



*L'ensemble des causes d'un
phénomène est inaccessible à
l'intelligence humaine, mais le
besoin de rechercher ces causes est
inscrit dans l'âme de l'homme. Et
l'intelligence, étant incapable de
saisir la multiplicité et la complexité
des conditions d'un phénomène, dont
chacune peut paraître la cause,
s'empare de la plus proche, de la
plus facile à comprendre, et déclare :
voilà la cause.*

LÉON TOLSTOÏ,
La Guerre et la Paix,
Livre IV, 2^e partie, Chapitre I

*[...] trèèèè lennntemennnt Joe. C'est
comme ça qu'y faut faire : trèèèè
lennntemennnt.*

LES PIERRAFEU (doublage québécois),
4^e saison, Épisode 15

Université de Montréal

**Effets directs et aigus de médicaments
insulinosensibilisateurs sur la cellule bêta
des îlots pancréatiques : de l'outil de recherche à
l'identification de la décélération métabolique comme
mode d'action**

par

Julien Lamontagne

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en biochimie

Août, 2012

© Julien Lamontagne, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Effets directs et aigus de médicaments insulinosensibilisateurs sur la cellule bêta des
îlots pancréatiques : de l'outil de recherche à l'identification de la décélération
métabolique comme nouveau mode d'action

Présentée par :
Julien Lamontagne

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Benoît Coulombe, président-rapporteur
Dr Marc Prentki, directeur de recherche
Dr Jean-Louis Chiasson, membre du jury
Dr Frédéric Picard, examinateur externe
Dr Ali Ahmad, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) apparaît lorsque la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots du pancréas ne parvient plus à compenser la résistance à l'insuline des organes cibles. Parmi les médicaments disponibles pour traiter le DT2, deux classes agissent en améliorant la sensibilité à l'insuline : les biguanides (metformine) et les thiazolidinediones (pioglitazone et rosiglitazone). Des études suggèrent que ces médicaments protègent également la fonction des cellules β . Dans le but d'identifier des mécanismes par lesquels les médicaments insulinosensibilisateurs protègent les cellules β , nous avons étudié les effets aigus de la metformine et de la pioglitazone sur le métabolisme et la fonction des cellules INS 832/13, sécrétrices d'insuline et des îlots pancréatiques isolés de rats. Nous avons aussi validé *in vivo* avec des rats Wistar les principales observations obtenues en présence de pioglitazone grâce à des clamps glucidiques et par calorimétrie indirecte.

Le traitement aigu des cellules β avec de la pioglitazone ou de la metformine inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose en diminuant la sensibilité des cellules au glucose (inhibition en présence de concentrations intermédiaires de glucose seulement). Dans les mêmes conditions, les traitements inhibent aussi plusieurs paramètres du métabolisme mitochondrial des nutriments et, pour la pioglitazone, du métabolisme des lipides. Les composés affectent le métabolisme en suivant un patron d'inhibition similaire à celui observé pour la sécrétion d'insuline, que nous avons nommé « décélération métabolique ». La capacité de la pioglitazone à inhiber la sécrétion d'insuline et à ralentir le métabolisme mitochondrial de façon aiguë se confirme *in vivo*.

En conclusion, nous avons identifié la décélération métabolique de la cellule β comme nouveau mode d'action pour les médicaments insulinosensibilisateurs. La décélération métabolique causée par les agents insulinosensibilisateurs les plus utilisés semble provenir d'une inhibition du métabolisme mitochondrial et pourrait être impliquée dans les bienfaits de ceux-ci dans un contexte de stress métabolique. Le fait que les deux agents insulinosensibilisateurs étudiés agissent à la fois sur la sensibilité à l'insuline et sur la sécrétion d'insuline, les deux composantes majeures

du DT2, pourrait expliquer pourquoi ils sont parmi les agents antidiabétiques les plus efficaces. La décélération métabolique est une approche thérapeutique à considérer pour le traitement du DT2 et d'autres maladies métaboliques.

Mots clés : Diabète de type 2, Cellule bêta pancréatique, Sécrétion d'insuline, Métabolisme, Thiazolidinedione, Pioglitazone, Metformine, AMPK, PPARgamma, Décélération métabolique.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) appears when insulin secretion by pancreatic β -cells fails to compensate for insulin resistance. Two classes of anti-diabetic drugs have been used to target insulin resistance: biguanides (metformin) and thiazolidinediones (pioglitazone and rosiglitazone). Some studies suggest that these compounds also protect β -cell function. In order to identify the mechanisms whereby insulin-sensitizing agents protect β -cell function, we used INS 832/13 insulin secreting cells and isolated pancreatic rat islets to study the acute effects of pioglitazone and metformin on β -cell metabolism and function. Key observations obtained with pioglitazone were also validated *in vivo* in Wistar rats with the use of glucose clamps and indirect calorimetry.

In vitro, acute pioglitazone or metformin treatment inhibits glucose-induced insulin secretion by lowering β -cell sensitivity to glucose (inhibition only at sub-maximal glucose concentrations). The same treatments also inhibit parameters of nutrient mitochondrial metabolism and, in the case of pioglitazone, parameters of lipid metabolism. Both compounds alter metabolism following a pattern similar to that observed with insulin secretion, a pattern that we label “metabolic deceleration”. Pioglitazone also acutely inhibits insulin secretion and slows down mitochondrial metabolism *in vivo*.

In conclusion, we identified metabolic deceleration of the pancreatic β -cell as a new mode of action for insulin-sensitizing agents. Pioglitazone and metformin both seem to cause metabolic deceleration of the β -cell via inhibition of mitochondrial metabolism. This mode of action could participate in the beneficial effects of these compounds in the context of metabolic stress. The fact that these drugs affect both insulin sensitivity and insulin secretion, the two major components of T2D, may explain why they are among the most powerful anti-diabetic agents. Metabolic deceleration is a new therapeutic approach worth considering for the treatment of T2D and other metabolic diseases.

Keywords: Type 2 diabetes, Pancreatic beta-cell, Insulin secretion, Metabolism, Thiazolidinedione, Pioglitazone, Metformin, AMPK, PPARgamma, Metabolic deceleration.

Table des matières

Résumé	vii
Abstract.....	ix
Table des matières	xi
Liste des tableaux	xiv
Liste des figures.....	xv
Abréviations.....	xvii
Remerciements	xix
Introduction	1
1. Le diabète de type 2.....	1
1.1. Aperçu de l'homéostasie glucidique.....	1
1.2. Les facteurs qui affectent l'insulinémie.....	2
1.3. Prévalence, incidence et coûts du diabète.....	5
1.4. Types de diabète	5
1.5. Pathogenèse du diabète de type 2	6
1.6. Étiologie du diabète de type 2	8
2. Sécrétion d'insuline induite par le glucose.....	12
2.1. Caractéristiques générales	12
2.2. Voie de déclenchement.....	13
2.3. Voies d'amplification par le métabolisme mitochondrial et l'anaplérose..	15
2.4. Modèle de la voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longues chaînes	18
2.5. Causes de la détérioration de la fonction des cellules β dans le développement du diabète de type 2.....	21
3. Traitement du diabète de type 2	23
3.1. Aperçu des différentes approches.....	23
3.2. Présentation de la metformine et des biguanides.....	27
3.3. La metformine et la cellule β pancréatique	31
3.4. Présentation de la pioglitazone et des thiazolidinediones	33
3.5. La pioglitazone et la cellule β pancréatique	36
4. Hypothèse et buts.....	38

4.1. Hypothèse.....	38
4.2. Objectifs :.....	39
Résultats.....	41
5. Premier article.....	41
5.1. Présentation du premier article.....	41
5.2. Premier article.....	43
5.3. Effets aigus de la metformine sur la fonction et le métabolisme de la cellule β – résultats supplémentaires accompagnant le premier article.....	77
5.4. Retour critique sur le premier article.....	84
6. Deuxième article.....	88
6.1. Présentation du deuxième article.....	88
6.2. Deuxième article.....	90
6.3. Résultats supplémentaires accompagnant le deuxième article.....	119
6.4. Retour critique sur le deuxième article.....	120
Discussion.....	125
7. Retour sur les résultats.....	125
7.1. Observations <i>in vitro</i>	125
7.2. Observations <i>in vivo</i>	126
8. Origines et conséquences des effets aigus de la pioglitazone et de la metformine sur le métabolisme et la fonction des cellules β	127
8.1. Inhibition du complexe I par les agents insulinosensibilisateurs.....	127
8.2. Autres cibles mitochondriales pour les thiazolidinediones.....	132
8.3. Liaison des thiazolidinediones à PPAR γ	134
8.4. Autre cible potentielle pour la metformine.....	136
8.5. Activation de l'AMPK par les agents insulinosensibilisateurs.....	137
8.6. Effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme.....	139
8.7. Inhibition de la voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline.....	143
8.8. Inhibition des voies d'amplification de la sécrétion d'insuline.....	144
8.9. Activation des voies qui freinent la sécrétion d'insuline.....	147
8.10. Modèles proposés.....	149
9. Origines et conséquences des effets aigus de la pioglitazone et de la metformine sur la protection des cellules β contre les stress métaboliques.....	152

9.1. Le concept de la décélération métabolique.....	152
9.2. Limites de l'application du concept de la décélération métabolique.....	157
9.3. Bénéfices de la décélération métabolique pour la cellule β	161
9.4. Bénéfices de la décélération métabolique pour l'organisme	165
9.5. Cibler l'hyperinsulinémie dans le traitement du diabète de type 2?.....	169
9.6. Rôle de l'activation de PPAR γ dans la cellule β	172
9.7. Mise à jour du modèle du mode d'action des thiazolidinediones.....	174
10. Conclusions	177
10.1. Retour sur les principaux résultats.....	177
10.2. Originalité, intérêt des découvertes et contribution à l'avancement des connaissances.....	178
10.3. Considérations sur de nouvelles approches thérapeutiques.....	179
10.4. Suite à donner aux travaux	180
Bibliographie	185
Annexe A – Estimation de la concentration intracellulaire de metformine.....	xxi

Liste des tableaux

Tableau I – Liste partielle des gènes de susceptibilité au diabète de type 2..... 11

Tableau II – Liste partielle des composés antidiabétiques..... 27

Liste des figures

Figure 1 – Maturation de la proinsuline en insuline et peptide C à l’intérieur des granules de sécrétion.....	4
Figure 2 – Relation hyperbolique entre la sécrétion d’insuline et la sensibilité à l’insuline chez l’humain.....	8
Figure 3 – Modèle de la voie de déclenchement de la sécrétion d’insuline.....	14
Figure 4 – Modèle de la voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne proposé pour l’amplification de la sécrétion d’insuline par les lipides.....	17
Figure 5 – Régulation et rôles de l’AMPK.....	20
Figure 6 – Structure de quelques molécules antidiabétiques reliées à la classe des biguanides et à celle des thiazolidinediones.....	28
Figure 7 – Schéma simplifié du métabolisme énergétique mitochondrial.....	131
Figure 8 – Modèles proposés pour expliquer les effets aigus de la pioglitazone et de la metformine sur le métabolisme et la fonction des cellules β	151
Figure 9 – Schéma des effets de différentes interventions qui modifient l’énergie intracellulaire disponible sur la sécrétion d’insuline induite par le glucose et l’accumulation de métabolites dans la cellule β	155
Figure 10 – Modèle révisé des effets des thiazolidinediones sur l’homéostasie glucidique.....	177

Figures supplémentaires accompagnant les articles présentés

Figure S1 – La metformine s’accumule lentement dans les cellules INS 832/13.....	78
Figure S2 – La metformine inhibe l’oxydation des carburants en CO ₂ des cellules INS 832/13.....	80
Figure S3 – La metformine diminue le potentiel de membrane mitochondrial des cellules INS 832/13 selon le patron de la décélération métabolique.....	81
Figure S4 – La metformine diminue la détection des dérivés réactifs de l’oxygène dans les cellules INS 832/13.....	82
Figure S5 – La metformine inhibe la sécrétion d’insuline induite par le glucose selon le patron de la décélération métabolique, mais est sans effet sur la libération de	

glycérol par les cellules INS 832/13.....	84
Figure S6 – L’administration aigüe de pioglitazone tend à diminuer la concentration d’acides gras libres et de triacylglycérols en circulation chez le rat Wistar au cours de clamps hyperglycémiques.....	119

Abréviations

ADP : adénosine diphosphate

AICAR : aminoimidazole carboxamide ribonucléotide

AMP : adénosine monophosphate

AMPC : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

AMPK : kinase activée par l'AMP

BSA : albumine sérique bovine

CB1 : récepteur des cannabinoïdes 1

CDK5 : kinase dépendante des cyclines 5

CISD1/mitoNEET : *CDGSH iron sulfur domain 1* (ou mitoNEET)

Cycle GL/AGL : cycle glycérolipides/acides gras libres

DHAP : dihydroxyacétone phosphate (ou glycérone-3-phosphate)

DMSO : diméthylsulfoxyde

DPP-4 : dipeptidylpeptidase-4

DT2 : Diabète de type 2

FAD/FADH₂ : flavine adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)

GLP-1 : *glucagon-like peptide-1*

HE : dihydroéthidium

IC₅₀ : concentration à laquelle un composé diminue de moitié une activité donnée

IDE : enzyme de dégradation de l'insuline

K_{ATP} : canal potassique dépendant de l'ATP

K_M : constante de Michaelis

LKB1 : kinase B1 du foie (ou sérine/thréonine kinase 11)

NAD⁺/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme oxydée/forme réduite)

OCT1 : transporteur de cations organiques 1

PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

SGLT2 : cotransporteur sodium/glucose 2

TZD : thiazolidinedione

VDCC : canal calcique dépendant du voltage

À Christian

Remerciements

Six ans d'études et deux publications à titre de premier auteur ont demandé des efforts de plusieurs autres personnes que de moi-même, dont en premier lieu **Marc Prentki**. Merci Marc pour ces nombreuses séances de motivation, de psychologie, d'orientation au choix de carrière, et bien sûr de formation en recherche scientifique. Merci d'avoir su créer un environnement si favorable à l'apprentissage dans votre laboratoire. Merci enfin pour toutes les opportunités que vous avez mises sur ma route, au laboratoire et dans la diffusion de nos travaux ici et à l'étranger.

Merci à **Erik Joly** pour sa disponibilité, ses nombreux conseils et son expertise scientifique. Merci à **Chris Nolan** pour son esprit analytique et sa patience d'exception. Merci à **Murthy Madiraju** et **Marie-Line Peyot** pour leur expertise scientifique. Merci à **Roxane Lussier** pour ses connaissances approfondies en toutes sortes de détails techniques essentiels, pour sa disponibilité effrayante et surtout pour le plaisir de travailler à ses côtés. Merci à **Johane Morin** de permettre au laboratoire de fonctionner.

Merci à **Vincent Poitout** pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses excellentes idées. Merci à **Thierry Alquier** pour son expertise scientifique. Merci à **Mélanie Ethier** et **Grace Fergusson** pour leur expertise technique et leur professionnalisme exemplaire.

Merci aux étudiants, collègues et amis du laboratoire de Marc Prentki, du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, de l'Institut du cancer de Montréal et du Centre de recherche du diabète de Montréal pour les nombreuses discussions stimulantes et les environnements de travail agréables. J'aimerais remercier en particulier **Annie Barbeau** et **Claudiane Guay**, qui m'ont initié aux techniques utilisées dans le laboratoire, et **Émilie Pepin**, qui a contribué aux résultats inclus dans cette thèse.

Merci aux membres du jury pour leur révision minutieuse de cette thèse.

Merci à **Anne-Hélène**, ma blonde qui est devenue ma femme, d'accepter mes horaires erratiques. Merci enfin à **bébé dragon**, devenue Louise Lamontagne alias poussin vorace, dont l'arrivée imminente a insufflé un peu d'urgence salutaire dans la rédaction de cette thèse.

Introduction

1. Le diabète de type 2

1.1. Aperçu de l'homéostasie glucidique

Le diabète est une maladie insidieuse au développement lent et aux symptômes souvent subtils : une soif et une faim persistantes, une urine anormalement abondante, une vision brouillée, de la fatigue et une perte de poids (Beaser 2007). Dans sa forme la plus fréquente, les symptômes sont causés par un dérèglement de l'homéostasie du glucose, le principal carburant de l'organisme. Cette apparente bénignité est sans doute derrière le fait qu'environ le tiers des personnes atteintes de diabète ignorent leur état (Beaser 2007).

