de GPAT1 *in vivo* spécifiquement dans le foie de souris C57BL/6 a augmenté l'incorporation de palmitate dans les LPA, DAG et TG (Linden *et al.* 2006). Dans un autre modèle de surexpression de GPAT1 où la protéine a été surexprimée par un adénovirus dans des hépatocytes primaires isolés de rats, on a noté une augmentation de la masse des TG, et le taux d'incorporation du traceur radioactif ¹⁴C-oléate a été augmenté de plus de 2 fois (Lewin *et al.* 2005).

Des cultures primaires d'hépatocytes isolés à partir du modèle de souris *ob/ob* où GPAT1 a été inhibée par des ARNi (ARN interférant) avec une construction exprimant un *short hairpin (shARN)* ont montré un contenu réduit en TG et en DAG (Xu *et al.* 2006).

Dans tous les modèles décrits plus haut, les observations démontrent un rôle de GPAT1 dans la synthèse *de novo* des TG.

7.2 GPAT2

Cet isoforme était détectable seulement dans les mitochondries des souris déficientes en GPAT1. En effet, des mitochondries isolées à partir de ce modèle

démontraient une activité résiduelle sensible au NEM et une absence de spécificité pour la longueur de la chaîne aliphatique de l'acyl-CoA ou pour son degré de saturation, contrairement à GPAT1 (Lewin *et al.* 2004). L'isoforme GPAT2 a des similitudes avec GPAT1 au niveau de la structure, mais l'enzyme a ses extrémités amino- et carboxy-terminales localisées toutes deux dans l'espace intra membranaire mitochondriale (Wang *et al.* 2007).

7.3 GPAT3

Le premier isoforme microsomal de GPAT, GPAT3, a été cloné par Cao *et al.* en 2006 chez les adipocytes de souris. Ces auteurs ont identifié l'isoforme en cherchant un gène qui correspondait aux critères suivants : un domaine acyltransférase et dont l'expression est augmentée pendant la différenciation des adipocytes. L'ARNm de GPAT3 augmente de 60 fois lors de la différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1 et la protéine identifiée a une activité sensible au NEM (Cao *et al.* 2006). Dans cette étude, la surexpression du gène isolé dans des HEK293 a augmenté l'incorporation du traceur ¹⁴C-oléate dans les triglycérides, et il a été montré que l'activité enzymatique est spécifique pour le glycérol-3-phosphate. Un autre groupe a observé récemment que GPAT3 possède aussi une activité AGPAT (Sukumaran *et al.* 2009). En effet, la protéine surexprimée dans la lignée CHO a montré une spécificité pour l'acylation d'un acyl-CoA en sn-2 du LPA.

7.4 GPAT4

Le deuxième isoforme microsomal de GPAT, GPAT4, a été identifié en 2008 simultanément par les groupes des chercheurs Cao et Coleman (Chen *et al.* 2008 ; Nagle *et al.* 2008). Le gène avait initialement été identifié comme le sixième isoforme de la LPA acyltransférase (Li *et al.* 2003). Les groupes de Chen et Coleman ont montré qu'AGPAT6, aussi connu comme LPAAT-zeta avait été identifié à tort et qu'il s'agissait en fait de GPAT4.

Les souris déficientes pour GPAT4 (Beigneux *et al.* 2006) ont un poids 25 % moindre et ont un défaut au niveau de la lactation. En effet, leur lait est appauvri en DAG

et TG. De plus, les souris résistent à la prise de poids normalement occasionnée par une diète de cafétéria (diète riche en calories). Parallèlement, une augmentation de la dépense énergétique et une diminution du contenu en TG des tissus adipeux brun et blanc sont observées. Le foie de ces souris contient 45 % moins de TG et il a été proposé que GPAT4 aurait un rôle à jouer dans la synthèse de TG *in vivo*. Cette situation n'a pas été reproduite dans les modèles cellulaires alors que la surexpression de GPAT1 dans les mêmes lignées cellulaires a augmenté la production des TG (Linden *et al.* 2004 ; Lewin *et al.* 2005). Ceci permet de spéculer que le LPA et le PA produits par GPAT4 se trouvent dans un autre *pool* que celui utilisé pour faire les TG produits par l'intermédiaire de GPAT1. La surexpression de GPAT4 dans les cellules HEK293 et COS-7 n'augmente pas la production des TG malgré une augmentation de l'activité GPAT sensible au NEM (Nagle *et al.* 2008).

8. La glucolipotoxicité de la cellule β pancréatique

Une exposition des cellules β *in vitro* aux acides gras à court terme potentialise la sécrétion d'insuline, mais à long terme elle altère la fonction de la cellule β et, suivant les modèles expérimentaux et particulièrement à haut glucose, peut induire l'apoptose (Lee *et al.* 1994; Prentki *et al.* 2002; El-Assaad *et al.* 2003). L'obésité en combinaison avec la résistance à l'insuline est un facteur de risque du diabète de type 2. La résistance à l'insuline qui se développe en réponse à l'environnement obésogène persiste dans le temps et une sous-population d'individus génétiquement prédisposés est incapable de compenser par une augmentation de la sécrétion d'insuline pour la résistance, et la cellule β défaille. En effet, des études longitudinales ont démontré que la fonction de la cellule β se détériore dans les années qui suivent le diagnostic de diabète de type 2 (UK prospective Diabetes study 1995 ; Kahn *et al.* 2006).

8.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires de la glucolipotoxicité

Dans des études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires ou des îlots pancréatiques de rat isolés, une exposition prolongée à des concentrations élevées d'acides gras est

associée à une inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (El-Assaad *et al.* 2003 ; Prentki *et al.* 2002 ; Poitout et Robertson 2002).

Les mécanismes qui sont impliqués dans les manifestations fonctionnelles de la glucolipotoxicité peuvent se manifester à deux niveaux. D'un côté, une détérioration de la sécrétion d'insuline par les acides gras et d'un autre côté, la diminution de l'expression du gène de l'insuline. Les mécanismes par lesquels les acides gras affectent la sécrétion d'insuline et la transcription du gène sont différents. L'exposition aiguë des îlots pancréatiques au palmitate diminue l'expression du gène de l'insuline (Hagman *et al.* 2005).

Notre laboratoire s'intéresse particulièrement à la détérioration de la sécrétion d'insuline par les acides gras et le glucose, et aux mécanismes moléculaires impliqués dans la défaillance de la cellule β pancréatique. Notre laboratoire a émis l'hypothèse selon laquelle la répartition des acides gras vers l'estérification et la synthèse des glycérolipides sont inhérentes à la glucolipotoxicité de la cellule β .

Le degré de saturation des acides gras influence leur toxicité. Les acides gras monoinsaturés comme l'oléate sont moins toxiques parce qu'ils peuvent être stockés sous forme de TG (Listenberger *et al.* 2003 ; Maedler *et al.* 2003). D'autre part, les acides gras saturés, comme le palmitate qui peut-être un précurseur des céramides, causent de la toxicité. Notre groupe s'intéresse aux voies biochimiques et aux intermédiaires lipidiques impliqués dans la glucolipotoxicité.

Il est documenté qu'une élévation chronique du glucose et/ou des acides gras réduits la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Roduit *et al.* 2004 ; Weir *et al.* 2001). Ceci a été observé dans les cellules β et en îlots *in vitro* (Sako et Grill 1990 ; Zhou *et al.* 1994), ainsi que chez le rat perfusé (Mason *et al.* 1999) et chez l'humain (Paolisso *et al.* 1995).

Le concept de glucolipotoxicité propose que le glucose élevé agisse en synergie avec les acides gras circulants pour causer les défaillances pléiotropiques associées au diabète de type 2 et au syndrome métabolique. Les perturbations du métabolisme des nutriments dans l'état de glucolipotoxicité pourraient conduire la cellule β à décompenser et encourager la détérioration de la fonction pancréatique dans le contexte du diabète de type 2 associé à l'obésité. Les bases biochimiques de la glucolipotoxicité sont encore imprécises bien que le métabolisme du glucose et des acides gras soit nécessaire.

Parallèlement à mon étude sur les effets à court terme des acides gras sur la sécrétion d'insuline, les outils moléculaires développés ont été utilisés dans une étude sur les effets de l'exposition à long terme de la cellule β aux acides gras en présence de glucose qui a été publiée dans le journal *Endocrinology*. La mort cellulaire induite par les acides gras et le glucose a été documenté dans cette étude *in vitro* réalisée par notre groupe (El-Assaad *et al.* 2010) et elle est décrite dans cette thèse.

Dans cette étude, une analyse de profilage génétique a été réalisée dans les cellules INS 832/13 afin d'identifier les bases biomoléculaires des changements qui pourraient être instrumentaux dans le processus de la glucolipotoxicité. En résumé, après une exposition chronique de 24 h au palmitate, la glucolipotoxicité est associée à des changements dans l'expression des gènes impliqués dans la répartition des lipides, le métabolisme des stérols, la fonction mitochondriale et le stress oxydatif. Dans cette étude, nous avons obtenu par des approches moléculaires un support direct pour appuyer l'hypothèse proposant que des altérations précoces dans la répartition des lipides vers les voies de biosynthèse sont instrumentales dans la glucolipotoxicité en promouvant l'estérification des acides gras et en diminuant leur oxydation.

Dans cette étude des changements de l'expression génique induits par la glucolipotoxicité, l'analyse a été faite en mettant l'emphase sur les gènes relatifs au métabolisme du glucose et des lipides. Plus précisément, ceux relatifs à la répartition des lipides, la glycolyse, le métabolisme énergétique mitochondrial et le métabolisme des stérols et des isoprènes. Parce que le métabolisme du glucose et des lipides est nécessaire

pour la glucolipotoxicité nous avons proposé que ces diverses voies métaboliques pourraient être impliquées dans l'induction de la dysfonction de la cellule β et sa mort.

Des changements dans les produits de transcription (ARNm) impliquant la répartition des lipides ont été observés. Une réduction de l'expression de la sous-unité α de l'AMPK, qui régule l'homéostasie énergétique cellulaire ainsi qu'une régulation à la hausse d'enzymes du métabolisme lipidique comme l'isoforme du foie de CPT-1, ACC1 et la SCD1 ; et aussi du facteur de transcription clé FoxA2 (auparavant appelé HNF3 β) qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans la β -oxydation.

Les changements observés pour les gènes impliqués dans le métabolisme des lipides suggèrent que les processus d'estérification et de la synthèse des acides gras devraient être augmentés dans les conditions de glucolipotoxicité, ce qui est en concordance avec des résultats précédents de notre laboratoire (Roche *et al.* 1998). Plusieurs isoformes de l'ACS et des FABP sont augmentés, ce qui suggère des niveaux d'acides gras-CoA élevés dans ce contexte. Ceci est en accord avec l'étude de Larsson (Larsson *et al.* 1996) où les acyl-CoA ont augmenté de 2 fois suite à une exposition aiguë de cellules pancréatiques HIT-T15 au palmitate.

Dans l'étude décrite ici et réalisée par des collègues du laboratoire, les données de la puce à ADN suggèrent que les acides gras-CoAs devraient être efficacement estérifiés puisqu'entre autre l'expression de la stéaroyl-CoA désaturase (SCD-1) est augmentée et que l'expression de l'AMPK est diminuée. En effet, l'activité de GPAT est inhibée par l'AMPK.

En complément à la redirection du métabolisme des lipides vers les voies d'estérification comme processus menant à la glucolipotoxicité, les acides gras ont aussi des actions toxiques dans diverses cellules via le stress oxydatif (Tanaka *et al.* 1999). L'exposition d'îlots au palmitate augmente la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (Carlsson *et al.* 1999). La grande utilisation du glucose par la cellule β et son métabolisme mitochondrial a comme conséquence l'activation de la chaîne de transport

des électrons et la production de ROS. Le radical O_2^- est généré par la réduction d'un électron de l'oxygène moléculaire principalement par le complexe I et III de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie (Nishikawa *et al.* 2000). Le stress oxydatif dans la cellule β pancréatique est associé à l'exposition combinée du glucose et des acides gras. La raison en est que la cellule β exprime peu les enzymes antioxydants en comparaison aux autres tissus (Lenzen *et al.* 1996 ; Tiedge *et al.* 1997 ; Robertson *et al.* 2004).

9. Mise en contexte du projet de recherche, objectif et thématique de la thèse

Plusieurs études ont suggéré dans différents modèles *in vitro* que les cellules β utilisent des voies signalétiques lipidiques dans les mécanismes de transduction du glucose et des acides gras menant à la sécrétion de l'insuline. En ce qui concerne la situation *in vivo*, la concentration des acides gras augmente avec l'obésité et ces derniers seraient utilisés pour amplifier la sécrétion d'insuline induite par le glucose, laquelle est nécessaire pour contrer la résistance à l'insuline des tissus périphériques pendant la phase de compensation. Dans la cellule β , les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline en partie via leur métabolisme, mais les voies métaboliques impliquées et les métabolites associés agissant comme facteurs de couplage métabolique restent à être déterminés. Les dérivés lipidiques qui participeraient à l'amplification de la sécrétion induite par le glucose et les acides gras demeurent méconnus quoique certaines études mettent en évidence le DAG (Corkey *et al.* 1989 ; Peter-Riesch *et al.* 1988 ; Rhee *et al.* 2002 ; Sheu *et al.* 2003 ; Kwan *et al.* 2006), produit soit via la voie d'estérification ou la voie lipolytique du cycle TG/acide gras.

Au moment d'entreprendre la présente étude, notre laboratoire avait proposé la possibilité de l'existence d'un signal lipidique qui serait dégradé par la β -oxydation tel que présenté plus haut. Ce signal serait absent à faible concentration de glucose lorsque la β -oxydation est maximale et il serait présent à haut glucose lorsque l'estérification est favorisée au détriment de la β -oxydation. Ce signal pourrait donc provenir de l'estérification des acides gras et constituerait un signal positif pour la sécrétion d'insuline. Lors de la synthèse *de novo* des TG, plusieurs intermédiaires pourraient être des lipides

signalétiques. En effet, le LPA, le PA et les DAG sont produits au cours de différentes étapes de la synthèse des glycérolipides, et chacun de ces intermédiaires lipidiques a été impliqué dans différents processus de signalisation impliquant des récepteurs couplés aux protéines G. Parallèlement, le même signal ou un signal similaire pourrait être produit par l'autre partie du cycle TG/acide gras, soit par la lipolyse. En effet, la lipolyse tout comme l'estérification est stimulée par l'élévation des concentrations de glucose et elle peut générer plusieurs intermédiaires dont le DAG et le MAG. Notre groupe et d'autres ont récemment publié des études supportant un rôle pour la lipolyse dans l'amplification de la sécrétion d'insuline (Nolan et Prentki 2008 ; Nolan *et al.* 2006 ; Peyot *et al.* 2004 ; Mulder *et al.* 2004).

Dans la présente thèse, nous avons émis l'hypothèse qu'en présence de glucose et d'acide gras, des molécules signalétiques lipidiques comme le LPA, PA et DAG sont produites par le processus d'estérification *de novo* des acides gras et amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cette hypothèse est liée à une question majeure du laboratoire qui est de savoir si dans le cadre du cycle TG/acides gras la voie d'estérification et/ou lipolytique est/sont impliquée(s) dans le système de transduction métabolique de la cellule β en réponse au glucose et aux acides gras.

La présente thèse de doctorat avait donc comme objectif de déterminer si les processus d'estérification des acides gras jouent un rôle dans le système de couplage métabolique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras. Pour réaliser ce projet, nous avons modifié le métabolisme des acides gras de la cellule β à l'aide d'approches de la biologie moléculaire, en augmentant ou diminuant l'expression d'enzymes clés de l'estérification des AG. Nous avons alors étudié les conséquences de ces changements sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence ou absence d'acides gras, et corrélié ceci avec des changements du métabolisme des lipides.

Dans cette étude, étant donné l'absence d'inhibiteur pharmacologique spécifique pour l'estérification des acides gras, nous avons utilisé des outils moléculaires (transfection permettant la surexpression ou diminution de l'expression d'un gène particulier par des

plasmides ou siARN, respectivement) pour altérer spécifiquement la répartition des lipides vers l'estérification des acides gras en lipides complexes. L'étape catalysée par la GPAT est la première de la voie d'estérification des glycérolipides et est connue comme étant l'étape limitante de cette voie. Nous avons donc choisi de changer l'expression de cet enzyme GPAT pour tester notre hypothèse proposant un rôle de l'estérification des acides gras dans le système de couplage métabolique de la cellule β . Les effets de la surexpression ou de la diminution de l'expression de différents isoformes de GPAT sur la sécrétion d'insuline et la répartition des lipides ont été mesurés.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel

Le palmitate a été obtenu de Nu-Check Prep (Elysian, MN). Le [1-¹⁴C]palmitate (55 mCi/mmol) a été obtenu de PerkinElmer (Boston, MA). Le D-[U-¹⁴C]-glucose (317 mCi/mmol) provient de GE Healthcare (Baie d'Urfé, Québec). L'albumine de sérum bovin (BSA) issue de la fraction V et sans acides gras, le polyéthylène glycol (PEG) 8000 proviennent de Sigma (St-Louis, MO). Les milieux de culture RPMI 1640 sans glucose et avec 11 mM glucose proviennent de Invitrogen (Burlington, Ontario). La solution commerciale de trypsine 0.05 % et d'EDTA 0.53 mM ainsi que le sérum de veau foetal (FBS) proviennent de Wisent (St-Bruno, Québec). La solution de bleu de trypan 0.4 % provient de Invitrogen (Carlsbad, CA). La trousse NEFA C provient de WAKO Chemicals USA Inc., (Richmond, VA) et la trousse BCA Protein Assay provient de Pierce (Rockford, IL).

Méthodes

Culture cellulaire des lignées de cellules β pancréatiques

Pour la partie de l'étude où la protéine de fusion GPAT1-myc est transduite par adénovirus, la lignée dans laquelle le système Tet-ON a été implanté et utilisée était la lignée INSr β (Wang et Iynedjian 1997), laquelle a été cultivée avec du sérum exempt d'antibiotiques.

Les cellules INS 832/13 et INSr β sont cultivées en monocouche avec des passages à une fréquence de 2 fois par semaine dans des flacons de culture de 75 cm² contenant 12 mL de milieu de culture standard. Ce milieu de culture standard est composé de RPMI 1640 à 11 mM glucose auquel ont été ajoutés 10 mM d'Hepes à pH 7.4, 2 mM de L-glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 50 μ M de β -mercaptoéthanol et 10 % (v/v) de sérum de veau foetal décomplémenté. Le complément du sérum est inactivé par un

traitement thermique à 56 °C d'une durée de 30 min. Pour la culture des cellules INSrβ, le sérum utilisé est certifié sans antibiotique.

Les cellules sontensemencées à une densité de $1.1 \times 10^4 - 1.7 \times 10^4$ cellules/cm². Le temps de doublement des cellules INS 832/13 et des INSrβ est de 30-35 h. Lorsqu'une confluence de 80 % est atteinte, soit après 3 à 4 jours de culture, les cellules sont repiquées. Le tapis cellulaire est rincé avec une solution PBS. Les cellules sont ensuite décollées avec une solution de trypsine 0.05 % et d'EDTA 0.53 mM. Les cellules sont maintenues en culture pour un maximum de 10 passages, correspondant aux passages 54 à 65 pour les INS 832/13 et PX à PX+10 pour les INSrβ. Les cultures sont maintenues en atmosphère humide avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C.

Lorsque la concentration du glucose est différente de 11 mM, le RPMI 1640 sans glucose est utilisé et la concentration de glucose est ajustée à partir d'une solution stock stérile de glucose préparée à 1 M dans l'eau.

Numération des cellules et évaluation de la viabilité par le test d'exclusion au bleu de trypan

La numération cellulaire est réalisée sur une cellule de Malassez aussi appelée hématocytomètre. La coloration au bleu de trypan a été utilisée pour évaluer la viabilité des cellules. Les cellules vivantes possèdent des membranes cellulaires intègres qui ne permettent pas l'entrée du colorant. La cellule vivante est donc de couleur claire, alors qu'une cellule morte est bleue parce que l'intégrité de sa membrane est perdue.

Une aliquote de la suspension cellulaire est prélevée et diluée dans un volume égal de la solution de bleu de trypan 0.4 % afin d'obtenir une dilution 1/2. Le décompte d'au moins 100 cellules vivantes est réalisé pour s'assurer d'un décompte fiable.

Préparation du tampon bicarbonate de Krebs-Ringer (KRB) supplémenté avec de l'Hepes (KRBH)

Le KRBH est constitué de 135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄, 1.5 mM CaCl₂, 2 mM NaHCO₃ et 10 mM Hepes à pH 7.4. La solution de KRBH est préparée la journée même de l'expérience à partir des solutions mères suivantes : KRB 5X, 100 mM NaHCO₃ et 1M Hepes à pH 7.4. La solution est équilibrée dans un incubateur cellulaire à 37 °C contenant 5 % de CO₂ en atmosphère humide pendant au moins 90 min. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 7.4 avec une solution de NaOH 1 M.

Préparation du palmitate couplé à l'albumine

Une solution de 5 % (p/v) d'albumine bovine exempte d'acides gras dans la solution KRBH pH 7.4 est préparée et filtrée à travers un filtre avec des pores de 0.22 µm (solution KRBH-BSA). Une solution saturée de palmitate est préparée avec environ 200 mg de palmitate pour chaque 35 mL de solution KRBH-BSA. La solution est mélangée vigoureusement et incubée pendant 16 h à 37 °C avec une agitation légère. La solution est filtrée sur 0.22 µm et conservée à 37°C. La concentration du palmitate dans la solution filtrée est déterminée par le dosage des acides gras avec la trousse NEFA C. La concentration de la solution est ajustée à 4 mM avec la solution KRBH-BSA stérile et incubée à 37°C avec légère agitation pendant au moins 30 min. Des aliquotes sont préparées et conservées à -20°C. La concentration de la solution est vérifiée avec la trousse de dosage des acides gras NEFA C.

β-oxydation du palmitate

L'expérience est réalisée avec des cellules adhérentes et permet d'évaluer la capacité des cellules à oxyder le palmitate en CO₂ et en corps cétoniques. Le traceur radioactif [1-¹⁴C]palmitate est utilisé et permet d'évaluer de façon quantitative la capacité d'oxydation des cellules. L'oxydation totale est quantifiée en faisant la somme du ¹⁴CO₂ relâché et des ASP (de l'anglais acid soluble products) qui correspondent aux corps cétoniques (Fulgencio *et al.* 1996). Le ¹⁴CO₂ relâché est capturé par une trappe constituée

d'un filtre de fibre de verre trempé d'une solution de KOH. Le système de tampon bicarbonate est utilisé comme méthode de capture du $^{14}\text{CO}_2$. Le principe est expliqué par l'équation d'équilibre d'Hendersen-Hasselbach : $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$

Procédure pour les cellules INSr β

Les cellules INSr β sontensemencées dans des bouteilles de 25 cm² (T-25), traitées et cultivées pour obtenir une confluence de 70 à 80 %. Seize heures avant l'expérience, le milieu de culture est changé et les cellules sont pré-incubées dans 2 mL de RPMI 1640 complet avec 3 mM glucose. Les cellules sont ensuite rincées avec 1 mL de KRBH 0.5% BSA et 2 mM glucose et pré-incubées dans 1 mL de KRBH 0.5 % BSA et 2 mM glucose pour 30 min. Le milieu de pré-incubation est remplacé par le milieu d'incubation (décrit plus bas) à des concentrations croissantes de glucose (2, 6, et 16 mM) pendant 1 h.

Procédure pour les cellules INS 832/13

Les cellules sontensemencées dans des bouteilles de 25 cm², traitées et cultivées pour obtenir une confluence de 70 à 80%. Le jour de l'expérience, le milieu de culture est changé et les cellules sont pré-incubées pendant 2 h dans 2 mL de RPMI 1640 complet avec 1 mM glucose. Les cellules sont ensuite rincées et pré-incubées dans 1 mL de KRBH 0,5 % (p/v) BSA et 2 mM glucose pour 45 min. L'incubation à des concentrations croissantes de glucose (1, 5, 10 mM) 1 h dans 1 mL d'un milieu d'incubation décrit plus bas.

Le milieu d'incubation avec traceur radioactif est constitué de 0.2 $\mu\text{Ci/mL}$ [1- ^{14}C]palmitate, 0.2 mM palmitate, 0.5 % (p/v) BSA et 1 mM L-carnitine dans du KRBH. Cette préparation est incubée au moins 30 min afin de permettre une répartition à l'équilibre du palmitate froid et du traceur avec l'albumine. Un mL de milieu est ajouté à chaque plat pour l'incubation. Une condition sans cellules est utilisée comme blanc.

Capture du $^{14}\text{CO}_2$

Les cellules ont étéensemencées dans des bouteilles de 25 cm² (T-25), cultivées et traitées comme il a été décrit plus haut. L'expérience est réalisée dans un système fermé.

La méthode a été décrite précédemment par Roduit *et al.* (2004). Brièvement, au lancement de l'incubation avec le traceur radioactif le bouchon est remplacé par un montage constitué comme suit : un bouchon de caoutchouc (grosneur 14.5 Fisher ref 14-126BB) dans lequel 3 cm de tube PVC de 4.7 mm de diamètre (Fisher ref. 14-169-7B) est inséré. L'extrémité du tube est entourée d'une pellicule de cire (parafilm) pour assurer l'étanchéité. Un tiers d'un filtre rond de 1.5 cm de diamètre GF/B (Whatman) est inséré dans le tube et mouillé avec 150 μ L de KOH 0.1 M. Le système est fermé.

À la fin de l'incubation, 200 μ L d'acide perchlorique 40 % (v/v) sont injectés à l'aide d'une aiguille 23G1½ en travers du bouchon de caoutchouc afin d'acidifier le milieu, d'arrêter l'incubation et de libérer le CO₂. Le milieu est délicatement mélangé dans la bouteille. Elles sont installées sur un agitateur avec mouvement lent linéaire pour au moins une nuit avant d'enlever les bouchons.

Les filtres sont transférés dans des bouteilles à scintillation liquide contenant 5 mL de liquide à scintillation. Une attente d'au moins 12 h avant de compter est nécessaire pour que le ¹⁴CO₂ contenu dans le filtre se mélange au solvant. Les bouteilles sont placées dans un compteur bêta (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb, PerkinElmer, Boston, MA).

Produits solubles dans la fraction acide (ASP de l'anglais acid soluble products)

À l'ouverture des bouteilles, 1 mL du milieu acidifié est transféré dans des tubes et centrifugé à 1000 X g pendant 10 minutes dans une microcentrifugeuse. En effet, l'acide perchlorique précipite les acides gras liés aux protéines. Huit cents microlitres de surnageant sont transférés dans les bouteilles à scintillation contenant 5 mL de liquide à scintillation et comptés dans un compteur bêta.

Analyse des résultats

La conversion des cpm générés par le nombre de moles de ¹⁴C provenant du palmitate se fait comme suit : 50-100 μ L du milieu d'incubation (correspondant à 10-20 nmol de palmitate) sont précisément transférés dans une bouteille à scintillation et compté.

La relation entre cpm et mole est ainsi établie. Le taux d'oxydation est normalisé par la quantité totale de protéine déterminée par un dosage BCA.

Estérification du palmitate

Dans l'expérience d'estérification du palmitate, les cellules sont incubées en présence d'un traceur radioactif [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate et son incorporation dans différentes classes de lipides complexes est quantifiée. Le système de séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) utilisé permet de séparer les lipides neutres des différentes classes tels que les triglycérides (TG), diacylglycérols (DAG), cholestérol esters (CE) et les phospholipides (PL).

L'incorporation du traceur radioactif en lipides complexes, l'estérification du palmitate, est induite par des concentrations croissantes de glucose. Le milieu d'incubation avec traceur radioactif [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate est constitué de la même préparation décrite plus haut pour la β -oxydation.

À la fin de l'incubation, le milieu est retiré et le tapis cellulaire est rincé avec 1 mL de PBS à 37 °C et les cellules sont grattées dans 2 mL de PBS à 4°C. La suspension de cellules est transférée dans un tube en verre et centrifugée à 500 x g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est aspiré et le culot est suspendu dans 3 mL de réactif de Folch constitué de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ dans un rapport de 3 :1 (Folch 1957). Les tubes sont entreposés à -20°C pendant 16 h.

Dans l'étude avec GPAT3, l'incorporation du traceur est mesurée à l'équilibre comme suit : 48 h après la transfection de pcDNA3.1-GPAT3 ou du contrôle, les cellules sont incubées 24 h dans les conditions de glucolipotoxicité en présence de 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate. Les cellules sont rincées et grattées dans le PBS et les lipides sont extraits comme décrit ici.

L'extraction des lipides est réalisée par l'ajout de 0.75 mL d'eau à la préparation de Folch. L'échantillon est mélangé vigoureusement et centrifugé à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C. La phase organique (celle du dessous) est transférée dans un nouveau tube en verre et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif avec flux continu d'azote gazeux.

Le culot de lipides est ensuite dissous dans 50 µL de CHCl₃ et chargé sur une plaque de silice pour la chromatographie sur couche mince (Whatman, Clifton, NJ, USA). La migration s'effectue dans une chambre de migration en verre préalablement équilibrée avec la phase mobile constituée d'éther de pétrole/éther diéthylique/acide acétique glacial (70 :30 :1). La migration est complétée lorsque le front de migration atteint 0.5 cm de l'extrémité supérieure de la plaque. La plaque de silice est retirée de la chambre et séchée à l'air libre. La plaque est ensuite emballée dans une pellicule plastique. Les différentes classes de lipides sont identifiées grâce à la migration conjointe de standards (Sigma, St-Louis, MO). La quantification du ¹⁴C a été réalisée par scintillation liquide après avoir gratté les bandes ou avec la technologie d'accumulation énergétique au phosphore utilisant un Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences).

Quantification du ¹⁴C en scintillation liquide

La plaque est placée dans une cassette avec film (Kodak) et exposée pendant au moins 3 jours. L'emplacement des bandes correspondant aux PL, DAG, NE-PAL, TG et CE est marqué au crayon à mine sur la plaque en s'orientant par rapport aux standards de lipides puis et les zones de silices sont délicatement grattées et transférées dans des vials à scintillation liquide contenant 5 mL de liquide à scintillation (PerkinElmer, Boston, MA). Chaque échantillon est placé dans un compteur bêta. Un signal basal est déterminé dans une zone de silice absente de radioactivité. La conversion du signal en moles de palmitate incorporées est effectuée grâce au prélèvement de 50 µl de la préparation du traceur ¹⁴C qui est soumis aux mêmes étapes d'extraction que dans le cas des échantillons. Dans les conditions utilisées, le signal en cpm qui correspond à 10 nmol peut donc être converti en mol de palmitate incorporé.

Quantification du ¹⁴C par accumulation énergétique au phosphore

L'écran est activé par une exposition de 15 min sur une source lumineuse telle que celles utilisées pour la lecture de radiogrammes. La plaque est emballée dans de la pellicule plastique et placée dans la cassette pour au moins 4 jours. L'écran est lu sur Typhoon Trio. La quantification est faite avec l'application ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences, Baie d'Urfé, Qc, Canada).

Le signal généré exprimé en unités relatives est converti en moles de palmitate incorporé comme suit : 50 μ L du milieu d'incubation (correspondant à 10 nmol de palmitate) sont traités en parallèle des échantillons à partir de l'ajout du réactif de Folch et le signal de la bande correspondant au palmitate non-estérifié sur la plaque de silice est utilisé pour établir la relation entre le signal et le nombre de mole de palmitate incorporé. Le taux d'estérification est normalisé par la quantité totale de protéines déterminée par un dosage BCA.

Oxydation du glucose

Les cellules INSr β sontensemencées dans des bouteilles de 25 cm² (T-25), traitées et cultivées pour obtenir une confluence de 70 à 80%. Seize heures avant l'expérience, le milieu de culture est changé et les cellules sont pré-incubées dans 2 mL de milieu de culture complet avec 3 mM glucose. Les cellules sont ensuite rincées et pré-incubées dans 1 mL de KRBH 0.5 % BSA et 2 mM glucose pour 30 min suivi d'une heure d'incubation dans 1 mL de KRBH 0.5 % BSA, 0.2 μ Ci/mL D-[U-¹⁴C]glucose et des concentrations croissantes de glucose (2, 6, et 16 mM) en absence ou en présence de 0.2 mM palmitate.

L'incubation a lieu dans un système fermé tel que celui qui a été décrit pour la β -oxydation du palmitate. Les filtres sont transférés dans des vials à scintillation liquide contenant 5 mL de scintillant. Une attente d'au moins 12 h avant de compter est nécessaire pour que le ¹⁴CO₂ contenu dans le filtre se mélange au scintillant. Les bouteilles sont comptées comme décrit plus haut pour la β -oxydation du palmitate.

Sécrétion d'insuline avec les cellules INS 832/13

Les cellules sontensemencées en plaque 12-puits à une densité de 0.5×10^6 cellules par puits dans du RPMI 1640 complet à 11 mM glucose. Après 48-72 h, le milieu est remplacé par 1 mL de RPMI 1640 complet avec 3 mM glucose et incubé pendant 2 h. Les cellules sont ensuite pré-incubées 45 min dans du KRHB, 0.5 % BSA et 1 mM glucose suivis d'une heure d'incubation avec des concentrations croissantes (1, 5 et 10 mM) de glucose dans du KRBH, 0.5 % BSA en présence ou en absence de palmitate 0.2 mM dans un volume total de 0.5 mL/puits.

Sécrétion d'insuline avec les cellules INSr β

Les cellules sontensemencées en plaque 6-puits à une densité de 1.5×10^6 cellules par puits. Après 48 h, les cellules atteignent la sub-confluence et la densité cellulaire est évaluée par la numération sur un hémacytomètre et les cellules sont infectées à une M.O.I. de 20 dans un volume de 0.5 mL de RPMI 1640 complet à 11 mM glucose. Les plaques sont déposées sur un agitateur de type berceau placé dans un incubateur à cellules. Après 4 h de contact entre les virus et les cellules, le milieu contenant les virus est enlevé et le tapis cellulaire est rincé avec 1 mL de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite incubées pendant 20 h dans 2 mL de milieu de culture complet à 11 mM glucose sans (ctl) ou avec 1 μ g/mL de doxycycline (GPAT1).

Le milieu de culture est changé et les cellules sont pré-incubées pendant 16 h dans 2 mL de RPMI 1640 complet avec 3 mM glucose. Les cellules sont ensuite rincées et pré-incubées dans 1 mL de KRBH 0.5 % BSA et 2 mM glucose pour 30 min. Les cellules sont incubées dans 1 mL de KRBH 0.5 % BSA en absence ou en présence de 0.2 mM palmitate avec 2, 6, 16 mM glucose et 2 mM glucose avec 35 mM KCl. La sécrétion d'insuline basale due aux manipulations est évaluée sur des puits incubés 2 min dans du KRBH supplémenté de 0.5% BSA et 2 mM glucose avec et sans palmitate. Après 1 h d'incubation, le milieu est prélevé et centrifugé à 500 x g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un tube pour évaluer la concentration d'insuline. Cette étape est nécessaire pour éviter que quelques cellules détachées faussent le dosage de l'insuline.

Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'au dosage de l'insuline. Dans le cas de la surexpression de GPAT1-myc, les échantillons ont aussi été utilisés pour le dosage du glycérol. La même procédure est utilisée dans le cas des plaques 12-puits mais les volumes de pré-incubation et d'incubation sont 2 fois moindres.

Le contenu total en insuline est évalué comme suit : Les cellules des puits incubés en présence de 1-2 mM glucose sont utilisées pour le dosage du contenu total en insuline. Les cellules sont décollées en grattant le fond du puits dans 1 mL de PBS à 4°C, le puits est rincé avec 0.5 mL de PBS supplémentaire. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min. Un mL de solution éthanol/acide (75 % CH₃CH₂OH et 0.2 M HCl) est ajouté sur le culot de cellules. Les tubes sont entreposés au moins une nuit à 4°C avant d'être ultrasoniqués avec une sonde directement dans le tube eppendorf. Les échantillons sont centrifugés à 3000 x g pendant 5 min à 4°C. Les deux tiers du surnageant sont prélevés afin d'éviter d'avoir des débris cellulaires et congelés pour le dosage de l'insuline.

Dosage de l'insuline par essai radioimmunologique (RIA)

Cette méthode repose sur le concept de reconnaissance antigène-anticorps. L'antigène se lie de façon spécifique à l'anticorps par des liens de nature non-covalente (pont hydrogène, lien électrostatique, force de Van der Waals et des liens hydrophobes). Il s'agit d'un essai de type compétitif non-homogène où l'insuline de l'échantillon est en compétition avec de l'insuline radioactive (¹²⁵I-insuline) lors d'une première période d'incubation. Le complexe antigène-anticorps est ensuite précipité lors d'une deuxième étape d'incubation avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de cobaye en présence de polyéthylène glycol (PEG) et de sérum de cobaye. Le précipité est ensuite séparé du surnageant par centrifugation ou filtration et la quantité de radioactivité du culot obtenu est mesurée.

La quantité de radioactivité mesurée est inversement proportionnelle à la concentration du compétiteur. Afin de déterminer la concentration d'insuline dans les

échantillons, une courbe standard est réalisée avec de l'insuline et elle est utilisée pour faire l'interpolation des concentrations.

L'essai utilisé par le laboratoire a été adapté à partir de l'essai commercial et établi à partir de l'essai développé par Linco (maintenant Millipore). Des dilutions d'insuline humaine sont utilisées comme standard (0.0625 à 16 ng/mL). L'antisérum de cobaye anti-insuline et l'anti-cobaye IgG isolé du cheval sont préparés selon les recommandations des manufacturiers. Le tampon phosphate est constitué de 50 mM NaH₂PO₄ et 25 mM EDTA à pH 7.5 et filtré avec un filtre 0.22 µm. Le tampon phosphate est additionné de 1 % albumine bovine (tampon phosphate-albumine) ou de 3 % polyéthylène glycol (PEG) 8000 (tampon phosphate-PEG).

Les échantillons sont dilués dans du tampon phosphate-albumine de façon à ce que les valeurs mesurées soient incluses dans les limites de la courbe standard. La dilution de l'anticorps primaire utilisée doit permettre d'obtenir une liaison totale de 30-40 % de l'insuline radioactive en absence de compétiteur.

Procédure par centrifugation

L'essai est réalisé en plaçant dans des tubes de polypropylène et en respectant cet ordre d'addition : 50 µL d'une dilution appropriée de l'échantillon, 50 µL de ¹²⁵I-insuline (Millipore) et 50 µL de l'anticorps anti-insuline. Les échantillons sont chargés en duplicata. Les réactions sont incubées pendant au moins 16 h à 4°C afin d'atteindre l'équilibre de la liaison antigène-anticorps. À la suite de la première incubation, 500 µL de préparation de l'anticorps secondaire sont ajoutés pour précipiter le complexe immunologique. Après 2 h d'incubation à 4°C, les tubes sont centrifugés à 1330 x g pendant 15 min à 4°C. Chaque tube est ensuite planté dans un support et le surnageant des tubes est vidé en inversant le support. Les tubes sont laissés à égoutter afin d'enlever le plus de surnageant possible. Le bruit de fond (*background*) est quantifié dans des tubes où l'anticorps primaire est remplacé par 50 µL de tampon phosphate-albumine. La quantité de radioactivité est mesurée dans un compteur gamma Wizard (PerkinElmer).

Procédure par filtration

L'essai a été optimisé considérant la grande quantité d'échantillons et la disponibilité d'un appareil de filtration de type Harvester (PerkinElmer). L'essai est réalisé dans une plaque 96-puits en polypropylène d'une capacité de 0.8 mL. Les additions de réactifs et les incubations sont identiques avec la procédure par centrifugation décrite plus haut à l'exception près que le milieu est aspiré et le complexe immunologique est retenu par le filtre au lieu d'être récupéré par centrifugation. Cette technique a l'avantage de traiter 96 échantillons à la fois plutôt que de manipuler les tubes radioactifs un à un comme dans l'essai utilisant la centrifugation.

À la fin des incubations, la plaque 96-puits à filtres (PerkinElmer) est mouillée par une aspiration de tampon phosphate-PEG. La plaque d'échantillons est ensuite aspirée et rincée 2 fois en remplissant les puits de tampon phosphate-PEG. Lorsque la plaque de puits filtrée est sèche, une pellicule d'étanchéité (*back seal*) est apposée et 50 μ L de liquide à scintillation (PerkinElmer) sont ajoutés. Une pellicule transparente de type TopSeal est collée sur la plaque et celle-ci est comptée sur TopCount (PerkinElmer).

Les cpm sont corrigés pour la valeur basale mesurée en absence de l'anticorps primaire (*background*). Les cpm corrigés sont graphés en fonction de la concentration d'insuline exprimée en log de concentration d'insuline en g/mL. La courbe sigmoïdale est intrapolée avec le logiciel GraphPad (Prism).

Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Il s'agit d'un essai homogène colorimétrique réalisé en une seule étape qui combine deux réactions chimiques : La réaction de Biuret, qui consiste en la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines dans un milieu alcalin, suivit d'une réaction du Cu^{1+} avec le BCA.

La première étape est constituée par la réaction de Biuret où la chélation du cuivre (Cu^{2+}) par une protéine dans un milieu alcalin forme un complexe légèrement bleu. Lors de

cette réaction, les peptides qui contiennent 3 résidus acides aminés ou plus forment un complexe dans un environnement contenant du sodium potassium tartrate.

Au cours de la deuxième étape du développement de la couleur, le BCA réagit avec l'équivalent réduit (Cu^{1+}) qui a été formé par la première réaction. La couleur mauve intense qui se développe résulte de la chélation de deux molécules de BCA avec un ion Cu^{1+} . Le complexe BCA/cuivre est hydrosoluble et l'absorbance à 562 nm est linéaire en fonction de la concentration de protéine.

Le dosage est réalisé avec la trousse de Pierce (Rockford, IL). Chaque échantillon est évalué en duplicata selon les directives du fabricant dans une microplaque transparente de 96 puits. Les valeurs sont intrapolées à partir d'une courbe standard d'albumine. Les échantillons à doser sont dilués de 1/2 à 1/5. La lecture de la densité optique (D.O.) s'effectue avec un spectrophotomètre lecteur de microplaque FluoStar Optima à 570 nm (BMG, Offenburg, Allemagne).

Surexpression de GPAT1-myc par adénovirus

L'ADN de GPAT1 (rat) a été gracieusement reçu du Dr. Rosalind Coleman de (North Carolina University, États-Unis). L'ADNc a été sous-cloné pour obtenir une protéine de fusion avec l'épitope myc à l'extrémité C-terminale de GPAT1. Le vecteur de Qbiogene AdCuOTR5 (Massie *et al.* 1998a) a été utilisé pour sous-cloner la protéine de fusion GPAT1-myc. Ce vecteur est ensuite transfecté dans les cellules HEK293 pour recombinaison et production de particules virales. Les adénovirus ont été préparés comme décrit par Jani *et al.* (1997) et Massie *et al.* (1998a) afin de réduire la possibilité d'occurrence de particules virales compétentes répliquatives. Des productions de particules à moyenne échelle sont réalisées avec la lignée permissive de la famille des HEK293, les BMA200-8 (obtenues du Dr Langelier). Il s'agit d'une lignée permissive qui permet le cycle lytique complet et qui est idéale pour la propagation et la production de particules virales avec efficacité (titre dans l'ordre des $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ pfu/mL) et ayant l'avantage de ne pas produire de particule virale recombinante (avec un potentiel infectieux). Les

adénovirus ont été purifiés par gradient de chlorure de césium (Graham et Prevec 1991) ou par le système de cartouche Adeno-X de Clontech. Les titres des lots d'adénovirus sont quantifiés avec la méthode par plage de lyses décrite dans Massie *et al.* (1998b).

Transfection d'ADN plasmidique dans les INS832/13 par la méthode d'Amaxa

Les cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 complet jusqu'à confluence de 50-70 %. Des culots contenant 6×10^6 de cellules sont préparés. Chaque culot est utilisé pour la transfection de 5 μg d'ADN et suspendu 100 μl de solution V (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD). La suspension cellules-ADN est transférée dans une cuvette et placée dans l'appareil. Le protocole d'électroporation T-27 est utilisé. À la fin du pulse électrique, 0.5 ml de RPMI 1640 complet à 37°C est ajouté rapidement et délicatement à la suspension dans la cuvette de transfection et cette préparation est transférée dans un tube contenant du RPMI 1640 complet à 37°C à raison de 1 transfection pour 10-13 mL de milieu. La suspension cellulaire est distribuée dans la plaque 6-puits (2 mL) ou 12-puits (1 mL) et cultivée dans une étuve thermostatée à 37°C avec atmosphère de CO₂ 5%.

Transfection de duplexes d'ARNi

La même technique est utilisée pour transfecter une combinaison d'ADN et d'ARN. Les cellules sont transfectées avec un total de 5 μg d'acides nucléiques constitué d'ADN du plasmide pBluescript seul (*carrier DNA*) ou en combinaison avec des duplexes d'ARNi. Plusieurs contrôles sont nécessaires : seulement de l'ADN comme contrôle négatif de la transfection comme tel (mock), un duplexe d'ARN qui n'a pas de cible pour activer Dicer (contrôle négatif). Les cellules sont ensuite cultivées pendant 72 h dans du RPMI 1640 complet avec 11 mM glucose. Le milieu est changé après les premiers 24 h.

Préparation du plasmide pcDNA3.1-GPAT3-HA

L'ADNc original de GPAT3 (Cao *et al.* 2006) a été obtenu de l'ATCC (cDNA clone MGC :105091 IMAGE :30387839). Celui-ci a été utilisé comme gabarit dans une réaction de PCR avec les amorces suivantes : forward, 5'GCAGGATCC

ATGGAGGGCGCAGAGCTGGC3' et reverse, 5'ACGCTCGAGGCTGAGAGATCCATTGCCACA3'. Les amorces ont été dessinées pour introduire des sites de restriction BamHI et XhoI nécessaires pour le sous clonage dans le vecteur de transfert pCR BLUNT TOPO (Invitrogen) et pour enlever le codon stop naturel. Le produit GPAT3 obtenu a ensuite été sous cloné dans pcDNA3.1 (+) Neo (Invitrogen) en suivant les instructions du manufacturier. Un épitope HA et un nouveau codon stop ont été introduits à l'extrémité C-terminale en utilisant un ADN composé de 2 amorces synthétiques hybridés ensemble et comportant des extrémités cohésives avec le site de restriction XhoI (5'TCGAGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTTAAGGGCC3'; 5'CTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC3').

Les amorces ont été dessinées pour introduire des sites de restriction BamHI et XhoI afin de permettre le sous-clonage dans le vecteur pcDNA3.1 (+) Neo (Invitrogen). Le vecteur recombinant pcDNA3.1-GPAT3-HA a entièrement été séquencé avec les amorces T7 et BGH reverse priming site pour s'assurer de sont intégrité.

Production d'ADN plasmidique

Le plasmide est intégré dans les bactéries compétentes DH5 et isolé par maxi-prep grâce à la trousse Plasmid Maxi Kit de Qiagen. La qualité de la préparation et la forme prépondérante superenroulée des plasmides dans les préparations sont vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose et par analyse d'enzyme de restriction. Le dosage du plasmide a été effectué avec un spectrophotomètre en mesurant la densité optique (D.O.) où $1 \text{ D.O.}_{260} = 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ pour l'ADN double brin. Le ratio de $\text{D.O.}_{260} / \text{D.O.}_{280}$ est aussi évalué.

Transformation de bactéries par électroporation

L'électroporateur Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) a été utilisé selon le protocole recommandé par le manufacturier. Brièvement, 50 μL d'une suspension de bactéries électrocompétentes et 10 ng du plasmide (dans un volume maximal de 2 μL) sont délicatement transférés dans une cuvette à électroporation de 0.2 cm.

Préparation des bactéries électrocompétentes

Une préparation de bactéries culottées par centrifugation alors qu'elles sont dans leur phase exponentielle de croissance est gonflée par une série de lavage dans une solution froide de glycérol 10 %. Précisément, 1 L de bactéries DH5 α est cultivé jusqu'à une D.O. de 0.8. Les bactéries en phase de croissance exponentielle sont culottées par centrifugation à 3645 x g pendant 10 min à 4°C. Le culot est rincé par 250 mL de glycérol 10 % stérile et à 4°C. Cette opération est répétée 4 fois. Le dernier culot est suspendu, aliquoté et congelé rapidement dans un bain d'éthanol et de glace sèche. Les aliquotes sont conservées à -80°C.

Extraction de l'ARN total

L'ARN total des cellules est extrait avec la trousse RNeasy mini (Qiagen) en incluant l'étape de la RNase-free DNase (Qiagen). La concentration d'ARN de l'éluat et la qualité de la préparation est caractérisée par le ratio de la D.O. à 260 sur celle à 280 nm où 1 D.O.₂₆₀ = 40 ng/ μ L pour l'ARN.

Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)

L'ADNc a été préparé à partir de l'ARN par la RT-MLV (de l'anglais Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase) (Invitrogen, Carlsbad, CA) et d'hexamères. Des réactions de constitué de 1-2 μ g d'ARN combiné(s) à 1 μ g Pd(N)₆ dans un volume total de 41.5 μ L sont incubés pendant 3 minutes à 73°C. Les échantillons sont refroidis sur glace 2 minutes et 8.5 μ L d'un cocktail constitué des concentrations finales suivantes dans 50 μ L total : de tampon 1X (recette du manufacturier), 1 mM dNTP, 100 mM DTT, 0.5 μ L RT-MLV. Les réactions sont incubées à 37°C pendant 1 h. Les préparations sont ensuite conservées à -20 °C en attendant leur analyse par PCR quantitatif.

PCR quantitatif en temps réel

Les niveaux relatifs des ADNc correspondant à un gène sont déterminés par PCR quantitatif en temps réel. Les réactions de PCR sont réalisées sur Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) avec LC Faststart DNA Master^{plus} SYBR Green (Roche Applied Science). Les résultats sont analysés avec le logiciel RotorGene version 6.0.19 (Corbett Research).

Tableau I. Amorces de PCR quantitatif en temps réel

amorce	séquence
GPAT1 forward	GTC CTC GCT CGG GAT TTT GAC
GPAT1 reverse	CTT CCT GGT CAT CTT GCT CTG
GPAT3 forward	GTC CTA GCT CGG GAT TTT GAC
GPAT3 reverse	CGT CGC CCA AGA TTA AGA CAT
GPAT4 forward	CGT CCT CTT CAC CCT CCT ACT
GPAT4 reverse	TTC TTC TCC TTG GCT CCT CTC
Cyclophilin forward	CTT GCT GCA GAC ATG GTC AAC
Cyclophilin reverse	GCC ATT ATG GCG TGT GAA GTC

Analyse par buvardage de Western

Cette technique a été utilisée pour vérifier l'expression des protéines de fusion GPAT1-myc et GPAT-HA. Les extraits protéiques totaux sont préparés dans un tampon de lyse constitué de Tris 6.25 mM pH 6.8, 2 % SDS et 6 M urée. L'ADN génomique est brisé par sonication et l'échantillon est homogénéisé. La concentration des protéines pour chaque échantillon est déterminée par la méthode BCA en suivant les instructions du fabricant.

Électrophorèse

Les échantillons (40-100 µg de protéines) sont dénaturés par une incubation de 5 min à 95°C dans un tampon de charge constitué de Tris-HCl 40 mM pH 6.8, de bleu de bromophénol 25 %, SDS 2.5 %, β-mercaptoéthanol 2.5 % et glycérol 5 %. Le poids

moléculaire des échantillons est déterminé en comparaison avec le marqueur de poids moléculaire PageRuler Plus (Fermentas). Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes de type SDS-PAGE constitué d'un gel de polyacrylamide à 8.5 % dans un tampon de migration Tris 0.375 M pH 8.8 et SDS 0.1 %. Un courant électrique de 30 mA par gel est appliqué au montage pendant 90 min.

Transfert

Les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide vers une membrane de nitrocellulose Pro-Tran (Scheicher & Schuell, Dassel, Allemagne) par électrotransfert humide. Le tampon de transfert est constitué de Tris-glycine (20 mM Tris pH 8.8, 160 mM glycine et 20 % méthanol). Le transfert est effectué à 100 V pendant 1 h dans une enceinte réfrigérée. La membrane est ensuite lavée avec de l'eau pour enlever les résidus d'acrylamide. La membrane est colorée au rouge ponceau pour vérifier l'efficacité du transfert et les différences de charges entre les puits. La membrane est finalement rincée avec la solution Tris-Tween avant la détection immunologique.

Détection immunologique

La membrane est ensuite saturée avec une solution de blockage constituée de lait 5 % dans une solution tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM et 0.1 % Tween 20 (solution Tris-Tween-lait). La membrane est incubée 2 h à la température ambiante avec l'anticorps primaire dilué dans la solution Tris-Tween-lait avec légère agitation. La membrane est ensuite lavée avec la solution Tris-Tween suivi d'une incubation de 15 min à 37 °C dans du Tris-Tween-lait. L'anticorps secondaire dilué dans le Tris-Tween-lait est incubé pendant 1 h à la température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 5 min dans la solution de Tris-Tween, rincée une dernière fois dans la solution Tris (sans Tween) avant de faire la détection par chimioluminescence avec la trousse ECL (Amersham) selon les directives du fabricant. La durée d'exposition de la membrane au film (Kodak) est normalement de quelques secondes à quelques minutes.

Tableau II. Anticorps utilisés pour les analyses par buvardage de Western

Anticorps	Espèce	Dilution	Source
anti-myc	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology, San Jose, CA
anti-HA	Souris	1/200	Cell Signaling Technology, Danvers, MA
anti-souris couplé à la HRP	Chèvre	1/20 000	BioRad, Hercules, CA

Microscopie confocale

Les cellules INS 832/13 sont transfectées avec 5 µg d'ADN plasmidique comme décrit plus haut. Les cellules sontensemencées à une concentration de 500 x 10³ cellules/puits sur lamelle de verre (Thermo Scientific, thickness no 1.5) dans une plaque 12-puits et cultivées pendant 48 h dans le milieu de culture standard.

Les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 20 min, perméabilisées par 0.1% Triton X-100 pendant 10 min suivis de deux lavages par PBS, et bloquées avec 2% BSA pour 1 h à la température ambiante. Les cellules sont marquées par une triple coloration.

Dans le cas de GPAT1-myc, l'épitope myc est détecté avec un anticorps primaire anti-myc (SantaCruz) dilué 1/100 et d'un anticorps secondaire anti-souris Alexa 488 (Invitrogen) dilué 1/500. Les mitochondries sont marquées avec le Mitotracker (Invitrogen) utilisé à 100 nM et dilué dans du RPMI 1640 complet. Cette étape est réalisée avant de fixer et perméabiliser les cellules.

Dans le cas de GPAT3-HA, l'épitope HA est détecté avec un anticorps primaire anti-HA de souris (don du Dr Bouvier, Université de Montréal) dilué 1/1000 et d'un anticorps secondaire anti-souris Alexa 488 dilué 1/250 (Invitrogen). Le réticulum endoplasmique est marqué avec l'anticorps primaire anti-calréticuline (ABCAM) et de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au TRITC dilué 1/500 (Jackson).

Autant dans les cas de GPAT1-myc et de GPAT3-HA, les noyaux sont colorés avec 400 nM de DAPI (Invitrogen) dilué dans le PBS.

Les cellules ont été observées aux longueurs d'ondes appropriées avec le microscope confocal Leica TCS SP5 (Wetzlar, Allemagne). Les images ont été analysées avec le logiciel Leica Application Suite Advanced Fluorescence (Leica Microsystems).

Analyses statistiques

Les données sont analysées et les graphiques réalisés avec Prism5 (GraphPad Software, San Diego CA). Les données sont exprimées comme la moyenne \pm erreur standard (ES) de 2 ou 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata ou en triplicata.

Les données sont évaluées par une analyse de variance à un facteur (ANOVA) en utilisant un test de Bonferroni comme test *post hoc* ou un test T de Student, dépendamment du nombre d'échantillons.

Chapitre III : Résultats

Introduction

Plusieurs approches ont été utilisées afin d'étudier le rôle du métabolisme des lipides dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Dans l'intention de modifier le processus d'estérification *de novo* des acides gras, plus spécifiquement la première étape de la synthèse des triglycérides à partir des acides gras, nous avons fait le choix de modifier l'expression de l'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) qui constitue aussi l'étape limitante de l'estérification (Haldar et Vancura 1992 ; Coleman et Lee 2004).

La présentation des résultats expérimentaux de cette étude est constituée de six sections organisées chronologiquement selon la disponibilité et l'utilisation des différentes approches moléculaires. Ainsi, au moment d'entreprendre cette thèse, seul l'isoforme GPAT1 était cloné et au cours de notre travail de thèse, les nouvelles connaissances dans le domaine du métabolisme des lipides ont établi l'existence (et les séquences d'ADNc) des isoformes GPAT2, 3 et 4. Les choix méthodologiques ont été guidés par la disponibilité des technologies d'ARNi, de surexpression et de transfection.

Dans la première partie, nous démontrons la corrélation entre l'estérification du palmitate et la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules INS 832/13 et INSr β .

Dans la seconde partie, notre objectif a été d'augmenter l'estérification *de novo* des lipides et d'examiner les conséquences sur la sécrétion d'insuline, afin de déterminer si cette voie du métabolisme des lipides est impliquée dans le système de transduction métabolique de la cellule β . Dans ce but, l'isoforme mitochondrial GPAT1, le seul à être connu et cloné au commencement de cette étude, est surexprimé, sous la forme d'une protéine de fusion avec l'épitope myc (GPAT1-myc), dans les cellules INSr β par un adénovirus et un système inductible de type Tet-ON.

Dans la troisième partie, suite au clonage en 2006 d'un des deux isoformes de GPAT présent au niveau du réticulum endoplasmique (Cao *et al.* 2006), nous avons construit la protéine de fusion GPAT3-HA. Cette dernière a été surexprimée dans les INS 832/13, toujours dans l'optique de modifier le processus d'estérification et d'en mesurer les conséquences sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras. En effet, contrairement à GPAT-1, un enzyme mitochondrial, GPAT-3 est associé au réticulum endoplasmique et il est connu que le signallement par les lipides a une composante spatiale importante.

Jusqu'en 2006, la transfection d'ADN ou d'ARN était difficile dans les lignées INS. Avec l'arrivée de la technique d'électroporation appelée nucléofection d'Amaxa (Hamm *et al.* 2002), nous avons pu améliorer grandement l'efficacité de transfection dans les INS ouvrant la porte sur de nouveaux protocoles. Dans la quatrième partie, nous avons ainsi utilisé la technologie d'ARNi associée à la nucléofection pour inhiber l'expression de GPAT1 dans la lignée cellulaire INS 832/13, et examiner les conséquences sur la sécrétion de l'insuline en réponse aux nutriments.

Dans la cinquième partie, suite à la découverte en 2008 que GPAT4, le deuxième isoforme localisé au niveau du réticulum endoplasmique, avait été identifié à tort en tant qu'AGPAT6 (Chen *et al.* 2008; Nagle *et al.* 2008), les deux isoformes GPAT1 et GPAT4 ont été conjointement inhibées par la technologie d'ARNi dans les cellules INS 832/13.

Enfin, dans la sixième et dernière partie, nous avons étudié le rôle de l'estérification *de novo* dans le processus de glucolipotoxicité/apoptotique de la cellule β en surexprimant la protéine de fusion GPAT3-HA dans les cellules INS 832/13.

Il est important de noter, pour comprendre la logique de la séquence des expériences décrites au cours de notre travail de thèse, qu'ont été découverts trois nouveaux isoformes de GPAT, ce qui a considérablement compliqué notre travail et le fait de tester rigoureusement notre hypothèse de départ. En effet, cette voie métabolique

devenait redondante en ce qui a trait aux isoenzymes impliqués ce qui ouvrait la voie à des changements compensatoires suite à l'altération de l'expression d'un isoenzyme particulier. De plus, on découvrait que ces isoenzymes GPAT sont en fait localisés dans différents compartiment sub-cellulaires, impliquant un aspect « spatial » au projet qui ne pouvait pas être considéré initialement, et la possibilité de transduction métabolique localisée dans des sous-compartiments cellulaires.

Les lignées cellulaires insulinosécrétrices

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules β forment le corps central des îlots de Langerhans. Cependant il n'y a pas beaucoup de ces îlots dans un animal comme la souris. En effet, nous sommes en mesure d'isoler entre 100-300 îlots par souris ce qui est trop peu pour faire des études de surexpression ou d'inhibition de l'expression ; surtout dans le contexte où nous voulons mesurer des effets sur le métabolisme des lipides ce qui requière beaucoup de matériel biologique. De plus, les cellules β normales se transfectent difficilement. Le choix d'un modèle cellulaire adéquat pour l'étude des effets du métabolisme des acides gras sur la sécrétion d'insuline devient donc important. Les lignées cellulaires insulinosécrétrices rapportées dans la littérature sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau III. Principales lignées cellulaires pancréatiques insulinosécrétrices

Lignée	Espèce	Caractéristique(s)	Référence(s)	Sécrétion d'insuline induite par le glucose	Contenu total en insuline versus îlot
MIN-6	souris	Perte du potentiel	Ishihara <i>et al.</i> 1993	Faible amplitude	Faible
β H9C9	souris	sécrétoire avec les passages	Liang <i>et al.</i> 1996	Faible amplitude	Très faible
β TC6-F7	souris	passages	Efrat <i>et al.</i> 1988	Faible amplitude	Très faible
HIT	hamster		Regazzi <i>et al.</i> 1990	Faible amplitude	Très faible
RINm5F	rat		Regazzi <i>et al.</i> 1990 ; Gazdar <i>et al.</i> 1980	Faible amplitude	Très Faible
BRIN-BD11	rat	Faiblement différenciée	McClenaghan <i>et al.</i> 1996	Faible amplitude	Très faible
INS-1	rat	Population hétérogène ; instable sur des périodes de culture de durée prolongée	Asfari <i>et al.</i> 1992	Faible amplitude, 2 à 4 fois	\approx 10%
INS-1E	rat	Clone sélectionné des INS-1	Merglen <i>et al.</i> 2004	6 fois	\approx 15%
INS 832/13	rat	Clone de INS-1 transfecté avec ADNc de la pro-insuline humaine	Hohmeier <i>et al.</i> 2004	10 fois	\approx 15%
INSr β	rat	Système Tet-ON	Wang <i>et al.</i> 1997 ; Wang <i>et al.</i> 2001	10-12 fois	\approx 15%

Plusieurs lignées cellulaires sont disponibles pour l'étude de la sécrétion d'insuline, mais il n'existe aucune lignée humaine rapportée à ce jour. Les lignées existantes proviennent du rat, du hamster et de la souris. Cependant, elles ont plusieurs limites. Des lignées cellulaires de souris comme les MIN-6 (et ses dérivés), les β TC6-F7 et les β H9C9 sont bien utilisées. Elles démontrent une faible induction de la sécrétion d'insuline par le glucose et elles prolifèrent lentement. De plus, elles perdent rapidement leur potentiel insulinosécrétoire avec les passages. En comparaison avec les îlots fraîchement isolés, les cellules de hamster HIT (Regazzi *et al.* 1990) ont un contenu plus bas en insuline et ont une sécrétion d'insuline induite par le glucose de seulement 2 fois.

Des lignées cellulaires de rat ont aussi été établies comme les RINm5F, BRIN-BD11 et les INS-1. Dans le cas des RINm5F (Gazdar *et al.* 1980), elles ont un très faible contenu en insuline et ne répondent pas au glucose dans des concentrations physiologiques. De plus, elles perdent leurs caractéristiques différenciées en culture prolongée et sont contaminées par un virus (Hoftiezer *et al.* 1987). Les BRIN-BD11 (McClenaghan *et al.* 1996) sont faiblement différenciées, ont un contenu en insuline très réduit et une faible potentialisation de la sécrétion par le glucose d'environ 3 fois.

Les cellules INS-1, une lignée cellulaire pancréatique de rat isolée à partir d'un insulinome induit par des radiations, sont sensibles au glucose dans des concentrations physiologiques mais ne sécrètent que 2 à 4 fois plus d'insuline de bas à haut glucose ce qui est loin de la potentialisation de 10 à 15 fois observée pour des îlots fraîchement isolés (Asfari *et al.* 1992). De plus, la lignée INS-1 est non clonale et représente une population hétérogène ce qui rend la lignée instable sur des périodes de cultures prolongées. Par conséquent des lignées dérivées des INS-1 ont été établies. La lignée INS-1E est dérivée d'un clone isolé de la lignée parentale INS-1 qui a été sélectionné selon les caractéristiques suivantes : un contenu en insuline raisonnable et une sécrétion induite par le glucose de plus de 6 fois (Mergle *et al.* 2004).