Tous les types cellulaires de l'organisme sont en mesure d'utiliser le glucose comme source d'énergie. Il est même l'unique carburant des érythrocytes et, à moins d'un jeûne prolongé, des neurones (Watford et Goodridge 2000), qui sont ainsi particulièrement sensibles à l'hypoglycémie. Les conséquences d'une hypoglycémie sur le système nerveux central sont graves, voire fatales (Halimi 2010). Par contre, une augmentation transitoire de la glycémie est relativement sans risque. Après tout, notre glycémie augmente après chaque repas le temps que le corps gère le nouvel apport de nutriments (DeFronzo 2004). L'hyperglycémie chronique engendre toutefois une panoplie de complications qui vont des maladies cardiovasculaires à l'insuffisance rénale en passant par la cécité et l'amputation (Collectif 1993; Beaser 2007). Une glycémie supérieure ou égale à 7,0 mmol/L à jeun ou supérieure ou égale à 11,1 mmol/L deux heures après un repas sont des critères de diagnostic du diabète sucré (Association canadienne du diabète 2008). Une partie du glucose n'est pas réabsorbé par la filtration rénale lorsque la glycémie dépasse les 9 à 10 mmol/L. L'hypertonie du sang (Silbernagl et Despopoulos 2001) et de l'urine (Beaser 2007) provoquent respectivement la soif persistante et l'urine abondante qui caractérisent le diabète.

Le maintien de l'homéostasie glucidique dépend d'un nombre important de variables qui incluent l'absorption des nutriments, la capacité des organes à capter le glucose, le contrôle de la production endogène de glucose et la sécrétion de

différentes hormones, en particulier l'insuline et le glucagon (DeFronzo 2004). Ces deux hormones peptidiques proviennent du pancréas endocrine, dont les cellules sont regroupées en structures nommées « îlots de Langerhans ». Les îlots de mammifères sont généralement composés à environ 60 % de cellules β , qui produisent l'insuline, et à 20-30 % de cellules α , qui produisent le glucagon (Jones et Persaud 2010).

Les principaux rôles de l'hormone insuline dans le contrôle de l'homéostasie glucidique sont de 1) réguler l'entrée du glucose dans les muscles et dans une moindre mesure les tissus adipeux, 2) d'inhiber la production endogène de glucose par le foie, 3) d'inhiber la lipolyse par les adipocytes et 4) d'inhiber la sécrétion de glucagon (DeFronzo 2004; Unger et Cherrington 2012). L'action de l'insuline passe par l'activation de son récepteur, exprimé à la surface de la plupart des types cellulaires incluant les myocytes squelettiques, les hépatocytes et les adipocytes (Capeau 2003). Le contrôle glycémique est ainsi grandement perturbé en absence d'insuline, ou si la voie de signalisation du récepteur à l'insuline est compromise. Le profil lipidique est également affecté puisque la libération d'acides gras par les adipocytes n'est plus inhibée après un repas (DeFronzo 2004).

Le rôle du glucagon est quant à lui de stimuler la production hépatique de glucose, par la glycogénolyse et la gluconéogenèse, de façon à prévenir l'hypoglycémie en période de jeûne (Watford et Goodridge 2000). Lorsqu'un jeûne se termine, l'insuline supprime la sécrétion de glucagon (Unger et Cherrington 2012). Le glucagon a longtemps été considéré comme une hormone secondaire dans la régulation de l'homéostasie glucidique. Il bénéficie toutefois d'un regain d'attention ces dernières années (Henquin et coll. 2011). L'hyperglucagonémie, due au manque d'insuline, serait à l'origine de la diminution du stockage de glucose dans le foie et de l'augmentation de la production hépatique de glucose chez les patients atteints de diabète de type 1 (Unger et Cherrington 2012). Ainsi, une grande partie des perturbations métaboliques provoquées par l'absence d'insuline pourrait être directement causée par une hyperglucagonémie (Unger et Cherrington 2012).

1.2. Les facteurs qui affectent l'insulinémie

L'insulinémie dépend de la quantité d'insuline sécrétée, qui s'ajuste aux besoins de l'organisme selon sa sensibilité à l'insuline (voir section 1.4), mais

également de la quantité d'insuline retirée de la circulation. La demi-vie de l'insuline est de seulement quatre à six minutes dans la circulation sanguine (Duckworth, Bennett et Hamel 1998). La dégradation, ou clairance de l'insuline (volume de plasma qui peut être nettoyé de l'insuline par unité de temps (Valera Mora et coll. 2003)), fait intervenir : 1) sa liaison à son récepteur; 2) l'internalisation du complexe ligand-récepteur; 3) et la protéolyse de l'hormone par l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE, pour *insulin degrading enzyme*) ou par les lysosomes (Valera Mora et coll. 2003).

Tous les organes qui expriment le récepteur à l'insuline participent à son retrait de la circulation (Valera Mora et coll. 2003). Le foie est toutefois particulièrement impliqué (Michael et coll. 2000). Près de 50 % de l'insuline est retirée de la circulation par le foie après un premier passage dans la veine porte (Duckworth, Bennett et Hamel 1998). Les reins ont également un rôle majeur dans ce processus, par la filtration glomérulaire et par la liaison de l'insuline à son récepteur (Valera Mora et coll. 2003). La dégradation de l'insuline est donc un phénomène quantitativement important. C'est également un phénomène qui varie sensiblement d'un individu à l'autre et d'une condition physiologique/pathophysiologique à l'autre (Duckworth, Bennett et Hamel 1998).

L'insulinémie augmente généralement chez les individus obèses de façon à compenser une augmentation de la résistance à l'insuline (voir section 1.4). Certains chercheurs proposent que l'augmentation de l'insuline en circulation soit principalement due à une diminution de la clairance de l'insuline (Erdmann et coll. 2012). Chez les individus atteints de diabète de type 2, la diminution de la clairance de l'insuline est importante (Erdmann et coll. 2012). En condition d'hyperinsulinémie chronique, la clairance hépatique de l'insuline diminue entre autres à cause d'une diminution de l'expression des récepteurs à l'insuline à la surface des hépatocytes (Valera Mora et coll. 2003).

Comment peut-on comparer la quantité réelle d'insuline sécrétée par un organisme si la clairance de l'hormone est importante et varie d'un individu à l'autre? Une réponse se trouve dans le peptide C, qui est un sous-produit de la maturation de la proinsuline en insuline dans les granules de sécrétion (Davidson 2004). Telle que schématisée à la **figure 1**, la proinsuline est composée d'une seule chaîne peptidique

contenant trois ponts disulfures. La prohormone est clivée en trois peptides à l'intérieur des granules de sécrétion par les enzymes proprotéine convertase 1 et 2, et la carboxypeptidase E. Les chaînes A et B demeurent retenus ensemble grâce aux ponts disulfures et forment l'insuline mature, alors que le peptide qui les relie, le peptide C, est libéré (Davidson 2004). L'insuline et le peptide C sont donc produits et sécrétés en quantités équimolaires. Toutefois, le peptide C est relativement stable en circulation (Steiner 2004) et il est principalement retiré du sang par les reins, grâce à la filtration glomérulaire (Valera Mora et coll. 2003). La demi-vie du peptide C est ainsi beaucoup plus longue que celle de l'insuline, ce qui en fait un marqueur intéressant pour évaluer la sécrétion d'insuline.

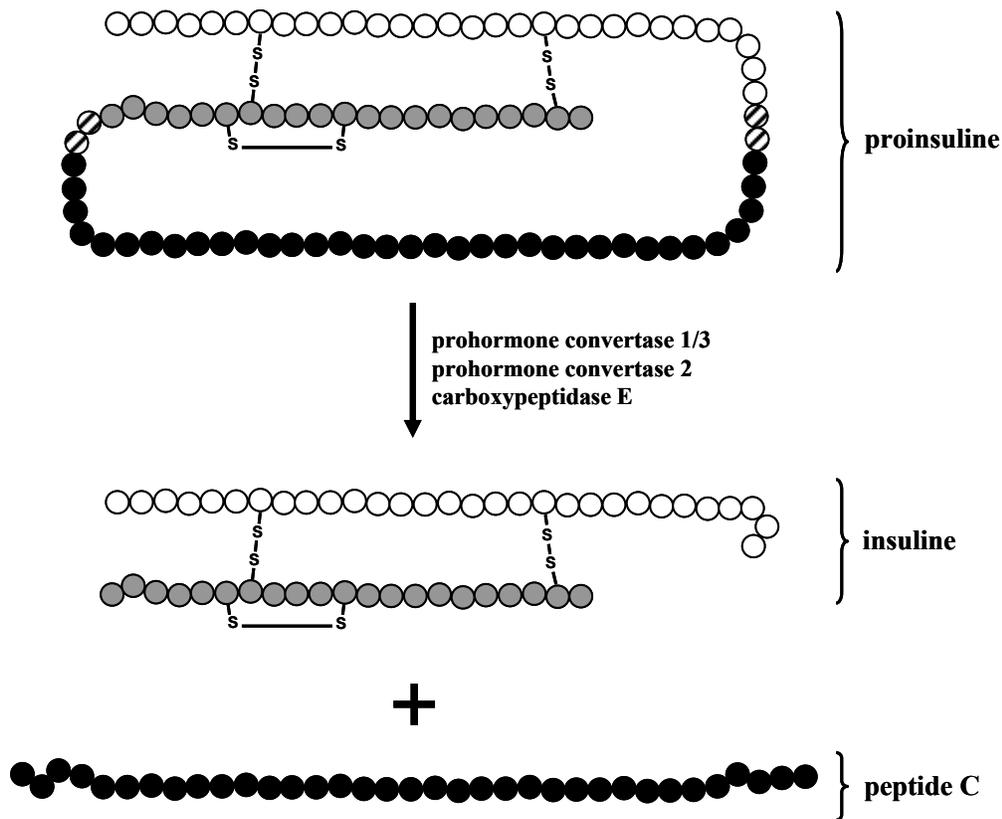


Figure 1 – Maturation de la proinsuline en insuline et peptide C à l'intérieur des granules de sécrétion. Les acides aminés de la chaîne A sont schématisés par des cercles gris, ceux de la chaîne B par des cercles blancs et ceux du peptide C par des cercles noirs. Les cercles hachurés indiquent les acides aminés qui sont excisés lors du processus de maturation. Ce schéma est adapté de *(Pro)Insulin processing: a historical perspective* de Howard Davidson (Davidson 2004).

1.3. Prévalence, incidence et coûts du diabète

Une méta-analyse effectuée en 2010 par Shaw et coll. estimait la prévalence du diabète à 6,4 % des adultes à l'échelle mondiale (Shaw, Sicree et Zimmet 2010). Au Canada, les derniers chiffres disponibles à l'Agence de la santé publique du Canada (2006-2007) font état d'environ deux millions de Canadiens touchés, soit 6,2 % de la population (ASPC 2009). Si les pourcentages impressionnent, le nombre de nouveaux cas est encore plus frappant : 211 168 en 2006-2007 au Canada. Entre 2002 et 2006, la prévalence du diabète aurait ainsi augmenté d'environ 20 %. Toutes les tranches d'âge ne sont pas affectées de la même façon. Alors que 2 % des Canadiens dans la trentaine sont touchés, la proportion grimpe à 23 % chez les personnes âgées de 75-79 ans (ASPC 2009).

Le traitement adéquat du diabète est un enjeu important dû à la pression énorme qu'un contrôle inadéquat fait porter sur les systèmes de santé. Les personnes atteintes de diabète sont en effet hospitalisées une fois et demie à trois fois plus souvent que la population générale (Beaser 2007). D'après une étude commandée par l'Association canadienne du diabète, le fardeau financier associé au diabète au Canada a été projeté à plus de 12,2 milliards de dollars en 2010. Les coûts directs de la maladie, soit ceux engendrés par l'utilisation du système de santé (hospitalisations et visites médicales) et l'achat de médicaments, auraient alors représenté environ 3,5 % des dépenses en santé publique au Canada (Somerville 2009).

1.4. Types de diabète

Le mot « diabète » fait référence à un état pathologique caractérisé par une élimination excessive d'urine et une soif intense (Robert, Rey et Rey-Debove 1990). Dans la très grande majorité des cas, le diabète est provoqué par un dérèglement de l'homéostasie du glucose. Il existe quatre grands types de diabète lié à l'homéostasie glucidique, ou diabète sucré. Dans le premier cas, la capacité de l'organisme à sécréter l'insuline est abolie suite à la destruction de la majorité des cellules β des îlots du pancréas. Il s'agit généralement d'une réaction auto-immunitaire dirigée contre les cellules β (Beaser 2007). Ce type de diabète est appelé **diabète de type 1** ou insulino-dépendant, ou encore diabète juvénile étant donné qu'il se manifeste le

plus souvent chez les jeunes (Beaser 2007). Environ 10 % des cas de diabète sucré sont de type 1 (Beaser 2007).

Dans le second cas, la maladie apparaît lorsque la sécrétion d'insuline devient insuffisante pour compenser la résistance à l'insuline des organes périphériques et inhiber la production endogène de glucose. La résistance à l'insuline peut se définir comme une réponse biologique subnormale à une concentration donnée d'insuline (Surampudi, John-Kalarickal et Fonseca 2009). Il s'agit alors de **diabète de type 2 (DT2)**, qui représente de 80 à 90 % des cas (Laakso 2008), et apparaît généralement après 40 ans (Beaser 2007).

L'inadéquation entre la sécrétion d'insuline et la résistance à l'insuline peut se manifester lors de circonstances qui augmentent la résistance à l'insuline, comme lors d'une grossesse. Dans ce dernier cas, l'intolérance au glucose est transitoire et il est alors question de **diabète gestationnel** (Buchanan et Xiang 2005), qui représente le troisième type de diabète sucré. De 3 à 5 % des femmes enceintes seraient affectées, des femmes qui sont ensuite à risque élevé de développer un DT2 (Ben-Haroush, Yogev et Hod 2004). Les enfants de ces femmes sont également plus susceptibles d'obésité et de DT2 (Buchanan et Xiang 2005). Le quatrième type regroupe les cas qui découlent d'une cause spécifique, par exemple associés à un gène en particulier. Quelques-uns de ces cas sont présentés à la section 1.6.

1.5. Pathogenèse du diabète de type 2

La pathogenèse du DT2 fait intervenir deux composantes majeures : 1) une diminution de la fonction des cellules β du pancréas et 2) une augmentation de la résistance à l'insuline (Beaser 2007). En d'autres termes, il y a inadéquation entre l'insuline sécrétée et la quantité requise pour contrôler la glycémie. La sécrétion d'insuline a normalement la capacité de s'adapter rapidement aux changements de sensibilité à l'insuline de façon à maintenir une tolérance normale au glucose (Kahn 2003). Dans une population saine, qui présente une tolérance normale au glucose, la relation entre la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline a l'aspect d'une courbe hyperbolique (**figure 2**) (Kahn et coll. 1993; Kahn 2003). C'est-à-dire que le produit de la sécrétion d'insuline et de la sensibilité à l'insuline est une constante, qui a été nommée « indice de disposition du glucose » (traduction libre de *glucose*

disposition index) (Bergman et coll. 2002). Un individu dont la sensibilité à l'insuline diminue conserve une tolérance normale au glucose en augmentant sa sécrétion d'insuline (déplacement du point A au point B sur le graphique) grâce à un phénomène de compensation des cellules β (Reaven 1988; Kahn 2003; Prentki et Nolan 2006). Différentes conditions ou circonstances ont un impact sur la résistance à l'insuline, dont une prédisposition génétique, l'obésité, certains médicaments comme les inhibiteurs de protéases utilisés contre le VIH (Carr et coll. 1998), la puberté (Bloch, Clemons et Sperling 1987) et le fait d'être enceinte. En effet, au dernier trimestre d'une grossesse, les femmes ont une résistance à l'insuline qui rejoint celle mesurée chez des patients atteints de DT2 (Buchanan et Xiang 2005). De même, environ les deux tiers des individus obèses présentent une résistance à l'insuline supérieure à la moyenne (Gauthier et Ruderman 2010). Pourtant, de nombreux individus obèses et résistants à l'insuline (Nolan, Damm et Prentki 2011) et la très grande majorité des femmes enceintes (Ben-Haroush, Yogeve et Hod 2004) maintiennent leur « indice de disposition du glucose » et conservent une tolérance normale au glucose. Chez ces personnes, une augmentation de la masse et de la fonction des cellules β permet une compensation parfaite de la sécrétion d'insuline face à l'augmentation de la résistance à l'insuline (Prentki et Nolan 2006).

Chez certains individus résistants à l'insuline, la compensation des cellules β n'est toutefois pas suffisante pour maintenir une tolérance normale au glucose ou une glycémie normale à jeun (Weir et Bonner-Weir 2004). Cette condition est représentée à la **figure 2** par la lettre C et correspond à un état prédiabétique, défini par l'Association canadienne du diabète comme une situation où la glycémie se situe entre 6,1 et 6,9 mmol/L à jeun ou entre 7,8 et 11,0 mmol/L deux heures après une hyperglycémie provoquée. L'état prédiabétique est déjà associée à une décompensation des cellules β causée par une dysfonction (perte de la première phase de sécrétion d'insuline), à une altération de leur phénotype (dédifférenciation) (Weir et Bonner-Weir 2004) et à une diminution de leur masse (Butler et coll. 2003). Cette situation peut être stable pendant plusieurs années (Weir et Bonner-Weir 2004). Cependant, sous la pression de certains facteurs qui affectent les cellules β ou la résistance à l'insuline, et avec l'âge, la sécrétion d'insuline peut devenir nettement insuffisante pour contrôler la glycémie. Il est alors question de perte de compensation

des cellules β et l'état diabétique apparaît (Unger et Grundy 1985; Prentki et Nolan 2006). Cette condition est représentée à la **figure 2** par la lettre D. L'incapacité des cellules β à compenser la résistance à l'insuline est donc un élément clé de l'apparition du DT2 (Prentki et Nolan 2006). De même, une intervention qui aurait pour but d'empêcher le développement du DT2 chez une personne à risque devrait freiner ou prévenir la décompensation des cellules β (DeFronzo et Abdul-Ghani 2011).