La lignée INS 832/13 a été obtenue du Dr CB Newgard (Duke University, Durham NC). Il s'agit d'une lignée cellulaire établie à partir d'un clone stable isolé suite à la transfection de la lignée parentale INS-1 avec un plasmide de la pro-insuline humaine (Hohmeier *et al.* 2000). Très tôt dans son développement, cette lignée a été contaminée par des mycoplasmes. Cependant, le groupe du Dr Newgard a réussi la décontamination sans trop affecter les caractéristiques insulinosécrétoires. Le contenu en insuline est normal et la sécrétion d'insuline induite par le glucose est de plus de 8 fois, se comparant ainsi très bien avec des îlots fraîchement isolés. De plus, les cellules prolifèrent bien, ce qui en fait une lignée de choix.

Pour la partie de l'étude avec GPAT1 où un vecteur avec un promoteur inducible à la tétracycline est transduit par adénovirus, la lignée INSR β est utilisée. La lignée INSR β dans laquelle le système Tet-ON a été implanté (Wang *et al.* 1997 ; Wang *et al.* 2001) a été établie à partir d'un clone stable d'INS-1 qui a été transfecté avec un plasmide codant pour le facteur de transcription rtTA (Gossen *et al.* 1995). Cette lignée est employée pour éviter d'avoir à utiliser la co-infection avec un adénovirus exprimant le facteur de transcription rtTA. Ce système d'activation a été développé par Gossen *et collègues*. Ils ont modifié le répresseur TetR du système Tet-OFF en générant un transactivateur transcriptionnel qui résulte de la fusion du domaine d'activation VP16 avec un répresseur Tet mutant. Le transactivateur qui en résulte nécessite la présence de la tétracycline, ou un de ces dérivés, pour se lier spécifiquement au promoteur Tet et promouvoir la transcription.

Corrélation entre l'estérification des acides gras et la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Des études précédentes de notre laboratoire ont montré que lorsque la β -oxydation est augmentée par des approches biomoléculaires, ce qui a pour résultat de diminuer l'estérification des lipides, une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est observée (Herrero *et al.* 2005). Nous voulions donc tester directement l'hypothèse proposant que l'estérification des lipides et spécifiquement celle des acides gras en lipides complexes (DAG, TG) est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion induite par le glucose.

Nous avons d'abord évalué la dose dépendance de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les deux lignées cellulaires utilisées dans cette étude (Figures 8 et 9).

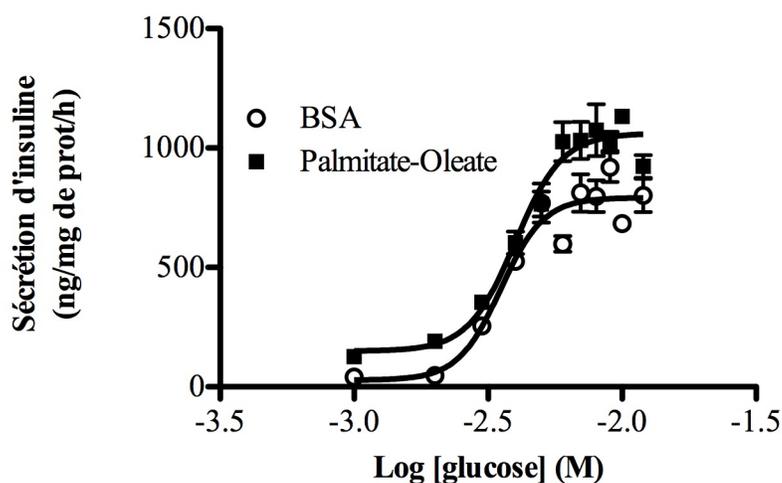


Figure 8. Les cellules $INSr\beta$ sécrètent l'insuline en réponse au glucose et les acides gras amplifient cette réponse.

Les cellules ont été cultivées et traitées tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les cellules sont incubées pendant une heure avec des concentrations croissantes de glucose en absence (BSA) ou en présence de 0.125 mM palmitate et 0.125 mM d'oléate. Les résultats montrent dans une expérience les moyennes de trois puits indépendants de cellules \pm ES.

À la Figure 8, nous observons une augmentation de la sécrétion d'insuline de façon dose-dépendante du glucose. Malgré que la sécrétion d'insuline soit augmentée de 28 fois de bas à haut glucose avec un EC_{50} en glucose de 3.5 mM ($R^2=9.8$) dans la condition sans acides gras et de 7 fois en présence d'acides gras avec un EC_{50} pour le glucose de 4 mM ($R^2=9.3$), la sécrétion d'insuline est augmentée de 25 % au maximum de la réponse au glucose. Le contenu total en insuline est de 7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine. Les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline de 34 % à haut glucose dans les $INSr\beta$ sans changer l' EC_{50} pour le glucose.

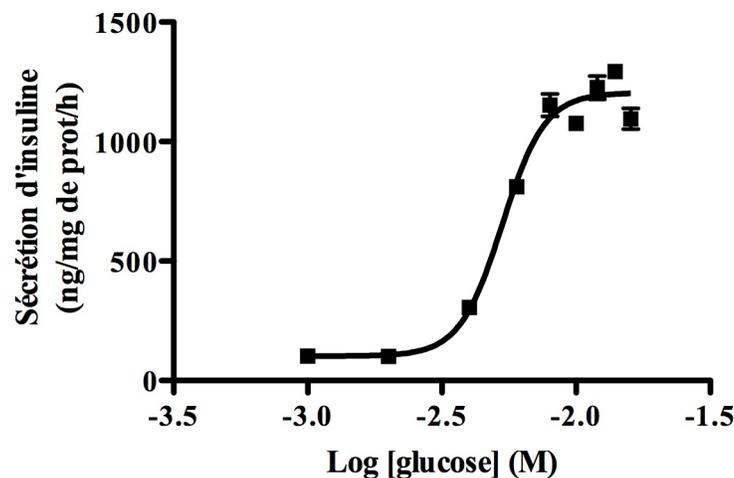


Figure 9. Les cellules INS 832/13 sécrètent l'insuline en réponse au glucose en présence de palmitate.

Les cellules ont été cultivées et traitées tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate et de 0.2 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata ($n=6$).

À la Figure 9, la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de palmitate est effectivement augmentée par des concentrations croissantes de glucose avec un EC_{50} pour le glucose de 5.3 mM ($R^2=9.6$) et une augmentation de 10.7 fois de bas à haut glucose. La concentration finale d'acide gras utilisée dans la figure 9 (0.2 mM) est similaire à celle avec le mélange de palmitate et d'oléate dans les $INSr\beta$ (Fig. 8) qui est de 0.25 mM. Le contenu total en insuline dans le cas des INS 832/13 est de 8.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéine.

Les Figures 8 et 9 montrent que les cellules INS 832/13 et INSr β sécrètent l'insuline en réponse au glucose de façon adéquate dans des concentrations physiologiques de glucose, ont des contenus appréciables en insuline et donc que le choix de ces lignées cellulaires pour l'étude est approprié.

Afin d'étudier l'estérification des acides gras directement en parallèle avec la sécrétion d'insuline induite par le glucose, les contenus lipidiques ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) dans les mêmes échantillons que la figure 9. L'incubation avec un traceur radioactif, ici le [1- 14 C]palmitate conjointement au palmitate comme seule espèce d'acide gras permet de calculer une activité spécifique et de déterminer expérimentalement le taux d'incorporation du palmitate dans les différentes classes de lipides.

L'incorporation du [1- 14 C]palmitate induite par des concentrations croissantes de glucose a été mesurée comme montré à la Figure 10.

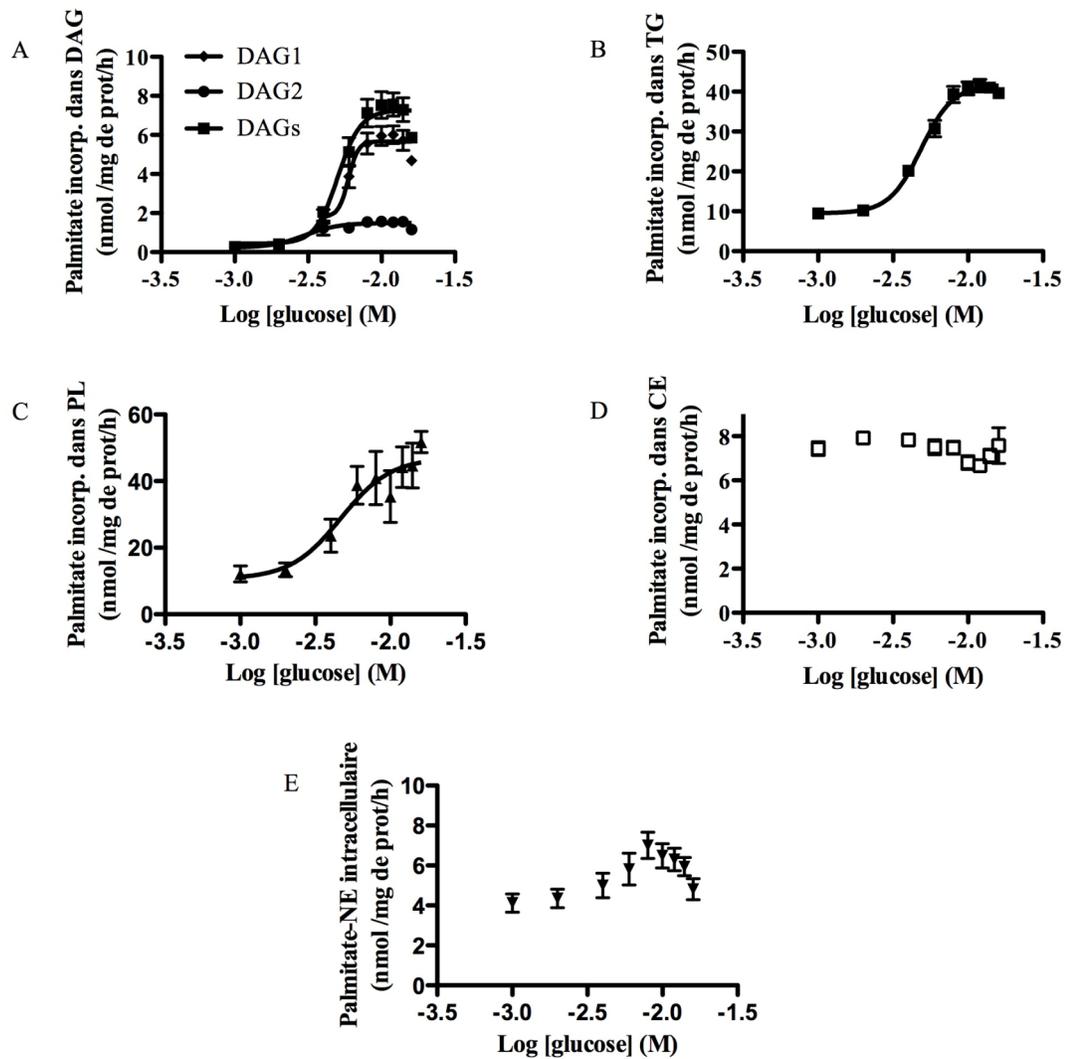


Figure 10. L'estérification du palmitate en glycérolipides et phospholipides est dépendante du glucose.

Les cellules INS 832/13 sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate et 0.2 $\mu\text{Ci/mL}$ $[1-^{14}\text{C}]$ palmitate. Les lipides des cellules sont extraits par la méthode de Folch et séparés par chromatographie sur couche mince. L'intensité radioactive des bandes a été quantifiée avec le Typhoon Trio. DAG (A), TG (B), PL (C), cholestérol esters (CE) (D) et palmitate non-estérifié (NE) (E). DAGs représente la combinaison des deux bandes de DAG. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata ($n=6$).

Les différentes classes de lipides sont quantifiées après 1 h d'incubation avec le [1-¹⁴C]palmitate. Les cellules n'étant pas préalablement incubées avec l'acide gras et le traceur, nous avons l'expression d'un taux d'estérification du palmitate en lipides complexes.

Nous observons à la Figure 10 que l'incorporation du [1-¹⁴C]palmitate est augmentée par des concentrations croissantes de glucose dans les DAG (A), les TG (B) et les PL (C) avec des EC₅₀ de 5.9 mM (R²=0.78), 4.9 mM (R²=0.94) et 4.7 mM (R²=0.49) respectivement.

Les DAGs représentent la combinaison du total de deux bandes sur la CCM qui sont constituées de deux espèces de DAG. Pour les deux espèces, l'incorporation du palmitate est augmentée par des concentrations croissantes de glucose.

L'incorporation du traceur en CE n'est pas induite par le glucose. Cela n'est pas une surprise sachant que le palmitate est beaucoup moins utilisé par les cellules pour estérifier le cholestérol que l'oléate (Coleman et Lee 2004).

Finalement, les concentrations intracellulaires de palmitate-NE (non-incorporé en lipide complexe) ne varient pas significativement avec l'augmentation du glucose. Ce dernier résultat suggère que l'augmentation de l'incorporation du palmitate en lipides complexes induite par le glucose n'est pas seulement due à une augmentation des niveaux intracellulaires d'acides gras.

Afin de vérifier si une corrélation entre l'estérification du palmitate en lipides complexes et la sécrétion d'insuline existe, les résultats des Figures 9 et 10 ont été combinés pour produire un nouveau graphique. La sécrétion d'insuline est représentée en fonction du taux d'estérification en différentes classes de lipides complexes à la Figure 11.

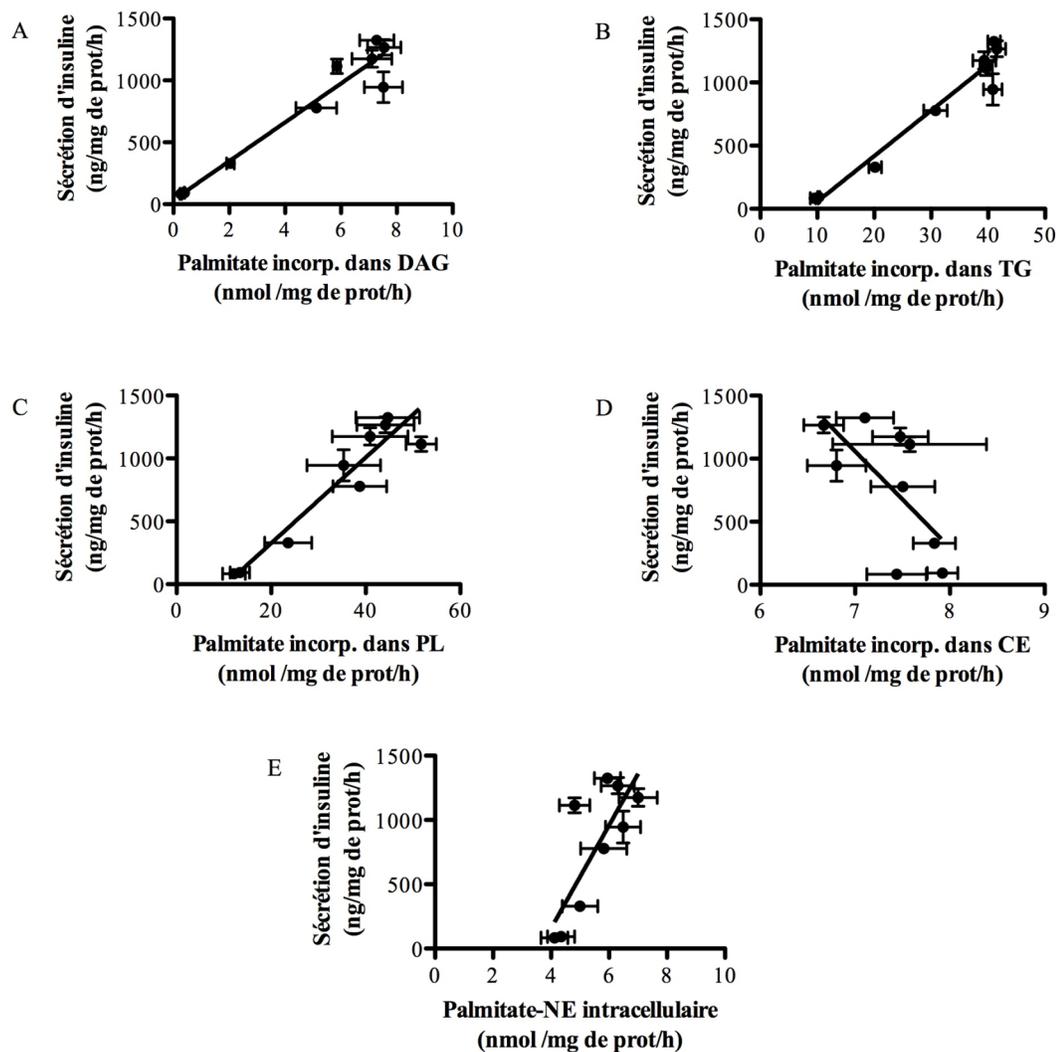


Figure 11. La corrélation entre la sécrétion d'insuline et le taux d'estérification du palmitate pour les différentes classes de lipides.

Les résultats des figures 9 et 10 ont été combinés pour chacune des concentrations de glucose pour produire un nouveau graphique afin d'établir des corrélations entre l'incorporation du palmitate en lipides complexes et la sécrétion d'insuline. DAG (A) TG (B) PL (C) CE (D) palmitate-NE (E). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicata ($n=6$).

Nous observons une corrélation de la sécrétion d'insuline et de l'estérification dans le cas des DAG, TG et des PL avec des coefficients de corrélation (R^2) de 0.9, 0.91 et 0.87 respectivement. Dans le cas des CE et du palmitate-NE intracellulaire il n'y a pas de

corrélation comme en témoignent les coefficients de corrélation R^2 de 0.41 et 0.62 respectivement. Nous observons donc une corrélation entre l'augmentation de l'estérification *de novo* du palmitate en glycérolipides et phospholipides et la sécrétion d'insuline mais pas avec l'estérification avec le cholestérol.

Conséquence de la surexpression de GPAT1-myc et de l'augmentation de l'estérification des lipides dans les INSr β sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Afin de vérifier l'implication de l'estérification *de novo* des acides gras dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, plusieurs approches moléculaires ont été utilisées dans le dessein de favoriser l'estérification des lipides. Plus spécifiquement, la modulation de l'expression de l'enzyme responsable de l'étape limitante de la synthèse *de novo* des lipides complexes, l'enzyme GPAT, a été utilisée comme outil moléculaire (Coleman *et al.* 2004 ; Gimeno et Cao 2008 ; Cao *et al.* 2006). Au commencement de cette étude, le seul isoforme de GPAT à être cloné était GPAT1 qui est localisée sur la membrane externe de la mitochondrie.

Dans cette section, les adénovirus sont utilisés pour la transfection des cellules pour plusieurs raisons. Les méthodes de transfection traditionnelles qui étaient disponibles à ce moment n'étaient pas efficaces dans les lignées à l'étude. Avec la LipofectamineTM 2000 (Invitrogen) par exemple, une efficacité de transfection de seulement 30 % était observée lorsqu'évaluée avec un plasmide exprimant la GFP (données non présentées). Notre choix s'est donc arrêté sur la technologie des adénovirus parce qu'ils sont efficaces comme moyen de transgénèse, particulièrement dans des types cellulaires qui ont une activité répliquative faible (McClenaghan *et al.* 1996). Il est rapporté dans la littérature que l'efficacité d'infection est de 70-80 % dans les îlots primaires isolés et près de 100 % dans les lignées cellulaires dérivées d'insulinomes (Porte *et al.* 2003). De plus, ils représentent des outils judicieux puisqu'ils peuvent accommoder des transgènes relativement longs de 5-7 kb, ils se propagent facilement pour obtenir des stocks viraux avec de hauts titres et il est facile d'en faire la production. L'ADN des adénovirus s'intègre peu efficacement à

l'ADN génomique et le vecteur d'ADN existe de façon prédominante sous la forme d'épisome, l'expression du transgène est donc transitoire. Nous avons évalué l'efficacité d'infection par les adénovirus dans les INSr β avec un adénovirus exprimant la GFP. Nous avons observé que 90-100 % des cellules exprimaient la GFP en utilisant une M.O.I. (de l'anglais multiplicity of infection, correspondant au nombre de particules virales par cellule) de moins de 10 (données non présentées).

La construction d'ADNc de GPAT1 a été obtenue du Dr R Coleman (North Carolina University) et les manipulations de biologie moléculaire pour la préparation du vecteur adénoviral ont été réalisées par MJ Sasseville (Laboratoire Dr Langelier). La construction réalisée est une protéine de fusion avec l'épitope myc situé en C-terminal de GPAT1. Le système d'expression est régulé par un promoteur TR5, sensible à la présence de tétracycline (Tet). L'épitope myc nous permet de mesurer facilement l'expression de la protéine de fusion par analyse buvardage de Western en utilisant un anticorps anti-myc du commerce, étant donné qu'aucun anticorps spécifique n'est disponible contre GPAT1. Après l'étape de recombinaison des adénovirus, j'ai réalisé les étapes de préparation des stocks à partir de la sélection du clone viral ayant la meilleure expression de la protéine GPAT1-myc. Le clone choisi a été amplifié, purifié et titré comme il est décrit dans la section Matériel et méthodes.

Les stocks viraux ont été caractérisés non seulement au niveau de leur expression mais aussi de l'efficacité de leur induction du système Tet-ON. À la Figure 12, une seule bande est détectée à 90 kDa par l'anticorps anti-myc. Dans la condition contrôle, cultivée en absence d'inducteur, aucune bande n'a été détectée même avec une M.O.I. élevée suggérant que l'activité basale du promoteur TR5 en absence de doxycycline est minimale. Le système Tet-ON ne fuit donc pas en absence de l'inducteur. L'induction de la transcription est aussi contrôlée par la présence de la doxycycline d'une façon dose-dépendante (*donnée non présentées*).

L'avantage du protocole utilisé et du choix du système Tet-ON est d'éviter d'introduire un biais via le titre du virus, en utilisant le même stock viral et la même

quantité de virus dans les deux groupes comparés (contrôle vs traitement). À la Figure 12, nous observons une augmentation de l'expression de GPAT1-myc de façon dose-dépendante en fonction de la M.O.I. Nous avons donc observé que le système Tet-ON fonctionne de façon fiable et que l'activité du promoteur à la tétracycline est indétectable en absence de doxycycline.

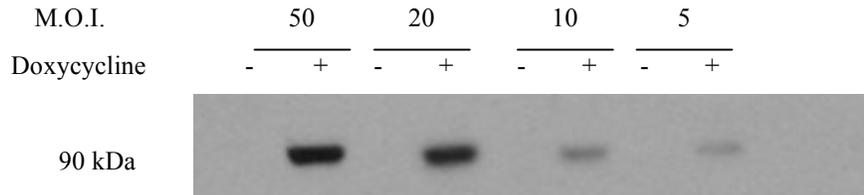


Figure 12. La surexpression de GPAT1-myc au moyen d'un adénovirus recombinant en utilisant le système Tet-ON dans les INSR β est dépendante de la M.O.I. et de la doxycycline.

Les cellules sont exposées à des quantités croissantes de particules virales (M.O.I.) en absence ou en présence de 1 μ g/mL doxycycline. Les cellules ont été traitées et cultivées comme décrit dans la section Matériel et méthodes. Cinquante μ g d'extraits protéiques totaux sont soumis à une analyse par buvardage de Western avec un anticorps contre l'épitope myc.

La viabilité cellulaire a été évaluée par numération cellulaire avec exclusion au bleu de trypan suite à une exposition de 4 h des cellules aux adénovirus et à la doxycycline pendant 24h. La viabilité des cellules n'était pas affectée par la présence de virus ou par l'exposition à la doxycycline (viabilité >95 %).

Afin de s'assurer que l'expression de la protéine de fusion GPAT1-myc est localisée à la mitochondrie, nous avons réalisé des expériences d'immunocytochimie et de colocalisation par microscopie confocale. La technique d'imagerie utilisant différents fluorophores a été utilisée pour visualiser la distribution de la protéine de fusion. Cette technique permet la détection simultanée de structures intracellulaires en plus de la protéine d'intérêt.

La construction d'ADN GPAT1-myc utilisée pour l'adénovirus a été sous-clonée dans le vecteur pcDNA3.1. Le plasmide pcDNA3.1-GPAT1-myc a été transfecté dans les INS 832/13 par nucléofection. À la Figure 13, plusieurs images d'un même plan focal sont

acquises à différentes longueurs d'ondes correspondant aux fluorophores utilisés pour la détection des différentes structures. Au panneau A, les cellules sont marquées à l'aide d'un anticorps primaire anti-myc fait chez la souris et révélé par un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorophore Alexa. Au panneau B, les mitochondries sont marquées avec le Mitotracker (Invitrogen). Au panneau C, l'ADN double brin contenu dans les noyaux est marqué avec du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). La coloration des noyaux est utilisée comme coloration de contraste afin de voir toutes les cellules.

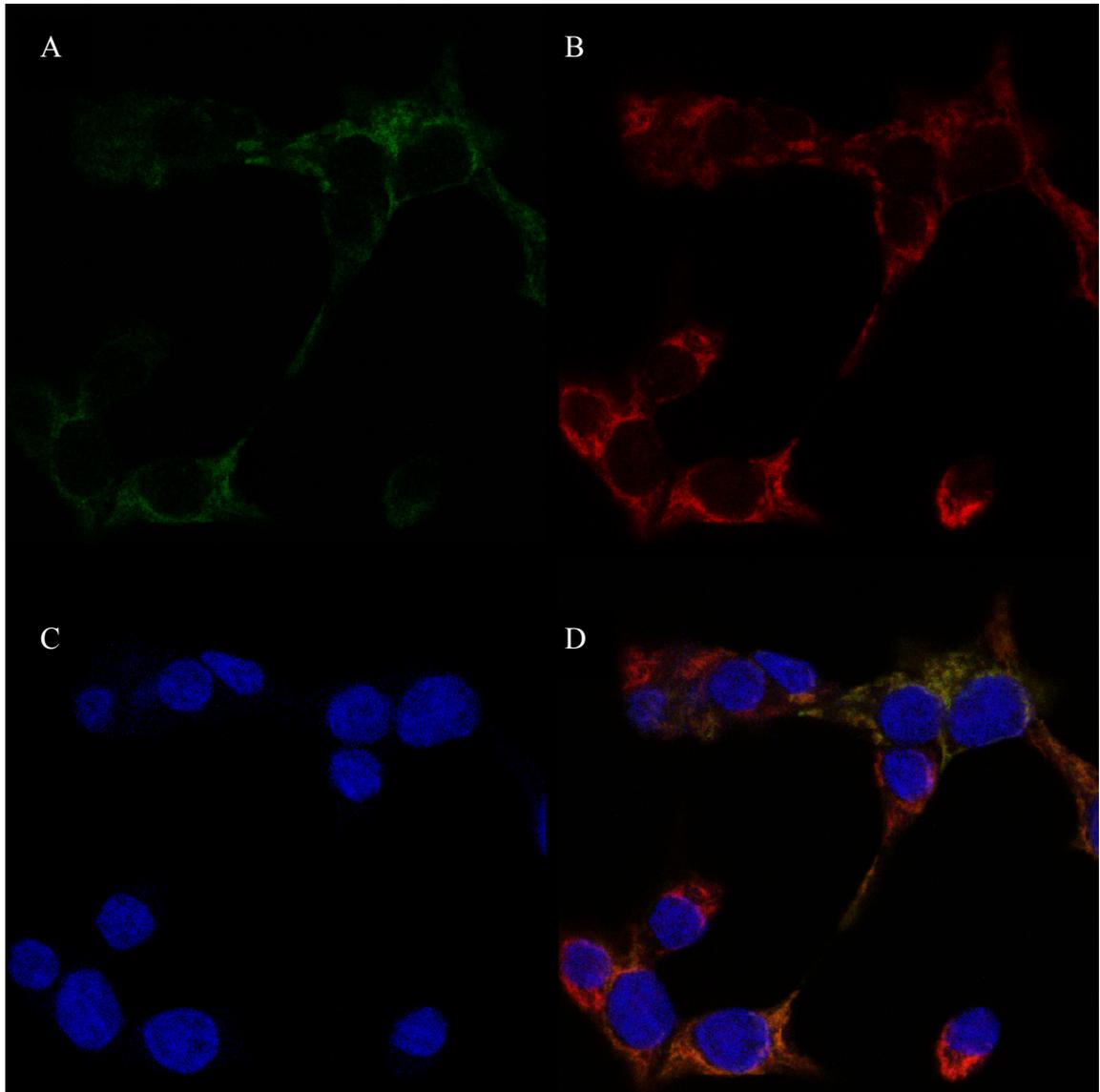


Figure 13. La protéine de fusion GPAT1-myc colocalise avec les mitochondries. Les cellules INS 832/13 sont transfectées avec 5 μg du plasmide pcDNA3.1-GPAT1-myc. Les cellules sont fixées, perméabilisées et colorées comme décrit dans la section Matériel et méthodes. GPAT1-myc en vert (A), les mitochondries en rouge (B). Les noyaux sont visualisés par une coloration de contraste DAPI (bleue) (C et D). La coloration jaune représente la colocalisation de l'épitope myc avec le marqueur de la mitochondrie (D). Objectif 63X et zoom 3.6.

La Figure 13 montre le marquage des mitochondries dans la situation où GPAT1-myc est surexprimée. Le marquage de l'épitope myc est détectable seulement dans la situation où GPAT1-myc est surexprimée. Au panneau D, nous observons une colocalisation de l'expression de l'épitope myc avec le marquage des mitochondries. La représentation d'une série de coupes optiques acquises dans l'axe des z nous confirme la localisation de la protéine de fusion GPAT1-myc au niveau des mitochondries. La spécificité de l'anticorps secondaire est démontrée par l'absence de signal en absence d'anticorps primaire (données non-présentées).

L'efficacité de la transfection du plasmide pcDNA3.1-GPAT1myc est faible en comparaison avec celle obtenue en utilisant l'adénovirus. En effet, l'ADNc de GPAT1 constitue un grand insert et le ratio du nombre de plasmides/cellule est probablement faible considérant l'utilisation constante de 5 µg d'ADN. Lors d'expériences d'immunofluorescence avec les adénovirus comme moyen de transfection (comme dans les conditions utilisées pour l'étude), nous n'avons pas observé d'expression de l'épitope myc dans le cytoplasme même avec une M.O.I. de 50 (données non présentées).

Pour examiner si notre outil moléculaire est efficace afin d'augmenter le métabolisme des lipides vers l'estérification, l'activité de la protéine de fusion GPAT1-myc est évaluée par la mesure du taux d'incorporation du traceur [1-¹⁴C]palmitate en lipides complexes de différentes classes isolés par un système de chromatographie sur couche mince (CCM) qui permet de séparer les DAG, les TG et les CE et le palmitate non-estérifié (NE) intracellulaire comme décrit à la Figure 10. Les PL, qui sont de nature polaire, ne migrent pas sur la CCM et restent à l'origine. L'incorporation du [1-¹⁴C]palmitate est induite avec des concentrations croissantes de glucose dans les cellules infectées avec l'adénovirus GPAT1-myc en présence et en absence de doxycycline. L'effet de la surexpression de GPAT1-myc dans les cellules INSrβ sur le taux d'estérification du palmitate en lipides complexes a été mesuré dans la Figure 14.