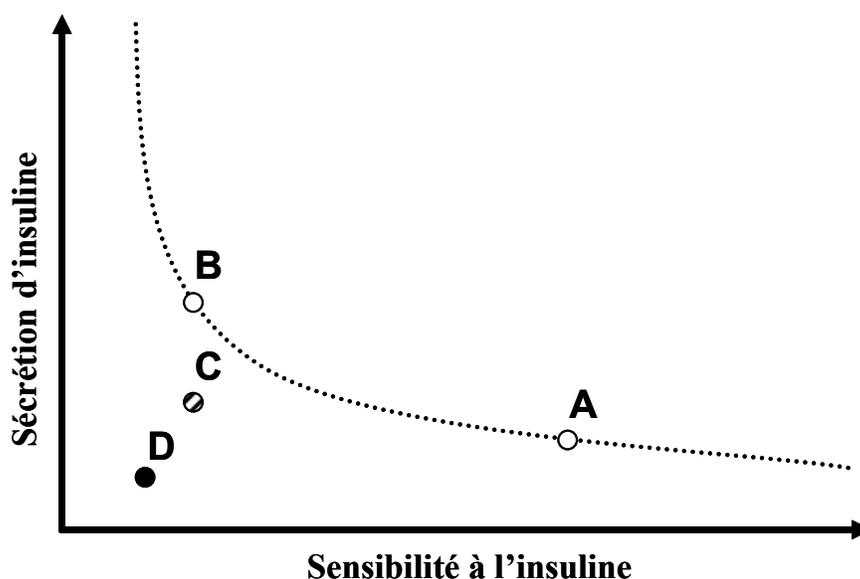


Figure 2 – Relation hyperbolique entre la sécrétion d'insuline et la sensibilité à l'insuline chez l'humain. Les points A et B (cercles blancs), qui se situent sur la courbe, présentent l'adaptation attendue d'un individu sain qui passe d'une situation de bonne sensibilité à l'insuline (A) à une situation de sensibilité réduite (B). Le point C (cercle hachuré) correspond à un état prédiabétique. Chez les patients atteints de DT2 (point D, cercle noir), la sécrétion d'insuline est nettement insuffisante par rapport à la diminution de la sensibilité à l'insuline. Adapté de *The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes* de Steven Kahn (Kahn 2003).

1.6. Étiologie du diabète de type 2

Les facteurs à l'origine de la détérioration de la résistance à l'insuline et de la décompensation des cellules β incluent des éléments modifiables (diète, sédentarité, tabagisme, pollution, additifs alimentaires, etc.) et non modifiables (génétique, âge, antécédent de diabète gestationnel, faible poids à la naissance, etc.) (Laakso 2008;

Alonso-Magdalena, Quesada et Nadal 2011; Corkey 2012). La cause principale de l'épidémie actuelle de DT2 est sans doute la surabondance chronique de nourriture hautement calorigénique affectant des individus sédentaires et prédisposés génétiquement (Nolan, Damm et Prentki 2011).

Le DT2 est une maladie polygénique. Il existe toutefois plusieurs cas monogéniques de diabète, classés dans le diabète de causes spécifiques. Ces cas se regroupent sous les appellations de diabète néonatal (Greeley et coll. 2010), MODY (*maturity onset diabetes in the young*) (Steck et Winter 2011) ou MIDD (*maternally inherited diabetes and deafness*) (Maassen 2002). Le diabète néonatal apparaît avant l'âge de six mois et tire le plus souvent son origine d'une mutation spontanée dans un des gènes codant pour une des deux sous-unités du canal potassique dépendant de l'ATP (K_{ATP}) (Greeley et coll. 2010). Le canal K_{ATP} est essentiel au contrôle de la sécrétion d'insuline par la cellule β (voir section 2.2). Les cas de MODY sont héréditaires (autosomales dominantes), se manifestent à un âge précoce et se caractérisent par une sécrétion d'insuline déficiente (Steck et Winter 2011). Le sous-type MODY2 par exemple, est causé par une mutation dans le gène codant pour l'enzyme glucokinase, retrouvée dans les hépatocytes et les cellules β du pancréas (Froguel et coll. 1993). La glucokinase a un rôle majeur dans la régulation du métabolisme du glucose et, comme nous le verrons à la section 2.2, est impliquée de près dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Matschinsky 1990). Les autres sous-types de MODY connus sont pour la plupart associés à des mutations dans des gènes de facteurs de transcription clés exprimés dans les cellules β pancréatiques (MODY1, gène du facteur nucléaire des hépatocytes 4α (*HNF4A*) (Yamagata et coll. 1996); MODY3, gène *HNF1A* (Yamagata et coll. 1996); MODY4, gène du facteur promoteur de l'insuline 1 (*IPF-1*, aussi nommé *Pdx-1*) (Stoffers et coll. 1997); MODY5, gène *HNF1B* (Horikawa et coll. 1997); MODY6, gène *NEUROD1* (Malecki et coll. 1999)); MODY7, gène *KLF11* (Fernandez-Zapico et coll. 2009); MODY9, gène *PAX4* (Plengvidhya et coll. 2007). Trois autres sous-types de MODY ont été décrits : MODY8, causé par une mutation du gène codant pour la lipase des carboxyl esters qui affecte d'abord le pancréas exocrine (Raeder et coll. 2006); MODY10, lié à une mutation du gène de l'insuline (Edghill et coll. 2008; Molven et

coll. 2008) et MODY11, dû à une mutation du gène *BLK* codant pour une protéine tyrosine kinase dont l'activité augmente l'expression du facteur de transcription IPF-1 (Borowiec et coll. 2009). La prévalence des MODY serait de 1 à 2 % dans la population européenne (Ledermann 1995). Les cas de MIDD ont aussi une prévalence d'environ 1 % et sont liés à une mutation de l'ADN mitochondrial qui cause, entre autres effets, une dysfonction des cellules β et une perte de leur masse (Murphy et coll. 2008).

Le DT2 est quant à lui associé à un ensemble de gènes de susceptibilités pour lesquels on retrouve des variations alléliques qui ont chacune un impact très faible sur le risque d'être atteint de la maladie, mais qui sont fréquentes dans la population (Vaxillaire et Froguel 2010). Plusieurs de ces gènes de susceptibilité ont été identifiés récemment grâce aux importantes avancées technologiques dans les domaines de la génétique, de la génomique et de la biostatistique, entre autres par des études d'association pangénomiques (Frayling 2007). En 2011, une quarantaine de gènes de susceptibilité au DT2 étaient confirmés et plusieurs autres étaient en voie de l'être (Nolan, Damm et Prentki 2011). Le **tableau I** présente une liste de quelques-uns de ces gènes, choisis pour leur importance ou leur lien avec le présent travail. Comme pour les formes monogéniques de diabète, les variants rapportés affectent presque exclusivement la capacité des cellules β à sécréter l'insuline (Vaxillaire et Froguel 2010). Le fait que les variants alléliques qui augmentent les risques de DT2 soient nombreux et se retrouvent fréquemment dans la population suggère une importante hétérogénéité dans l'étiologie de l'hyperglycémie (O'Rahilly, Barroso et Wareham 2005; Vaxillaire et Froguel 2010). Cette hétérogénéité est accrue par les modifications épigénétiques associées à l'environnement *in utero* (problématique dans le cas d'une sous-alimentation de la mère par exemple), par le bagage épigénétique qui témoigne du mode de vie des générations précédentes et par les millions de gènes de la flore intestinale, différente d'un individu à l'autre (Burcelin et coll. 2011; Nolan, Damm et Prentki 2011; Katada, Imhof et Sassone-Corsi 2012). Certains chercheurs considèrent d'ailleurs le DT2 comme un syndrome plutôt qu'une maladie étant donnée son importante diversité étiologique (Robertson 2009; Herder et Roden 2011).

Tableau I – Liste partielle des gènes de susceptibilité au diabète de type 2

Protéine (Gène) – Rôle	Variant	Effet sur activité	Conséquence pathologique	Références
PPAR-γ (<i>PPARG</i>) – Récepteur nucléaire, favorise le stockage des lipides (Tontonoz, Hu et Spiegelman 1994)	Pro12Ala	↓ avec Pro	↑ résistance à l'insuline	(Altshuler et coll. 2000; Gouda et coll. 2010)
Kir6.2 (<i>KCNJ11</i>) – Sous-unité des canaux potassique K_{ATP} (voir section 2.2)	Glu23Lys	↑ avec Lys	↓ sécrétion d'insuline	(Nielsen et coll. 2003)
TCF7L2 (<i>TCF7L2</i>) – Facteur de transcription associé à la voie de signalisation <i>Wnt</i>	C→T au site rs7903146 (intron)	↑ avec T	↓ sécrétion d'insuline ↓ prolifération des cellules β	(Cauchi et coll. 2007; Shu et coll. 2008)
ZnT8 (<i>SLC30A8</i>) – Transporteur de cations, important pour le transport du zinc dans les cellules β	Arg325Trp	↓ avec Trp	↓ sécrétion d'insuline	(Frayling 2007; Vaxillaire et Froguel 2010)
GCK (<i>GCK</i>) – Catalyse la première réaction glycolytique dans les cellules β et les hépatocytes	?	?	↓ fonction β pancréatique	(Dupuis et coll. 2010)

2. Sécrétion d'insuline induite par le glucose

2.1. Caractéristiques générales

Les mécanismes moléculaires à la base de la sécrétion d'insuline ne sont pas encore totalement élucidés. Selon Jean-Claude Henquin, la cellule β est aujourd'hui perçue comme un « senseur de carburants, électriquement excitable, sous contrôle hormonal et nerveux » (traduction libre; Henquin 2009). Le principal carburant en question est le glucose (Nolan et Prentki 2008). Toutefois, différents mécanismes permettent de moduler la sécrétion d'insuline induite par le glucose selon les quantités circulantes des autres nutriments utilisables comme carburant (acides aminés (Newsholme, Gaudel et McClenaghan 2010) et lipides (Nolan et coll. 2006)) et en fonction de certains signaux hormonaux (hormones incrétones (Drucker 2006), glucagon (Mayhew, Wright et Ashmore 1969), somatostatine (Youos 2011)) et nerveux (Thorens 2010). Pour provoquer l'exocytose des granules contenant l'insuline, ces mécanismes doivent soit mener à un influx intracellulaire de calcium, ou agir une fois la concentration cytoplasmique de calcium augmentée. Il est ainsi question de différentes voies de sécrétion d'insuline induite par le glucose : une voie de déclenchement, qui permet l'influx de calcium et qui est basée sur le catabolisme du glucose, et des voies d'amplification, qui modulent la quantité d'insuline sécrétée (Henquin 2000).

À moins d'activer un récepteur membranaire (par exemple les acides gras à longues chaînes qui lient le récepteur FFAR1 couplé aux protéines G pour augmenter la sécrétion d'insuline (Nolan et coll. 2006)) ou de dépolariser la cellule (comme peuvent le faire l'arginine et l'alanine (Henquin 2009)), les nutriments doivent être métabolisés par la cellule β pour déclencher (glucose) ou amplifier (glucose, acides gras, acides aminés et corps cétoniques) la sécrétion d'insuline. Les molécules qui font le lien entre le métabolisme des nutriments et la libération des granules de sécrétion sont appelées « facteurs de couplage métabolique » (Newgard et McGarry 1995).

Cette biologie complexe, à laquelle participent le métabolisme des différents nutriments, l'électrophysiologie et les mécanismes d'exocytose, a l'avantage d'offrir

de nombreuses possibilités d'ajustements fins sur lesquelles peuvent intervenir les signaux extracellulaires hormonaux et nerveux. Elle permet aussi deux autres caractéristiques de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, à savoir 1) son aspect biphasique, comprenant une première phase de libération d'insuline rapide (<15 min) et quantitativement importante, et une seconde phase de sécrétion soutenue et plus faible (Henquin 2009); et 2) son aspect pulsatile, avec des cycles d'amplitudes variables d'une durée d'environ trois à quatre minutes (Hellman 2009). Chez les patients atteints de DT2, la première phase de sécrétion d'insuline en réponse au glucose est absente et les oscillations de la deuxième phase sont défectueuses (Wajchenberg 2010). Les prochaines sections présentent un survol des aspects biochimiques des modèles proposés pour la voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et pour quelques voies d'amplification.

2.2. Voie de déclenchement

La voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline, souvent appelée voie dépendante des canaux K_{ATP} ou encore voie classique, est illustrée à la **figure 3**. Cette voie implique le métabolisme du glucose et fait intervenir l'ATP comme facteur de couplage, plus précisément l'ATP d'origine mitochondriale (Malmgren et coll. 2009). Deux enzymes sont particulièrement importantes dans la capacité des cellules β à doser efficacement le glucose en circulation : le transporteur de glucose GLUT2 et la glucokinase (hexokinase IV). Le transporteur GLUT2 possède un K_M élevé pour le glucose (autour de 13 mmol/L; faible affinité), qui permet un équilibre des concentrations de glucose de part et d'autre de la membrane plasmique (Burant et Bell 1992). Quant à la glucokinase, elle phosphoryle le glucose dans la première réaction de la glycolyse, qui est également l'étape limitante de cette voie métabolique (Matschinsky et coll. 2011). La glucokinase possède aussi un K_M élevé pour le glucose (8 mmol/L) et elle n'est pas inhibée par son produit de réaction (le glucose-6-phosphate), permettant une modulation de son activité en fonction des concentrations physiologiques de glucose (Matschinsky et coll. 2011). Il s'agit du véritable senseur de glucose de la cellule β (Matschinsky 1990). Ainsi, l'utilisation du glucose est modulée sur une large fenêtre de concentrations physiologiques (3 à 20 mmol/L), permettant déjà un ajustement de la sécrétion (Nolan et Prentki 2008).

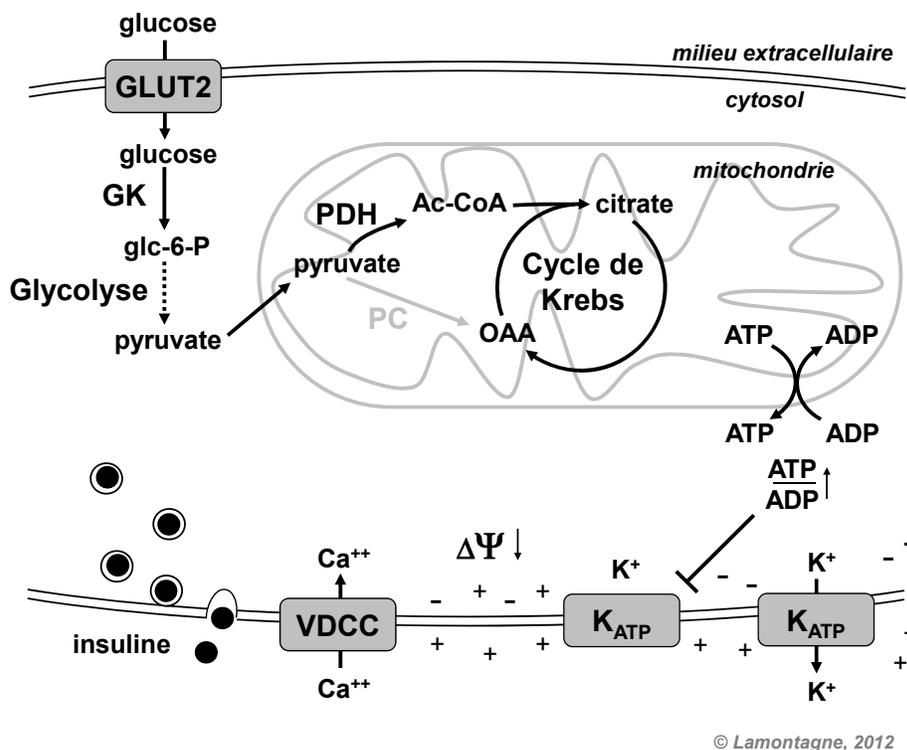


Figure 3 – Modèle de la voie de déclenchement de la sécrétion d’insuline. Voir la section 2.2 pour la description détaillée du modèle. Ac-CoA, acétyl-CoA; $\Delta\Psi$, potentiel de membrane; GK, glucokinase; glc-6-P, glucose-6-phosphate; K_{ATP} , canal potassique dépendant de l’ATP; OAA, oxaloacétate; PDH, complexe pyruvate déshydrogénase, VDCC, canal calcique dépendant du voltage.

La glycolyse produit du pyruvate, qui entre dans les mitochondries. Dans la cellule β , environ la moitié du pyruvate mitochondrial est oxydé en acétyl-CoA par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase et utilisé dans le cycle de Krebs (MacDonald 1993). L’autre moitié est convertie en oxaloacétate par l’enzyme pyruvate carboxylase dans une réaction dite anaplérotique (qui ajoute des intermédiaires métaboliques au cycle de Krebs (Owen, Kalhan et Hanson 2002)). Cette seconde réaction sera abordée à la section 2.3. Les réactions du cycle de Krebs fournissent des équivalents réduits utilisés dans la chaîne de transport d’électron pour la synthèse d’ATP (phosphorylation oxydative). L’augmentation de la concentration cytosolique de ce facteur de couplage, et en particulier l’augmentation du ratio ATP:ADP, mène à la fermeture des canaux potassique dépendants de l’ATP (canaux K_{ATP}). La fermeture des canaux K_{ATP} dépolarise la cellule β et ouvre les canaux calcique dépendants des différences de potentiel électrique de type L (canaux VDCC,

pour *voltage-dependent calcium channel*) (Ashcroft et Rorsman 1990; Prentki 1996). À noter que le déclenchement de la sécrétion par la dépolarisation de la cellule β peut se faire de façon artificielle, en augmentant la concentration extracellulaire de potassium (Gembal, Gilon et Henquin 1992) ou par l'ajout d'une concentration supraphysiologique d'arginine (Nolan et Prentki 2008).

L'influx de calcium, en présence d'ATP et d'AMPC, active les dernières étapes de la sécrétion d'insuline permettant l'exocytose des granules de sécrétion (Kasai et coll. 2010). L'exocytose des granules de sécrétion implique le réarrangement des protéines du cytosquelette ainsi que celui de plusieurs protéines à la surface des vésicules et à la surface interne de la membrane plasmique (Wang et Thurmond 2009).

2.3. Voies d'amplification par le métabolisme mitochondrial et l'anaplérose

D'autres molécules d'origine mitochondriale ont été proposées comme facteur de couplage métabolique (Maechler et coll. 2010). Le flux d'électrons dans la membrane interne des mitochondries génère de l'anion superoxyde, un dérivé réactif de l'oxygène qui est rapidement converti en peroxyde d'hydrogène par l'enzyme superoxyde dismutase (Nicholls et Ferguson 2002). Le peroxyde d'hydrogène a été identifié comme un second messager (Rhee 2006). Plusieurs groupes ont observé une augmentation de la concentration de peroxyde d'hydrogène dans la cellule β avec une augmentation de la concentration de glucose et ont associé les concentrations de peroxyde d'hydrogène à la sécrétion d'insuline (Pi et coll. 2007; Leloup et coll. 2009). Ces groupes ont émis l'hypothèse selon laquelle le peroxyde d'hydrogène est un facteur de couplage métabolique. D'autres ont toutefois obtenu des résultats opposés (Martens et coll. 2005; Sarre et coll. 2012). Nous ajoutons notre contribution à ce débat à la section 8.8.

Comme mentionné plus haut, la production d'acétyl-CoA pour faire tourner le cycle de Krebs n'est pas le seul sort métabolique des carbones du glucose dans la cellule β . D'autres voies métaboliques sont importantes, autant en terme de flux qu'en terme d'implication dans les mécanismes d'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Deux autres possibilités sont abordées ici : 1) la carboxylation

du pyruvate en oxaloacétate dans la mitochondrie (anaplérose), permettant à des intermédiaires du cycle du Krebs de sortir de la mitochondrie (cataplérose) et 2) la formation de glycérol-3-phosphate à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) dans le cytosol.

Les réactions anaplérotiques ont été abondamment étudiées dans la cellule β et sont à l'origine de plusieurs modèles de voies d'amplification de la sécrétion d'insuline (Prentki et coll. 1992; Chen et coll. 1994; Schuit et coll. 1997; Farfari et coll. 2000; MacDonald 2003; Cline et coll. 2004; Jensen et coll. 2006; Guay et coll. 2007). Barbara Corkey et Marc Prentki ont proposé un de ces modèles, nommé « voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne » (Corkey et coll. 1989) et présenté dans une forme actualisée à la **figure 4**. Dans ce modèle, l'oxaloacétate anaplérotique est condensé à l'acétyl-CoA pour produire du citrate par l'enzyme citrate synthase dans la première réaction du cycle de Krebs. Le citrate en surplus quitte la mitochondrie par le transporteur des tricarboxylates puis est clivé en oxaloacétate et en acétyl-CoA par l'enzyme ATP-citrate lyase. L'acétyl-CoA est ensuite carboxylé en malonyl-CoA par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase. Étant peu utilisé pour la synthèse d'acides gras dans la cellule β (le complexe enzymatique acide gras synthase y est peu exprimé), le malonyl-CoA s'accumule et inhibe l'enzyme carnitine-palmitoyl transférase-1, responsable de l'entrée dans la mitochondrie des acyls-CoA à longue chaîne (étape limitante dans la β -oxydation des lipides). L'accumulation du malonyl-CoA permet ainsi de modifier la répartition lipidique dans la cellule β , en freinant leur oxydation au profit de voies anaboliques. Les acyls-CoA sont alors utilisés, entre autres, pour la synthèse des glycérolipides et des esters de cholestérol. Les acides gras libres (Olofsson et coll. 2004), les acyls-CoA (Deeney et coll. 2000), les diacylglycérols (Alcazar et coll. 1997) et de nombreuses autres molécules de signalisation lipidique (Prentki et Madiraju 2008) produites par cette voie ont été proposées pour amplifier la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Le malonyl-CoA est donc considéré ici comme le facteur de couplage métabolique, puisqu'il relie le métabolisme du glucose à la production de molécules de signalisation lipidique provenant d'un changement dans la répartition des lipides (inhibition de leur oxydation et augmentation de leur estérification).

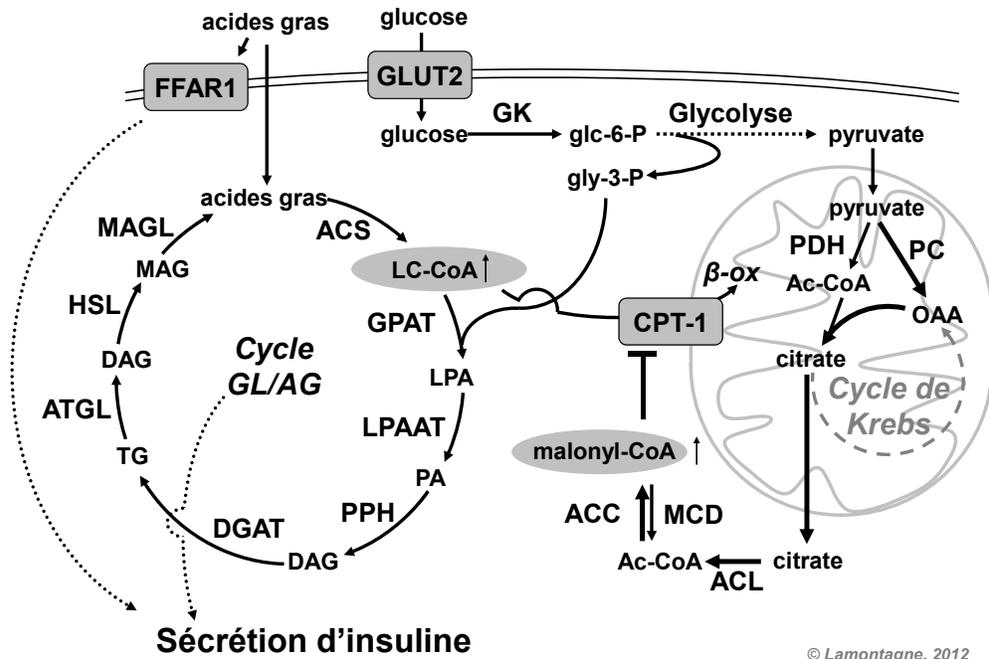


Figure 4 – Modèle de la voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne proposé pour l'amplification de la sécrétion d'insuline par les lipides. Voir la section 2.3 pour la description détaillée du modèle. MAG, monoacylglycérol; MAGL, lipase du monoacylglycérol; HSL, lipase hormonosensible; ACC, acétyl-CoA carboxylase; Ac-CoA, acétyl-CoA; ACL, ATP citrate lyase; ACS, acyl-CoA synthétase; ATGL, lipase adipocytaire du triacylglycérol; DAG, diacylglycérol; DGAT, diacylglycérol acyl transférase; FFAR1, récepteur des acides gras 1 (GPR40); GK, glucokinase; glc-6-P, glucose-6-phosphate; gly-3-P, glycérol-3-phosphate; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase; LC-CoA, acyl-CoA à longue chaîne; LPA, acide lysophosphatidique; LPAAT, acide lysophosphatidique acyl transférase; MCD, malonyl-CoA décarboxylase; OAA, oxaloacétate; PA, acide phosphatidique; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate déshydrogénase, PPH, acide phosphatidique phosphohydrolase; TG, triacylglycérol.

La synthèse des glycérolipides requiert du glycérol-3-phosphate, qui est produit à partir du DHAP, un intermédiaire de la glycolyse, par l'isoforme cytosolique de l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase (**figure 4**). Le glycérol-3-phosphate sert de squelette sur lequel sont ajoutés des acyls-CoA par estérification jusqu'à l'obtention de triacylglycérol (figure 4; Nelson, Cox et Lehninger 2008)). La cellule β ne stocke pas de grandes quantités de triacylglycérol, mais l'hydrolyse plutôt en acides gras libres et en glycérol, créant un cycle d'estérification et de lipolyse (cycle glycérolipides/acides gras libres (GL/AGL)) (Nolan et coll. 2006; Prentki et Madiraju 2012). L'activité du cycle GL/AGL génère

de nombreuses molécules de signalisation lipidique identifiées ou proposées comme modulateurs de la sécrétion d'insuline (monoacylglycérol, diacylglycérol, acide phosphatidique, etc.) (Nolan et coll. 2006; Prentki et Madiraju 2008; Prentki et Madiraju 2012). En conditions normales, la cellule β exprime peu l'enzyme glycérol kinase (Noel et coll. 1997) et le glycérol, ne pouvant être phosphorylé à nouveau, est éliminé à l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire des transporteurs aquaglycéroporines (Matsumura et coll. 2007). Le dosage du glycérol extracellulaire est ainsi une méthode indirecte de mesure de l'activité lipolytique.

Le glycérol-3-phosphate participe également au transfert d'équivalents réduits du cytosol à la mitochondrie de façon à stimuler la phosphorylation oxydative, la synthèse d'ATP et donc la sécrétion d'insuline (Bender et coll. 2006). En effet, le glycérol-3-phosphate peut être réoxydé en DHAP par l'isoforme mitochondriale de l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase. La réaction permet la réduction du cofacteur flavine adénine dinucléotide, forme oxydée (FAD), qui transfère ensuite ses électrons directement à l'ubiquinone dans la chaîne de transport d'électrons (Nicholls et Ferguson 2002). Ce mécanisme, appelé navette glycérol-3-phosphate, permet également de réoxyder le NADH et de soutenir la glycolyse (Prentki 1996). Le NAD^+ sert en effet de cofacteur à la sixième réaction de la glycolyse, catalysée par l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Nelson, Cox et Lehninger 2008).

2.4. Modèle de la voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longues chaînes

Plusieurs études ont testé le modèle du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne notamment en modifiant l'expression de certaines enzymes clés dans la cellule β . Entre autres études, notre laboratoire a surexprimé l'enzyme malonyl-CoA décarboxylase responsable de la réaction inverse de celle catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Roduit et coll. 2004) et a surexprimé une forme de l'enzyme carnitine-palmitoyl transférase-1 insensible au malonyl-CoA (Herrero et coll. 2005). Les manipulations moléculaires ont donné des résultats en accord avec le modèle, à savoir qu'une augmentation de l'oxydation des acides gras et une diminution de la quantité d'acides gras libres et d'acides gras incorporés à des glycérolipides sont clairement associées à une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Roduit et coll. 2004; Herrero et coll. 2005).

Le projet à l'origine de la présente thèse a débuté dans la lignée des études tentant de réfuter ou d'enrichir le modèle du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne. Pour compléter les résultats obtenus avec des outils de biologie moléculaire, nous avons utilisé une approche pharmacologique ayant pour cible la kinase activée par l'AMP (AMPK) (Lamontagne 2006). Comme schématisé à la **figure 5**, l'AMPK est une sérine/thréonine kinase qui agit tel un senseur de l'état énergétique de la cellule (Hardie 2011). L'AMPK est une protéine hétérotrimérique, composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices, β et γ . Elle est activée en conditions de restriction énergétique par 1) une augmentation des ratios ADP:ATP et AMP:ATP et par 2) la phosphorylation de la thréonine 172 (position chez l'humain) de la sous-unité α par certaines kinases dont l'enzyme LKB1 (Hardie 2011). Son activité favorise les voies cataboliques, productrices d'énergie et inhibe celles qui en consomment (Ruderman et Prentki 2004). Par exemple, l'AMPK phosphoryle et inhibe les enzymes acétyl-CoA carboxylase (présentée plus haut, importante pour la synthèse *de novo* des acides gras et la répartition lipidique) et hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (étape limitante de la synthèse du cholestérol) (Carling, Zammit et Hardie 1987). L'inhibition de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase diminue la quantité de malonyl-CoA cytosolique, ce qui relâche l'inhibition de l'enzyme carnitine palmitoyl transférase-1 et favorise l'oxydation des lipides.

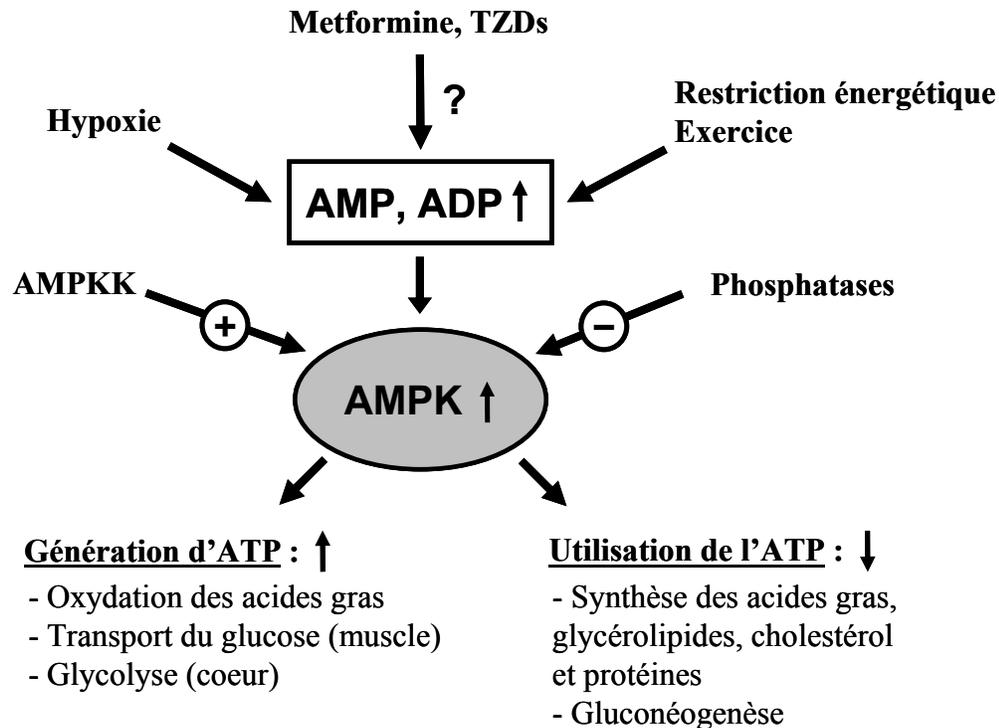


Figure 5 – Régulation et rôles de l'AMPK. L'AMPK est activée en présence de fortes concentrations d'ADP et d'AMP, et de faibles concentrations d'ATP, en étant phosphorylée par une autre kinase (dont LKB1). Son activité stimule les voies cataboliques, productrices d'ATP et inhibe les voies anaboliques, consommatrices d'ATP. Figure adaptée de *AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome* de Neil Ruderman et Marc Prentki (Ruderman et Prentki 2004).

Ainsi, la modulation pharmacologique de l'activité de l'AMPK est un outil intéressant qui offre la possibilité de changer la répartition lipidique en favorisant l'oxydation des acides gras au détriment des voies anaboliques (Ruderman et Prentki 2004). L'approche pharmacologique offre plusieurs avantages sur les approches de biologie moléculaire (ARN interférant et autres manipulations génétiques) : 1) elle permet une altération aigüe du système biologique qui ne fait pas intervenir un réarrangement de l'expression des gènes et une adaptation de la cellule; 2) elle permet un ajustement facile de l'intensité de l'effet par l'ajustement de la dose du composé; 3) elle peut être facilement transposée *in vivo*.