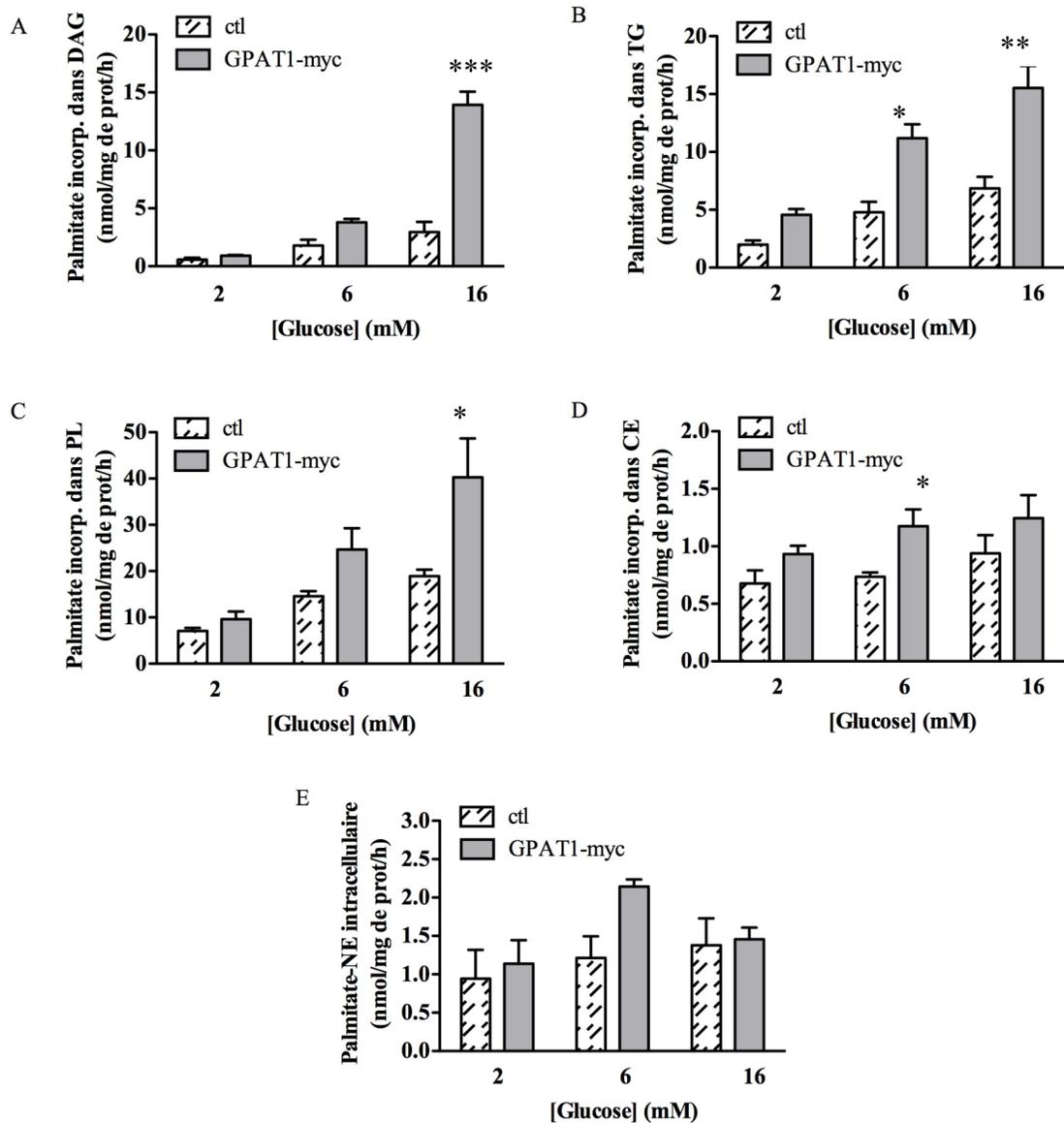


Figure 14. L'expression de GPAT1-myc augmente l'estérification du palmitate en lipides complexes dans les Insr β .

Les cellules sont infectées avec l'adénovirus et traitées tel que décrit dans Matériel et méthodes en absence (ctl) et en présence de doxycycline (GPAT1-myc). Les cellules sont ensuite incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate, 0.2 μ Ci/mL [$1-^{14}$ C]palmitate, 0.5 % BSA et 1 mM carnitine. Les classes de lipides sont séparées par CCM. L'incorporation du [$1-^{14}$ C]palmitate en DAG (A), TG (B), PL (C) CE (D) et palmitate non-estérifié (NE) (E) est quantifiée par scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata (n=4). * p <0.05, ** p <0.01 et *** p <0.001

À la Figure 14, le taux d'incorporation du palmitate en DAG, TG et PL est augmenté par les concentrations croissantes de glucose autant dans la situation contrôle (en absence de doxycycline) que dans celle où GPAT1-myc est surexprimée. La surexpression de GPAT1-myc augmente l'incorporation du traceur dans les DAG de 1.6, 2.1 et 4.7 fois à 2, 6, et 16 mM glucose, respectivement en comparaison avec la situation contrôle. L'incorporation du traceur en TG induite par le glucose est augmentée par la surexpression de GPAT1-myc de 2.3 fois aux trois concentrations de glucose respectivement. Au niveau des PL, l'incorporation du palmitate est augmentée de 1.4, 1.7 et 2.1 fois à 2, 6 et 16 mM glucose respectivement par l'expression de GPAT1-myc.

Ensuite, l'effet de la surexpression de GPAT1-myc sur la β -oxydation du palmitate a été mesuré. Afin de vérifier si l'augmentation de l'estérification est accompagnée par une diminution de la β -oxydation du palmitate, comme ce qui a été observé dans d'autres modèles cellulaires où GPAT1 est surexprimé (Igal *et al.* 2001), l'oxydation du [1- 14 C]palmitate est quantifiée en mesurant le 14 CO₂ et les produits solubles dans la fraction acide (ASP de l'anglais acid soluble products). Les ASP sont constitués en majeure partie de corps cétoniques (Fulgencio *et al.* 1996).

Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose, en présence d'une concentration non-limitante de carnitine pour le transport des acides gras par la CPT-1 dans les mitochondries.

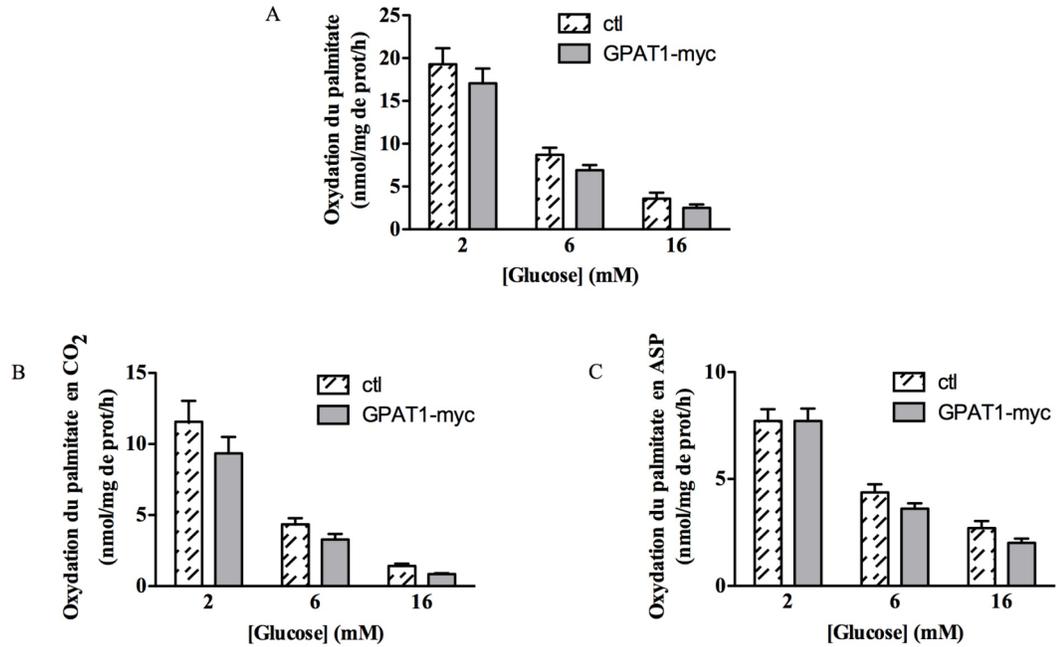


Figure 15. Effet de l'expression de la GPAT1-myc sur la β -oxydation du palmitate dans les Insr β .

Les cellules sont infectées avec l'adénovirus et traitées tel que décrit dans Matériel et méthodes en absence (ctl) et en présence de doxycycline (GPAT1-myc). Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate, 0.2 μ Ci/mL [14 C]palmitate, 0.5 % BSA et 1 mM L-carnitine. La quantification a été faite par scintillation liquide du 14 CO₂ libéré et des ASP (A), 14 CO₂ (B) et ASP (C). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata (n=4).

À la Figure 15, l'effet du glucose sur l'inhibition de la β -oxydation des acides gras a été mesuré. La β -oxydation du palmitate est inhibée de façon croissante avec les concentrations de glucose. La β -oxydation est inhibée de façon glucose dose-dépendante dans les deux populations de cellules. La surexpression de GPAT1-myc ne diminue pas de façon significative la β -oxydation du palmitate aux concentrations de glucose utilisées. Nous pouvons cependant observer que l'expression de GPAT1-myc tend à légèrement diminuer non significativement la β -oxydation du palmitate à 6 et 16 mM glucose.

Afin de vérifier si l'augmentation de la répartition des lipides vers l'estérification en réponse à une augmentation de GPAT1 se traduit par une augmentation de la sécrétion d'insuline, celle-ci a été mesurée à la Figure 16.

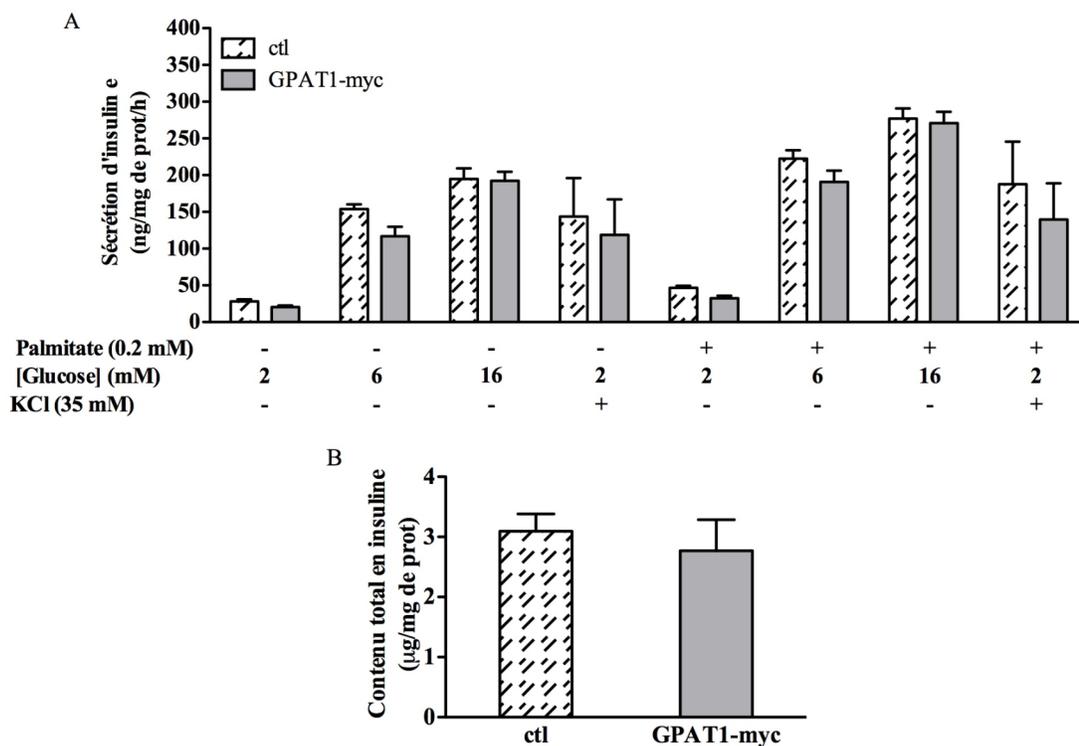


Figure 16. L'expression de GPAT1-myc n'altère pas la sécrétion d'insuline en absence et en présence de palmitate dans les Insr β .

Les cellules ont été traitées comme décrit dans Matériel et méthodes en absence (ctl) et en présence de doxycycline (GPAT1-myc). Les cellules sont ensuite incubées avec des concentrations croissantes de glucose dans du KRBH contenant 0.5 % BSA en absence ou en présence de 0.2 mM palmitate. La concentration d'insuline est déterminée par dosage radio immunologique. Sécrétion d'insuline (A) et contenu total en insuline (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (n=9).

Une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose est observée dans la situation contrôle de 5.5 et 6.9 fois de 2 à 6 et de 2 à 16 mM glucose respectivement. La sécrétion d'insuline stimulée par une concentration dépolarisante de KCl est similaire dans les deux populations de cellules. Le glucose augmente la sécrétion d'insuline autant dans la situation contrôle que lorsque GPAT1-myc est surexprimée.

L'expression de GPAT1-myc n'a pas modifié de façon significative la sécrétion d'insuline, à toutes les concentrations de glucose utilisées. Le contenu total en insuline est similaire dans les deux groupes de cellules. Les résultats présentés ici ne sont pas en faveur d'un effet de l'estérification des acides gras, tout au moins via la voie impliquant GPAT1, dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et la potentialisation de la sécrétion par les acide gras, contrairement à ce qui a été proposé dans notre hypothèse.

Nous devons souligner qu'aucune toxicité n'a été observée (données non présentée, estimation de la viabilité par coloration au bleu trypan) mais l'infection pourrait avoir altéré le métabolisme cellulaire. En effet, nous avons observé que l'utilisation de vecteurs viraux tels que les adénovirus peuvent perturber substantiellement le métabolisme des lipides des cellules (Przybytkowski *et al.* 2007) et peuvent mener à des artéfacts sur le métabolisme si ceux-ci sont en présence des cellules pendant 16 h (Guay *et al.* 2011, étude à soumettre).

Dans l'étude réalisée ici, la période d'exposition des cellules aux adénovirus est de seulement 4 h, ce qui n'a pas affecté la sécrétion d'insuline induite par le glucose. En effet, nous avons comparé la sécrétion d'insuline dans des cellules avec et sans infection. Afin de vérifier l'intégrité de la voie classique de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, des expériences d'oxydation du glucose ont été réalisées.

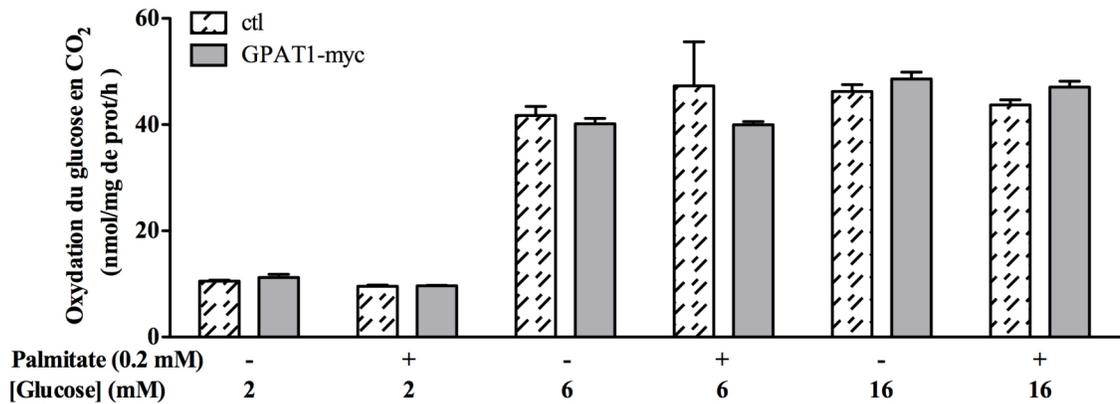


Figure 17. L'oxydation du glucose n'est pas altérée par l'expression de GPAT1-myc dans les Insr β .

Les cellules ont été traitées comme décrit dans Matériel et méthodes en absence (ctl) et en présence de doxycycline (GPAT1-myc). Les cellules sont ensuite incubées avec 0.2 μ Ci/mL D-[U- 14 C]glucose et des concentrations croissantes de glucose dans du KRBH contenant 0.5 % BSA en absence et en présence de 0.2 mM palmitate. Le 14 CO $_2$ est quantifié par scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (n=6).

L'oxydation du glucose augmente de 4 et 4.4 fois de 2 à 6 et de 2 à 16 mM glucose dans la situation contrôle ; de 3.7 et 4.3 fois de 2 à 6 et de 2 à 16 mM glucose en présence de GPAT1-myc. L'oxydation du glucose est similaire dans les deux conditions. D'un autre côté, la présence de palmitate ne change pas le taux d'oxydation du glucose, ce qui est en accord avec l'absence de cycle de Randle dans la cellule β (Segall *et al.* 1999). L'expression de GPAT1-myc n'a pas modifié l'oxydation du glucose aux différentes concentrations de glucose étudiées. La voie classique de la sécrétion d'insuline faisant appel au Ca $^{2+}$ ne semble pas avoir été altérée par la surexpression de GPAT1-myc, car la sécrétion en réponse au glucose et au KCl élevé n'a pas été modifiée.

Il est connu que la lipolyse est active dans la cellule β et celle-ci a été impliquée dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans des études concernant la signalisation par les lipides (Masiello *et al.* 2002 ; Mulder *et al.* 2004 ; Peyot *et al.* 2004). Dans le laboratoire, la lipolyse est estimée d'après la quantité de glycérol libéré dans le milieu

extracellulaire. Les milieux réactionnels des expériences de sécrétion d'insuline ont donc aussi été utilisés pour mesurer la libération du glycérol.

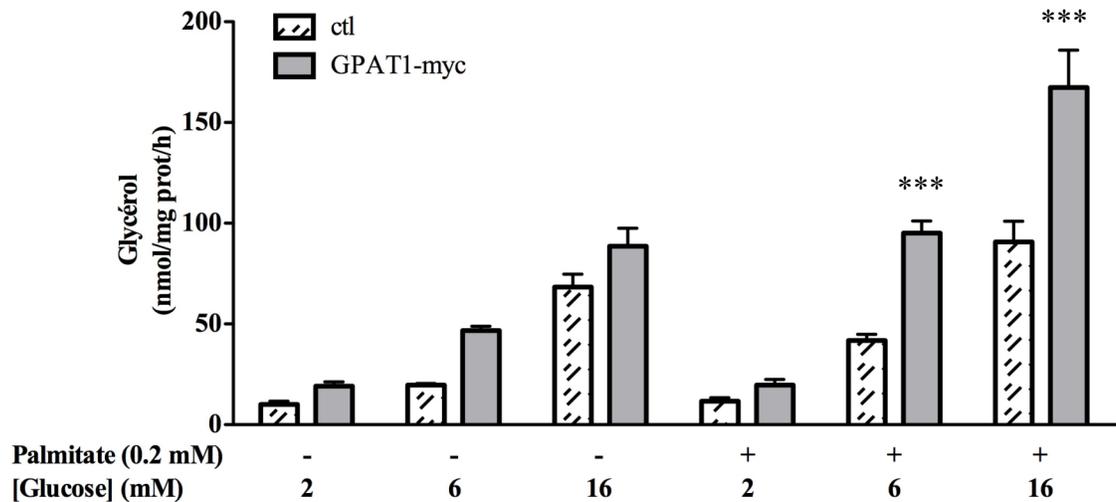


Figure 18. La libération du glycérol est augmentée par la surexpression de GPAT1-myc. Les cellules ont été traitées comme décrit dans Matériel et méthodes. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose dans du KRBH contenant 0.5 % BSA en absence et en présence 0.2 mM de palmitate. La concentration de glycérol libéré est déterminée par le dosage enzymatique décrit dans Matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata ($n=9$). *** $p<0.001$

À la Figure 18, la lipolyse est augmentée en fonction de la concentration de glucose. Dans la situation contrôle, la présence de palmitate augmente de 1.1, 2.1 et 1.3 fois la lipolyse à 2, 6 et 16 mM glucose respectivement. Dans les conditions où GPAT1-myc est surexprimée, la lipolyse est davantage augmentée par rapport à la situation contrôle.

Des travaux réalisés par notre laboratoire auxquels j'ai participé (Nolan *et al.* 2006 ; Roduit *et al.* 2004) ont suggéré que les mécanismes de la compensation de la cellule β lors de la résistance à l'insuline impliquaient une augmentation de l'estérification des lipides et de la lipolyse et donc du cycle TG/acide gras. Ceci particulièrement dans le contexte de la coexistence fréquente d'une concentration plasmatique d'acides gras élevée

(Nolan *et al.* 2006). Dans cette étude, les rats Zucker lean (ZL) et Zucker fatty (ZF) sont utilisés pour décrire les mécanismes de signalisation par les lipides lors de la lipolyse impliqués dans la sécrétion d'insuline. Le rat ZF est déficient génétiquement pour le récepteur à leptine avec comme conséquence de générer une hyperphagie, l'obésité, l'hyperlipidémie et une résistance à l'insuline sans toutefois développer un diabète. En effet, les cellules β du rat ZF compensent pleinement pour la résistance à l'insuline. Il est observé dans les îlots de ce modèle de rat hyperinsulinémique, une augmentation de l'incorporation du [1- 14 C]palmitate en DAG, en TG, en PL et en palmitate non-estérifié intracellulaire ainsi qu'une augmentation de la lipolyse telle que démontré dans la Figure 19. Ces résultats nous ont permis de conclure qu'un cycle TG/acides gras libres (voir Fig. 7) est présent et fortement augmenté dans les îlots de rats ZF, en comparaison aux îlots de rats contrôle. Ce cycle pourrait être impliqué dans la compensation de la cellule β face à la résistance à l'insuline.

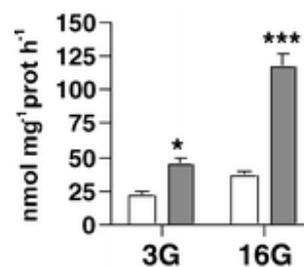


Figure 19. La lipolyse induite par le glucose est augmentée dans les îlots des rats ZF. Les îlots isolés des rats contrôle ZL (barre claire) et des rats ZF (barre grise) sont incubés avec 3 (3G) ou 16 mM (16G) glucose. La libération du glycérol est mesurée comme reflet de la lipolyse. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES pour $n=10$ constitués des mesures pour 10 rats dans 5 expériences indépendantes ; * $p<0.05$ et *** $p<0.001$ (tirée de Nolan *et al.* Diabetologia 2006 49 :2120-2130 Figure 4a).

À la Figure 19, la lipolyse est augmentée de 65 % dans les îlots de rats ZL de bas à haut glucose comparativement à 161 % pour les rats ZF. À haut glucose, la lipolyse est 3.2 fois plus élevée dans les îlots des rats ZF. Dans la même étude, l'activité des enzymes NCEH et TGL (de l'anglais neutral cholesterol hydrolase et triglycéride lipase, respectivement) est augmentée (Nolan *et al.* 2006).

Afin de vérifier si la lipolyse joue un rôle dans la sécrétion d'insuline en présence d'acides gras lors de la compensation des ZF, la lipolyse a été diminuée par l'orlistat, un inhibiteur pan-lipases (Pommier *et al.* 1995). L'orlistat se lie au site catalytique des lipases et bloque ainsi l'accès du substrat au site actif. Il a été démontré que l'inhibition de la lipolyse par l'orlistat dans les îlots normaux diminuait la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Dans le contexte où les concentrations plasmatiques d'acides gras sont élevées conjointement à la résistance à l'insuline, la lipolyse est impliquée dans la compensation par la cellule β . À la figure suivante, la lipolyse est inhibée par l'orlistat dans des îlots de rats ZF.

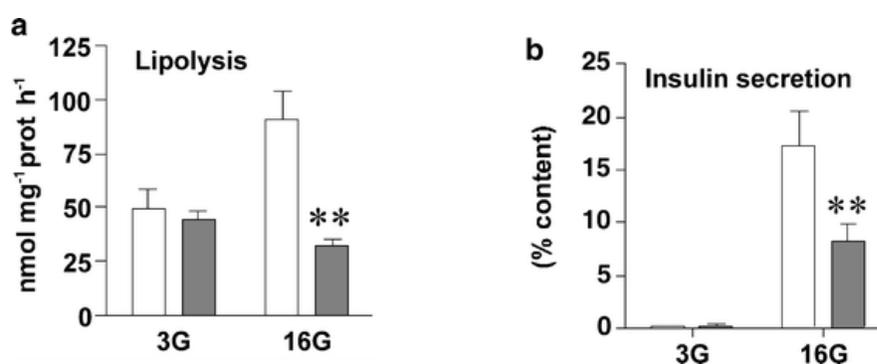


Figure 20. L'inhibition de la lipolyse dans les îlots pancréatiques isolés de rats ZF est accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de palmitate.

La lipolyse (a) et la sécrétion d'insuline (b) ont été mesurées après l'exposition d'îlots de rats ZF à 3 (3G) et 16 mM (16G) glucose et 0.25 mM palmitate en absence (barre claire) ou en présence de 0.2 mM orlistat (barre grise). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 4 rats. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 8 rats. ** $p < 0.01$ (tirée de Nolan *et al.* Diabetologia 2006 49 :2120-2130 Figure 5)

À la Figure 20, la lipolyse est induite par le glucose et l'orlistat en abolit l'induction. L'inhibition de la lipolyse par l'orlistat est accompagnée par une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Dans le modèle de rat ZF utilisé, l'augmentation de la lipolyse et de l'estérification ont été associés à une augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence d'acides gras.

Cependant, contrairement à la situation des îlots ZF et nos attentes, l'augmentation de l'estérification *de novo* du palmitate en lipides complexes par la surexpression de

l'isoforme mitochondrial GPAT1-myc ne semble pas avoir altéré la production de lipides signalétiques impliqués dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline.

Pourtant, l'adénovirus utilisé pour la transfection du système Tet-ON exprimant la protéine de fusion GPAT1-myc a changé le métabolisme lipidique en augmentant l'estérification du palmitate dans les INS 832/13. L'utilisation des adénovirus dans notre protocole expérimental n'a pas causé de toxicité et les changements que nous avons observés au niveau du métabolisme ne sont pas dû à la toxicité. Mais contrairement à nos attentes, la surexpression de GPAT1-myc n'a pas augmenté la sécrétion d'insuline.

Conséquence de la surexpression de l'isoforme GPAT3 et de l'augmentation de l'estérification des lipides dans les INS 832/13 sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation de l'estérification du palmitate par la surexpression de la protéine de fusion GPAT1-myc localisée sur la mitochondrie n'a pas modifié la sécrétion d'insuline induite par le glucose et le palmitate. L'estérification des acides gras et la génération d'intermédiaires lipidiques au niveau mitochondrial ne semblent donc pas importantes pour expliquer l'effet amplificateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline. Puisque l'isoforme mitochondrial GPAT1 n'est pas impliqué de façon significative dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras, nous avons émis l'hypothèse que peut-être que d'autres isoformes de GPAT, situées sur le réticulum endoplasmique, pourraient être importantes dans la sécrétion d'insuline.

En 2006, le premier isoforme de GPAT situé sur le réticulum endoplasmique a été cloné par la compagnie Wyeth Research (Cao *et al.* 2006). L'ADNc de GPAT3 a été obtenu d'ATCC et nous avons construit une protéine de fusion avec un épitope HA. La protéine GPAT3 a été clonée en fusion avec un épitope HA à l'extrémité C-terminale et inséré dans le vecteur d'expression pcDNA3.1 sous le contrôle d'un promoteur CMV. L'épitope HA est utilisé pour mesurer l'expression de la protéine de fusion étant donné

l'absence d'anticorps spécifique contre GPAT3. La construction a été caractérisée par séquençage (données non présentées) et l'expression de la protéine GPAT3-HA a été mesurée après différents temps post-transfection (Figure 21). La situation contrôle est des cellules transfectées avec un plasmide exprimant le gène de la Renilla luciférase (pcDNA3.1-Luc).

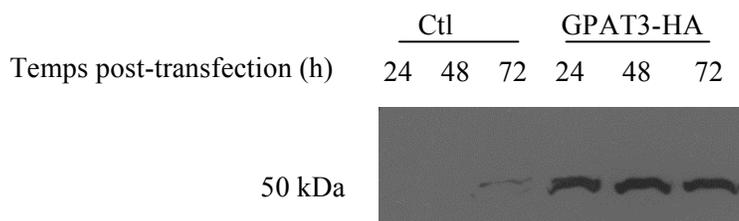


Figure 21. Expression de la protéine de fusion GPAT3-HA dans les cellules INS 832/13. Les cellules sont transfectées avec le plasmide contrôle *pcDNA3.1-Luc* (Ctl) ou avec le *pcDNA3.1-GPAT3-HA* (GPAT3-HA) et sont alors cultivées pendant 24 à 72 h dans du RPMI complet à 11 mM glucose. Dix μg d'extraits protéiques totaux sont soumis à une analyse par buvardage de Western avec un anticorps contre l'épitope HA.

À la Figure 21, dans la condition où GPAT3-HA est exprimée, nous observons une bande à 50 kDa qui correspond au poids attendu de la protéine GPAT3 combiné avec celui de l'épitope HA. Nous distinguons une faible bande dans la situation contrôle à 72 h parce qu'il y a eu une fuite du puits de droite au moment de déposer l'échantillon.

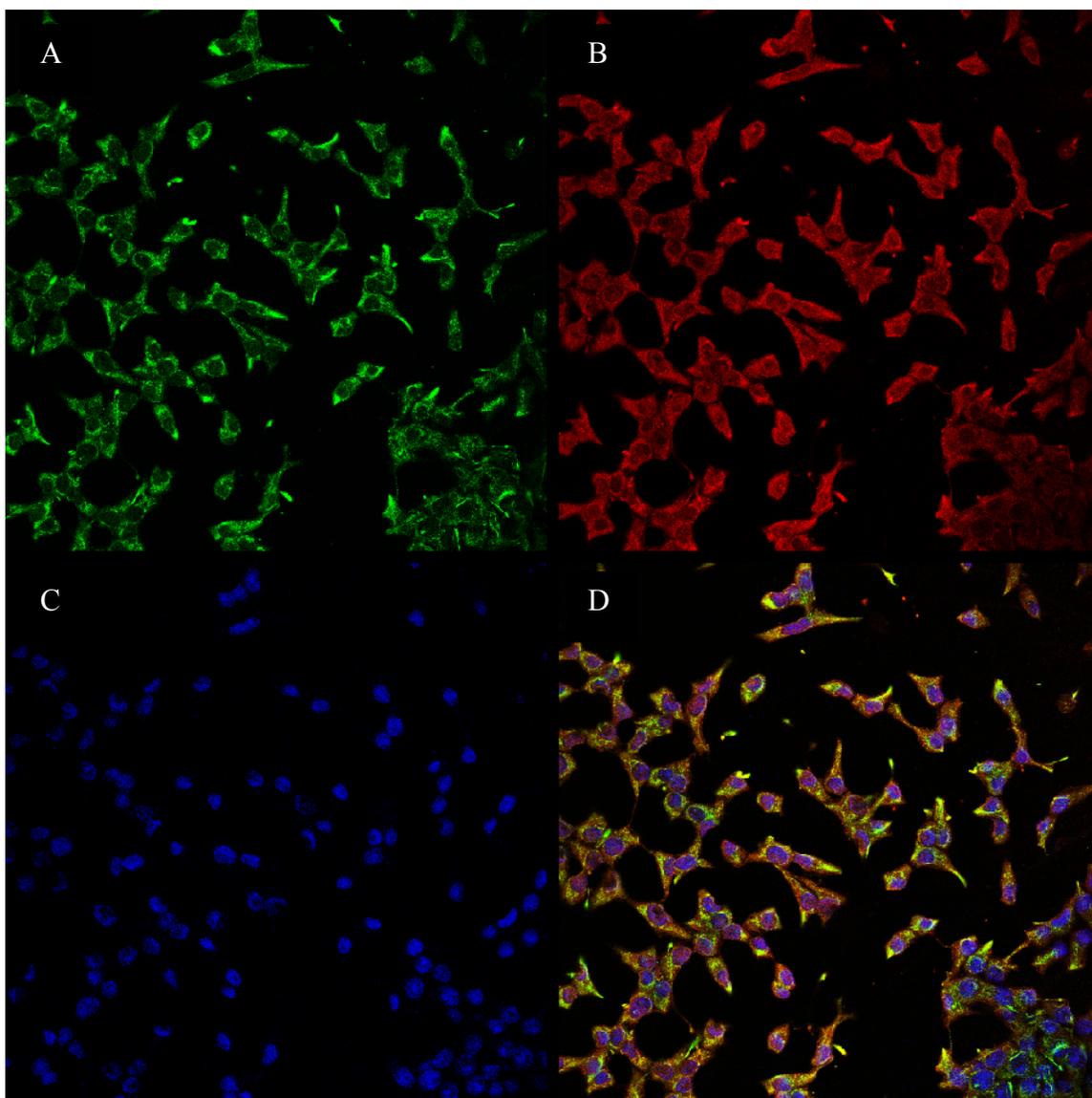


Figure 22. La protéine de fusion GPAT3-HA colocalise avec les réticulum endoplasmiques.

Les cellules INS 832/13 sont transfectées avec 5 µg du plasmide pcDNA3.1-GPAT3-HA. Les cellules sont fixées, perméabilisées et colorées comme décrit dans la section Matériel et méthodes. GPAT3-HA en vert (A), le réticulum endoplasmique en rouge (B). Les noyaux sont visualisés par une coloration de contraste DAPI (bleue) (C et D). La coloration jaune représente la colocalisation de l'épitope HA le marqueur du réticulum endoplasmique (D). Objectif 63X et zoom 1.