2.5. Causes de la détérioration de la fonction des cellules β dans le développement du diabète de type 2

Les causes de la dégradation continue de la fonction et de la masse des cellules β dans la pathogenèse du DT2 ne sont pas encore totalement élucidées. Il est maintenant clair que les cellules β peuvent être prédisposées génétiquement à un dysfonctionnement. Cela dit, l'épidémie actuelle de DT2 a été associée par plusieurs à la surabondance d'aliments calorigéniques (Leahy 2005; Nolan, Damm et Prentki 2011). Les cellules β seraient-elles particulièrement sensibles à un excès de nutriments? Leur fonction les condamne peut-être à cette susceptibilité. En effet, les cellules β doivent « doser » les nutriments de façon à ajuster la sécrétion d'insuline aux quantités circulantes de carburants. Or, ce dosage des nutriments se fait principalement grâce à leur catabolisme intracellulaire (Malaisse et coll. 1979; Prentki 1996). Les cellules β gèrent ainsi une importante quantité de nutriments, qui produisent une grande variété de métabolites. Certains de ces métabolites modifient négativement les activités cellulaires (directement, par exemple en modifiant la composition des membranes, ou indirectement, en activant des voies de signalisation ou des facteurs de transcription) et d'autres sont hautement réactifs, comme le peroxyde d'hydrogène (Sakai et coll. 2003) ou toxiques, comme les céramides (Lang, Ullrich et Gulbins 2011).

L'hyperglycémie et la dyslipidémie ont toutes deux été associées à la détérioration de la fonction des cellules β (Robertson 2009). Les acides gras sont essentiels à la sécrétion d'insuline (Stein et coll. 1996) et amplifient substantiellement la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Nolan et coll. 2006). Néanmoins, l'exposition chronique à des concentrations élevées d'acides gras a des conséquences néfastes sur la cellule β (McGarry et Dobbins 1999). Par exemple, l'augmentation forcée des concentrations circulantes d'acides gras durant 24 h chez des sujets sains diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Paolisso et coll. 1995). Et d'un point de vue plus mécanistique, la synthèse de céramides à partir de l'acide gras palmitate inhibe l'expression du gène de l'insuline *in vitro* (Kelpe et coll. 2003).

Cela dit, un environnement encore plus délétère pour la cellule β apparaît lorsque l'hyperglycémie s'ajoute à l'hyperlipidémie (El-Assaad et coll. 2003). Cet

environnement est dit « glucolipotoxique » (Prentki et Corkey 1996). En conditions glucolipotoxiques, l'hyperlipidémie s'accompagne d'une quantité stimulante de glucose, qui génère du malonyl-CoA et empêche l'oxydation des acides gras tout en favorisant leur estérification (Prentki et Corkey 1996). Les travaux de notre laboratoire suggèrent que ces changements dans la répartition lipidique conduisent à la perte de fonction des cellules β et éventuellement à leur mort par apoptose (El-Assaad et coll. 2003; El-Assaad et coll. 2010). D'après nos plus récents résultats, l'altération de la répartition lipidique en conditions glucolipotoxiques précéderait des points de vue chronologique et mécanistique les autres perturbations associées à l'hyperglycémie et à l'hyperlipidémie, notamment l'accumulation de céramides, le stress oxydatif et le stress au réticulum endoplasmique (El-Assaad et coll. 2010). Le stress oxydatif et le stress au réticulum endoplasmique sont tous deux associés à l'hypersécrétion d'insuline, une caractéristique de l'état prédiabétique (Aston-Mourney et coll. 2008; Andrikopoulos 2010), et pourraient être impliqués dans la détérioration de la fonction des cellules β .

Rôle du stress oxydatif

L'hyperglycémie chronique entraîne une augmentation de la quantité d'espèces réactives dérivées de l'oxygène dans les cellules β (Robertson et coll. 2004). Les dérivés réactifs de l'oxygène sont entre autres formés par les propriétés oxydantes du glucose lui-même (Robertson et coll. 2004), par des fuites d'électrons de la chaîne de transport à la membrane interne des mitochondries (Nicholls et Ferguson 2002) et par l'activité de l'enzyme NADPH oxydase à la membrane plasmique (Newsholme et coll. 2007). Il est intrigant de constater que les cellules β sont peu outillées pour faire face à ces dérivés réactifs. En effet, relativement à leur importante activité métabolique, les îlots humains et de rongeurs expriment très peu les enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase, responsables de l'élimination des dérivés réactifs de l'oxygène (Tonooka et coll. 2007). De plus, cette capacité antioxydante n'est pas augmentée lorsque les îlots sont incubés en présence de concentrations élevées de glucose (Tonooka et coll. 2007). Pour que le stress oxydatif mène à la dysfonction des cellules β et à leur apoptose, nos travaux suggèrent que l'hyperglycémie doit être accompagnée d'hyperlipidémie (El-Assaad et coll. 2010).

Rôle du stress au réticulum endoplasmique

Puisqu'une cellule β fonctionnelle sécrète de l'insuline en présence de glucose, l'hyperglycémie chronique entraîne une hypersécrétion soutenue d'insuline. Le glucose stimule non seulement la sécrétion d'insuline, mais également l'expression du gène de l'insuline et la biosynthèse de l'hormone (Poitout et coll. 2006). Ainsi, l'hypersécrétion implique un important trafic d'insuline immature le long de la voie de biosynthèse, notamment à l'intérieur du réticulum endoplasmique où trois ponts disulfures doivent être formés sur la proinsuline repliée correctement (Fonseca et coll. 2010). La cellule β est ainsi à risque d'altérations dans l'homéostasie du réticulum endoplasmique, un stress qui peut se traduire par une accumulation de protéines défectueuses (stress du réticulum endoplasmique) et l'activation d'un mécanisme d'adaptation appelé « réponse aux protéines mal repliées » (traduction libre de « *unfolded protein response* ») (Fonseca et coll. 2010). De fait, une surabondance d'acides gras, particulièrement l'acide gras saturé palmitate, en condition d'hyperglycémie constitue un environnement favorable au stress du réticulum endoplasmique dans la cellule β (Karunakaran et coll. 2012). Si le stress est modéré, la cellule s'adapte et continue de sécréter de l'insuline. Si le stress est trop élevé, la réponse aux protéines mal repliées déclenche l'apoptose (Fonseca et coll. 2010). L'ablation génique ou des mutations de différentes protéines impliquées dans cette réponse cellulaire au stress du réticulum endoplasmique conduisent au diabète à la suite d'une déficience des cellules β pancréatiques (Harding et coll. 2001; Ishihara et coll. 2004; Ladiges et coll. 2005).

3. Traitement du diabète de type 2

3.1. Aperçu des différentes approches

Aucun traitement ne permet pour l'instant de guérir du diabète. Au mieux, certaines chirurgies bariatriques permettent de normaliser la glycémie des patients. Les pharmacopées traditionnelles et occidentales offrent toutefois plusieurs agents antidiabétiques oraux qui aident à contrôler la glycémie, réduisent les risques de complications et, pour certains, ralentissent la progression de la maladie (Bailey et Krentz 2010; Yang et coll. 2011; Haddad et coll. 2012). Les principales approches

pharmaceutiques sont de 1) diminuer la résistance à l'insuline, 2) d'augmenter la quantité d'insuline en circulation et 3) de réduire directement l'hyperglycémie (Bailey et Krentz 2010) (**tableau II**). Plusieurs plantes utilisées par les médecines traditionnelles chinoise (Yang et coll. 2011), ayurvédique (Shekelle et coll. 2005) ou amérindienne (Haddad et coll. 2012) ont des effets pouvant tomber dans une ou plusieurs de ces catégories. À l'exception de la berbérine, cette section ne discutera que des médicaments utilisés par la médecine occidentale.

Diminution directe de la glycémie

Plutôt que de cibler les mécanismes pathogéniques du diabète (sécrétion d'insuline déficiente et résistance à l'insuline), une classe de composés s'attaque directement à la glycémie : les inhibiteurs des enzymes α -glucosidases, qui adoucissent les variations postprandiales de glycémie (**tableau II**). Ces molécules, dont l'acarbose, ralentissent la dégradation des glucides complexes et des disaccharides dans l'intestin grêle, ce qui retarde l'absorption du glucose (Hanefeld 2008). L'acarbose améliore le contrôle glycémique chez les patients atteints de DT2, peu importe qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec une autre approche pharmacologique (metformine, sulfonilurées, insuline) (Chiasson et coll. 1994). Son utilisation est malheureusement restreinte car il provoque couramment des flatulences et malaises gastro-intestinaux (Derosa et Maffioli 2012). Puisqu'ils diminuent la glycémie, les inhibiteurs des α -glucosidases pourraient théoriquement protéger la cellule β . Aucune étude ne suggère un tel effet protecteur pour l'instant.

Augmentation de la sécrétion d'insuline

Considérant que le diabète apparaît à la suite d'une incapacité des cellules β à sécréter suffisamment d'insuline, la stimulation pharmacologique de la sécrétion d'insuline est une approche évidente. Deux cibles différentes sont visées sur la cellule β pour ce faire : 1) les sulfonilurées et les meglitinides provoquent la fermeture des canaux K_{ATP} en se liant à leur sous-unité SUR1 (Pfeiffer 2008) et 2) les analogues du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et les inhibiteurs de l'enzyme dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) augmentent la signalisation des récepteurs aux hormones incrétines (Gallwitz et Nauck 2008) (**tableau II**).

Les différents composés insulinothropes ne stimulent pas tous la sécrétion d'insuline de la même façon. Les agents qui bloquent les canaux K_{ATP} sont de

puissants sécrétagogues, qui dépolarisent la cellule β et stimulent la sécrétion d'insuline qu'il y ait présence ou non de glucose (Pfeiffer 2008). Par contre, les composés qui modulent l'activité des récepteurs aux hormones incrétines amplifient la sécrétion d'insuline de façon dépendante du glucose (Gallwitz et Nauck 2008).

Les bienfaits des activateurs des canaux K_{ATP} sur l'homéostasie glucidique ne sont pas durables; l'effet sur la sécrétion d'insuline et le contrôle de la glycémie est rapide et important, mais ces médicaments ne protègent pas à long terme les cellules β contre la détérioration de leur fonction et de leur masse (Holman 2006; Kahn et coll. 2006). L'activation du récepteur au GLP-1 pourrait avoir des effets bénéfiques sur la fonction et la masse des cellules β (Gallwitz et Nauck 2008). Des données recueillies pendant deux ans auprès de patients atteints de DT2 suggèrent une meilleure durabilité du contrôle glycémique chez les utilisateurs d'un analogue du GLP-1 par rapport à ceux d'un sulfonyleurée (Garber et coll. 2011). L'introduction sur le marché de ces agents antidiabétiques est toutefois récente et les études approfondies sur le sujet ne sont pas encore disponibles.

Diminution de la sécrétion d'insuline

De façon paradoxale, des composés qui inhibent la sécrétion d'insuline semblent aussi avoir la capacité d'améliorer le contrôle glycémique chez les individus atteints de DT2. Ces molécules sont en aucun cas utilisées pour traiter le DT2, mais présentent un intérêt certain à la vue des résultats présentés dans cette thèse. Il s'agit du diazoxide (Greenwood, Mahler et Hales 1976), de la somatostatine (Laedtke et coll. 2000) et des agonistes inverses du récepteur aux cannabinoïdes CB1 (rimonabant et ibipinabant (Lynch et coll. 2011)). Le diazoxide, le rimonabant et l'ibipinabant provoquent l'effet inverse des sulfonyleurées : ils ouvrent les canaux K_{ATP} (Trube, Rorsman et Ohno-Shosaku 1986; Lynch et coll. 2011), ce qui se traduit dans la cellule β par une inhibition de la sécrétion d'insuline (Loubatieres, Mariani et Alric 1968). Un traitement de sept jours avec du diazoxide (accompagné d'insuline) permet à des individus atteints de DT2 d'améliorer la fonction de leurs cellules β (Greenwood, Mahler et Hales 1976). Une partie des effets positifs du diazoxide chez les individus atteints de diabète pourrait venir de l'activation des canaux K_{ATP} dans les neurones de l'hypothalamus, inhibant la production endogène de glucose (Kishore et coll. 2011). L'arrêt momentané de la sécrétion d'insuline permet néanmoins de

rétablir la sensibilité des cellules β au glucose (Leahy, Bumbalo et Chen 1994), le ratio proinsuline:insuline, la première phase de libération d'insuline (abolie lors du diabète) et l'aspect pulsatile de cette libération, en plus d'augmenter la quantité d'insuline sécrétée (Laedtke et coll. 2000). Cette approche n'a pas fait l'objet d'études extensives et, à notre connaissance, n'est pas privilégiée pour le développement de nouveaux agents antidiabétiques.

Diminution de la résistance à l'insuline

Enfin, deux classes de médicaments ont pour principal effet de diminuer la résistance à l'insuline : les biguanides (phenformine, buformine, metformine) et les thiazolidinediones (TZDs; troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone) (**tableau II** et **figure 6**). Parmi les molécules mentionnées, seules la metformine, la rosiglitazone et la pioglitazone sont encore disponibles pour traiter le diabète au Canada en 2012. La metformine et les TZDs sont présentés en détail dans les prochaines sections. À priori, ces deux classes de médicaments insulinosensibilisateurs ne partagent pas le même mode d'action. Les TZDs agissent d'abord en favorisant la lipogenèse dans les tissus adipeux (Ye et coll. 2004) alors que l'effet majeur de la metformine vient d'une inhibition de la production hépatique de glucose (Perriello et coll. 1994). Les TZDs et la metformine ont toutefois en commun d'être en mesure d'activer rapidement l'AMPK dans différents types cellulaires (Zhou et coll. 2001; Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002; Saha et coll. 2004; LeBrasseur et coll. 2006), un effet qui, dans les deux cas, pourrait être causé par une inhibition du complexe I de la chaîne de transport d'électron dans les mitochondries (Brunmair et coll. 2004).

L'activation rapide de l'AMPK (Lee et coll. 2006) et l'inhibition du complexe I (Turner et coll. 2008) sont des effets qui ont également été rapportés pour un produit naturel appelé « berbérine ». La berbérine est un alcaloïde retrouvé dans certaines plantes, dont *Coptis chinensis* utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise (Yang et coll. 2011). Un traitement à la berbérine diminue la résistance à l'insuline chez des individus atteints de DT2 (Yin, Xing et Ye 2008). La berbérine n'est pas un médicament antidiabétique utilisé au Canada.

Tableau II – Liste partielle des composés antidiabétiques.

Composés ou classes	Effet	Protection de la fonction β pancréatique?
Inhibiteurs des α -glucosidases	↓ absorption des glucides	Inconnu
Sulfonylurées	↑ sécrétion d'insuline	Non
Meglitinides	↑ sécrétion d'insuline	Non
Analogues du GLP-1	↑ sécrétion d'insuline en présence de glucose ↑ autres effets liés à l'activation du GLP-1R	Peut-être
Inhibiteurs de la DPP-4	↑ sécrétion d'insuline en présence de glucose ↑ autres effets des hormones normalement dégradées par la DPP-4	Peut-être
Metformine	↓ résistance à l'insuline ↓ production hépatique de glucose	Peut-être
Thiazolidinediones	↓ résistance à l'insuline	Oui

GK, glucokinase.

3.2. Présentation de la metformine et des biguanides

Le premier « médicament » pouvant être associé à la classe des biguanides est un extrait de la plante *Galega officinalis*, indigène au pourtour méditerranéen. Il est question de l'utilisation de cette plante pour traiter les symptômes du diabète depuis, au moins, le 17^e siècle (Bailey et Day 2004). Deux principes actifs, capables de diminuer la glycémie chez les patients diabétiques, ont été isolés de cette plante au début du 20^e siècle : la guanidine et la galéine (**figure 6**) (Bailey et Day 2004). Basés sur ces molécules, des composés synthétiques (des diguanides appelés synthalines) sont apparus dès les années 1920 pour le traitement du diabète en Europe (Bailey et Day 2004). Peu efficaces et ayant des effets indésirables importants, les diguanides ont rapidement été éclipsés par l'arrivée de l'insuline, découverte en 1921. Malgré ce contexte, la metformine (ou diméthylbiguanide; **figure 6**) a été synthétisée en 1929 et testée avec succès chez les animaux pour ses propriétés hypoglycémiantes (Bailey et Day 2004). Il faut néanmoins attendre 1957-1958 pour que des études cliniques soient menées avec la metformine et deux biguanides similaires, la phenformine et la buformine (Ungar, Freedman et Shapiro 1957; Mehnert et Seitz 1958; Bailey et Day 2004). Les trois produits ont été commercialisés. Toutefois, la phenformine et la buformine, plus puissantes, ont été retirées du marché à cause de risque important d'acidose lactique (Bailey et Day

2004). La metformine est disponible depuis 1972 au Canada (Campbell 1984) et depuis 1995 aux États-Unis d'Amérique (Bailey et Krentz 2010). Elle est aujourd'hui le médicament antidiabétique le plus fréquemment prescrit à travers le monde (Bailey et Krentz 2010) et fait partie de la liste modèle des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS 2011).