Nous n'avons pas observé de détection de signal en absence de l'anticorps primaire. Nous pouvons noter l'absence de signal dans le cytoplasme montrant que l'expression de GPAT3-HA ne déborde pas dans le cytoplasme dans les conditions expérimentales utilisées.

Nous pouvons observer une efficacité de transfection de près de 100 % avec pcDNA3.1-GPAT3-HA. En comparaison à la Figure 13, qui a été réalisée avec la transfection de pcDNA3.1-GPAT1-myc, nous observons à la Figure 22 une excellente efficacité de transfection due à la petite taille du plasmide de pcDNA3.1-GPAT3-HA. Le protocole de nucléofection développé dans le laboratoire nécessite que la quantité d'ADN soit gardée constante à 5 µg. En effet, l'insert étant plus court, le ratio ADN/cellule est plus grand.

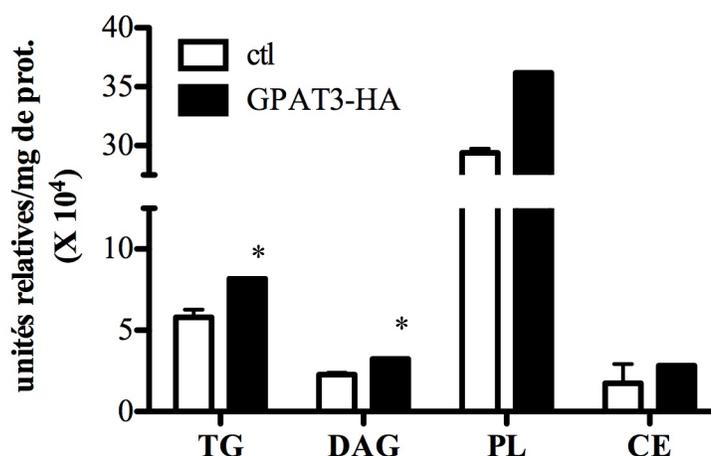


Figure 23. La surexpression de GPAT3-HA augmente les niveaux de DAG et de TG dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont transfectées avec les plasmides pcDNA3.1-Luc (ctl) ou pcDNA3.1-GPAT3-HA (GPAT3-HA) puis cultivées et traitées, comme décrit dans Matériels et méthodes en présence de 0.1 µCi/ml [1-¹⁴C]palmitate pendant 24 h. L'incorporation du ¹⁴C a été déterminée à l'équilibre. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ES de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata (n=6). *P<0.05 vs ctl

À la Figure 23, nous avons vérifié l'efficacité de l'outil moléculaire GPAT3-HA pour augmenter l'estérification du palmitate dans les INS 832/13. Nous avons observé, dans des expériences d'estérification réalisées avec le traceur incubé à l'équilibre, une augmentation de l'incorporation du traceur de 1.4, 1.4 et 1.2 fois dans les classes de lipides TG, DAG et PL respectivement.

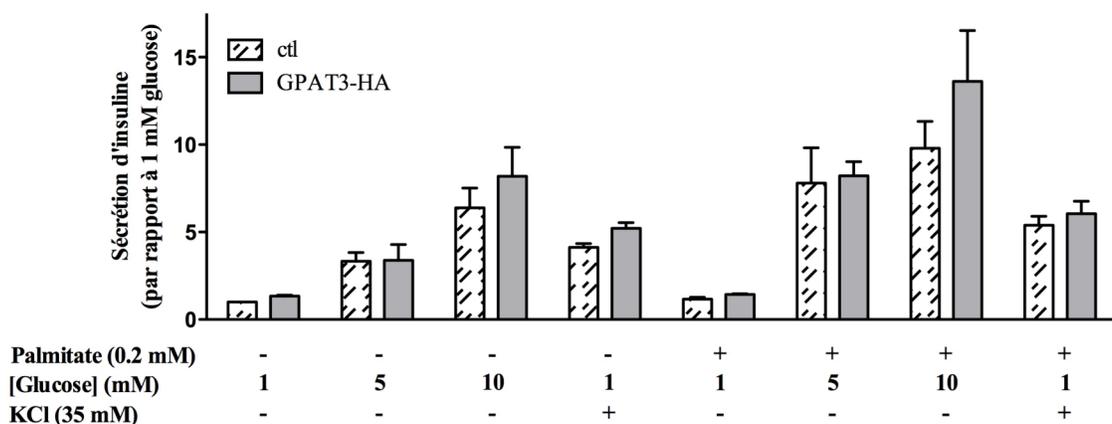


Figure 24. La surexpression de GPAT3-HA ne modifie pas significativement la sécrétion d'insuline induite par le glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont cultivées et traitées comme décrit dans Matériel et méthodes avec pcDNA3.1-Luc (ctl) ou pcDNA3.1-GPAT3-HA (GPAT3-HA) et incubées avec des concentrations croissantes de glucose dans du KRBH supplémenté 0.5 % BSA en absence et en présence de 0.2 mM palmitate. La concentration d'insuline est déterminée par dosage radio immunologique. Sécrétion d'insuline (A) et contenu total en insuline (B). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm ES de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicata (n=12).

À la Figure 24, dans la situation contrôle transfectée avec le plasmide pcDNA3.1-Luc, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est augmentée de 3.3 et 6.4 fois à 5 et 10 mM glucose comparativement à 1 mM, respectivement. Dans la condition de surexpression de GPAT3-HA, la sécrétion d'insuline induite par le glucose est augmentée de 2.6 et 6.2 fois à 5 et 10 mM glucose comparativement à 1 mM, respectivement. La surexpression de GPAT3-HA n'a pas augmenté significativement la sécrétion d'insuline induite par le glucose, même en présence de palmitate.

Inhibition de l'expression de GPAT1 par les siRNA

Les résultats présentés dans la section précédente ont montré que la surexpression de GPAT1-myc n'affecte pas la sécrétion d'insuline. Ceci ne signifie pas nécessairement que cette dernière n'est pas impliquée dans la sécrétion d'insuline induite par les nutriments. En effet, peut être que le niveau d'expression endogène de GPAT1 est suffisant pour générer des molécules signalétiques lipidiques et qu'une surexpression est superflue. Une surexpression de GPAT1 pourrait par exemple augmenter la production de glycérolipides tels le DAG dans des gouttelettes lipidiques ou un compartiment cellulaires non liés à la transduction de signaux. Le développement des technologies de transfection conjointement à l'évolution des connaissances des ARN interférents (ARNi) nous ont alors permis de diminuer l'expression de l'isoforme de GPAT1 dans les INS 832/13. Dans un premier temps, les duplexes d'ARNi contre GPAT1 ont été obtenus de la compagnie IDT. Ces duplexes ont effectivement diminué l'expression de l'ARNm de GPAT1 (données non présentées). Des concentrations de 400 et 800 nM de deux des trois duplexes testés ont réduit de 70 % l'expression de l'ARNm de GPAT1 48 h après la transfection.

Nous n'avions pas d'anticorps nous permettant de mesurer la diminution de l'expression de la protéine GPAT1. Cependant, lors d'expériences d'estérification du palmitate, des résultats préliminaires réduisant l'estérification par la présence de ARNi n'ont pu être reproduits. En effet, des problèmes de stabilité et de variation entre les lots produits par IDT nous ont conduit à utiliser les duplexes d'une autre compagnie, soit Ambion.

Trois duplexes d'ARNi contre GPAT1 ont été étudié pour leur efficacité potentielle à réduire cet enzyme. Différentes concentrations des duplexes d'ARNi, à différents temps après la transfection ont été testés (Figure 25). Bien que l'actine soit généralement utilisée comme contrôle pour normaliser les niveaux d'ARNm, nous avons utilisé la cyclophiline. En effet, lors d'une analyse de profilage génétique des cellules INS 832/13 soumises à des conditions glucolipotoxique les niveaux d'ARNm étaient perturbés en faisant un mauvais gène de contrôle.

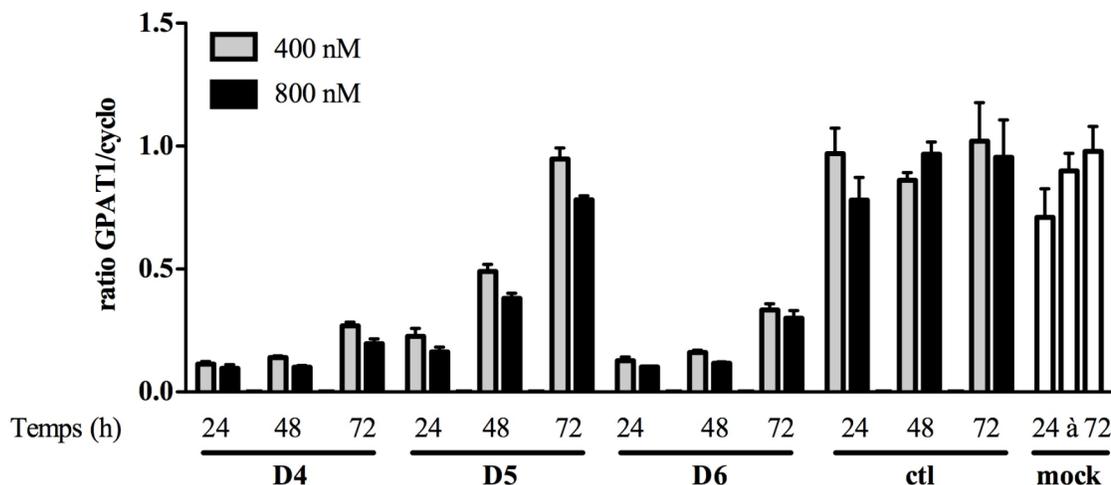


Figure 25. Sélection des duplexes d'ARNi pour l'inhibition de l'expression de GPAT1 dans les cellules INS 832/13.

Les cellules ont été transfectées avec un total de 5 µg d'acides nucléiques constitué de pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 400 ou 800 nM de duplexe de siRNA contre GPAT1. Des siRNA ne reconnaissant aucune séquence connue ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 24 à 72 h dans du RPMI complet à 11 mM glucose. L'ARNm est préparé avec la trousse RNeasy (Qiagen) et l'ADNc est préparé par une réaction RT. Les niveaux relatifs de l'ARNm de GPAT1 sont déterminés relativement à ceux de la cyclophiline par PCR quantitatif en temps réel. Les résultats sont exprimés en moyennes ± ES de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata (n=4).

Nous avons mesuré une diminution du niveau de l'ARNm GPAT1 de 90 % après 24 h de la transfection des duplexes d'ARNi D4 et D6. Des réductions de 70 à 90 % de l'expression de GPAT1 sont observées avec les 2 concentrations utilisées pour les duplexes D4 et D6. Dans le cas du duplexe D5, l'effet sur l'inhibition de l'expression de GPAT1 est clairement dépendante du temps après la transfection et des effets inhibiteurs de 80, 50 et 10 % sont constatés à 24, 48 et 72 h. Nous avons aussi observé une diminution dose-dépendante de l'expression d'environ 25 % avec 400 à 800 nM de siRNA, particulièrement dans le cas du duplexe D4.

À la Figure 26, nous avons vérifié si la sécrétion d'insuline induite par le glucose était changée suite à la diminution de l'ARNm de GPAT1 dans les cellules INS 832/13. Nous avons choisi d'utiliser les duplexes D4 et D6 pour la stabilité de la diminution de l'ARNm observée pendant 72 h de culture post-transfection.

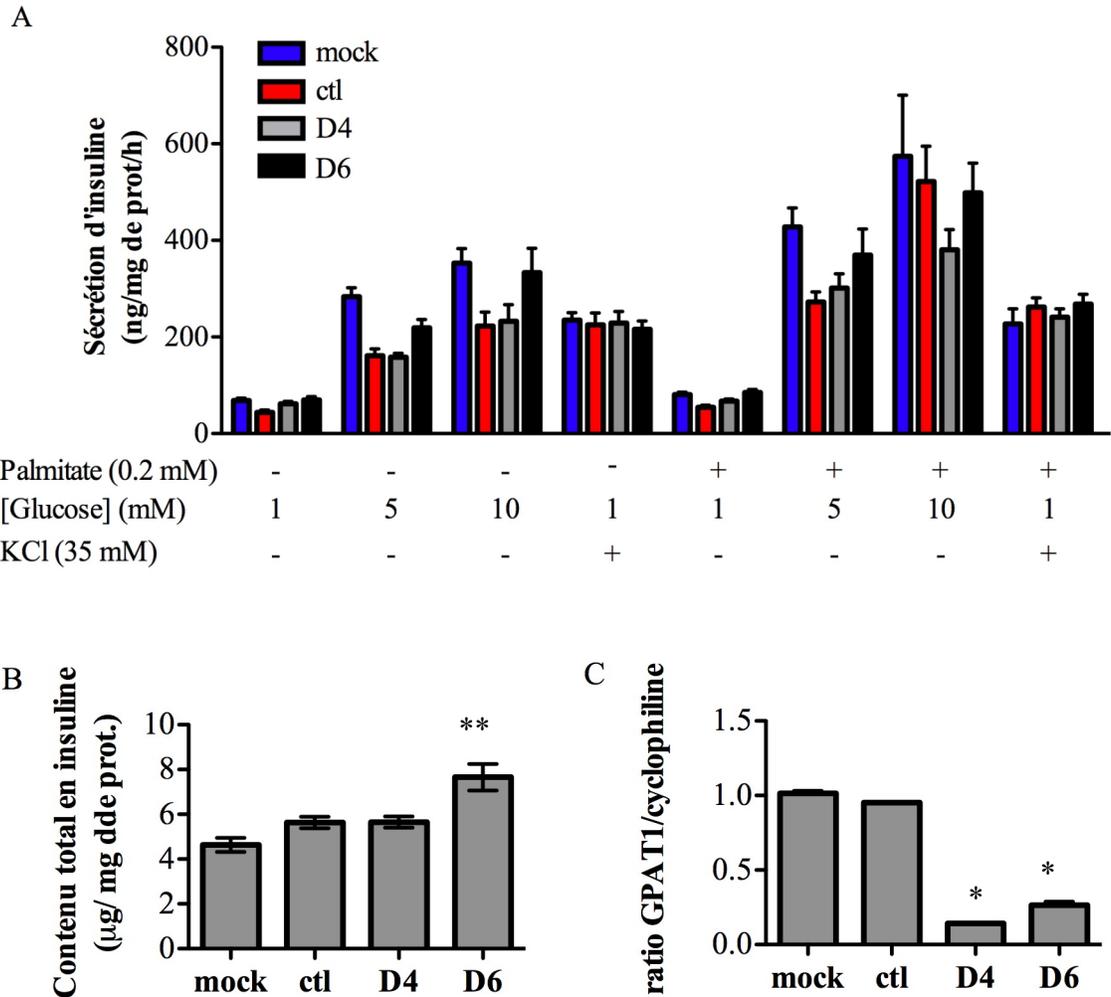


Figure 26. Effet de l'inhibition de l'expression de GPAT1 par des siRNA sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont transfectées avec le vecteur pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 800 nM de siRNA contre GPAT1 (D4 et D6) ou d'un siRNA contrôle (ctl) et traitées comme décrit dans Matériel et méthodes. Sécrétion d'insuline (A), contenu total en insuline (B) et les niveaux d'ARNm de GPAT1 (C), ** $P < 0.05$ vs ctl, * $P < 0.01$ vs ctl. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata ($n=9$).

À la Figure 26, tel qu'attendu, des concentrations croissantes de glucose induisent la sécrétion d'insuline. La présence de palmitate potentialise la sécrétion d'insuline à des concentrations de glucose intermédiaire et élevé. La transfection d'un siRNA contrôle

comparativement au plasmide pBluescript seul (mock) a entraîné une légère diminution de la sécrétion d'insuline. Cette diminution n'est pas associée à une diminution de l'expression de GPAT1 (Fig. 26C). Cela suggère que l'activation du processus naturel d'ARNi peut influencer en partie la sécrétion d'insuline même en absence apparente d'un effet sur l'expression d'un gène. Nous avons aussi observé que le contenu total en insuline est légèrement augmenté dans la condition où le duplexe D6 est utilisé. Malgré les contenus totaux en insuline légèrement différents, la sécrétion d'insuline induite par le KCl est similaire dans toutes les situations.

L'ARNm de GPAT1 est réduit de 86 et 74 % par les duplexes D4 et D6 respectivement alors que le plasmide pBluescript seul et le duplexe d'ARNi contrôle négatif n'ont pas affecté le niveau d'ARNm de GPAT1. Malgré une réduction efficace du niveau d'ARNm de GPAT1, nous ne pouvons pas l'associer à une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et au palmitate quoique le plus efficace des siRNA contre GPAT1 (D4) montre une diminution non significative de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de palmitate.

Pour déterminer si l'inhibition de l'expression de GPAT1 par les siRNA a influencé le métabolisme des lipides, des expériences d'estérification du [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate en lysophosphatidate (LPA) ont été réalisées dans les cellules INS 832/13 transfectées avec les duplexes D4 et D6. À la Figure 27, l'incorporation du palmitate en LPA est induite par des concentrations croissantes de glucose. Différentes concentrations de duplexes ainsi que différents temps post-transfection ont été utilisés.

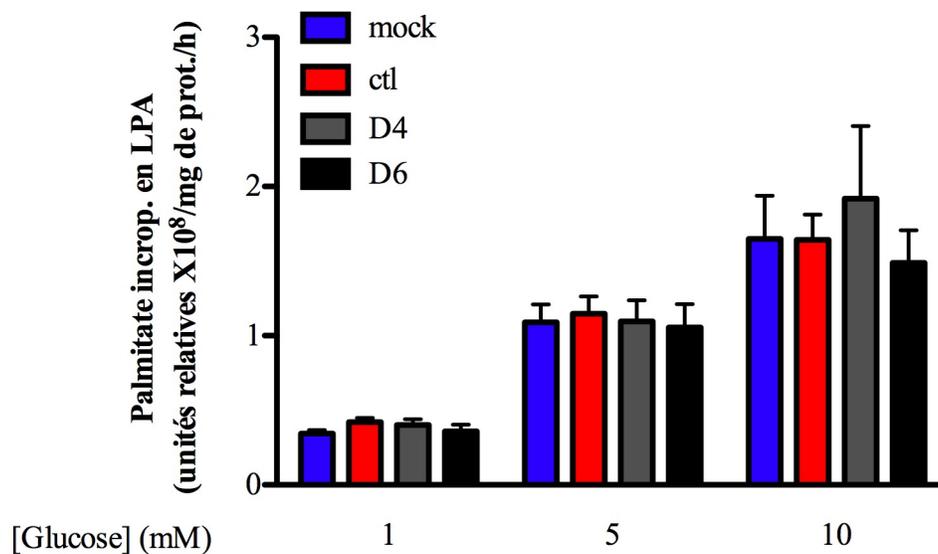


Figure 27. L'inhibition de l'expression de GPAT1 par des siRNA n'a pas diminué l'estérification du palmitate en LPA dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont transfectées avec le vecteur pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 400 nM de siRNA contre GPAT1 (D4 et D6) ou d'un siRNA contrôle (ctl) et traitées comme décrit dans Matériel et méthodes. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate, 0.2 μ Ci/mL [14 C]palmitate, 0.5 % BSA et 1 mM L-carnitine. L'incorporation du [14 C]palmitate en LPA est quantifiée par scintillation liquide. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata (n=4).

À la Figure 27, contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé de diminution significative de l'incorporation du palmitate en LPA lorsque les siRNA contre GPAT1 sont utilisés. Il est possible que malgré une réduction de 74-86 % de l'ARNm de GPAT1 par le traitement avec les siRNA (Fig. 26C), la protéine elle-même ne soit pas diminuée. En effet, il est généralement admis que les protéines impliquées dans le métabolisme ont des demi-vies relativement longues en comparaison aux protéines d'une voie de signalisation. Une deuxième explication peut être avancé si nous considérons qu'il existe plusieurs isoformes de l'enzyme GPAT dans les cellules. Ainsi, il est possible que par un phénomène de compensation, les niveaux de LPA puissent se maintenir grâce à la redondance des autres GPAT. La diminution de l'expression d'un des isoforme n'altère pas nécessairement les niveaux de LPA ou même ceux de DAG et TG.

Inhibition simultanée de l'expression de GPAT1 et GPAT4

Le seul isoforme de GPAT situé sur le réticulum endoplasmique a être cloné jusqu'en 2008 était GPAT3. Dans l'intention de diminuer son expression, trois duplexes d'ARNi contre GPAT3 ont été étudié pour leur efficacité à réduire l'ARNm. À la Figure 28, trois duplexes d'ARNi contre GPAT3 utilisés à différentes concentrations ont été testé.

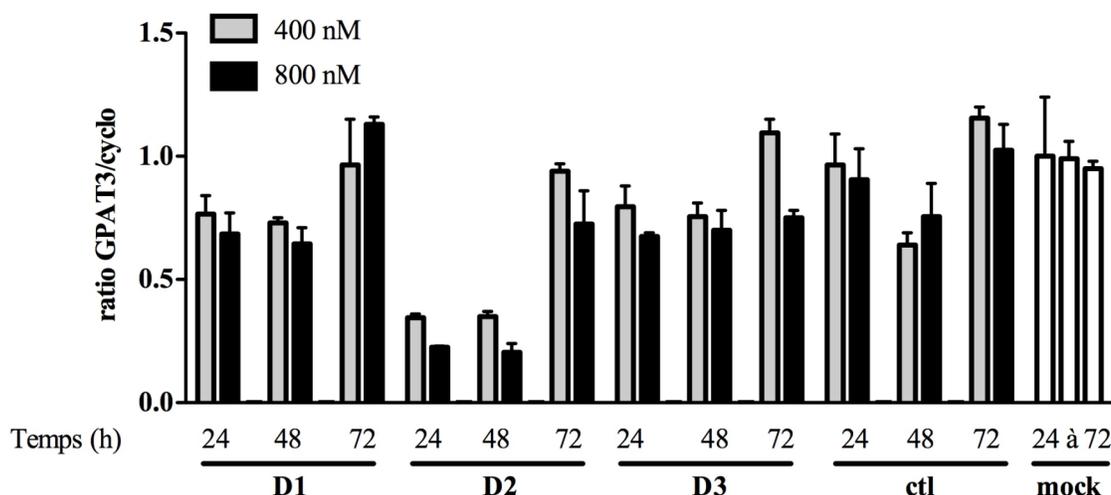


Figure 28. Effet des duplexes d'ARN pour l'inhibition de l'expression de GPAT3 dans les cellules INS 832/13.

Les cellules ont été transfectées avec un total de 5 μ g d'acides nucléiques constitué de pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 400 ou 800 nM de duplexe de siRNA contre GPAT3. Des siRNA ne reconnaissant aucune séquence connue ont été utilisés comme contrôles négatifs. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 24 à 72 h dans du RPMI complet à 11 mM glucose. L'ARNm est préparé avec la trousse RNeasy (Qiagen) et l'ADNc est préparé par une réaction RT. Les niveaux relatifs de l'ARNm de GPAT3 sont déterminés relativement à ceux de la cyclophiline par PCR quantitatif en temps réel. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES d'une expérience réalisée en duplicata ($n=2$).

Lors des expériences de quantification de l'ARNm de l'isoforme de GPAT3 nous avons suspecté que celui-ci était peu exprimé, tel qu'observé par le par les C_T élevés par PCR quantitatif. Nous avons tout de même tenté de diminuer cet isoforme avec des siRNA dans les INS 832/13. Des duplexes de siRNA contre GPAT3 ont été testé à la Figure 28. Seulement le duplexe D2 a réduit l'ARNm de GPAT3 mais cette réduction n'est pas stable dans le temps.

À la lumière des résultats obtenus avec des duplexes d'ARNi contre GPAT1, afin d'altérer la première étape de l'estérification des lipides il tombait sous le sens de réduire les isoformes les plus abondants simultanément. Ce raisonnement est aussi supporté par des expériences préliminaires où nous avons inhibé l'expression de GPAT3, le seul isoforme du réticulum endoplasmique cloné à ce moment en 2008, sans observer de changement sur la sécrétion d'insuline (résultats non montrés).

Suite à l'identification du deuxième isoforme de GPAT situé sur le réticulum endoplasmique (GPAT4) simultanément par les groupes des chercheurs Cao et Coleman (Chen *et al.* 2008 ; Nagle *et al.* 2008), nous avons mesuré les niveaux des différents isoformes de GPAT présents dans les INS 832/13 par PCR quantitative afin de déterminer les isoformes les plus abondants aux niveaux des ARNm.

À la Figure 29, nous pouvons estimer que GPAT3 est l'isoforme le moins exprimé dans les INS 832/13. En comparant les valeurs C_T des GPAT à différentes dilutions d'ADNc, nous pouvons estimer facilement que les niveaux d'ARNm de GPAT3 sont de 30-50 fois moins abondant que GPAT1. L'isoforme GPAT1 est qu'en à lui environ 5-7 fois moins abondant que GPAT4.

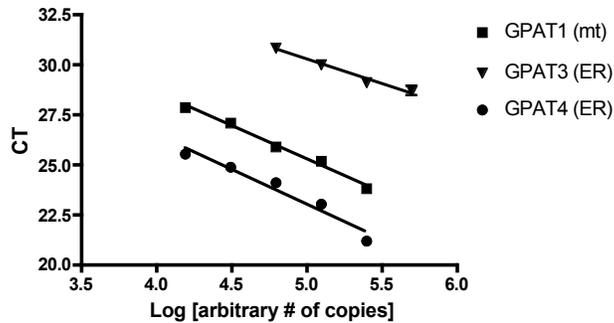


Figure 29. Les isoformes 1 et 4 de GPAT sont les plus exprimés dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont cultivées jusqu'à une confluence de 80 % dans du milieu RPMI complet. L'ARNm est préparé par la trousse de Qiagen et l'ADNc est synthétisé par RT. Les niveaux relatifs d'ADNc des différents isoformes sont évalués par PCR en temps réel et comparés en fonction de leur C_T en utilisant les mêmes dilutions d'ADNc. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES d'une expérience réalisée en duplicata (n=2).

Au niveau de l'ARNm, GPAT4 est donc l'isoforme de GPAT le plus exprimé dans la lignée cellulaire INS 832/13 suivi de GPAT1. L'isoforme GPAT3 est le moins exprimé. Nous avons donc tenté de diminuer conjointement GPAT1 et 4, les deux isoformes les plus exprimés, afin de tester notre hypothèse concernant la signalisation par des molécules lipidiques dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Un changement de la répartition des lipides a été obtenu en utilisant des siRNA contre GPAT1 et 4. L'incorporation du [1- 14 C]palmitate a été mesurée dans les INS 832/13 transfectées avec les duplexes d'ARNi contre GPAT1 et GPAT4 (Fig. 30).

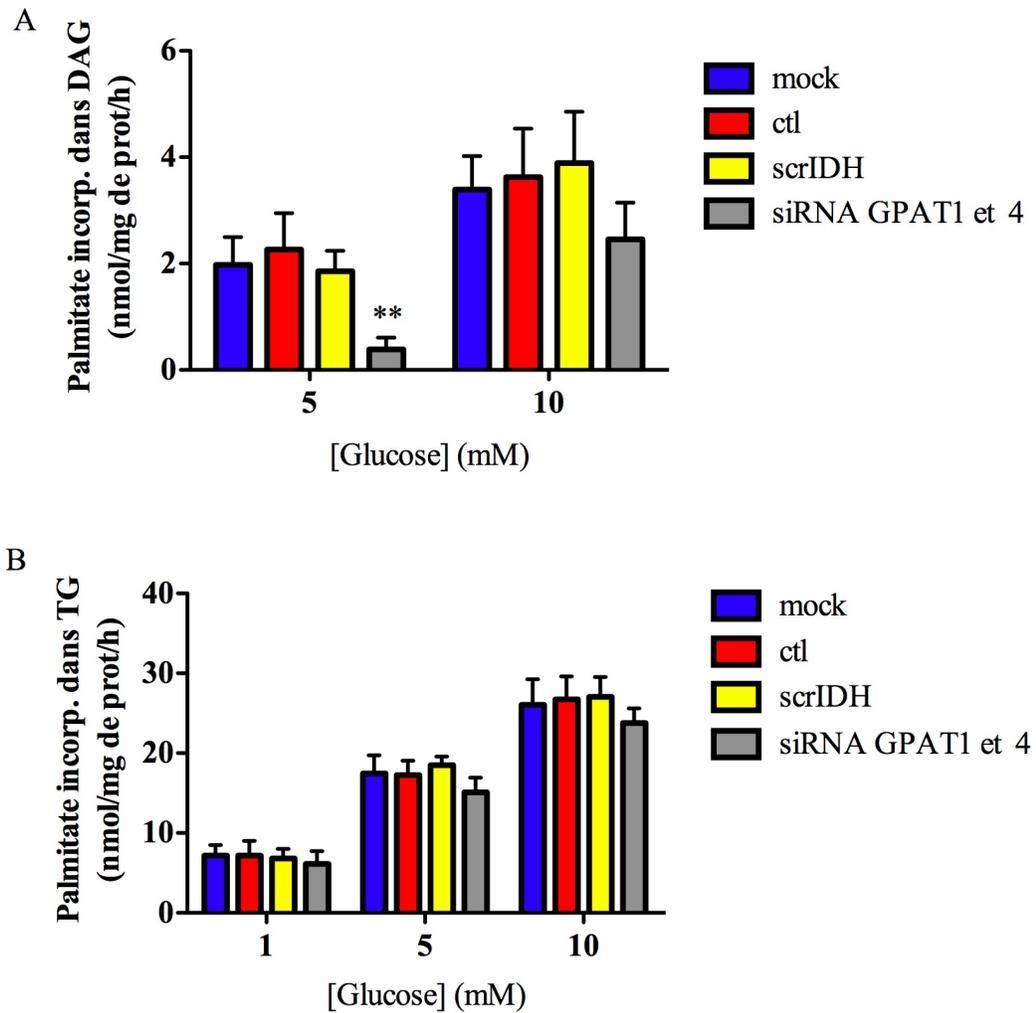


Figure 30. L'estérification du palmitate en DAG est diminuée par l'inhibition de GPAT1 et GPAT4 dans les INS 832/13 à la concentration stimulatrice intermédiaire de 5 mM glucose.

Les cellules sont transfectées avec un total de 5 μg d'acides nucléiques constitué de pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 400 nM total de siRNA contre GPAT1 et 4 (GPATs) ou de 2 différents siRNA contrôle (ctl et scrIDH). Les cellules sont cultivées et traitées comme décrit dans Matériel et méthodes. Les cellules sont incubées avec des concentrations croissantes de glucose en présence de 0.2 mM palmitate, 0.2 $\mu\text{Ci/mL}$ [1- ^{14}C]palmitate, 0.5 % BSA et 1 mM carnitine. L'incorporation du ^{14}C en DAG (A) et en TG (B) est quantifiée avec la technologie Typhoon Trio. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 2 expériences indépendantes réalisées en duplicata (n=4). **P<0.01 vs ctl.

Comme attendu, l'incorporation du [1- ^{14}C]palmitate en DAG et en TG est induite par le glucose dans les situations contrôle. L'inhibition conjointe de l'expression de

GPAT1 et 4 a réduit significativement l'estérification du palmitate en DAG à 5 mM glucose seulement et à 10 mM glucose nous observons une diminution non-significative. Dans les cas des TG, ils sont légèrement diminués (non-significativement) aux deux concentrations de glucose.

À la Figure 31, nous avons ensuite déterminé si la réduction de la répartition vers les lipides complexes était accompagnée d'une réduction de la sécrétion d'insuline induite par le glucose à 5 et 10 mM.

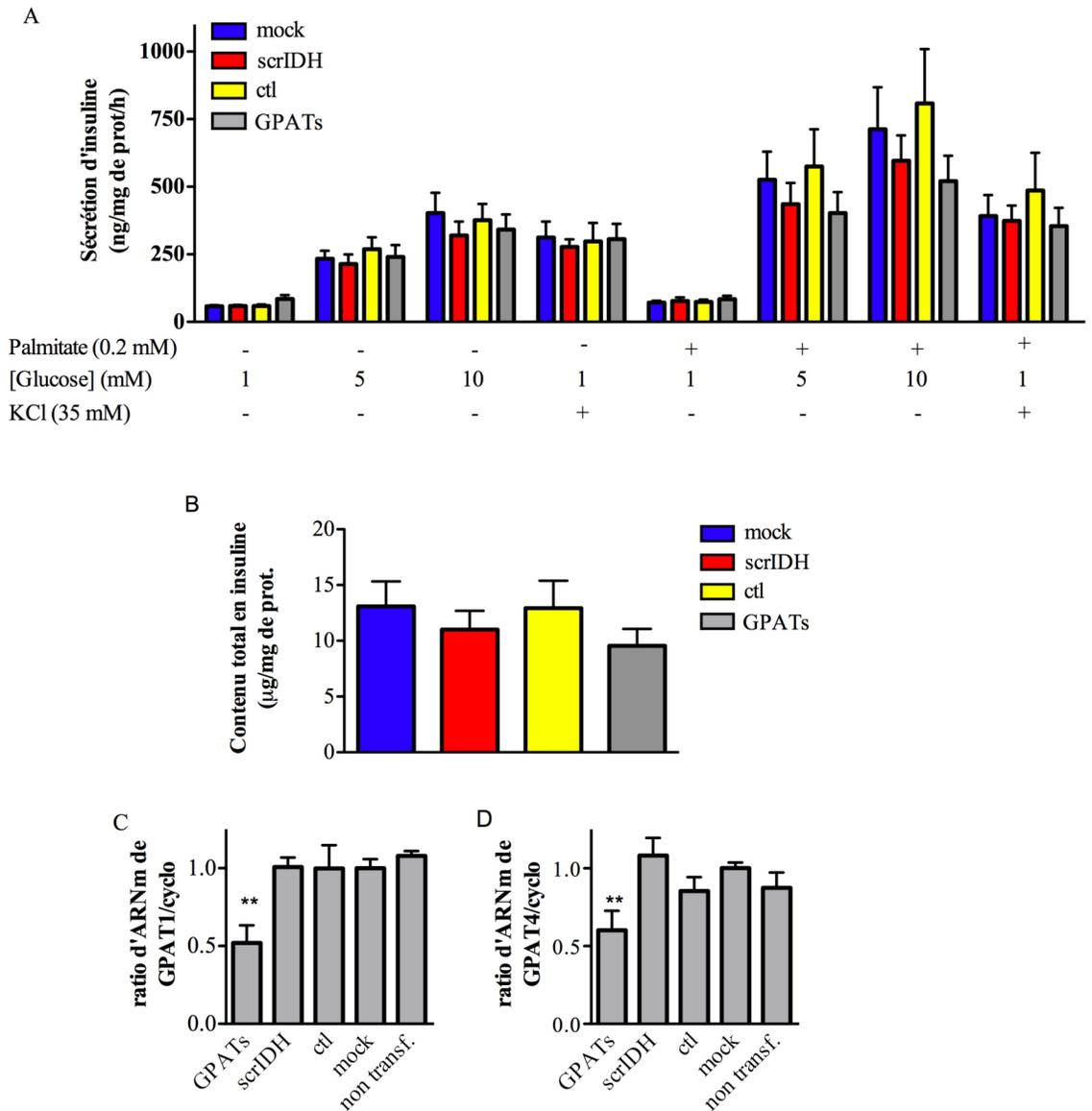


Figure 31. Effet de l'inhibition de l'expression de GPAT1 et de GPAT4 sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose en absence et en présence de palmitate dans les cellules INS 832/13.

Les cellules sont transfectées avec un total de 5 µg d'acides nucléiques constitué de pBluescript seul (mock) ou en combinaison avec 400 nM total de siRNA contre GPAT1 et GPAT4 (GPATs) ou de 2 siRNA contrôles (ctl et scrIDH). Les cellules sont transfectées et traitées comme décrit dans Matériel et méthodes. Sécrétion d'insuline (A), contenu total en insuline (B). Les résultats sont exprimés en moyennes ± ES de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (n=9). Niveaux d'ARNm de GPAT1 et GPAT4 (C et D). Les résultats sont exprimés en moyennes ± ES de 3 expériences indépendantes (n=3). **P<0.01 vs ctl

Le contenu total en insuline n'a pas été modifié significativement par l'inhibition conjointe de l'expression de GPAT1 et 4. Malgré une réduction de l'expression de 50 % des ARNm des deux isoformes, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras n'est pas diminuée .

Ainsi, malgré des efforts considérables, les différentes approches moléculaires utilisées pour augmenter ou diminuer l'expression des différents isoformes de GPAT, soit individuellement ou simultanément, n'ont pas perturbé la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence et en absence de palmitate.

Rôle de GPAT et de l'estérification des acides gras dans la glucolipotoxicité

L'étiologie du diabète de type 2 implique une détérioration progressive de la fonction des cellules β (Kahn 2001 ; Polonsky *et al.* 1996) et une perte de la masse des cellules β pancréatiques (Butler *et al.* 2003). On pense généralement que cette réduction de la masse pourrait être due en partie à l'apoptose des cellules β . En effet, une exposition chronique des cellules β à des concentrations élevées en glucose et acides gras, seuls ou combinés, diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Roduit *et al.* 2004 ; Weir *et al.* 2001) et diminue l'expression du gène de l'insuline (Hagman *et al.* 2005). De plus, dans des modèles cellulaires et de cultures primaires, il a été observé que l'exposition chronique à ces nutriments induit l'apoptose, particulièrement lorsque le glucose et les acides gras sont simultanément élevés (Robertson *et al.* 2004 ; El-Assaad *et al.* 2003 ; Maedler *et al.* 2003 ; Federici *et al.* 2001 ; Piro *et al.* 2002 ; Marshak *et al.* 1999 ; El-Assaad *et al.* 2010).

Une étude de profilage génétique a été réalisée dans notre laboratoire afin d'établir un lien entre les bases biochimiques de la glucolipotoxicité et les altérations de l'expression génique. La glucolipotoxicité a été induite dans les cellules INS 832/13 cultivées à 20 mM glucose et 0.3 mM palmitate pendant 24 h. L'analyse transcriptomique réalisée a permis d'identifier des changements de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, la glycolyse, la biosynthèse des stérols, la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif ainsi que dans l'altération de la sécrétion et la biosynthèse de l'insuline (El-Assaad *et al.* 2010).

Dans cette étude, en association avec les changements au niveau de l'expression des gènes, des changements métaboliques ont aussi été identifiés. Une augmentation des TG intracellulaires ainsi que des céramides a été observée (El-Assaad *et al.* 2010).

Des changements caractéristiques de la dysfonction de la cellule β ont été quantifiés. En effet, lorsque les cellules INS 832/13 sont exposées chroniquement au

glucose et au palmitate, la sécrétion d'insuline basale (à bas glucose) est augmentée alors que celle induite par le glucose est diminuée. De plus, le contenu total en insuline est réduit d'environ 50 %.

Afin d'estimer les effets de la glucolipotoxicité sur le métabolisme mitochondrial, le potentiel membranaire mitochondrial et les niveaux cellulaires d'ATP ont été mesurés. À la Figure 32A, la polarisation de la membrane mitochondriale a été mesurée à l'aide de la Rhodamine 123 (Rh123) de Molecular Probes. L'incubation pendant 10 minutes des cellules à 20 mM de glucose diminue la fluorescence ce qui correspond à une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale. À la Figure 32B, l'incubation des cellules pendant 10 minutes à 20 mM glucose entraîne une augmentation du contenu en ATP. Dans le cas des cellules de la situation contrôle cultivées 24 h à 5 mM, l'incubation pendant 10 minutes avec 20 mM glucose diminue la fluorescence de la Rh123 et augmente le contenu en ATP. L'exposition chronique des cellules à 20 mM glucose pendant 24 h abolit l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale suite à une augmentation du glucose de 2 à 20 mM. Dans cette condition le contenu d'ATP à la concentration basale de glucose est aussi augmenté et il n'est pas augmenté par la présence de 20 mM glucose. L'exposition chronique des cellules au palmitate à bas glucose montre une hyperpolarisation membranaire en réponse au glucose élevé similaire à la situation contrôle où les cellules sont cultivées à 5 mM de glucose, et l'augmentation du contenu en ATP induite par le glucose est aussi normale. Le traitement chronique des cellules avec 20 mM de glucose en présence de 0.3 mM palmitate montre une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et une diminution du contenu en ATP à bas et haut glucose.

Afin d'établir un lien entre la diminution de l'expression d'isoformes de glutathione S-transferase et de glutathione peroxidase identifiés par les études avec puces d'ADN, le stress oxydatif dans les cellules décrites plus haut a aussi été évalué. À la Figure 32C, les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS de l'anglais reactive oxygen species) ont été quantifiés par FACS (de l'anglais fluorescence activated cell sorter) par le décompte du nombre de cellule positives pour un chromophore sensible aux ROS. L'incubation des cellules pendant 24 h avec 5 ou 20 mM de glucose seul n'augmente pas

les ROS. La présence de palmitate à bas glucose augmente le niveau mesuré de ROS, mais c'est en présence de 20 mM glucose et de 0.3 mM palmitate que la plus grande augmentation est observée.

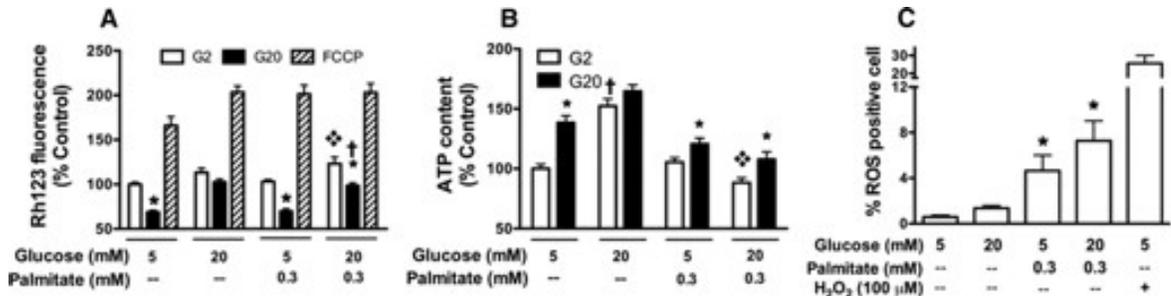


Figure 32. Stress métabolique au cours de l'élévation chronique du glucose en présence de palmitate.

Les cellules INS 832/13 sont cultivées et traitées comme décrit par El-Assaad *et al.* 2010. Brièvement, les cellules sont exposées pendant 24 h aux différentes concentrations de glucose et de palmitate et sont ensuite stimulées avec 2 mM (2G) ou 20 mM (20G) de glucose pour déterminer le potentiel mitochondrial en utilisant la Rhodamine 123 (Rh123) (A) et le contenu en ATP (B). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata ($n=9$). En A, * $P<0.02$ vs G2 pour le même traitement de 24 h, † $P<0.05$ vs G20 du traitement de 24 h à 5 mM glucose ; ♦ $P<0.05$ vs G2 du traitement de 24 h à 5 mM glucose. En B, * $P<0.05$ vs G2 pour le même traitement de 24 h, † $P<0.01$ vs G20 du traitement de 24 h à 5 mM glucose ♦ $P<0.05$ vs G2 cultivée à 5 mM glucose. Les ROS (reactive oxygen species) sont évalués par FACS après incubation des cellules avec le CM-H₂DCFDA (C). Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 4 expériences indépendantes. * $P<0.05$ vs 5 mM glucose. (tirée de El-Assaad *et al.* *Endocrinology* 2010 151 :3061-3073 Fig. 4A-C)

Dans des études précédentes, des agents pharmacologiques altérant la répartition des lipides en faveur de l'oxydation des acides gras prévenaient la glucolipotoxicité de la cellule β . Inversement, l'inhibition de l'oxydation des acides gras en faveur de l'estérification accentuait la glucolipotoxicité (El-Assaad *et al.* 2003).

Ces études pharmacologiques de notre groupe ont suggéré que l'estérification des lipides joue un rôle dans l'induction de la glucolipotoxicité en ce qui a trait à l'apoptose. Ainsi les intermédiaires dérivés des lipides comme le LPA, DAG, TG ont peut-être un rôle à jouer dans l'induction de la glucolipotoxicité. Afin de tester directement cette hypothèse, dans l'étude publiée de El-Assaad *et al.* (2010) j'ai surexprimé l'isoforme GPAT3 dans les

cellules INS 832/13 dans le but de favoriser l'estérification du palmitate en lipides complexes. Nous avons arrêté notre choix sur GPAT3 parce que nous voulions augmenter les intermédiaires lipidiques sur le réticulum endoplasmique, car ce compartiment est le site principal de la biosynthèse des glycérolipides et que le stress du réticulum a été associé au dysfonctionnement de la cellule β lié au diabète de type 2 (Prentki et Nolan 2006), et de plus lors de la réalisation de l'étude l'isoforme GPAT4 n'était pas encore identifié.

La construction pcDNA3.1-GPAT3-HA a été utilisée comme outil moléculaire pour augmenter la répartition de lipides vers l'estérification dans le contexte de la glucolipotoxicité. Comme nous l'avons vu plus tôt, la surexpression de GPAT3-HA dans les INS 832/13 a modifiée la répartition des lipides en augmentant les niveaux de DAG et de TG (Fig. 23).

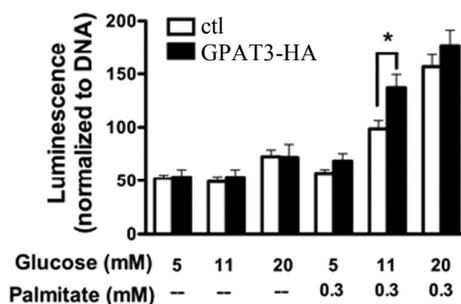


Figure 33. La surexpression de GPAT3-HA augmente la glucolipotoxicité à une concentration intermédiaire de glucose en présence de palmitate.

*Les cellules sont cultivées et traitées comme décrit par El-Assaad et al. 2010. L'activité caspase-3 est déterminée par un essai homogène luminométrique. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm ES de 4 expériences indépendantes réalisées en quadruplicate (n=16). *P<0.05 vs ctl (tirée de El-Assaad et al. Endocrinology 2010 151 :3061-3073 Fig. 5C)*

À la Figure 33, l'apoptose induite par la glucolipotoxicité est évaluée par l'activité caspase-3. L'apoptose a été évaluée à l'aide d'un essai où une augmentation de l'activité caspase se traduit par une augmentation de la luminescence. Les cellules INS 832/13 ont été transfectées avec les plasmides exprimant la luciférase ou GPAT3-HA et ont été traitées chroniquement (24 h) avec des concentrations croissantes de glucose en absence ou

en présence de palmitate. À la Figure 33, dans la situation contrôle où un plasmide de contrôle exprimant la luciférase est utilisé, les concentrations croissantes de glucose n'augmentent pas l'activité caspase-3. La présence de palmitate à bas glucose n'induit pas d'augmentation de la luminescence. Par contre, comme attendu, les concentrations croissantes de glucose en présence de palmitate augmentent l'activité caspase-3.

La surexpression de GPAT3-HA n'a pas augmenté l'activité caspase-3 en présence du glucose seul. Par contre, en présence de palmitate et d'une concentration intermédiaire de 11 mM glucose, nous avons mesuré une augmentation significative de l'activité caspase-3, suggérant un rôle des processus d'estérification dans le phénomène de glucolipotoxicité.

Chapitre IV : Discussion et conclusions

L'apparition du diabète de type 2 est précédée par une période prédiabétique où l'hyperinsulinémie compense pour la résistance des tissus cibles afin de garder une glycémie normale. Dans ce contexte, la cellule β doit inévitablement sécréter davantage d'insuline. La cellule β doit donc « sentir » la demande en insuline de l'organisme et ajuster sa sécrétion en fonction de la résistance. Les mécanismes par lesquels la cellule β augmente sa fonction physiologique ne sont pas bien élucidés.

Dans le contexte de l'obésité, et où la résistance à l'insuline est présente, la concentration plasmatique d'acides gras est généralement élevée. Ceci nous permet de concevoir qu'une présence accrue des acides gras est peut-être associée à l'augmentation de la sécrétion d'insuline pour répondre effectivement à l'augmentation de la résistance des tissus cible.

L'exposition aux acides gras stimule la sécrétion d'insuline induite par le glucose lorsqu'infusé *in vivo* (Madison *et al.* 1968 ; Crespin *et al.* 1973) et dans des expériences *in vitro* (Prentki *et al.* 1992 ; Alcazar *et al.* 1997). Le rôle du métabolisme des acides gras dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline est mis en évidence par exemple par l'utilisation de bromo-palmitate, un dérivé non métabolisable du palmitate, qui ne stimule pas la sécrétion d'insuline *in vitro* (Parker *et al.* 2003). Pareillement, la prévention de l'activation des acides gras en acyl-CoA par l'utilisation de la triacsin C *in vitro* abolit l'effet de potentialisation des acides gras sur la sécrétion d'insuline (Roduit *et al.* 2004).

Le métabolisme des acides gras est tout au moins en partie nécessaire à l'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, cependant ceux-ci stimulent aussi la sécrétion d'insuline par la voie d'un ou plusieurs récepteurs membranaires. En effet, il est maintenant connu que la cellule β exprime un récepteur pour les acides gras, le GPR40, appelé aussi FFAR1 (Briscoe *et al.* 2003 ; Itoh *et al.* 2003 ; Kotarsky *et al.* 2003). Dans l'étude de Itoh et collègues, l'inhibition de l'expression du

GPR40 par siRNA dans la lignée MIN6 a aboli la potentialisation de la sécrétion d'insuline par le palmitate. Cependant, l'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose est très faible dans leur modèle et les d'acides gras sont utilisés en absence d'albumine. Dans une autre étude, la sécrétion d'insuline est réduite de 50 % dans les souris déficientes en GPR40 en comparaison avec les souris sauvages lors de la perfusion d'Intralipid, une solution commerciale de lipides et d'héparine (Latour *et al.* 2007). Malgré l'absence du récepteur GPR40, une potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par la présence de palmitate est observée. Ainsi, malgré l'effet indéniable des acides gras via un récepteur, le métabolisme des acides gras semble nécessaire pour produire une partie de l'effet d'amplification de la sécrétion d'insuline. Les deux voies empruntées par les acides gras pour stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose semblent donc être complémentaires.

Lorsque la β -oxydation des lipides a été modifiée par des approches pharmacologiques ou moléculaires, l'effet des acides gras sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline a été altéré. Par exemple, la surexpression de MCD a diminué la sécrétion d'insuline en présence d'acides gras (Roduit *et al.* 2004) et l'augmentation de la β -oxydation par la surexpression de l'enzyme CPT-1 muté de façon à le rendre insensible au malonyl-CoA (Herrero *et al.* 2005) a réduit la sécrétion d'insuline en présence et en absence d'acides gras. D'après ces études, il semble que la β -oxydation pourrait être couplée à la dégradation d'un lipide signalétique influençant la sécrétion d'insuline. Ainsi, l'implication d'une molécule issue du métabolisme lipidique comme facteur de couplage pour la sécrétion de l'insuline en réponse aux nutriments a déjà été mise de l'avant. Des concentrations élevées de glucose encouragent la synthèse *de novo* des lipides et par le fait même les intermédiaires lipidiques tels les DAG.

Dans notre étude, nous avons donc examiné si l'estérification *de novo* des acides gras est impliquée dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Nous avons émis l'hypothèse que des lipides signalétiques sont produits par le processus d'estérification *de novo* en présence d'acides gras et de glucose. Dans cet objectif,

différentes approches moléculaires ont été utilisées pour augmenter ou réduire l'estérification *de novo* des lipides dans une lignée cellulaire β pancréatique.

Résultats principaux de l'étude

Nous avons d'abord montré que l'estérification *de novo* du palmitate en lipides complexes corrèle avec la potentialisation de la sécrétion d'insuline dans la lignée cellulaire β pancréatique INS 832/13. L'estérification *de novo* mesurée par l'incorporation du palmitate est induite par le glucose en DAG et en TG et elle corrèle étroitement avec la sécrétion d'insuline (voir Fig. 11). D'autre part, les niveaux de palmitate-NE ne sont pas augmentés en parallèle à l'induction de la sécrétion d'insuline par le glucose suggérant que l'augmentation en DAG et en TG n'est pas due à une augmentation de la disponibilité en acide gras dans la cellule et que la molécule signalétique n'est pas l'acide gras libre lui-même.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons modifié l'expression de l'enzyme responsable de la première étape de la synthèse *de novo* des lipides complexes, la GPAT, dans les lignées cellulaires INSr β et INS 832/13. Le choix de commencer cette étude par la surexpression de l'enzyme GPAT1 était motivé par le fait qu'il était le seul isoforme cloné au moment de commencer l'étude. De plus, la surexpression de GPAT1 dans des modèles *in vitro* avait augmenté efficacement l'estérification de l'acide gras oléate en lipides complexes. Ainsi, la surexpression de la protéine GPAT1 dans des cellules CHO et HEK293 a augmenté l'incorporation de l'oléate en TG (Igal *et al.* 2001). La surexpression de GPAT1 dans des cultures primaires d'hépatocytes a produit une augmentation de l'estérification de l'oléate accompagnée d'une diminution de la β -oxydation (Linden *et al.* 2004 ; Lewin *et al.* 2005). Dans un autre modèle de rat où GPAT1 a été surexprimé *in vivo* par la perfusion du foie avec des adénovirus, les niveaux de DAG et de LPA hépatiques ont été augmentés (Nagle *et al.* 2007). Ces résultats provenant d'autres modèles nous ont indiqué que le choix d'utiliser GPAT1 pour augmenter le flux d'estérification et donc potentiellement augmenter la présence d'un lipide signalétique était raisonnable.

Tel qu'anticipé, les concentrations croissantes de glucose enclenchent l'estérification et inhibent la β -oxydation des lipides dans les cellules INS 832/13. La surexpression de la protéine de fusion GPAT1-myc a augmenté le taux d'incorporation du palmitate dans les DAG, les TG et les PL (voir Fig. 14). Malgré une augmentation de l'estérification *de novo* du palmitate par l'expression de la protéine de fusion GPAT1-myc, ceci n'a pas augmenté la sécrétion d'insuline contrairement à nos attentes (voir Fig. 16). Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer ce résultat. Premièrement, la surexpression de GPAT1 n'a pas changé les niveaux de palmitate-NE. L'évaluation de la quantité intracellulaire de palmitate-NE constitue une mesure indirecte des niveaux d'acyl-CoA (Roduit *et al.* 2004). Des études précédentes dans les cellules HIT-15 ont montré qu'une diminution des acyl-CoA à longue chaîne totaux cellulaires était présente en parallèle avec l'induction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Prentki *et al.* 1992). Dans la mesure où la majorité des acyl-CoA est présente au niveau mitochondrial (Prentki *et al.* 1992) et que à haut glucose le transfert des acyl-CoA à la mitochondrie est inhibé, ceci suggérait une augmentation des acyl-CoA au niveau cytosolique à haut glucose et/ou une augmentation de leur estérification causant une diminution de leur contenu total cellulaire à haut glucose. La surexpression de GPAT1 dans les INSr β n'a pas changé les niveaux d'acyl-CoA totaux en réponse au glucose et aux acide gras (données non présentées). Ainsi si les acyl-CoA cytosoliques agissent en tant que facteur de couplage directement en modifiant l'exocytose (Deeney *et al.* 1992), alors des phénomènes de compensation n'ont pas permis de changer leurs niveaux et la sécrétion d'insuline. Deuxièmement, la surexpression de GPAT1 n'a pas entraîné de réduction significative de la β -oxydation. Ceci est contraire à l'étude de Lewin et collègues (Lewin *et al.* 2004), ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet sur la sécrétion d'insuline dans notre modèle. Un autre groupe a aussi montré que la surexpression de GPAT1 diminuait la β -oxydation. Ainsi, les hépatocytes en culture primaire ont montré une β -oxydation de l'oléate réduite (Linden *et al.* 2006). Inversement, dans les hépatocytes primaires isolés de souris déficientes pour GPAT1, une augmentation de la β -oxydation est observée (Hammond *et al.* 2007). Les acyl-CoA sont les substrats réciproques de l'estérification et de la β -oxydation comme il a été démontré dans des cultures primaires d'hépatocytes où GPAT1 a été surexprimée par adénovirus et ceci a augmenté l'incorporation de l'oléate en TG de

plus de 2 fois et a diminué de façon concomitante la β -oxydation de l'oléate de 40 % (Lewin *et al.* 2004). Il est connu que GPAT1 et CPT1 sont des protéines intrinsèques de la membrane mitochondriale et il semble y avoir des évidences que les deux enzymes compétitionnent pour la même réserve d'acyl-CoA (Hammond *et al.* 2005). Ainsi, il se pourrait que l'augmentation de GPAT1 ait augmenté un cycle TG/acide gras dans un compartiment cellulaire éloigné de la membrane plasmique qui n'est pas lié à la transduction de signaux métaboliques pour la sécrétion d'insuline. De ce fait, même les acides gras estérifiés sont rapidement régénérés par la voie lipolytique et transformés en acyl-CoA de façon à ce que les contenus totaux d'acyl-CoA et d'acides gras libres restent inchangés.

Dans notre modèle de surexpression de GPAT1, bien que l'estérification soit augmentée, cette approche n'a pas diminué la β -oxydation du palmitate (voir Fig. 15). Les cellules INS 832/13 étant des cellules cancéreuses, elles peuvent manifester quelques divergences au niveau métabolique par rapport aux cellules normales. En effet, leur métabolisme des nutriments peut être altéré et différent d'une cellule normale. Par exemple, dans un modèle de cellules mammaires isolées d'un cancer agressif qui est étudié dans le laboratoire, la β -oxydation des lipides était très faible par rapport à des cellules mammaires normales (Przybytkowski *et al.* 2007). Cet inconvénient aurait pu être évité par la réalisation d'expériences *ex vivo* avec des cultures primaires d'îlots pancréatiques de rats isolés. Cependant, la transfection d'îlots isolés pour la surexpression ou l'inhibition de protéine dans le but de faire des mesures du métabolisme exige beaucoup de matériel biologique et cela est difficilement réalisable d'un point de vue technique. De plus, les îlots sont constitués de plusieurs types cellulaires, ce qui pourrait induire un biais dans l'interprétation des résultats.

L'absence d'effet sur la sécrétion d'insuline par la surexpression de GPAT1-myc n'est pas due à la présence de l'épitope myc en position carboxy-terminale de la protéine de fusion. En effet, l'épitope n'a pas affecté le potentiel d'activité de l'enzyme comme il est démontré par le taux d'incorporation du palmitate qui a été augmenté dramatiquement dans les DAG et les TG (voir Fig. 14). De plus, la protéine de fusion était bel et bien

exprimée à la localisation cellulaire attendue, la mitochondrie (voir Fig. 13). Dans d'autres études où GPAT1 a été utilisée sous la forme d'une protéine de fusion, l'épitope était aussi situé en position carboxy-terminale (Igal *et al.* 2001 ; Linden *et al.* 2004).

Les enzymes du métabolisme lipidique sont régulés à court terme par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, dans une étude qui compare les niveaux d'expression de GPAT1 dans plusieurs tissus en réponse au statut nutritionnel, une grande divergence est observée entre les niveaux d'expression et l'activité enzymatique (Lewin *et al.* 2001a). D'ailleurs les processus d'oxydation et d'estérification sont régulés réciproquement par la kinase AMPK. En effet, l'activité d'ACC, l'enzyme qui produit le malonyl-CoA qui inhibe CPT-1, est inhibée par l'AMPK alors que celle de MCD est activée. Conjointement, l'activité de GPAT est inhibée (Park *et al.* 2002 ; Ruderman *et al.* 2003). Ainsi, les phénomènes compensatoires envisagés plus haut indiquant une absence de changements dans les niveaux d'acides gras libres et des acyl-CoA totaux et de la β -oxydation lorsque GPAT1 est augmenté pourraient être dûs à des changements de l'activité de ces enzymes clés de la répartition des voies du métabolisme des lipides via des modifications allostériques ou covalentes (par exemple l'état de phosphorylation).

Nous avons aussi vérifié que la surexpression de GPAT1 n'a pas affecté l'intégrité de la voie classique (voir Fig. 17). En effet, si elle était diminuée ceci pourrait peut-être masquer une augmentation potentielle de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (voie d'amplification). La surexpression de GPAT1 n'a pas affecté l'oxydation du glucose et de plus la présence de palmitate à toutes les concentrations de glucose n'a pas diminué l'oxydation du glucose. Ceci est en accord avec le fait que le cycle de Randle est absent des cellules β (Segall *et al.* 1999).

Les résultats obtenus avec la surexpression de l'isoforme mitochondrial GPAT1 suggèrent que le flux d'estérification passant par la mitochondrie n'est pas impliqué dans la production d'un signal positif pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose. La surexpression de GPAT1 a bel et bien augmenté l'incorporation des acides gras dans les TG et DAG sans toutefois modifier la sécrétion d'insuline soit en absence ou en présence

d'acides gras exogènes. Ce résultat ne nous permettait pas de conclure que l'estérification des acides gras n'est pas impliqué dans la sécrétion d'insuline, car un autre isoforme de GPAT, dans un autre compartiment cellulaire pourrait jouer un rôle dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras et la sécrétion induite par le glucose.

Suite à ces résultats négatifs, dans un deuxième temps, nous avons donc surexprimé un isoforme de GPAT présent sur le réticulum endoplasmique dans les cellules INS 832/13. Au moment de faire ce choix, le seul isoforme du RE qui était cloné était GPAT3. La construction d'ADN réalisée exprimait la protéine de fusion GPAT3-HA avec l'épitope hémagglutinine (HA) situé dans la partie carboxy-terminale de la protéine. La protéine GPAT3-HA était active comme démontré par les niveaux de DAG qui ont été augmentés (voir Fig. 23). De plus, la protéine GPAT3-HA était exprimée à la localisation cellulaire attendue, soit le réticulum endoplasmique (voir Fig. 22). Malgré une augmentation de l'estérification du palmitate, nous n'avons pas observé d'augmentation de la sécrétion d'insuline en présence de palmitate contrairement à notre hypothèse (voir Fig. 24). Dans notre étude, nous avons utilisé le palmitate, un acide gras saturé et la GPAT3, contrairement à GPAT1, n'a pas de préférence pour l'acide gras saturé versus insaturé. Lorsque la GPAT3 a été surexprimé dans les cellules HEK-293, une augmentation de l'incorporation de l'oléate dans les TG a été observée sans influencer l'incorporation dans les PL (Cao *et al.* 2006) ce qui corrèle avec nos résultats. Il n'existe pas de modèle de souris déficientes en GPAT3.

Avec l'outil moléculaire GPAT3-HA, nous avons utilisé la transfection par électroporation plutôt que l'infection par des adénovirus comme dans le cas de GPAT1-myc. Ceci a été possible grâce à la disponibilité de la nucléofection. Quoique le protocole technique soit rigoureusement exécuté dans le cas des deux techniques de transfection, dans le cas de l'électroporation nous avons observé une variabilité inter expérience plus grande que celle obtenue avec l'utilisation des adénovirus. Le plus grand nombre de manipulations et de solutions utilisées pour la nucléofection constitue une explication plausible pour cette variabilité.

Nous concluons de notre étude avec la protéine de fusion GPAT3-HA que le flux des lipides qui passe par GPAT3 n'est pas impliqué dans la potentialisation par le palmitate de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. D'ailleurs, suite à l'identification du deuxième isoforme situé sur le réticulum endoplasmique, nous avons déterminé que les niveaux endogènes d'expression de l'ARNm de GPAT3 dans la lignée INS 832/13 utilisée pour l'étude sont cent fois plus faible que ceux de GPAT4.

Précédemment, nous avons vu que la surexpression des isoformes GPAT1 et GPAT3 ne semble pas modifier la sécrétion d'insuline même si le métabolisme des lipides a été perturbé en favorisant l'estérification du palmitate en lipides complexes (DAG et TAG). Comme explication, nous avançons le raisonnement suivant : il est peut-être difficile de mettre en évidence un signal lipidique par la surexpression d'une enzyme clé dans un système qui est probablement déjà au maximum lorsque les cellules sont exposées au glucose élevé.