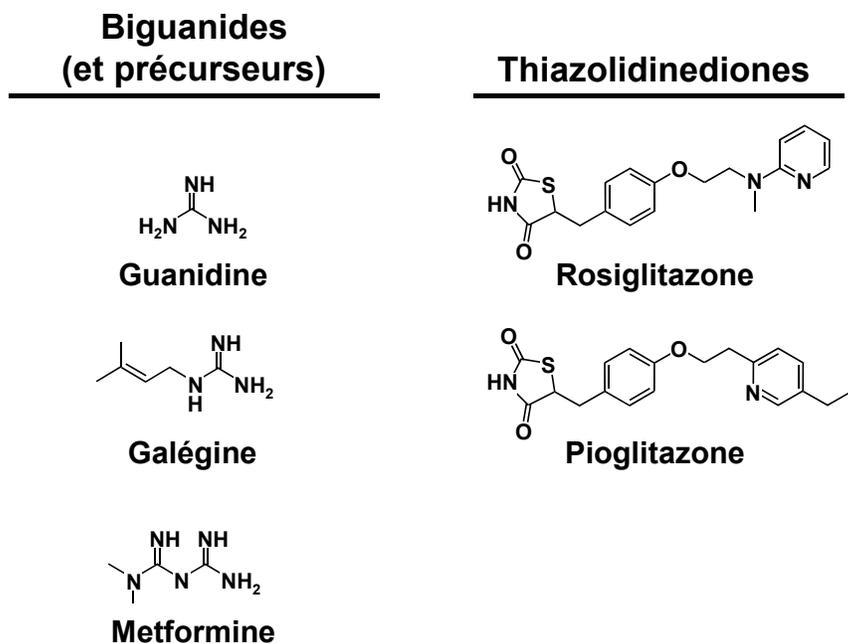


Figure 6 – Structure de quelques molécules antidiabétiques reliées à la classe des biguanides et à celle des thiazolidinediones.

La metformine est une molécule très polaire, porteuse d'une charge positive entre pH 4 et pH 10 (van de Merbel et coll. 1998). Elle traverse ainsi difficilement les membranes biologiques. Sa diffusion est toutefois facilitée en fonction de son gradient électrochimique par des protéines de transport, tel le transporteur de cations organiques OCT1 (*organic cation transporteur 1*) (Wang et coll. 2002; Nies et coll. 2011). L'importance du transporteur OCT1 pour l'efficacité de la metformine a été brillamment démontrée en 2007 lors d'une étude sur la souris déficiente en OCT1 (insensible aux effets bénéfiques de la metformine sur la glycémie à jeun), doublée d'une démonstration des effets de différents variants génétiques chez l'humain, où une faible activité du transporteur a été associée à un faible effet hypoglycémiant de

la metformine (Shu et coll. 2007). En accord avec le fait que le principal effet bénéfique de la metformine soit une réduction de la production hépatique de glucose (Perriello et coll. 1994), OCT1 est principalement exprimé par les hépatocytes (Nies et coll. 2011). D'après le *Beta Cell Gene Atlas*, le transporteur est également exprimé dans les cellules bêta humaines et de rongeurs (T1DBase 2012). La charge positive de la metformine à pH physiologique lui offrirait la possibilité de s'accumuler du côté plus acide d'une membrane lipidique (comme la matrice mitochondriale par rapport à l'espace intermembranaire) (Davidoff 1971). La concentration plasmatique de la metformine administrée à des doses thérapeutiques est de 1 à 15 $\mu\text{mol/L}$ (Bailey et Turner 1996; Regenthal et coll. 1999). Le médicament est éliminé tel quel dans l'urine (Bailey et Krentz 2010).

Effets et mode d'action

Le bénéfice le plus évident de l'utilisation de la metformine sur l'homéostasie glucidique est une diminution de la production hépatique de glucose (Perriello et coll. 1994; Zhou et coll. 2001) sans provoquer d'hypoglycémie (Bailey et Krentz 2010). La diminution de la production hépatique de glucose serait due à une amélioration de la sensibilité à l'insuline des hépatocytes et à une diminution de l'entrée des substrats gluconéogéniques tels que le lactate (Bailey et Krentz 2010). Un traitement à la metformine améliore également le profil lipidique des patients sans augmenter leur masse corporelle (Bailey et Krentz 2010). Notons qu'il diminue généralement l'insulinémie (Stumvoll, Häring et Matthaei 2008).

À l'échelle cellulaire, les effets du médicament sur des hépatocytes, *in vitro*, après 3 à 6 h de traitement, incluent une diminution de la production de glucose, une augmentation de l'oxydation des acides gras et une diminution de l'expression des gènes lipogéniques (*SREBP-1*, *FAS*) (Zhou et coll. 2001). Ainsi, la metformine (0,5 à 1 mmol/L, 24 h) prévient ou réduit l'accumulation de lipides *in vitro* dans les hépatocytes (Zang et coll. 2004) et réduit la stéatose hépatique dans les modèles de souris obèses (Lin et coll. 2000).

La prise de metformine est associée à quelques effets indésirables, les plus fréquents étant des problèmes digestifs (diarrhée, nausée, inconfort abdominal (Bailey et Turner 1996)). Elle est également associée à un faible risque d'acidose lactique qui pourrait être causée par une augmentation de la production de lactate par les organes

périphériques et une inhibition de son utilisation ou de son transport dans le foie (Wang et coll. 2003).

Malgré sa longue histoire et son utilisation intensive, le mécanisme d'action de la metformine n'est toujours pas totalement élucidé. D'après les résultats les plus récents, la metformine diminuerait l'énergie disponible dans les cellules en inhibant le complexe I de la chaîne de transport d'électron (El-Mir et coll. 2000; Owen, Doran et Halestrap 2000; Brunmair et coll. 2004; Dykens et coll. 2008; Stephenne et coll. 2011). Cette seule restriction énergétique serait en mesure de ralentir la gluconéogenèse (Foretz et coll. 2010). La diminution de l'énergie intracellulaire active l'AMPK, une cible indirecte de la metformine connue depuis plusieurs années (Zhou et coll. 2001). Néanmoins, l'activation de l'AMPK n'est pas nécessaire pour observer les bienfaits de la metformine *in vivo*, pas plus que l'activation de la kinase de l'AMPK, LKB1 (Foretz et coll. 2010). L'AMPK (Zhou et coll. 2001) et LKB1 (Shaw et coll. 2005) avaient tour à tour été proposées comme chaînon manquant pour expliquer les effets de la metformine sur la production hépatique de glucose, mais ceci n'est peut-être pas le cas.

L'hypothèse du rôle central de l'inhibition du complexe I dans les effets de la metformine fait face à quelques contradictions ou zones d'ombre. D'abord, d'après l'activité de complexes mitochondriaux isolés de cardiomyocytes bovins et immunoprécipités, l'IC₅₀ pour l'inhibition du complexe I par la metformine est de 66 mmol/L (Dykens et coll. 2008). Il s'agit d'une concentration très élevée, même en supposant une accumulation mitochondriale. Ensuite, en 2002, les groupes de David Carling et Grahame Hardie (les codécouvreurs de l'AMPK) publiaient chacun un article mentionnant l'activation de l'AMPK par la metformine par un mécanisme indépendant d'une augmentation du ratio AMP:ATP (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002; Hawley et coll. 2002). Ces données ont été contredites depuis (Foretz et coll. 2010; Stephenne et coll. 2011), mais suggèrent néanmoins la possibilité d'un mode d'action pour la metformine qui ne fait pas intervenir de changement important dans l'état énergétique de la cellule. Enfin, la metformine normalise l'entrée et le stockage de glucose sous forme de glycogène dans les érythrocytes de patients diabétiques (Yoa et coll. 1993), alors que ces cellules sont dépourvues de mitochondries. En résumé, la metformine agit probablement, du moins en partie, via d'autres

mécanismes que ceux impliquant la mitochondrie (et en particulier le complexe I de la chaîne de transport d'électrons), l'état énergétique de la cellule (et le ratio AMP:ATP) ou l'AMPK.

3.3. La metformine et la cellule β pancréatique

Les effets de la metformine sur la cellule β sont moins bien documentés que ceux sur les hépatocytes. Les résultats de l'étude ADOPT suggèrent une détérioration moins rapide de la fonction des cellules β des patients nouvellement diagnostiqués pour le DT2 avec la metformine qu'avec le glyburide (un sulfonylurée), un effet presque aussi convaincant que celui observé avec la rosiglitazone (Kahn et coll. 2006). Les mêmes observations ont été faites lors d'une étude du *Diabetes Prevention Program Research Group*, qui a quantifié les effets d'une thérapie d'un an à la metformine chez des individus à risque élevé de développer le diabète de type 2. Les patients qui utilisaient la metformine développaient moins le diabète que ceux traités avec un placebo (Kitabchi et coll. 2005). Les effets les plus importants sur la sensibilité à l'insuline et la fonction β pancréatique étaient toutefois observés dans un troisième groupe, contraint à un changement de style de vie impliquant 150 min d'activité physique par semaine et à une diminution de 7 % de leur masse corporelle (Kitabchi et coll. 2005). Les deux groupes avec intervention (pharmacologique ou changement de style de vie) présentaient une insulinémie à jeun réduite, avec un effet plus marqué chez les individus actifs qui perdaient du poids (Kitabchi et coll. 2005). Cette dernière observation laisse supposer qu'un éventuel effet bénéfique de la metformine sur la fonction β pancréatique serait davantage le résultat de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline que d'un quelconque effet pharmacologique sur la cellule β . À moins que les deux interventions ne réduisent la sécrétion d'insuline en améliorant ainsi la sensibilité.

Plusieurs études *in vitro* ont mesuré les effets de la metformine sur la cellule β . La metformine y augmente l'activité de l'AMPK et cet effet proviendrait de l'inhibition du complexe I (Kefas et coll. 2004; Hinke et coll. 2007). Hinke et coll. ont observé à ce sujet que l'ajout de méthyl-succinate (qui fournit des électrons à la chaîne de transport d'électrons via le complexe II sans dépendre de l'activité du complexe I, inhibée par la metformine) à des cellules β en culture corrige l'inhibition

de l'activité mitochondriale provoquée par la metformine et empêche l'activation de l'AMPK (Hinke et coll. 2007).

Si on admet un effet protecteur de la metformine sur la fonction des cellules β , celui-ci pourrait être dû en partie à une diminution de l'apoptose. C'est en effet ce que nous avons observé au laboratoire avec des cellules INS 832/13 cultivées durant 24 heures en conditions glucolipotoxiques. L'ajout de 0,5 mmol/L metformine au milieu de culture prévient la mort des cellules par apoptose, possiblement en favorisant l'oxydation des acides gras grâce à l'activation de l'AMPK (El-Assaad et coll. 2003). D'ailleurs, dans ces expériences, l'utilisation d'un autre activateur de l'AMPK, l'AICAR, produit des effets similaires sur l'apoptose (El-Assaad et coll. 2003). Plusieurs études ont depuis confirmé nos résultats. Un traitement *in vitro* à la metformine (9 μ mol/L, 24 h) réduit l'apoptose mesurée sur des îlots humains isolés de patients diabétiques (Marchetti et coll. 2004). Le même effet a été observé *in vivo* sur des îlots de rats diabétiques nourris avec une diète riche en gras et traités avec de la metformine (Matveyenko et coll. 2009). Toujours *in vivo*, mais cette fois avec des échantillons de donneurs humains, un groupe a également noté qu'elle empêche l'accumulation de vacuoles autophagiques associées à un type particulier de mort cellulaire appelé « mort autophagique » (Masini et coll. 2009). La metformine (9 μ mol/L) protège aussi la fonction d'îlots humains contre les effets d'une concentration élevée de glucose (Lupi et coll. 1999) ou d'acides gras (Lupi et coll. 2002) par des mécanismes qui font intervenir entre autres un rétablissement de l'oxydation normale du glucose (réduite en présence d'acides gras) et des acides gras (augmentée en présence d'acides gras) (Patane et coll. 2000).

Les conséquences fonctionnelles d'un traitement *in vitro* de cellules β à la metformine ne sont toujours pas clairement définies. Au tournant des années 1990, des travaux effectués sur des pancréas isolés de rats et perfusés décrivaient une augmentation de la sécrétion d'insuline en présence de doses de metformine dites « physiologiques » (~10 μ mol/L, traitement aigu) (Gregorio et coll. 1989). Des expériences plus récentes avec des îlots pancréatiques humains ont mené à des observations similaires avec des concentrations plus élevées de metformine (0,2 mmol/L, traitement aigu) (Lupi et coll. 1997). Cependant, l'équipe de Guy Rutter publiait en 2004 qu'un traitement de 16 h de cellules MIN6 et d'îlots humains à la

metformine (1 mmol/L) inhibe de façon importante la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Leclerc et coll. 2004).

3.4. Présentation de la pioglitazone et des thiazolidinediones

La ciglitazone est la première molécule de la classe des TZDs à avoir été mentionnée dans la littérature, en 1983, pour ses effets antidiabétiques (Fujita et coll. 1983). Dans le courant des années 1980 et 1990, plusieurs TZDs ont fait l'objet d'études cliniques et un premier TZD, la troglitazone, a été introduit sur le marché en 1997 (Day 1999). Elle a toutefois rapidement été retirée des tablettes à cause de problèmes de toxicité hépatique (Mudaliar et Henry 2008). Au Canada, deux TZDs sont actuellement disponibles : la pioglitazone et la rosiglitazone (**figure 6**). L'image de ces médicaments a toutefois été ternie ces dernières années par plusieurs études décrivant des effets indésirables peu fréquents, mais inquiétants : l'utilisation de rosiglitazone a été associée à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde (Nissen et Wolski 2007), celle de pioglitazone à une plus grande incidence de cancer de la vessie (Piccinni et coll. 2011) et les deux médicaments augmentent les risques de fracture principalement chez les femmes (Riche et King 2010) et d'insuffisance cardiaque liée à la rétention d'eau (Buckingham et Hanna 2008). Même si l'avenir de cette classe de médicaments est plutôt sombre, d'autres TZDs sont encore en développement (Henriksen et coll. 2011).

Les TZDs sont des composés liposolubles qui traversent facilement les membranes biologiques et ne semblent pas s'accumuler dans les tissus, du moins chez les rongeurs (Fujita et coll. 2003). La pioglitazone et la rosiglitazone sont métabolisées principalement par le foie par l'isoforme CYP2C des cytochromes P450 (Calixto et coll. 2011). Dans le cas de la pioglitazone, plusieurs des métabolites générés ont également des propriétés antidiabétiques (Sohda, Ikeda et Meguro 1995). Ces métabolites ne s'accumulent probablement pas non plus (Fujita et coll. 2003) et sont tous moins efficaces que la molécule administrée (Sohda, Ikeda et Meguro 1995).

Effets et mode d'action

Contrairement à la metformine, les TZDs ont au moins une cible directe bien caractérisée : ce sont des agonistes du récepteur nucléaire et facteur de transcription

peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (Forman et coll. 1995; Lehmann et coll. 1995). L'activation de PPAR γ est associée à la différenciation des adipocytes et à l'entrée et au stockage des lipides dans la masse adipeuse (Anghel et Wahli 2007). Le mécanisme suivant a été proposé pour expliquer les bienfaits des TZDs sur la résistance à l'insuline : ils favorisent le stockage des acides gras dans les adipocytes, ce qui diminue leur accumulation dans le foie et les muscles squelettiques (Ye et coll. 2004) et prévient leurs effets néfastes sur la sensibilité à l'insuline (Morino, Petersen et Shulman 2006). Ainsi, les effets cliniques des TZDs incluent une amélioration du profil lipidique, caractérisée par une diminution des concentrations circulantes d'acides gras libres et, dans le cas de la pioglitazone, de triacylglycérols, une augmentation de la sensibilité à l'insuline des muscles squelettiques et des tissus adipeux, et une diminution de la production hépatique de glucose (Mudaliar et Henry 2008). Les TZDs augmentent également la concentration d'adiponectine en circulation (Maeda et coll. 2001), une adipokine qui a des effets positifs sur l'action de l'insuline (Tishinsky, Robinson et Dyck 2012).

Plusieurs données mettent en doute le rôle central de l'activation de PPAR γ dans les adipocytes pour expliquer les effets des TZDs. D'abord, l'augmentation de la masse adipeuse n'est pas essentielle à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline des myocytes : l'effet demeure chez des souris transgéniques dépourvues de tissus adipeux blancs (A-ZIP/F-1, dite souris *fatless*) traitées à la rosiglitazone (Kim et coll. 2003) et la troglitazone peut normaliser la glycémie chez des souris transgéniques (aP2/DTA) qui ont perdu une grande partie de leur masse adipeuse, détruite sous l'action de la toxine diphtérique exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique des adipocytes (Burant et coll. 1997). Ensuite, la rosiglitazone permet de rétablir la sensibilité à l'insuline des muscles et des hépatocytes dans un modèle de souris qui n'exprime pas PPAR γ dans ses adipocytes matures et qui a été rendue obèse par une diète riche en gras (He et coll. 2003). Il est intéressant d'ajouter que chez ces souris, la rosiglitazone n'est pas en mesure de diminuer la quantité d'acides gras libres en circulation (He et coll. 2003). Troisième élément, toujours chez la souris, l'expression de PPAR γ dans le muscle squelettique (Hevener et coll. 2003) et dans le cerveau (Lu et coll. 2011) ont été proposées comme éléments importants à l'effet des TZDs sur le muscle et sur le foie, respectivement. Enfin, l'efficacité relative des différents TZDs à

titre d'agents antidiabétiques (troglitazone > pioglitazone > rosiglitazone) ne correspond pas à leur affinité comme ligand du récepteur nucléaire PPAR γ (rosiglitazone > pioglitazone > troglitazone) (Feinstein et coll. 2005).