L'avènement de la technologie de nucléofection développée par Amaxa nous a ouvert la possibilité de pouvoir diminuer l'expression de protéines dans des cellules qui auparavant avaient une faible efficacité de transfection. Après la découverte de GPAT 2 et GPAT3 et notre étude sur ce dernier isoforme, deux études ont démontré l'existence d'un quatrième isoforme, GPAT4. Ceci pouvait expliquer nos résultats négatifs, mais a certainement contribué à compliquer la tâche expérimentale qui semblait relativement simple au début de notre thèse, c'est à dire de changer le flux métabolique à travers un enzyme unique. La mise au point dans le laboratoire de la technologie des siRNA dans les cellules INS 832/13 nous a alors permis de réduire les niveaux d'ARNm de GPAT1 et de GPAT4. Nous avons décidé d'inhiber l'expression de GPAT1 et de GPAT4, les deux isoformes les plus abondants au niveau de l'ARNm dans la lignée INS 832/13. Lors de l'inhibition de l'expression des ARNm de GPAT1 et de GPAT4, malgré une diminution hautement significative de l'estérification du palmitate en DAG à la concentration de glucose intermédiaire (5 mM) et stimulatrice pour la sécrétion d'insuline, nous n'avons pas observé de diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, même en présence de palmitate. Il n'est pas surprenant que nous n'ayons pas observé une diminution

significative de l'incorporation en acides gras dans le DAG à 10 mM glucose, car cette concentration est maximale dans les cellules INS et ainsi l'enzyme allostérique a pu être activé par le glucose, et de plus la concentration très haute en substrat a permis d'outrepasser l'effet de l'inhibition de l'expression des isoformes GPAT 1 et GPAT4. Quant au manque d'effet sur l'incorporation des acides gras dans les TG, il peut être expliqué par une augmentation compensatrice de la lipolyse, et de toute façon les TG stockés dans des gouttelettes lipidiques ne sont pas des molécules signalétiques.

Il est à noter que les résultats obtenus avec les différents isoformes de GPAT sont influencés par les types cellulaires. Ainsi, lorsque GPAT4 a été surexprimé dans les cellules HEK-293 et COS-7, l'estérification mesurée par l'augmentation de l'incorporation d'oléate en TG n'a pas été augmentée (Chen *et al.* 2008 ; Nagle *et al.* 2008). Mais dans la lignée d'hépatocytes HepG2, une augmentation est observée. Ces observations suggèrent que le « pool » de LPA et de PA qui est produit par GPAT4 est probablement différent de celui qui est constitué par GPAT1.

Conclusion de notre étude

Bien que la nécessité de l'activation métabolique des acides gras dans leur action sur la sécrétion d'insuline ne fasse aucun doute, l'ensemble de nos résultats suggère que l'estérification *de novo* des acides gras, en particulier l'augmentation de la production de DAG via la mitochondrie et les microsomes, n'est pas impliquée dans le système de couplage métabolique lié à la sécrétion d'insuline. Quoiqu'une corrélation entre la sécrétion d'insuline et l'estérification *de novo* du palmitate ait été observée, nous n'avons pas obtenu d'effet sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose, aussi bien en présence qu'en absence de palmitate, en manipulant l'estérification *de novo* avec les approches moléculaires que nous avons utilisées, soit la surexpression de GPAT1 et 3 ainsi que l'inhibition simultanée de l'expression des isoformes de loin les plus abondants GPAT1 et GPAT4.

Quoique les différentes approches moléculaires utilisées aient changé les niveaux de DAG, l'absence d'effet sur la sécrétion d'insuline peut être expliquée par le fait que ces approches n'ont pas perturbé les réserves de lipides (pool) impliquées dans le signal positif de la sécrétion d'insuline. Nous avançons cette explication en considérant qu'il est raisonnable de penser qu'il existe différents « pools » et flux de lipides à l'intérieur de la cellule. C'est probablement pour cela que malgré une augmentation du largage de glycérol (une mesure indirecte de la lipolyse) lorsque nous avons surexprimé GPAT1, nous n'avons pas observé d'augmentation de la sécrétion d'insuline.

Parallèlement à l'hypothèse qui avait été émise pour ma thèse, d'autres avenues étaient étudiées par d'autres membres du laboratoire. De récentes études ont démontré une corrélation entre l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques et la lipolyse (Winzel *et al.* 2006). La lipolyse est stimulée par une élévation de la concentration en glucose. De fait, des études réalisées par notre groupe et d'autres dans des modèles de souris déficientes en HSL et ATGL ont pu démontrer l'implication de la lipolyse dans la fonction de la cellule β (Mulder *et al.* 2004 ; Peyot *et al.* 2004 ; Hu *et al.* 2005 ; Peyot *et al.* 2009). Ainsi, la conclusion importante de notre thèse est que dans le cadre du cycle TG/acides gras, le bras constitué par l'estérification n'est pas celui impliqué dans la sécrétion d'insuline. Nos résultats sont intéressants dans la mesure où ils excluent ce bras d'estérification, et ils renforcent considérablement l'hypothèse selon laquelle le bras lipolytique est celui qui est impliqué dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras.

D'un autre côté, afin d'étudier les mécanismes de la compensation de la cellule β , un modèle de rongeur a été utilisé dans le laboratoire. Le rat ZF est obèse et hyperlipidémique, mais normoglycémique grâce à la compensation due à une hyperinsulinémie. Dans cette étude où je suis co-auteur, la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras a été accrue par rapport à celle observée dans les rats contrôle (Nolan *et al.* 2006a). Ceci était associé à une augmentation des voies métaboliques des lipides, soit l'estérification, la β -oxydation et la lipolyse. La présence de l'orlistat, un inhibiteur des lipases, a prévenu l'augmentation de la sécrétion d'insuline par les acides

gras. Avec cette étude, l'hypothèse que l'élévation du cycle triglycérides/acides gras est liée à la sécrétion d'insuline a été initiée. Nos études sont donc compatibles avec l'idée que c'est le bras lipolytique qui agit comme signal dans ce modèle animal comme dans la situation contrôle. Cependant les molécules signalétiques et leurs cibles n'ont pas été définies à ce jour mais ceci est un point majeur de la recherche de notre laboratoire.

Bien qu'il manque des expériences pour le prouver formellement, il semble donc que le flux d'estérifications des acides gras vers le DAG et les TG n'est pas responsable de l'action d'amplification des nutriments glucose et acides gras sur la sécrétion d'insuline. Ainsi, la production de LPA, de PA, de DAG, et de TG lors des processus d'estérification ne serait pas responsable de cette amplification. Cette conclusion liée à nos résultats est à première vue surprenante compte tenu des résultats de la littérature qui ont proposé un rôle pour les DAG dans la sécrétion d'insuline (Corkey *et al.* 1989 ; Rhee *et al.* 2002 ; Sheu *et al.* 2003 ; Kwan *et al.* 2006). Cependant, les DAG et autres signaux lipidiques supposément impliqués dans l'induction de la sécrétion pourraient être formés par d'autres processus que l'estérification et en d'autres lieux dans les cellules. Ainsi, les DAG peuvent être générés par la lipolyse des phospholipides lors de l'activation de certains GPCR comme nous l'avons vu précédemment. Aussi, le DAG, le LPA et le MAG peuvent être produits sur les gouttelettes lipidiques par la lipolyse des TG (voir Fig. 6). À la lumière de mes résultats, il est raisonnable d'avancer que la portion lipolytique du cycle TG/acides gras génère les lipides qui ont un potentiel signalétique important pour la sécrétion d'insuline. D'autres études sont présentement en cours par des collègues étudiants du laboratoire pour identifier la classe et l'espèce de lipide qui agit comme facteur de couplage métabolique. En ce sens, une proposition de projet pouvant faire suite à ma thèse sera décrite plus bas.

Les résultats présentés n'excluent donc pas la notion qu'une molécule issue du métabolisme lipidique agisse comme signal positif sur la sécrétion d'insuline. Les enzymes responsables du métabolisme ont plusieurs isoformes et les rôles des différentes protéines impliquées sont encore largement inconnus ou source de débat dans la littérature. En effet, il est connu que plusieurs organelles sont impliquées dans le métabolisme des lipides. Bien

que la synthèse ait lieu dans le cytoplasme, les lipides sont synthétisés par des enzymes situés à proximité de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. La β -oxydation, quant à elle, a lieu dans la mitochondrie ou le peroxysome. En plus, les enzymes qui activent les acides gras libres en acyl-CoA, les ACS, peuvent aussi avoir un potentiel de protéines de transport et dirigent les acides gras exogènes vers les voies de β -oxydation ou d'estérification.

Prises dans leur ensemble, mon étude et celles de mes collègues nous permettent de conclure que ce n'est pas l'estérification *de novo* des lipides qui constitue le signal positif mais probablement la lipolyse des TG et autres intermédiaires du cycle TG/acides gras.

Perspective

Dans la suite logique des études publiées qui impliquent la lipolyse et le cycle TG/acides gras dans la sécrétion d'insuline, une étude systématique du bras lipolytique du cycle pourrait être poursuivie (voir Fig. 7). L'utilisation d'une combinaison d'approches moléculaires et pharmacologiques nous permettrait de produire une accumulation d'un des intermédiaires lipidiques du cycle afin de tenter d'identifier le signal lipidique responsable de l'augmentation de la sécrétion d'insuline produit par la lipolyse.

Dans un premier temps, une accumulation de MAG pourrait être entraînée en surexprimant l'enzyme HSL, qui hydrolyse le TG et le DAG, en ajoutant (ou en absence pour le contrôle) un inhibiteur de la MAGL. Plusieurs inhibiteurs pour cet enzyme sont disponibles commercialement et il est possible de choisir une molécule qui entre par diffusion. Par exemple, le URB602 est un inhibiteur spécifique de la DAGL et agit à des concentrations dans l'ordre du micromolaire (Hohmann *et al.* 2005) ou le JZL184 qui agit dans l'ordre du nanomolaire (Long *et al.* 2009 ; Pan *et al.* 2009) serait utilisé.

Afin de réaliser cette étude, les cellules INS 832/13 seront transfectées avec une construction plasmidique pour la surexpression de HSL et elles seront incubées en présence d'inhibiteur de la MAGL. L'approche expérimentale de la surexpression

d'enzyme dans les INS 832/13 est déjà validée dans le laboratoire. L'augmentation du MAG par cette approche sera mesurée par la méthode de CCM après avoir marqué les lipides à l'équilibre avec un substrat radioactif, par exemple du glucose marqué au ^{14}C . Ainsi, après avoir utilisé les conditions de culture propices à une potentialisation de la sécrétion d'insuline par le glucose et en présence d'acides gras, les lipides produits par le métabolisme pourront être séparés avec la méthode de CCM (avec le système de solvant approprié et les standards relatifs à la classe de lipide) et quantifiés par densitométrie. Si le MAG est un des métabolites qui agit positivement sur la sécrétion d'insuline, celui-ci sera augmenté. Dans un deuxième temps, le MAG pourrait aussi être augmenté par une approche similaire à celle utilisée dans cette thèse en surexprimant ATGL au lieu de HSL dans les INS 832/13. Dans l'éventualité où l'augmentation de MAG dans la lignée INS 832/13 se traduirait par une augmentation de la sécrétion d'insuline, ces résultats pourraient être confirmés dans des îlots de rats infectés avec un adénovirus pour surexprimer ATGL ou HSL et ce conjointement à l'utilisation des inhibiteurs de la MAGL. La sécrétion d'insuline serait ensuite mesurée. Ainsi, ces expériences contribueraient à tester l'hypothèse que le MAG produit par la lipolyse constituerait le signal métabolique.

D'autre part, toujours avec l'objectif d'identifier le lipide responsable de l'augmentation de la sécrétion d'insuline, le modèle de rat ZF présenté plus haut pourrait être utilisé en comparaison avec le contrôle ZL dans des expériences de profilage des lipides par la technologie de LC-MS. La comparaison entre les profils des lipides obtenus par cette technique pourrait identifier la molécule présente dans les îlots de rat ZF et moins abondante dans ceux des ZL. Afin d'éviter l'hétérogénéité cellulaire des îlots, la lignée de cellules INS 832/13 pourrait être utilisée pour une étude-pilote. En effet, le modèle décrit dans l'étude de Peyot où ATGL a été réduite et la sécrétion d'insuline altérée pourrait être utilisé.

Limites de notre étude

La difficulté relative du projet de recherche entreprit résidait dans la disponibilité des outils pharmacologiques et de biologie moléculaire. Nous avons utilisé des approches moléculaires afin de perturber la voie de synthèse des TG vu l'absence d'inhibiteur pharmacologique. Notre choix s'est arrêté sur la GPAT parce qu'elle est considérée comme l'enzyme limitante de la voie de synthèse des TG. Ceci est supposé parce que c'est l'enzyme avec l'activité spécifique la plus faible de la voie métabolique (Coleman et Lee 2004). Mais des études récentes réalisées avec des souris déficientes pour les enzymes subséquentes de la voie métabolique semblent proposer que les étapes d'AGPAT ou de la lipin pourraient aussi constituer des étapes clés régulatrices dans la voie de synthèse des TG.

La technologie de l'ARN interférent (ARNi) était nouvellement commercialisée au moment de leur utilisation pour les expériences de diminution des isoformes de GPAT. En cours de projet, nous avons dû changer de fournisseur pour les duplexes d'ARN. Les modifications chimiques apportées aux molécules sont différentes et celles-ci peuvent influencer la stabilité des duplexes et leur toxicité. Les paramètres critiques décrivant les ARNi et l'élaboration des algorithmes pour le choix de la cible sont en constante évolution. Nous avons dessiné certains contrôles négatifs de type « scrambled » en utilisant les dernières informations disponibles dans la littérature et nous avons obtenu des effets non-spécifiques ou variables sur la sécrétion d'insuline. Nous supposons qu'il se peut que nous ayons obtenu un effet non-spécifique en atteignant un miARN inconnu impliqué dans l'effet étudié. Ceci semble possible vu le grand nombre de protéines et d'étapes impliquées dans la sécrétion d'insuline et le grand nombre de protéines. Dans le but de diminuer la possibilité d'effet non spécifique, nous avons utilisé des contrôles disponibles commercialement.

La lignée cellulaire INS 832/13 n'est pas facilement transfectable, mais l'utilisation de celle-ci nous permet d'avoir beaucoup de matériel biologique pour faire des mesures du

métabolisme. La lignée utilisée nous a permis d'obtenir des niveaux de transfection efficace avec la technologie récente de nucléofection d'Amaxa. La transfection d'îlots pancréatiques aurait été difficile vu la faible efficacité de transfection. De plus, les îlots sont constitués d'une population de cellules hétérogènes où 60-70 % des cellules seulement sont des cellules β , ce qui constitue un désavantage.

Les expériences réalisées pour cette thèse ont été faites à l'état « statique ». Ainsi, comme le milieu est recueilli pour analyse à la fin de la période d'incubation, la quantité d'insuline qui a été mesurée inclut l'insuline sécrétée au cours de la première et de la deuxième phase de sécrétion. Nous aurions pu réaliser les expériences en périfusion, qui consiste à incuber les cellules dans un flux continu et unidirectionnel de milieu d'incubation et ainsi visualiser les deux phases de la sécrétion d'insuline. Cependant, des expériences de périfusion réalisées avec des cellules infectées ou transfectées se sont montrées non concluantes. En effet, les cellules n'adhéraient pas bien et se détachaient avec le flux du liquide. Les cellules INS, afin de sécréter l'insuline doivent adhérer à un substrat (observations expérimentales).

Les expériences ont été réalisées dans des conditions reflétant les concentrations physiologiques de glucose : basale (2-3 mM), intermédiaire (aux alentours de l' EC_{50} qui est de 5-6 mM) et maximale (16-20 mM). Dans le contexte physiologique, les acides gras non-estérifiés sont charriés dans le plasma liés à de l'albumine. Dans le protocole expérimental utilisé au cours de cette étude pour la préparation des résultats, la concentration de palmitate de 0.2 mM est en association avec 0.5 % d'albumine, ce qui correspond à un ratio de palmitate/BSA de 2.7/1. En comparaison, la concentration des acides gras dans le sang est de 0.2 à 0.6 mM et la concentration d'albumine est de 3.4 à 5.4 % (Van der Vusse et Roemen 1995). Ces valeurs correspondent à un ratio palmitate/BSA compris entre 0.2/1 et 1.2/1. La molécule d'albumine ayant 7 sites de liaison pour les acides gras, la concentration utilisée dans notre étude est relativement physiologique.

Nous avons utilisé le palmitate comme seule espèce d'acide gras afin de faciliter la correspondance entre les résultats obtenus pour les mesures du métabolisme et ceux de

sécrétion d'insuline. Dans le plasma, les deux espèces les plus présentes sont l'oléate et le palmitate et elles sont présentes dans un rapport estimé de 1 :1 (Rothlin *et al.* 1962). Il est connu que l'oléate est plus efficacement incorporé en TG (Guo *et al.* 1999). Nous avons mesuré le taux d'estérification de l'oléate et du palmitate en lipides complexes dans la lignée cellulaire INS 832/13 utilisée dans l'étude. Les taux d'incorporation des deux espèces d'acides gras, utilisées seules ou en combinaison, étaient similaires.

Le schéma expérimental utilisé avec la lignée INS implique une pré-incubation à bas glucose afin d'observer une induction de la sécrétion d'insuline par le glucose comparable à celle observée avec les cultures primaires d'îlots pancréatiques. Au moment de lancer les incubations avec les concentrations croissantes de glucose, les cellules sont dans un état de jeûne. En effet, à bas glucose, la β -oxydation des lipides est à son maximum. Des expériences non présentées ont montré que les niveaux de TG endogènes diminuent très rapidement en présence de la concentration basale de glucose (2 ou 3 mM) après le changement de milieu pour une concentration basale de glucose. Ainsi, peu importait si la protéine GPAT était présente en grande quantité ou non, les niveaux de TG intracellulaires n'étaient pas élevés au moment de lancer l'expérience.

L'estérification de novo du palmitate et la glucolipotoxicité de la cellule β

Parallèlement à nos études des mécanismes de la sécrétion d'insuline impliquant les acides gras, notre laboratoire s'intéresse aussi aux effets négatifs des acides gras sur la cellule β . En effet, l'exposition aiguë des cellules β aux acides gras potentialise la sécrétion d'insuline alors qu'une exposition chronique a des effets délétères sur la fonction de la cellule β et sa survie, particulièrement à haut glucose (Lee *et al.* 1994 ; Prentki *et al.* 2002 ; El-Assaad *et al.* 2003). La glucolipotoxicité, résultant d'une exposition chronique aux acides gras saturés en présence d'une concentration élevée de glucose, est d'un intérêt particulier dans le contexte grandissant de l'obésité où les niveaux de TG et d'acides gras circulants sont élevés. Dans les cellules β , la glucolipotoxicité engendre des modifications de l'expression génique en général et du gène de l'insuline en particulier (Poitout et Robertson 2002), de l'exocytose ainsi qu'une augmentation de l'apoptose (Unger *et al.* 1985 ; Unger *et*

al. 1995 ; Prentki *et al.* 2002). Quoiqu'il soit accepté que le métabolisme du glucose et des acides gras soient nécessaires pour ces effets délétères, les mécanismes moléculaires responsables de ces altérations sont encore peu connus. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le métabolisme du glucose a une influence sur celui des lipides. Ainsi, le malonyl-CoA produit par le métabolisme du glucose agit comme un interrupteur de la β -oxydation et à haut glucose les lipides sont dirigés vers l'estérification.

Afin de mieux comprendre les mécanismes et les changements métaboliques associés aux événements précurseurs de la glucolipotoxicité, une étude génomique a été menée dans la lignée de cellules β pancréatiques INS 832/13 par notre laboratoire. Des études de profilage génétique utilisant soit le glucose soit les acides gras avaient déjà été réalisées par d'autres laboratoires sur des cellules β mais jamais en combinant le glucose élevé aux acides gras libres (Webb *et al.* 2000 ; Shalev *et al.* 2002 ; Song *et al.* 2001 ; Busch *et al.* 2002 ; Wang *et al.* 2004 ; Ghanaat-Pour et Sjöholm 2009 ; Zhou *et al.* 2003). La lignée cellulaire INS 832/13 a été utilisée pour réaliser notre étude afin d'éviter l'hétérogénéité cellulaire des îlots (contamination exocrine, cellules alpha, etc.). Aussi, une expérience-pilote avait montré une très grande variabilité entre les préparations d'îlots provenant de donneurs humains différents. Cependant, les résultats obtenus avec les micropuces à ADN utilisant les cellules INS 832/13 ont été confirmés par des expériences de PCR en temps réel quantitatives réalisées avec des îlots pancréatiques isolés de rat exposés à des conditions de glucolipotoxicité.

Notre étude a été publiée dans la revue *Endocrinology* (El-Assaad *et al.* 2010). Celle-ci a révélé l'existence de variations très précoces de l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées notamment dans le métabolisme des lipides et de la glycolyse, dans l'augmentation de la biosynthèse des stérols et isoprènes, dans la dysfonction mitochondriale, dans la biosynthèse et la sécrétion de l'insuline et dans le stress oxydatif. En support aux observations obtenues avec les micropuces, plusieurs expériences biochimiques mesurant les changements métaboliques ont été réalisées. Par

exemple, les résultats des micropuces à ADN ont montré des changements au niveau de la répartition des lipides. En effet, des changements de l'expression des gènes clés qui dirigent les acides gras vers l'estérification en lipides complexes ont été observés. Ainsi, les niveaux d'expression d'ACC1 ont été augmentés, pouvant conduire à une augmentation du malonyl-CoA et donc à l'inhibition de CPT1. L'expression de SCD1 a aussi été augmentée, ce qui est en accord avec les niveaux élevés de TG. En effet, la SCD1 désature le palmitate en oléate ce qui encourage son utilisation dans la synthèse des TG.

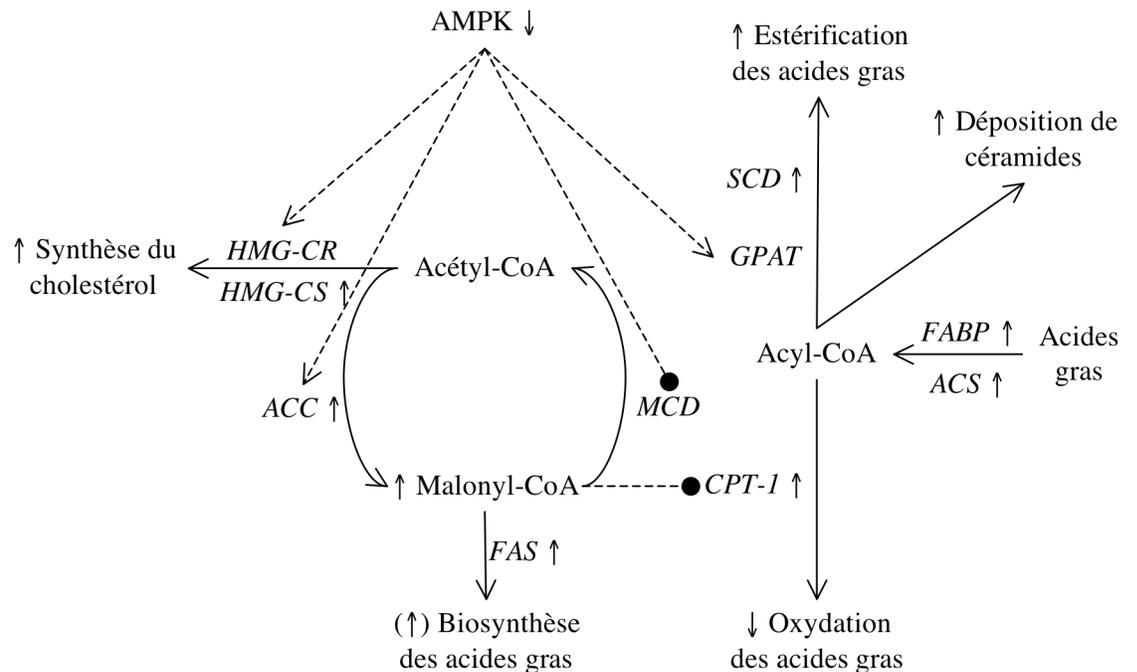


Figure 34. Les changements d'expression génique des enzymes et leurs conséquences sur les voies métaboliques modulant la répartition des lipides lors de la glucolipototoxicité. Les flèches près d'un gène (en italique) indiquent la direction du changement observé, alors qu'une flèche près d'une voie métabolique indique l'effet attendu résultant des changements de l'expression des gènes correspondant à ces voies. Les abréviations utilisées sont : ACS, acyl-CoA synthétase; FABP, fatty acid binding protein; FAS, fatty acid synthase; HMG-CR, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase; HMG-CS, HMG-CoA synthase; MCD, malonyl-CoA décarboxylase.

Un autre changement génomique que nous avons observé et qui favorise l'estérification est la diminution de l'expression de la sous-unité β de l'AMPK. Ce changement génomique est en accord avec nos observations biochimiques avec les

conditions de la glucolipotoxicité montrant que le contenu en TG est augmenté et que la β -oxydation est réduite. Dzamko et collègues ont d'ailleurs montré qu'une diminution de l'expression de la sous-unité β d'AMPK dans le foie diminuait l'oxydation des acides gras (Dzamko *et al.* 2010). D'autres laboratoires ont aussi observé que l'inhibition de l'AMPK est associée à une augmentation de l'estérification et à une diminution de la β -oxydation des lipides (Hardie et Pan 2002 ; Ruderman *et al.* 2003b).

Notre groupe avait proposé qu'une altération dans le réseau de signalisation métabolique qui est orchestré par l'AMPK et le malonyl-CoA soit une des causes initiales impliquée dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2, en particulier au niveau du dysfonctionnement de la cellule β (Ruderman et Prentki 2004). Nos observations actuelles sont en accord avec des résultats que nous avons obtenu dans des études précédentes (El-Assaad *et al.* 2003 ; Roduit *et al.* 2004) et supportent donc directement, pour la première fois au moyen d'une approche moléculaire comme rappellé ci-dessous, cette proposition. Prises dans leur ensemble, nos études soulignent un rôle instrumental pour la répartition des lipides vers l'estérification dans l'induction de la glucolipotoxicité.

Afin de vérifier l'importance de la répartition des lipides vers l'estérification dans l'induction de la glucolipotoxicité, deux approches moléculaires ont été utilisées pour changer la répartition des lipides vers l'estérification dans la lignée cellulaire INS 832/13. Ainsi, la protéine de fusion GPAT3-HA que j'ai sous-clonée et caractérisée a été utilisée dans l'optique d'augmenter l'estérification du palmitate en lipides complexes dans le contexte de la glucolipotoxicité. Nous avons observé une augmentation de la mort cellulaire par la surexpression de GPAT3-HA en présence de glucose intermédiaire et de palmitate. Ceci est en accord avec l'hypothèse qu'une augmentation de la synthèse de lipides complexes serait impliquée dans l'initiation de la glucolipotoxicité puisque l'outil moléculaire a augmenté l'incorporation des acides gras dans les TG et DAG. L'expression de GPAT3-HA n'a pas augmenté la mort cellulaire à la concentration élevée de glucose en présence de palmitate probablement parce que l'estérification est déjà à son niveau maximal pendant que la β -oxydation est à son niveau minimal.

La deuxième approche utilisée a constitué à réduire l'expression d'ACC1 avec des siRNA. La diminution d'ACC1 a aussi diminué la glucolipotoxicité, ce qui va dans le sens de notre hypothèse. En effet, la diminution d'ACC1 devrait être associée à une diminution de la synthèse de malonyl-CoA qui agit comme l'interrupteur entre la β -oxydation et l'estérification en favorisant la dégradation des lipides.

D'autres laboratoires ont observé qu'une exposition prolongée des îlots à des concentrations élevées de glucose en présence de palmitate entraîne une augmentation de l'estérification des acides gras en lipides neutres et que celle-ci corrèle avec une diminution de l'expression du gène de l'insuline (Briaud *et al.* 2001) et avec une diminution de la sécrétion d'insuline (Zhou *et al.* 1996). Ces études mettent en lumière le rôle des lipides complexes dans la perte de fonction de la cellule β suite à un stress métabolique causé par la glucolipotoxicité.

D'un autre côté, d'autres études ont plutôt suggéré un rôle protecteur de la mort cellulaire pour les TG (Cnop *et al.* 2001 ; Listenberger *et al.* 2003). En effet, dans ces études une corrélation inverse entre l'accumulation des TG et la mort des cellules β a été observée. Ceci n'est pas en contradiction avec nos observations puisque la ou les molécules qui produisent un effet toxique ne sont probablement pas le produit final (les TG), mais un des produits intermédiaires de la voie de synthèse comme les LPA, les PA ou les DAG. D'ailleurs, d'autres études ont proposées que les produits intermédiaires de l'estérification pourraient être des modulateurs de la mort cellulaire des cellules β (Briaud *et al.* 2001 ; Cnop *et al.* 2001 ; Listenberg *et al.* 2003 ; Schmitz-Peiffer *et al.* 2010). Par exemple, une étude a montré que dans un modèle de souris où l'obésité est induite par une diète riche en gras, une augmentation des niveaux de DAG qui activent la PKC δ est associée à l'apoptose des cellules β (Hennige *et al.* 2010).

En plus des DAG, les céramides sont une autre classe de molécules produites par le métabolisme du palmitate pouvant avoir un effet toxique sur la cellule β . Ces derniers sont aussi produits lorsque la répartition des lipides favorise l'estérification. La production des céramides a déjà été suggérée comme jouant un rôle dans l'apoptose des cellules β

(Maedler *et al.* 2003 ; Shimabukuro *et al.* 1998a) et dans la diminution de l'expression du gène de l'insuline (Kelpel *et al.* 2003) au cours de la glucolipotoxicité. Dans nos expériences, la glucolipotoxicité a aussi augmenté la déposition des céramides. L'origine précise de ces dépositions (augmentation de leur synthèse *de novo* ou dégradation des sphingosines) reste à être identifiée.

Des études réalisées avec des modèles de rats diabétiques impliquent aussi que la répartition des lipides vers l'estérification constituerait un événement-clé pour la fonction et la survie des cellules β . Par exemple, le rat Zucker diabetic fatty (ZDF) est un modèle déficient pour le gène de la leptine qui est obèse, hyperphagique, hyperlipidémique et hyperinsulinémique et qui développe le diabète de type 2. Dans ce modèle de rat, un traitement par la troglitazone, qui occasionne une réduction de l'expression de GPAT1, entraîne une diminution de l'accumulation des TG et une amélioration de la sécrétion d'insuline (Shimabukuro *et al.* 1998b).

Ainsi, nos résultats nous permettent de conclure que la répartition des lipides vers l'estérification et une diminution de la β -oxydation est instrumentale et initiatrice de la glucolipotoxicité ou du moins précède d'autres altérations comme le stress oxydatif, la dysfonction mitochondriale et le stress du réticulum endoplasmique parce que :

a) nous observons une synergie entre le glucose et le palmitate qui corrèle avec l'accumulation des TG et des céramides et que cette synergie ne corrèle pas avec les changements du métabolisme énergétique mitochondrial et la production de ROS ;

b) l'inhibition d'ACC1 a presque complètement prévenu la glucolipotoxicité alors que la surexpression de GPAT3-HA l'a augmentée ;

c) dans une étude antérieure de notre laboratoire où l'étomoxir (inhibiteur pharmacologique de la CPT1) a été utilisé, l'induction de l'apoptose par la glucolipotoxicité a été augmentée alors qu'une approche pharmacologique qui active l'AMPK (AICAR ou metformine) et qui favorise la β -oxydation l'a presque complètement prévenue (El-Assaad *et al.* 2003).

Ainsi, certains agents pharmacologiques qui sont couramment utilisés pour le traitement du diabète de type 2 et du syndrome métabolique pourraient peut-être avoir des effets bénéfiques pour la fonction de la cellule β . En effet, les statines, qui réduisent la biosynthèse du cholestérol, ou l'AICAR et la metformine qui activent l'AMPK pourraient avoir des effets bénéfiques sur la glucolipotoxicité de la cellule β .

En conclusion finale, les résultats de cette thèse suggèrent que la voie d'estérification dans le cadre du cycle TG/acides gras joue un rôle clé dans la mort cellulaire induite par la glucolipotoxicité dans les cellules β , mais en revanche n'est pas impliquée dans le système de couplage métabolique menant à la sécrétion de l'insuline, et que c'est plutôt le bras lipolytique qui génère les signaux lipidiques menant à l'exocytose des granules de sécrétion.

Bibliographie

- (U.K. prospective diabetes study 16. Overview of 6 years' therapy of type II diabetes: a progressive disease. U.K. Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes* 44:1249-1258.1995).
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPt, Boyd AE, 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268:423-426.1995).
- Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L (Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem* 57:241-254.2011).
- Alcazar O, Qiu-yue Z, Gine E, Tamarit-Rodriguez J (Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes* 46:1153-1158.1997).
- Alquier T, Peyot ML, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, Ronald Kahn C, Smith RD, Jetton TL, Metz TO, Prentki M, Poitout V (Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 58:2607-2615.2009).
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES (The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80.2000).
- Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJ (Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312:446-448.1984).
- Ashcroft FM, Rorsman P (ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 18:109-111.1990).
- Ashworth JM, Kornberg HL (The anaplerotic fixation of carbon dioxide by *Escherichia coli*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 165:179-188.1966).
- Beigneux AP, Vergnes L, Qiao X, Quatela S, Davis R, Watkins SM, Coleman RA, Walzem RL, Philips M, Reue K, Young SG (Agpat6--a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *J Lipid Res* 47:734-744.2006).
- Bell RM, Coleman RA (Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49:459-487.1980).