Sans remettre en question le fait que les TZDs sont des agonistes de PPAR γ , de nombreux autres mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer leurs effets. Le groupe de Bruce Spiegelman a récemment montré que les effets bénéfiques de la rosiglitazone proviennent principalement du fait qu'ils empêchent la phosphorylation de PPAR γ par la kinase dépendante des cyclines CDK5, ce qui altère le profil d'expression des gènes ayant un élément de réponse pour PPAR γ (Choi et coll. 2010). Des cibles non génomiques et indépendantes de l'activation de PPAR γ ont également été suggérées (Feinstein et coll. 2005). Deux cibles mitochondriales sont à considérer : la protéine CISD1/mitoNEET et, comme pour la metformine, le complexe I de la chaîne de transport d'électrons. La protéine mitoNEET a été identifiée pour la première fois en 2004 dans un effort pour trouver une cible mitochondriale à la pioglitazone (Colca et coll. 2004). Elle est localisée à la membrane externe des mitochondries, est stabilisée par la pioglitazone (Paddock et coll. 2007) et est impliquée dans la respiration oxydative (Wiley et coll. 2007). Quant à l'inhibition du complexe I, l'observation remonte également à 2004 (Brunmair et coll. 2004). Dans cet article, le groupe de Clemens Fürnsinn a mesuré *in vitro* un effet inhibiteur des TZDs (surtout la rosiglitazone) sur l'activité du complexe I à partir d'homogénats de muscle et de foie de rat (Brunmair et coll. 2004). En accord avec cette donnée, il a également été rapporté qu'un traitement à la troglitazone diminue le potentiel de membrane mitochondriale de cellules L6 différenciées en myotubes (Konrad et coll. 2005). Dans cette étude, l'effet a été associé à une augmentation de l'activité de l'AMPK et à une augmentation de l'entrée de glucose dans la cellule, dépendante de la présence de l'AMPK (Konrad et coll. 2005). Cette capacité des TZDs à activer l'AMPK est connue depuis les travaux de David Carling en 2002, qui comparaient les effets de la metformine à ceux de la rosiglitazone sur l'activité de l'AMPK dans des myocytes (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002). L'activation de l'AMPK induite par les TZDs est très rapide (quelques minutes) et a depuis été confirmée *in vivo* (Saha et coll. 2004; LeBrasseur et coll. 2006) et observée également sur les îlots pancréatiques (Wang et coll. 2007).

3.5. La pioglitazone et la cellule β pancréatique

Les bienfaits des TZDs sur la cellule β et la fonction β pancréatique ont fait l'objet de plusieurs revues (Walter et Lubben 2005; Campbell et Mariz 2007; DeFronzo et Abdul-Ghani 2011) et sont mentionnés dans quelques études cliniques. Dans l'étude ADOPT, présentée plus haut, menée chez des patients nouvellement diagnostiqués pour le DT2, les patients du groupe traité à la rosiglitazone étaient ceux dont la diminution de la fonction β pancréatique était la moins importante (versus ceux traités à la metformine ou avec un sulfonyleurée) (Kahn et coll. 2006). En monothérapie, la rosiglitazone présenterait ainsi une meilleure durabilité que la metformine ou un sulfonyleurée. Une étude dirigée par Ralph DeFronzo en 2007 concluait même que la pioglitazone améliorait la fonction des cellules β chez des patients atteints de DT2 (Gastaldelli et coll. 2007). Les TZDs permettraient également de prévenir ou de retarder l'apparition du DT2 chez des populations à risque (Buchanan et coll. 2002; Gerstein et coll. 2006; Xiang et coll. 2006; DeFronzo et coll. 2011), en partie en protégeant leur fonction β pancréatique dans un contexte de stress métabolique (Cavaghan et coll. 1997; Buchanan et coll. 2000; Buchanan et coll. 2002; Xiang et coll. 2006). En effet, chez des femmes californiennes d'origine hispanique ayant vécu un épisode de diabète gestationnel, un traitement aux TZDs (troglitazone et pioglitazone) arrêtaient le déclin de la fonction des cellules β (Buchanan et coll. 2002; Xiang et coll. 2006) en autant que le médicament améliorait la sensibilité à l'insuline (Buchanan et coll. 2002). Cet effet est particulièrement intéressant pour un médicament antidiabétique (DeFronzo et Abdul-Ghani 2011), mais il ne fait pas consensus dans la communauté scientifique (Rasouli et coll. 2007).

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'effet protecteur des TZDs sur la masse et la fonction des cellules β en conditions de stress métabolique (obésité, syndrome métabolique ou diabète). La protection pourrait venir 1) de la diminution de la demande en insuline associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Bollheimer et coll. 2003; Aston-Mourney et coll. 2008; Andrikopoulos 2010); 2) de l'amélioration du profil lipidique, ce qui diminuerait le stress lipotoxique; 3) de la diminution de la glycémie, diminuant les stress gluco- et glucolipotoxiques; 4) de la diminution de l'inflammation; 5) de l'activation de PPAR γ dans les cellules β ou

encore 6) de l'action des TZDs sur une ou d'autres cibles moléculaires présentes dans les cellules β , tels le complexe I et la protéine mitochondriale mitoNEET (Bonora 2008). Quelques possibilités sont discutées plus en détails à la section 9.3.

Quels sont les effets directs des TZDs sur la fonction des cellules β ? L'exposition aiguë (10 min à 2,5 h) de cellules β en culture ou d'îlots isolés à des TZDs a donné lieu à plusieurs résultats contradictoires. Deux groupes ont noté une augmentation de la sécrétion d'insuline (cellules HIT-T15, 1 ou 10 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone, 1 h, stimulation avec 3 ou 7 mmol/L glucose (Ohtani et coll. 1996); îlots de souris *ob/ob*, 10 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone, 20 min, stimulation avec 20 mmol/L glucose (Zhang et coll. 2009)) et un autre groupe une absence d'effets (cellules BRIN-BD11, jusqu'à 100 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone, 20 min, en présence de 1 ou 16,7 mmol/L glucose (Irwin et coll. 2011)). Des failles méthodologiques peuvent mettre en doute les résultats obtenus dans le cas des deux études qui mentionnent un effet stimulant des TZDs sur la sécrétion d'insuline. Dans la première étude, les cellules HIT-T15 utilisées sont très peu sensibles au glucose et ne représentent pas un bon modèle pour étudier les conséquences d'un traitement donné sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (leur phénotype ne correspond pas bien à celui d'une cellule β). Dans la seconde étude, des îlots de souris *ob/ob* ont été utilisés. Le modèle est peut-être pertinent, cependant les résultats sont exprimés en valeur relative à la condition témoin et il est impossible de juger de la qualité de l'expérience (réponse au glucose, méthode de normalisation). De plus, les chercheurs ont récolté les milieux d'incubation (suite aux traitements et à la stimulation au TZD) après avoir centrifugé les îlots. Cette manipulation provoque physiquement la sécrétion d'insuline et peut fausser les résultats (les îlots traités libèrent-ils davantage d'insuline parce qu'ils sont fragilisés par le traitement?).

D'autres chercheurs ont plutôt mesuré une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de TZDs (îlots de rats, 10 $\mu\text{mol/L}$ troglitazone, 2,5 h, stimulation avec 5,6 ou 16,7 mmol/L glucose (Bollheimer et coll. 2003); îlots humains sains ou d'individus diabétiques, 10 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone, 10 min, stimulation à 5 ou 20 mmol/L glucose (Zhang, Sjöholm et Zhang 2006); cellules MIN6, 10 $\mu\text{mol/L}$ troglitazone, 1 h, stimulation avec 25 mmol/L glucose (Wang et coll. 2007)). L'étude de Zhang et coll. a donné lieu à des observations

particulièrement intrigantes. Les mesures de sécrétion d'insuline ont été effectuées avec des îlots humains périfusés (installés dans une chambre dont le milieu est constamment renouvelé). L'ajout de pioglitazone au milieu de périfusion diminuait rapidement la libération d'insuline d'environ 50 %. Par contre, dès que le composé était retiré du milieu, la sécrétion d'insuline induite par le glucose augmentait grandement pour atteindre 200 % de la sécrétion d'insuline de départ (Zhang, Sjöholm et Zhang 2006). Les mêmes résultats contradictoires ont été rapportés pour les effets d'expositions prolongées à des TZDs, de 24 à 48 h (Shimabukuro et coll. 1998; Lupi et coll. 2004; Saitoh et coll. 2008; Schinner et coll. 2009). Faits curieux : la troglitazone (Sunaga et coll. 1999) et la rosiglitazone (Yu et coll. 2012) ont déjà été identifiées comme des inhibiteurs des canaux K_{ATP} , un effet qui devrait stimuler la sécrétion d'insuline (Sunaga et coll. 1999; Yu et coll. 2012). La pioglitazone n'aurait pas cette propriété (Sunaga et coll. 1999).

En résumé, les TZDs semblent en mesure de protéger la fonction β pancréatique. De nombreuses études *in vitro* mentionnent qu'ils ont des effets directs et aigus sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Les études menées avec de la pioglitazone qui emploient des modèles expérimentaux et des techniques adéquates suggèrent généralement que cet effet est inhibiteur.

4. Hypothèse et buts

4.1. Hypothèse

Les premiers résultats présentés dans cette thèse ont été générés dans le but d'étudier le modèle du malonyl-CoA/ acyls-CoA à longue chaîne en utilisant les médicaments insulinosensibilisateurs, et en particulier la pioglitazone et la metformine, comme outils pour activer l'AMPK et changer la répartition lipidique. L'hypothèse s'énonçait alors ainsi : **l'activation aigüe de l'AMPK par des moyens pharmacologiques favorise la β -oxydation des acides gras et réduit la quantité d'acides gras ou de leurs dérivés CoA disponibles pour stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose**. Les travaux devaient aussi permettre d'en apprendre davantage sur le rôle de l'AMPK dans les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose grâce à une approche qui n'utilise pas l'AICAR, peu

spécifique, et ne fait pas appel aux techniques de biologie moléculaire, qui altèrent forcément le profil d'expression génique du modèle étudié.

Une partie de la discussion revient sur notre première hypothèse en présentant les effets aigus des agents insulinosensibilisateurs sur la cellule β et la contribution de nos travaux à la compréhension des mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose.

L'hypothèse de départ a été en partie infirmée lorsque nous nous sommes aperçus que les agents pharmacologiques utilisés ne favorisaient pas la β -oxydation. Toutefois, à la lumière des premiers résultats, principalement l'important effet inhibiteur de la pioglitazone sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose, une nouvelle hypothèse a été formulée de façon à tenir compte du potentiel intérêt clinique du projet. Cette nouvelle hypothèse s'énonce ainsi : **la pioglitazone a des effets aigus, non génomiques et indépendants de PPAR γ sur la cellule β pancréatique qui sont impliqués dans les bienfaits du médicament, indépendamment des changements de sensibilité à l'insuline.** Ces effets incluent une décélération du métabolisme, associée à une inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, et sont communs aux agents insulinosensibilisateurs utilisés pour traiter le DT2. Les deux articles joints à la thèse ont été écrits en fonction de cette seconde hypothèse. Ainsi, la discussion de la présente thèse traite principalement de la contribution de nos travaux à la compréhension des mécanismes par lesquels la pioglitazone et la metformine sont efficaces pour traiter le DT2. L'ensemble de nos observations présente un nouveau mode d'action pour des agents antidiabétiques qui pourrait être exploité dans une perspective thérapeutique.

4.2. Objectifs :

Deux objectifs accompagnaient la première hypothèse mentionnée à la section précédente : 1) confirmer par une approche pharmacologique qu'une augmentation de la β -oxydation entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, en accord avec le modèle du malonyl-CoA/ acyls-CoA à longue chaîne et 2) déterminer le rôle de l'AMPK dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ces buts n'ont pas été atteints, pour différentes raisons qui sont discutées au chapitre 8.

Suite à la réorientation du projet de thèse (voir seconde hypothèse dans la section précédente), notre objectif principal est devenu celui d'identifier le mécanisme par lequel la pioglitazone agit sur la cellule β pour la protéger dans un contexte de stress métabolique, comme celui retrouvé dans l'état prédiabétique ou chez les individus atteints de DT2. Deux buts spécifiques ont alors été proposés et atteints : 1) caractériser les effets aigus et non génomiques de la pioglitazone sur le métabolisme et la fonction des cellules β *in vitro* et *in vivo*, indépendamment de son effet sur la résistance à l'insuline et 2) déterminer si la metformine, le seul autre médicament insulinosensibilisateur qui n'est pas un thiazolidinedione, a les mêmes effets que la pioglitazone sur la cellule β .

Résultats

5. Premier article

5.1. Présentation du premier article

Le premier article inséré dans cette thèse a été publié en 2009 dans la revue *Endocrinology* (Lamontagne et coll. 2009). Neuf auteurs ont été impliqués dans sa préparation. J'ai réalisé la majorité des expériences et contribué à l'écriture de l'article. Émilie Pepin a réalisé les expériences utilisant le composé C (figure 3) et a révisé l'article. Marie-Line Peyot, Erik Joly, Neil B. Ruderman et Vincent Poitout ont révisé l'article. S.R. Murthy Madiraju, Christopher J. Nolan et Marc Prentki ont contribué à l'écriture de l'article. Nous y présentons les effets aigus de la pioglitazone sur le métabolisme et la fonction des cellules β *in vitro* et *ex vivo*. Deux modèles expérimentaux ont été utilisés : les cellules INS 832/13 sécrétrices d'insuline, dérivées d'un insulinome de rat, et des îlots pancréatiques isolés de rats Wistar. Pour étudier les effets de la pioglitazone qui sont non génomiques et indépendants de l'activation de PPAR γ , nous avons limité la durée de nos traitements à 90 min.

Nous avons observé pour les deux modèles expérimentaux que des doses de pioglitazone de 10 à 50 $\mu\text{mol/L}$ inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose, mais seulement à des concentrations sous maximales de glucose. Le traitement n'affecte ni la libération basale (non stimulée) d'insuline, ni la sécrétion d'insuline maximale induite par des concentrations élevées de glucose, ni même l'amplification par le palmitate de la sécrétion d'insuline. En fait, la pioglitazone provoque un déplacement vers la droite de la courbe de sécrétion d'insuline induite par différentes concentrations de glucose, ou en d'autres termes, elle diminue la sensibilité des cellules β au glucose pour la sécrétion d'insuline. Le traitement n'affecte pas la sécrétion d'insuline induite par le KCl, indiquant que le défaut de sécrétion n'implique pas les processus d'exocytose. Dans ce contexte expérimental, l'AMPK est activée dans les cellules INS 832/13. De plus, le traitement de ces cellules avec d'autres composés pharmacologiques qui activent l'AMPK (metformine et berbérine) provoque le même type d'inhibition que celui observé avec la pioglitazone et l'inhibition de l'AMPK par le composé C rétablit la sécrétion d'insuline induite par le

glucose. Toujours en utilisant les cellules INS 832/13, nous avons mesuré différents paramètres du métabolisme du glucose et des lipides et noté que le traitement à la pioglitazone diminue l'oxydation du glucose en CO₂, diminue le potentiel de membrane mitochondrial et diminue le contenu en ATP des cellules. Un traitement avec 50 µmol/L de pioglitazone diminue également l'incorporation de palmitate aux diacylglycérols et aux phospholipides et inhibe radicalement la libération de glycérol, considérée comme une mesure de l'activité lipolytique. Le patron d'inhibition de l'oxydation du glucose, du contenu en ATP des cellules et de l'estérification des acides gras par la pioglitazone est similaire à celui observé pour la sécrétion d'insuline (inhibition à concentrations intermédiaires de glucose seulement). Nous avons appelé ce phénomène « décélération métabolique ».

Ces résultats nous ont amené à proposer que la décélération métabolique représente un mode d'action nouveau par lequel la pioglitazone, et possiblement la metformine, protège la cellule β et éventuellement d'autres types cellulaires contre les stress métaboliques. Ils nous ont aussi amené à suggérer que si ces composés sont si efficaces c'est peut-être parce qu'ils agissent à la fois sur la résistance à l'insuline et sur la cellule β, en diminuant l'hyperinsulinémie qui peut causer la résistance à l'insuline.

5.2. Premier article

Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic β -cell at submaximal glucose concentrations

Short title: Pioglitazone and β -cell metabolism

Julien Lamontagne, Émilie Pepin, Marie-Line Peyot, Érik Joly, Neil B. Ruderman, Vincent Poitout, S.R. Murthy Madiraju, Christopher J. Nolan and Marc Prentki

Affiliations:

J. Lamontagne, É. Pepin, M.-L. Peyot, É. Joly, S.R.M. Madiraju and M. Prentki: Molecular Nutrition Unit and Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, and Departments of Nutrition and Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

V. Poitout: Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, and Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

C.J. Nolan: The Australian National University Medical School, Canberra, Australia

N.B. Ruderman: Departments of Medicine and Physiology and Biophysics, Boston University School of Medicine and Diabetes Unit, Section of Endocrinology, Boston University School of Medicine and Boston Medical Center, Boston, MA, USA

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed:

Dr. Marc Prentki. Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, Montréal, QC, Canada

Keywords: pancreatic β -cell, thiazolidinedione, insulin secretion, glucose metabolism, glycerolipid/free fatty acid cycling.