- Ben-Haroush A, Yogeve Y, Hod M (Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 21:103-113.2004).
- Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ (Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 17:277-303.1997).
- Betz A, Ashery U, Rickmann M, Augustin I, Neher E, Sudhof TC, Rettig J, Brose N (Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21:123-136.1998).
- Bhat BG, Bardes ES, Coleman RA (Solubilization and partial purification of neonatally expressed rat hepatic microsomal monoacylglycerol acyltransferase. *Arch Biochem Biophys* 300:663-669.1993).
- Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ (Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *FASEB J* 13:805-812.1999).
- Brasaemle DL (Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48:2547-2559.2007).
- Briaud I, Harmon JS, Kelpe CL, Segu VB, Poitout V (Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes* 50:315-321.2001).
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI (The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278:11303-11311.2003).
- Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M (Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* 45:190-198.1996).
- Buchanan TA, Xiang AH (Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 115:485-491.2005).
- Busch AK, Cordery D, Denyer GS, Biden TJ (Expression profiling of palmitate- and oleate-regulated genes provides novel insights into the effects of chronic lipid exposure on pancreatic beta-cell function. *Diabetes* 51:977-987.2002).
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC (Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110.2003).

- Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE (Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19695-19700.2006).
- Carlsson C, Borg LA, Welsh N (Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 140:3422-3428.1999).
- Chen YQ, Kuo MS, Li S, Bui HH, Peake DA, Sanders PE, Thibodeaux SJ, Chu S, Qian YW, Zhao Y, Bredt DS, Moller DE, Konrad RJ, Beigneux AP, Young SG, Cao G (AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase. *J Biol Chem* 283:10048-10057.2008).
- Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik DL, Pipeleers DG (Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50:1771-1777.2001).
- Coleman RA, Lee DP (Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43:134-176.2004).
- Corkey BE, Glennon MC, Chen KS, Deeney JT, Matschinsky FM, Prentki M (A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 264:21608-21612.1989).
- Crespin SR, Greenough WB, 3rd, Steinberg D (Stimulation of insulin secretion by long-chain free fatty acids. A direct pancreatic effect. *J Clin Invest* 52:1979-1984.1973).
- Cruz WS, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML, Semenkovich CF (Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction. *J Biol Chem* 276:12162-12168.2001).
- Curry DL, Bennett LL, Grodsky GM (Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83:572-584.1968).
- Daniel S, Noda M, Straub SG, Sharp GW (Identification of the docked granule pool responsible for the first phase of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 48:1686-1690.1999).
- Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC (Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* 333:93-96.1988).
- Deeney JT, Tornheim K, Korchak HM, Prentki M, Corkey BE (Acyl-CoA esters modulate intracellular Ca²⁺ handling by permeabilized clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 267:19840-19845.1992).

- Devendra D, Liu E, Eisenbarth GS (Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328:750-754.2004).
- Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Del Prato S (Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19:259-270.2003).
- Dircks LK, Sul HS (Mammalian mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1348:17-26.1997).
- Doshi LS, Brahma MK, Sayyed SG, Dixit AV, Chandak PG, Pamidiboina V, Motiwala HF, Sharma SD, Nemmani KV (Acute administration of GPR40 receptor agonist potentiates glucose-stimulated insulin secretion in vivo in the rat. *Metabolism* 58:333-343.2009).
- Dotta F, Censini S, van Halteren AG, Marselli L, Masini M, Dionisi S, Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P (Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5115-5120.2007).
- Duman JG, Forte JG (What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C237-249.2003).
- Dzamko N, van Denderen BJ, Hevener AL, Jorgensen SB, Honeyman J, Galic S, Chen ZP, Watt MJ, Campbell DJ, Steinberg GR, Kemp BE (AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J Biol Chem* 285:115-122.2010).
- El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M (Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144:4154-4163.2003).
- El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, Sladek R, Buteau J, Maestre I, Pepin E, Zhao S, Iglesias J, Roche E, Prentki M (Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology* 151:3061-3073.2010).
- Ellis JM, Frahm JL, Li LO, Coleman RA (Acyl-coenzyme A synthetases in metabolic control. *Curr Opin Lipidol* 21:212-217.2010).
- Eriksson KF, Lindgarde F (Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmo feasibility study. *Diabetologia* 34:891-898.1991).
- Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M (Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes* 49:718-726.2000).

- Fernandez-Zapico ME, van Velkinburgh JC, Gutierrez-Aguilar R, Neve B, Froguel P, Urrutia R, Stein R (MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells. *J Biol Chem* 284:36482-36490.2009).
- Florez JC, Jablonski KA, Kahn SE, Franks PW, Dabelea D, Hamman RF, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D (Type 2 diabetes-associated missense polymorphisms KCNJ11 E23K and ABCC8 A1369S influence progression to diabetes and response to interventions in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 56:531-536.2007).
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509.1957).
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al. (Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:697-702.1993).
- Fujiwara K, Maekawa F, Yada T (Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E670-677.2005).
- Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pegorier JP (Troglitazone inhibits fatty acid oxidation and esterification, and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from starved rats. *Diabetes* 45:1556-1562.1996).
- Ganesh Bhat B, Wang P, Kim JH, Black TM, Lewin TM, Fiedorek FT, Jr., Coleman RA (Rat sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase: molecular cloning and characterization of the cDNA and expressed protein. *Biochim Biophys Acta* 1439:415-423.1999).
- Gembal M, Detimary P, Gilon P, Gao ZY, Henquin JC (Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 91:871-880.1993).
- Gerber SH, Sudhof TC (Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51 Suppl 1:S3-11.2002).
- Ghanaat-Pour H, Sjöholm A (Gene expression regulated by pioglitazone and exenatide in normal and diabetic rat islets exposed to lipotoxicity. *Diabetes Metab Res Rev* 25:163-184.2009).
- Giuffrida FM, Reis AF (Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab* 7:318-326.2005).
- Gonzalez-Baro MR, Granger DA, Coleman RA (Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase contains two transmembrane domains with the active site in the N-terminal domain facing the cytosol. *J Biol Chem* 276:43182-43188.2001).

- Gonzalo S, Linder ME (SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway. *Mol Biol Cell* 9:585-597.1998).
- Goode KA, Hutton JC (Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell. *Semin Cell Dev Biol* 11:235-242.2000).
- Graham FL, Prevec L (Manipulation of adenovirus vectors. *Methods Mol Biol* 7:109-128.1991).
- Gribble FM, Proks P, Corkey BE, Ashcroft FM (Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA. *J Biol Chem* 273:26383-26387.1998).
- Gruppig AY, Cnop M, Van Schravendijk CF, Hannaert JC, Van Berkel TJ, Pipeleers DG (Low density lipoprotein binding and uptake by human and rat islet beta cells. *Endocrinology* 138:4064-4068.1997).
- Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M (A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 282:35657-35665.2007).
- Guillam MT, Hummler E, Schaerer E, Yeh JI, Birnbaum MJ, Beermann F, Schmidt A, Deriaz N, Thorens B (Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17:327-330.1997).
- Guo W, Choi JK, Kirkland JL, Corkey BE, Hamilton JA (Incorporation of [1-13C]oleate into cellular triglycerides in differentiating 3T3L1 cells. *Lipids* 34:825-831.1999).
- Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V (Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 280:32413-32418.2005).
- Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Casalunovo T, Taback SP, Frackelton EC, Lawson ML, Robinson LJ, Skraban R, Lu Y, Chiavacci RM, Stanley CA, Kirsch SE, Rappaport EF, Orange JS, Monos DS, Devoto M, Qu HQ, Polychronakos C (A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448:591-594.2007).
- Halestrap AP (The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148:85-96.1975).
- Hamilton JA, Kamp F (How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48:2255-2269.1999).
- Hammond LE, Albright CD, He L, Rusyn I, Watkins SM, Doughman SD, Lemasters JJ, Coleman RA (Increased oxidative stress is associated with balanced increases in hepatocyte apoptosis and proliferation in glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 deficient mice. *Exp Mol Pathol* 82:210-219.2007).

- Hammond LE, Gallagher PA, Wang S, Hiller S, Kluckman KD, Posey-Marcos EL, Maeda N, Coleman RA (Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-deficient mice have reduced weight and liver triacylglycerol content and altered glycerolipid fatty acid composition. *Mol Cell Biol* 22:8204-8214.2002).
- Hammond LE, Neschen S, Romanelli AJ, Cline GW, Ilkayeva OR, Shulman GI, Muoio DM, Coleman RA (Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 is essential in liver for the metabolism of excess acyl-CoAs. *J Biol Chem* 280:25629-25636.2005).
- Hardie DG, Pan DA (Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans* 30:1064-1070.2002).
- Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M (Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* 280:13285-13291.2005).
- Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M (G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug Discov Today* 14:231-240.2009).
- Hennige AM, Ranta F, Heinzelmann I, Dufer M, Michael D, Braumuller H, Lutz SZ, Lammers R, Drews G, Bosch F, Haring HU, Ullrich S (Overexpression of kinase-negative protein kinase Cdelta in pancreatic beta-cells protects mice from diet-induced glucose intolerance and beta-cell dysfunction. *Diabetes* 59:119-127.2010).
- Henquin JC, Charles S, Nenquin M, Mathot F, Tamagawa T (Diazoxide and D600 inhibition of insulin release. Distinct mechanisms explain the specificity for different stimuli. *Diabetes* 31:776-783.1982).
- Herrero L, Rubi B, Sebastian D, Serra D, Asins G, Maechler P, Prentki M, Hegardt FG (Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 54:462-471.2005).
- Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* 435:1108-1112.2005).
- Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, Hinokio Y, Lindner TH, Mashima H, Schwarz PE, del Bosque-Plata L, Oda Y, Yoshiuchi I, Colilla S, Polonsky KS, Wei S, Concannon P, Iwasaki N, Schulze J, Baier LJ, Bogardus C, Groop L, Boerwinkle E, Hanis CL, Bell GI (Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 26:163-175.2000).
- Hu L, Deeney JT, Nolan CJ, Peyot ML, Ao A, Richard AM, Luc E, Faergeman NJ, Knudsen J, Guo W, Sorhede-Winzell M, Prentki M, Corkey BE (Regulation of

- lipolytic activity by long-chain acyl-coenzyme A in islets and adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E1085-1092.2005).
- Igal RA, Wang S, Gonzalez-Baro M, Coleman RA (Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol. *J Biol Chem* 276:42205-42212.2001).
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422:173-176.2003).
- Iwashima Y, Pugh W, Depaoli AM, Takeda J, Seino S, Bell GI, Polonsky KS (Expression of calcium channel mRNAs in rat pancreatic islets and downregulation after glucose infusion. *Diabetes* 42:948-955.1993).
- Joseph JW, Jensen MV, Ilkayeva O, Palmieri F, Alarcon C, Rhodes CJ, Newgard CB (The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281:35624-35632.2006).
- Kaaja R, Ronnema T (Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *Rev Diabet Stud* 5:194-202.2008).
- Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G (Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 355:2427-2443.2006).
- Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V (Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem* 278:30015-30021.2003).
- Kennedy EP (Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc* 20:934-940.1961).
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM (Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346:393-403.2002).
- Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B (A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 301:406-410.2003).
- Kushner RF, Sujak M (Prevention of weight gain in adult patients with type 2 diabetes treated with pioglitazone. *Obesity (Silver Spring)* 17:1017-1022.2009).

- Kwan EP, Xie L, Sheu L, Nolan CJ, Prentki M, Betz A, Brose N, Gaisano HY (Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes* 55:1421-1429.2006).
- Larsson O, Deeney JT, Branstrom R, Berggren PO, Corkey BE (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* 271:10623-10626.1996).
- Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V (GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56:1087-1094.2007).
- Leahy JL (Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36:197-209.2005).
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (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* 91:10878-10882.1994).
- Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M (Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20:463-466.1996).
- Lewin TM, Granger DA, Kim JH, Coleman RA (Regulation of mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase activity: response to feeding status is unique in various rat tissues and is discordant with protein expression. *Arch Biochem Biophys* 396:119-127.2001a).
- Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA (Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem* 276:24674-24679.2001b).
- Lewin TM, Schwerbrock NM, Lee DP, Coleman RA (Identification of a new glycerol-3-phosphate acyltransferase isoenzyme, mtGPAT2, in mitochondria. *J Biol Chem* 279:13488-13495.2004).
- Lewin TM, Wang S, Nagle CA, Van Horn CG, Coleman RA (Mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 directs the metabolic fate of exogenous fatty acids in hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E835-844.2005).
- Linden D, William-Olsson L, Ahnmark A, Ekroos K, Hallberg C, Sjogren HP, Becker B, Svensson L, Clapham JC, Oscarsson J, Schreyer S (Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation. *FASEB J* 20:434-443.2006).
- Linden D, William-Olsson L, Rhedin M, Asztely AK, Clapham JC, Schreyer S (Overexpression of mitochondrial GPAT in rat hepatocytes leads to decreased fatty

acid oxidation and increased glycerolipid biosynthesis. *J Lipid Res* 45:1279-1288.2004).

Lindstrom J, Ilanne-Parikka P, Peltonen M, Aunola S, Eriksson JG, Hemio K, Hamalainen H, Harkonen P, Keinanen-Kiukkaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Mannelin M, Paturi M, Sundvall J, Valle TT, Uusitupa M, Tuomilehto J (Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368:1673-1679.2006).

Lindstrom J, Louheranta A, Mannelin M, Rastas M, Salminen V, Eriksson J, Uusitupa M, Tuomilehto J (The Finnish Diabetes Prevention Study (DPS): Lifestyle intervention and 3-year results on diet and physical activity. *Diabetes Care* 26:3230-3236.2003).

Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, Schaffer JE (Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3077-3082.2003).

Liu S, Wilson KA, Rice-Stitt T, Neiman AM, McNew JA (In vitro fusion catalyzed by the sporulation-specific t-SNARE light-chain Spo20p is stimulated by phosphatidic acid. *Traffic* 8:1630-1643.2007).

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5:37-44.2009).

MacDonald MJ (Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270:20051-20058.1995).

MacDonald MJ, McKenzie DI, Walker TM, Kaysen JH (Lack of glycconeogenesis in pancreatic islets: expression of gluconeogenic enzyme genes in islets. *Horm Metab Res* 24:158-160.1992).

Madison LL, Seyffert WA, Jr., Unger RH, Barker B (Effect on plasma free fatty acids on plasma glucagon and serum insulin concentrations. *Metabolism* 17:301-304.1968).

Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52:726-733.2003).

Magnan C, Ktorza A (Production et sécrétion de l'insuline par la cellule b pancréatique. *EMC-Endocrinologie* 2:241-264.2005).

Malaisse WJ, Blachier F, Pochet R, Manuel y Keenoy B, Sener A (Calmodulin and calbindin in pancreatic islet cells. *Adv Exp Med Biol* 269:127-133.1990).

- Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hellerstrom C (Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J* 227:995-1002.1985).
- Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC (Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28:373-386.1979).
- Malecki MT, Mlynarski W (Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease. *Diabetes Obes Metab* 10:607-616.2008).
- Mashek DG, Li LO, Coleman RA (Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J Lipid Res* 47:2004-2010.2006).
- Mashek DG, Li LO, Coleman RA (Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. *Future Lipidol* 2:465-476.2007).
- Masiello P, Novelli M, Bombara M, Fierabracci V, Vittorini S, Prentki M, Bergamini E (The antilipolytic agent 3,5-dimethylpyrazole inhibits insulin release in response to both nutrient secretagogues and cyclic adenosine monophosphate agonists in isolated rat islets. *Metabolism* 51:110-114.2002).
- Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A (Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48:524-530.1999).
- Massie B, Couture F, Lamoureux L, Mosser DD, Guilbault C, Jolicoeur P, Belanger F, Langelier Y (Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol* 72:2289-2296.1998a).
- Massie B, Mosser DD, Koutroumanis M, Vitte-Mony I, Lamoureux L, Couture F, Paquet L, Guilbault C, Dionne J, Chahla D, Jolicoeur P, Langelier Y (New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology* 28:53-64.1998b).
- McGarry JD, Dobbins RL (Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42:128-138.1999).
- Meglasson MD, Matschinsky FM (Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 2:163-214.1986).
- Mendez CF, Leibiger IB, Leibiger B, Hoy M, Gromada J, Berggren PO, Bertorello AM (Rapid association of protein kinase C-epsilon with insulin granules is essential for insulin exocytosis. *J Biol Chem* 278:44753-44757.2003).
- Metzger BE, Coustan DR (Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care* 21 Suppl 2:B161-167.1998).

- Motta PM, Macchiarelli G, Nottola SA, Correr S (Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Tech* 37:384-398.1997).
- Mulder H, Yang S, Winzell MS, Holm C, Ahren B (Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* 53:122-128.2004).
- Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA (AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 338 (Pt 3):783-791.1999).
- Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, Tanimoto G, Yandell BS, Attie AD (The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11371-11376.2000).
- Nagasumi K, Esaki R, Iwachidow K, Yasuhara Y, Ogi K, Tanaka H, Nakata M, Yano T, Shimakawa K, Taketomi S, Takeuchi K, Odaka H, Kaisho Y (Overexpression of GPR40 in pancreatic beta-cells augments glucose-stimulated insulin secretion and improves glucose tolerance in normal and diabetic mice. *Diabetes* 58:1067-1076.2009).
- Nagle CA, An J, Shiota M, Torres TP, Cline GW, Liu ZX, Wang S, Catlin RL, Shulman GI, Newgard CB, Coleman RA (Hepatic overexpression of glycerol-sn-3-phosphate acyltransferase 1 in rats causes insulin resistance. *J Biol Chem* 282:14807-14815.2007).
- Nagle CA, Vergnes L, Dejong H, Wang S, Lewin TM, Reue K, Coleman RA (Identification of a novel sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform, GPAT4, as the enzyme deficient in *Agpat6*^{-/-} mice. *J Lipid Res* 49:823-831.2008).
- Newsholme P, Bender K, Kiely A, Brennan L (Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans* 35:1180-1186.2007).
- Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T, Glumer C, Thorsteinsson B, Borch-Johnsen K, Hansen T, Pedersen O (The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 52:573-577.2003).
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404:787-790.2000).
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M (Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 378:169-181.2011).
- Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, Fortier M, Guay C, Lamontagne J, Barbeau A, Przybytkowski E, Joly E, Masiello P, Wang S,

- Mitchell GA, Prentki M (Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49:2120-2130.2006a).
- Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M (Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:S16-23.2006b).
- Nolan CJ, Prentki M (The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 19:285-291.2008).
- Pan B, Wang W, Long JZ, Sun D, Hillard CJ, Cravatt BF, Liu QS (Blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis by selective monoacylglycerol lipase inhibitor 4-nitrophenyl 4-(dibenzo[d][1,3]dioxol-5-yl(hydroxy)methyl)piperidine-1-carboxylate (JZL184) Enhances retrograde endocannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 331:591-597.2009).
- Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, Hu ZX, Lin J, Xiao JZ, Cao HB, Liu PA, Jiang XG, Jiang YY, Wang JP, Zheng H, Zhang H, Bennett PH, Howard BV (Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20:537-544.1997).
- Paolisso G, Gambardella A, Amato L, Tortoriello R, D'Amore A, Varricchio M, D'Onofrio F (Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects. *Diabetologia* 38:1295-1299.1995).
- Pappan KL, Pan Z, Kwon G, Marshall CA, Coleman T, Goldberg IJ, McDaniel ML, Semenkovich CF (Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J Biol Chem* 280:9023-9029.2005).
- Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, Saha AK (Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* 277:32571-32577.2002a).
- Park YD, Wu BN, Tian WX, Zhou HM (Effects of osmolytes on unfolding of chicken liver fatty acid synthase. *Biochemistry (Mosc)* 67:914-917.2002b).
- Parker SM, Moore PC, Johnson LM, Poitout V (Palmitate potentiation of glucose-induced insulin release: a study using 2-bromopalmitate. *Metabolism* 52:1367-1371.2003).
- Permutt MA, Wasson J, Cox N (Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 115:1431-1439.2005).
- Peter-Riesch B, Fathi M, Schlegel W, Wollheim CB (Glucose and carbachol generate 1,2-diacylglycerols by different mechanisms in pancreatic islets. *J Clin Invest* 81:1154-1161.1988).

- Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Ruderman NB, Haemmerle G, Zechner R, Joly E, Madiraju SR, Poitout V, Prentki M (Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 284:16848-16859.2009).
- Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M (Hormone-sensitive lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 53:1733-1742.2004).
- Poitout V, Robertson RP (Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143:339-342.2002).
- Pongratz RL, Kibbey RG, Shulman GI, Cline GW (Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* 282:200-207.2007).
- Prentki M (New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134:272-286.1996).
- Prentki M, Corkey BE (Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 45:273-283.1996).
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3:S405-413.2002).
- Prentki M, Madiraju SR (Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29:647-676.2008).
- Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE (Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 267:5802-5810.1992).
- Przybytkowski E, Joly E, Nolan CJ, Hardy S, Francoeur AM, Langelier Y, Prentki M (Upregulation of cellular triacylglycerol - free fatty acid cycling by oleate is associated with long-term serum-free survival of human breast cancer cells. *Biochem Cell Biol* 85:301-310.2007).
- Pullman ME (A convenient and versatile method for the purification of CoA thiol esters. *Anal Biochem* 54:188-198.1973).
- Ramachandran A, Snehalatha C, Mary S, Mukesh B, Bhaskar AD, Vijay V (The Indian Diabetes Prevention Programme shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). *Diabetologia* 49:289-297.2006).

- Regazzi R, Ravazzola M, Iezzi M, Lang J, Zahraoui A, Andereggen E, Morel P, Takai Y, Wollheim CB (Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2265-2273.1996).
- Rhee JS, Betz A, Pyott S, Reim K, Varoqueaux F, Augustin I, Hesse D, Sudhof TC, Takahashi M, Rosenmund C, Brose N (Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108:121-133.2002).
- Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG (The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 52:1143-1151.2009).
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V (Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 1:S119-124.2004).
- Roche E, Farfari S, Witters LA, Assimacopoulos-Jeannet F, Thumelin S, Brun T, Corkey BE, Saha AK, Prentki M (Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* 47:1086-1094.1998).
- Roduit R, Masiello P, Wang SP, Li H, Mitchell GA, Prentki M (A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* 50:1970-1975.2001).
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M (A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes* 53:1007-1019.2004).
- Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, Becker TC, Sherry AD, Newgard CB, Jensen MV (A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281:30593-30602.2006).
- Rorsman P, Renstrom E (Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46:1029-1045.2003).
- Rothlin ME, Rothlin CB, Wendt VE (Free fatty acid concentration and composition in arterial blood. *Am J Physiol* 203:306-310.1962).
- Rubi B, Antinozzi PA, Herrero L, Ishihara H, Asins G, Serra D, Wollheim CB, Maechler P, Hegardt FG (Adenovirus-mediated overexpression of liver carnitine palmitoyltransferase I in INS1E cells: effects on cell metabolism and insulin secretion. *Biochem J* 364:219-226.2002).

- Ruderman N, Prentki M (AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3:340-351.2004).
- Ruderman NB, Park H, Kaushik VK, Dean D, Constant S, Prentki M, Saha AK (AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand* 178:435-442.2003a).
- Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW (Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144:5166-5171.2003b).
- Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, Shen L, Rocheleau G, Cavalcanti-Proenca C, Bacot F, Balkau B, Belisle A, Borch-Johnsen K, Charpentier G, Dina C, Durand E, Elliott P, Hadjadj S, Jarvelin MR, Laitinen J, Lauritzen T, Marre M, Mazur A, Meyre D, Montpetit A, Pisinger C, Posner B, Poulsen P, Pouta A, Prentki M, Ribel-Madsen R, Ruokonen A, Sandbaek A, Serre D, Tichet J, Vaxillaire M, Wojtaszewski JF, Vaag A, Hansen T, Polychronakos C, Pedersen O, Froguel P, Sladek R (Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 41:1110-1115.2009).
- Rutter GA (Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 22:247-284.2001).
- Sako Y, Grill VE (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* 127:1580-1589.1990).
- Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, Jimenez-Feltstrom J, Miyazaki J, Owman C, Olde B (Free fatty acid receptor 1 (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* 322:207-215.2005).
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ, Hughes TE, Groop L, Altshuler D, Almgren P, Florez JC, Meyer J, Ardlie K, Bengtsson Bostrom K, Isomaa B, Lettre G, Lindblad U, Lyon HN, Melander O, Newton-Cheh C, Nilsson P, Orho-Melander M, Rastam L, Speliotes EK, Taskinen MR, Tuomi T, Guiducci C, Berglund A, Carlson J, Gianniny L, Hackett R, Hall L, Holmkvist J, Laurila E, Sjogren M, Sterner M, Surti A, Svensson M, Tewhey R, Blumenstiel B, Parkin M, Defelice M, Barry R, Brodeur W, Camarata J, Chia N, Fava M, Gibbons J, Handsaker B, Healy C, Nguyen K, Gates C, Sougnez C, Gage D, Nizzari M, Gabriel SB, Chirn GW, Ma Q, Parikh H, Richardson D, Ricke D, Purcell S (Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331-1336.2007).
- Schmitz-Peiffer C, Biden TJ (Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes* 57:1774-1783.2008).
- Schmitz-Peiffer C, Biden TJ (PKCdelta blues for the beta-cell. *Diabetes* 59:1-3.2010).

- Schnell S, Schaefer M, Schofl C (Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* 263:173-180.2007).
- Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M (Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* 272:18572-18579.1997).
- Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S, Corkey BE, Prentki M (Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *Am J Physiol* 277:E521-528.1999).
- Seyffert WA, Jr., Madison LL (Physiologic effects of metabolic fuels on carbohydrate metabolism. I. Acute effect of elevation of plasma free fatty acids on hepatic glucose output, peripheral glucose utilization, serum insulin, and plasma glucagon levels. *Diabetes* 16:765-776.1967).
- Shalev A, Pise-Masison CA, Radonovich M, Hoffmann SC, Hirshberg B, Brady JN, Harlan DM (Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology* 143:3695-3698.2002).
- Shapiro H, Shachar S, Sekler I, Hershfinkel M, Walker MD (Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 335:97-104.2005).
- Sheu L, Pasyk EA, Ji J, Huang X, Gao X, Varoqueaux F, Brose N, Gaisano HY (Regulation of insulin exocytosis by Munc13-1. *J Biol Chem* 278:27556-27563.2003).
- Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH (Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *J Biol Chem* 273:32487-32490.1998a).
- Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH (Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. *J Biol Chem* 273:3547-3550.1998b).
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445:881-885.2007).
- Song F, Srinivasan M, Aalinkeel R, Patel MS (Use of a cDNA array for the identification of genes induced in islets of suckling rats by a high-carbohydrate nutritional intervention. *Diabetes* 50:2053-2060.2001).

- Song Y, Niu T, Manson JE, Kwiatkowski DJ, Liu S (Are variants in the CAPN10 gene related to risk of type 2 diabetes? A quantitative assessment of population and family-based association studies. *Am J Hum Genet* 74:208-222.2004).
- Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, Chen S, McGarry JD (Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97:2728-2735.1996).
- Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD (The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100:398-403.1997).
- Steneberg P, Rubins N, Bartoov-Shifman R, Walker MD, Edlund H (The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1:245-258.2005).
- Straub SG, Sharp GW (Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18:451-463.2002).
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW (Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346.2005).
- Sukumaran S, Barnes RI, Garg A, Agarwal AK (Functional characterization of the human 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase isoform 10/glycerol-3-phosphate acyltransferase isoform 3. *J Mol Endocrinol* 42:469-478.2009).
- Tajiri Y, Moller C, Grill V (Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology* 138:273-280.1997).
- Tan CP, Feng Y, Zhou YP, Eiermann GJ, Petrov A, Zhou C, Lin S, Salituro G, Meinke P, Mosley R, Akiyama TE, Einstein M, Kumar S, Berger JP, Mills SG, Thornberry NA, Yang L, Howard AD (Selective small-molecule agonists of G protein-coupled receptor 40 promote glucose-dependent insulin secretion and reduce blood glucose in mice. *Diabetes* 57:2211-2219.2008).
- Tanaka Y, Gleason CE, Tran PO, Harmon JS, Robertson RP (Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10857-10862.1999).
- Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S (Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742.1997).
- Unger RH (Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44:863-870.1995).

- Unger RH, Grundy S (Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28:119-121.1985).
- Valera A, Solanes G, Fernandez-Alvarez J, Pujol A, Ferrer J, Asins G, Gomis R, Bosch F (Expression of GLUT-2 antisense RNA in beta cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem* 269:28543-28546.1994).
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG (Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91:79-118.2011).
- van de Werve G, Lange A, Newgard C, Mechin MC, Li Y, Berteloot A (New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem* 267:1533-1549.2000).
- van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA (Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1:368-371.1992).
- Van der Vusse GJ, Roemen TH (Gradient of fatty acids from blood plasma to skeletal muscle in dogs. *J Appl Physiol* 78:1839-1843.1995).
- Van Nieuwenhoven FA, Van der Vusse GJ, Glatz JF (Membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins. *Lipids* 31 Suppl:S223-227.1996).
- Vancura A, Haldar D (Purification and characterization of glycerophosphate acyltransferase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 269:27209-27215.1994).
- Voet D, Voet JG (1995) *Biochemistry*: United States: John Wiley & Sons Inc.
- Wadden TA, Neiberg RH, Wing RR, Clark JM, Delahanty LM, Hill JO, Krakoff J, Otto A, Ryan DH, Vitolins MZ (Four-year weight losses in the Look AHEAD study: factors associated with long-term success. *Obesity (Silver Spring)* 19:1987-1998.2011).
- Wang H, Iynedjian PB (Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4372-4377.1997).
- Wang S, Lee DP, Gong N, Schwerbrock NM, Mashek DG, Gonzalez-Baro MR, Stapleton C, Li LO, Lewin TM, Coleman RA (Cloning and functional characterization of a novel mitochondrial N-ethylmaleimide-sensitive glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT2). *Arch Biochem Biophys* 465:347-358.2007).
- Wang X, Li H, De Leo D, Guo W, Koshkin V, Fantus IG, Giacca A, Chan CB, Der S, Wheeler MB (Gene and protein kinase expression profiling of reactive oxygen

- species-associated lipotoxicity in the pancreatic beta-cell line MIN6. *Diabetes* 53:129-140.2004).
- Webb GC, Akbar MS, Zhao C, Steiner DF (Expression profiling of pancreatic beta cells: glucose regulation of secretory and metabolic pathway genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5773-5778.2000).
- Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A (Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50 Suppl 1:S154-159.2001).
- WHO (Diabetes. Fact Sheet 312. August 2011).
- Williams CH, Oikarinen S, Tauriainen S, Salminen K, Hyoty H, Stanway G (Molecular analysis of an echovirus 3 strain isolated from an individual concurrently with appearance of islet cell and IA-2 autoantibodies. *J Clin Microbiol* 44:441-448.2006).
- Wing RR (Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial. *Arch Intern Med* 170:1566-1575.2010).
- Winzell MS, Strom K, Holm C, Ahren B (Glucose-stimulated insulin secretion correlates with beta-cell lipolysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1:S11-16.2006).
- Xu H, Wilcox D, Nguyen P, Voorbach M, Suhar T, Morgan SJ, An WF, Ge L, Green J, Wu Z, Gimeno RE, Reilly R, Jacobson PB, Collins CA, Landschulz K, Surowy T (Hepatic knockdown of mitochondrial GPAT1 in ob/ob mice improves metabolic profile. *Biochem Biophys Res Commun* 349:439-448.2006).
- Yet SF, Lee S, Hahm YT, Sul HS (Expression and identification of p90 as the murine mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Biochemistry* 32:9486-9491.1993).
- Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, Otonkoski T, Kandolf R, Hovi T, Roivainen M (Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* 47:225-239.2004).
- Yonezawa T, Katoh K, Obara Y (Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7. *Biochem Biophys Res Commun* 314:805-809.2004).
- Zhou YP, Grill VE (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* 93:870-876.1994).
- Zhou YP, Ling ZC, Grill VE (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* 45:981-986.1996).

Zhou YP, Marlen K, Palma JF, Schweitzer A, Reilly L, Gregoire FM, Xu GG, Blume JE, Johnson JD (Overexpression of repressive cAMP response element modulators in high glucose and fatty acid-treated rat islets. A common mechanism for glucose toxicity and lipotoxicity? J Biol Chem 278:51316-51323.2003).