“This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (MP) and the Canadian Diabetes Association (MP), grant DK019514-26 from the National Institute of Health (NR and MP) and a special program grant from the Juvenile Diabetes Research Foundation and National Health and Medical Research Council (ID 427695) (CN). JL is supported by a training award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and received support from Diabète Québec. MP and VP hold the Canada Research Chairs in Diabetes and Metabolism, and in Diabetes and Pancreatic β -cell Function, respectively.”

Precis: Pioglitazone causes a right shift in β -cell metabolic activation by glucose which results in reduced glucose-induced insulin secretion at intermediate range glucose concentrations: implications for β -cell preservation in type 2 diabetes.

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZD) have beneficial effects on glucose homeostasis via enhancement of insulin sensitivity and preservation of β -cell function. How TZD preserve β -cells is uncertain but it might involve direct effects via both peroxisome proliferator-activated receptor γ dependent and independent pathways. To gain insight into the independent pathway(s), we assessed the effects of short-term (≤ 90 min) exposure to pioglitazone (Pio) (10 to 50 μ M) on glucose-induced insulin secretion (GIIS), AMPK activation, and β -cell metabolism in INS 832/13 β -cells and rat islets. Pio caused a right shift in the dose-dependence of GIIS, such that insulin release was reduced at intermediate glucose but unaffected at either basal or maximal glucose concentrations. This was associated in INS 832/13 cells with alterations in energy metabolism, characterized by reduced glucose oxidation, mitochondrial membrane polarization and ATP levels. Pio caused AMPK phosphorylation and its action on GIIS was reversed by the AMPK inhibitor Compound C. Pio also reduced palmitate esterification into complex lipids and inhibited lipolysis. As for insulin secretion, the alterations in β -cell metabolic processes were mostly alleviated at elevated glucose. Similarly, the antidiabetic agents and AMPK activators metformin and berberine caused a right shift in the dose dependence of GIIS. In conclusion, Pio acutely reduces glucose oxidation, energy metabolism and glycerolipid/fatty acid cycling of the β -cell at intermediate glucose concentrations. We suggest that AMPK activation and the metabolic "deceleration" of the β -cell caused by Pio contribute to its known effects to reduce hyperinsulinemia and preserve β -cell function, and to act as an antidiabetic agent.

Abbreviations:

ACC: acetyl-CoA carboxylase

AMPK: AMP-activated protein kinase

DAG: diacylglycerol

FFA: free fatty acid

FCCP: carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

GIIS: glucose-induced insulin secretion

GL: glycerolipid

GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase

LC-CoA: long-chain acyl-CoA

Pio: pioglitazone

PL: phospholipid

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

T2D: type 2 diabetes

TG: triacylglycerol

TZD: thiazolidinedione

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) occurs when pancreatic β -cell compensation for insulin resistance fails (1, 2). Thiazolidinediones (TZDs), which are agonists of the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) (3), improve insulin resistance in T2D, at least in part through activation of PPAR γ in adipose tissue (4). PPAR γ activation stimulates the expansion of subcutaneous fat mass and diverts circulating lipids to be stored in adipocytes, away from skeletal muscles and hepatocytes (5), where their accumulation is generally associated with insulin resistance (6).

In addition to their insulin sensitizing effect, TZDs also preserve β -cell mass and function (reviewed in (7)). Many *in vivo* studies have described the protective effect of TZDs on β -cell function and/or the preservation of islet architecture in genetic or diet-induced rodent models of T2D (8-12). *Ex vivo* studies provide evidence that TZDs improve the insulin secretory capacity of rat (9, 13) and human (14) islets, and protect them from lipotoxicity and apoptosis. The ADOPT study showed evidence that TZDs are able to sustain glucose control in early T2D better than metformin or sulfonylureas, possibly due to β -cell preservation (15). TZDs may also lead to an increase in circulating adipokines, due to increased fat mass, and reduce glucolipotoxicity (10) and inflammation (16), and all these effects can be

collectively beneficial to β -cells. Direct TZD activation of PPAR γ expressed in β -cells (17, 18) is also likely, although its role in β -cell function is unclear.

TZDs may mediate their cellular effects via targets other than PPAR γ (19) of which the more documented is the rapid activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in various cell types both *in vivo* and *in vitro* (20-22), including β -cell (23). AMPK is a key regulator of energy metabolism with several downstream targets and its activity is influenced by changes in the AMP/ATP ratio. Fryer *et al.* have shown that in muscle cells AMPK activation by rosiglitazone involves a rapid increase in the AMP/ATP ratio (21), probably due to the TZDs' inhibitory effect on respiratory chain complex I (24). It is possible that in the β -cell, TZDs might also modulate energy metabolism and function through AMPK. An important target of AMPK is acetyl-CoA carboxylase (ACC), which in the β -cell is involved in lipid partitioning and amplification arms of glucose-induced insulin secretion (GIIS) pathways (25).

Here we postulated that direct TZD-mediated protection of the β -cell may in part involve acute PPAR γ -independent effects via AMPK and energy metabolism. We examined this hypothesis in INS 832/13 β -cells and isolated rat islets. The results show that the TZD pioglitazone (Pio) has an acute and profound impact on β -cell energy metabolism, reducing glucose oxidation, mitochondrial membrane potential and ATP production primarily at intermediate glucose concentrations. Furthermore, Pio markedly inhibits β -cell glycerolipid/free fatty acid (GL/FFA) cycling. These direct non-PPAR γ mediated metabolic effects of Pio are associated with a lowering of β -cell glucose sensitivity for insulin secretion and are dependent on AMPK activity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Cell culture supplies were from Corning (Corning, NY) and Fisherbrand (Nepean, ON, Canada). Pioglitazone-HCl (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO), berberine-HCl (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and metformin (1,1-dimethylbiguanide-HCl; Sigma) were dissolved in water. Compound C

(InSolution™) was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). D-[U-¹⁴C]glucose was from GE Healthcare (Baie d'Urfé, QC, Canada), [1-¹⁴C]palmitate from PerkinElmer Life Sciences (Downers Grove, IL), and palmitate sodium salt from Nu-Check Prep (Elysian, MN). Bicinchoninic acid protein assay from Pierce (Rockford, IL) was used. Stock unlabelled palmitate was prepared at 4 mM in 5% defatted BSA (Sigma) as described elsewhere (26). Defatted BSA was used in all experiments.

Cell culture

INS 832/13 cells (27) (passages 55 to 65) were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI 1640 with sodium bicarbonate (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), supplemented with 10% vol/vol fetal calf serum (Wisent), 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 50 μM β-mercaptoethanol (complete RPMI). Cells were grown to 80% confluence. Except when using metformin, media were changed to RPMI 1640 containing 3 mM glucose supplemented as the complete RPMI 24 h prior to the experiments. In experiments using metformin, media were changed 2 h prior to the experiments to RPMI 3 mM glucose containing metformin. Experiments were conducted in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4 (KRBH).

Islet isolation

All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the CRCHUM. Wistar rats from Charles River (St-Constant, QC, Canada) were anaesthetized with Somnotol® (MTC Pharmaceuticals, Hamilton, ON, Canada) and sacrificed by exsanguination. Pancreatic islets were isolated by collagenase (type XI from Sigma) digestion of total pancreas (28), followed by centrifugation (1040 x g) on a Histopaque 1119, 1077 (Sigma) gradient. Isolated islets were handpicked and cultured overnight in a Petri dish at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI 1640 with sodium bicarbonate, supplemented with 10% fetal calf serum, 10 mM HEPES pH 7.4, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin and 100 μg/mL streptomycin.

Insulin secretion measurement

INS 832/13 cells were washed in KRBH containing 1 mM glucose and 0.5% BSA (KRBH 1G/0.5%BSA) and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA in presence of pharmacological agents or vehicle. When utilized, compound C was

added first in pre-incubation media and pioglitazone added 20 min later. Insulin secretion from INS 832/13 cells was measured during 45-min static incubations in KRBH containing various glucose concentrations, 0.5% BSA and pharmacological agents or vehicle, with or without 35 mM KCl or 0.2-0.3 mM palmitate, as specified. For islet insulin secretion, batches of 10 islets were washed in KRBH containing 3 mM glucose and 0.5% BSA (KRBH 3G/0.5%BSA), and pre-incubated for 45 min in KRBH 3G/0.5%BSA containing pioglitazone or DMSO. Islets were then incubated for 45 min in KRBH containing various glucose concentrations or 3 mM glucose plus 35 mM KCl, 0.5% BSA and pioglitazone or DMSO. At the end of the incubation, media were collected and insulin extracted from cells or islets in acid-ethanol (1.5% vol/vol HCl, 75% vol/vol ethanol). Total insulin contents and media insulin concentrations were determined by radioimmunoassay using human insulin standards (Linco Research, St. Charles, MO).

Glucose oxidation

INS 832/13 cells were washed in KRBH 1G/0.5%BSA and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA plus pioglitazone or DMSO. Pre-incubation media were changed to KRBH containing various glucose concentrations, 0.07% BSA, pioglitazone or DMSO, and D-[U-¹⁴C]glucose at 0.10, 0.15 or 0.20 μ Ci/mL (for 1, 6 and 10 mM glucose media respectively) and [¹⁴C]CO₂ liberation was measured as previously described (29) after a 45-min incubation.

Mitochondrial membrane potential

INS 832/13 cells were washed in KRBH 1G/0.5%BSA, and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA to which 10 μ g/ml rhodamine 123 (Invitrogen) was added for the last 20 min. Then cells were washed and incubated for 25 min in KRBH 1G/0.5%BSA followed by a further wash and incubation for 10 min in KRBH containing 6 mM glucose and 0.5% BSA. At the end of this 10 min incubation baseline fluorescence (excitation: 485 nm/ emission: 530 nm) was measured on a FLUOstar microplate reader (BMG labtech, Offenburg, Germany). Pioglitazone, 5 μ M FCCP (Sigma) or DMSO were added, or medium was changed for KRBH 1G containing DMSO, and fluorescence was measured 10 min later.

Cellular ATP content

INS 832/13 cells were washed and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA. ATP content of INS 832/13 cells was measured using ATPlite kit (PerkinElmer, Boston, MA) after 10 min incubation in fresh KRBH containing varying concentrations of glucose, 0.5% BSA and pioglitazone, 2 μ M oligomycin (Sigma) or DMSO.

Palmitate oxidation and esterification

INS 832/13 cells, grown in 25-cm² flasks, were washed in KRBH 1G/0.5%BSA and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA plus pioglitazone or DMSO. Cells were then incubated for 45 min in fresh KRBH containing various glucose concentrations, 0.5% BSA, 0.2 mM unlabeled palmitate, 0.1 μ Ci/mL [¹⁴C]palmitate, 1 mM carnitine (oxidation only) and pioglitazone or DMSO. Oxidation and esterification measurements were performed as described elsewhere (26). Briefly, for oxidation, the incubation was in sealed flasks containing a glass fiber filter soaked in 5% KOH. At the end of the incubation, perchloric acid (40% vol/vol) was injected into each flask. After overnight isotopic equilibration, filters (containing trapped CO₂) were removed and aliquots of the acidified media containing acid soluble β -oxidation products (ASP) were collected for liquid scintillation counting. For palmitate esterification: following incubation, cells were washed and scraped in cold PBS, centrifuged and resuspended in 3 mL Folch reagent (30). Total lipids were extracted and non-polar lipids separated by thin layer chromatography. Incorporation of labeled palmitate into specific lipid species was quantified after scraping by liquid scintillation counting.

Lipolysis determination

INS 832/13 cells were washed in KRBH 1G/0.5%BSA and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA. Pioglitazone or DMSO were omitted from the pre-incubation media to avoid pioglitazone exposure in excess of 90 min. INS 832/13 cells were then incubated for 90 min in fresh KRBH containing various glucose concentrations, 0.5% BSA in the presence of pioglitazone or DMSO with or without 0.2 mM palmitate. Glycerol release, an index of lipolysis, was determined by a coupled enzymatic assay (31).

Immunoblot analysis

INS 832/13 cells were washed and pre-incubated for 45 min in KRBH 1G/0.5%BSA. Cells were then incubated for 20 min in KRBH containing various glucose concentrations, 0.5% BSA and pioglitazone or DMSO. Alternatively, for experiments using compound C, cells were collected at the end of the incubation. Cells were washed with cold PBS and lysed using a lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% vol/vol Triton X-100, 0.1% SDS, protease inhibitors, 1 mM Na₃VO₄ and 2.5 mM Na₄P₂O₇. Lysates were sonicated, aliquots were taken for protein assay and samples were stored at -80°C. Proteins from total cell extracts (20 µg protein) were separated on 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Scheicher & Schuell, Dassel, Germany) for Western blotting. Blotted proteins were probed using antibodies rabbit phospho-AMPK α (Thr172) mAb (cat. #2535), AMPK α and ACC (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and rabbit phospho-ACC (Ser79) (Upstate, Temecula, CA) according to suppliers' protocols. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Hercules, CA) was used as second antibody with SuperSignal West Pico chemiluminescence (Pierce) for detection.

Statistical analysis

Values are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunnett's post-test or two-way ANOVA with Bonferroni's post-test for multiple comparisons using Prism v5.01 and InStat v3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTS

Pioglitazone lowers the sensitivity of β -cells to glucose for insulin secretion

Acute exposure of β -cells to TZDs has been shown to reduce GIIS *in vitro* and this was attributed to activation of AMPK (23, 32, 33). In the present study, we confirmed these findings and noticed that a 90-min exposure to Pio, dose-dependently (10-50 μ M) inhibited GIIS in INS 832/13 cells in presence of 6-10 mM glucose (Fig. 1A). Interestingly, and one of the key aspects of our study, Pio treatment caused a

right-shift in the glucose dose-response curve for insulin secretion, and at 10 or 25 μM Pio there was no change in the maximal GIIS at 10 mM glucose. Thus, for the 25 μM Pio dose, insulin secretion was inhibited by 70-90% at 5-6 mM glucose, with almost total recovery of insulin release at 10 mM glucose. Recovery of almost full GIIS in INS 832/13 cells at 50 μM Pio required a higher concentration of the sugar and was apparent at 16 mM glucose (0.45 \pm 0.06 and 0.36 \pm 0.06 μg insulin/ mg prot/ 45 min for 16 mM glucose without or with 50 μM Pio, respectively (n = 9; not significantly different).

Pio had no effect on insulin release at low (non-stimulating) glucose concentrations, and did not affect high potassium-induced insulin release (Fig. 1B). Pio was also without effect on palmitate amplification of insulin secretion at 6 (Fig. 1C) or 10 mM glucose (data not shown).

Similar to the results obtained with INS 832/13 cells, Pio reduced significantly insulin secretion in isolated rat islets (Fig. 1D) at intermediate (8 mM) glucose only. Pio again had no effect on KCl (35 mM) induced insulin release at 3 mM glucose (data not shown). Total INS 832/13 cell and islet insulin contents were unaltered by Pio over the course of the experiments (data not shown). Thus, Pio specifically reduced β -cell glucose sensitivity for insulin secretion.

Inasmuch as high concentrations of Pio used in these experiments (50 μM) did not affect cellular insulin content or basal-, palmitate-, KCl- and high glucose-induced insulin secretion, and did not affect fat oxidation and the incorporation of palmitate into diacylglycerol and triacylglycerol (see below), it is unlikely that this drug exerts non-specific toxicity to β -cells.

Pioglitazone reduces metabolic activation by glucose in INS 832/13 cells

Glucose metabolism is necessary for the triggering and amplification arms of GIIS (34). Pio dose-dependently inhibited glucose oxidation in INS 832/13 cells, (Fig. 2A) which was most marked at 6 mM glucose (20% and 35% in the presence of 25 and 50 μM Pio, respectively). As seen for insulin secretion, the Pio inhibitory effect on glucose oxidation was partially alleviated at 10 mM glucose.

The reduction in glucose oxidation by Pio suggested that mitochondrial oxidative metabolism may be altered. In order to examine this possibility, we

measured mitochondrial membrane potential (Ψ_m) at 6 mM glucose using rhodamine 123 in INS 832/13 cells. As expected, there was a decrease in the fluorescence of the dye in cells exposed to 6 mM glucose, when compared to 1 mM glucose (Fig. 2B), indicating hyper-polarization of the mitochondrial membrane. Pio dose-dependently inhibited this glucose-induced membrane polarization. In presence of 50 μ M Pio, glucose-induced membrane polarization was significantly dissipated to the level observed at 1 mM glucose. Pio dose-dependently reduced the glucose-induced rise in ATP content (Fig. 2C). As for the other measured parameters, the effect of Pio was more prominent at intermediate (6 mM) than high (10 mM) glucose, with complete recovery for the 25 μ M Pio conditions.

Pioglitazone effect on insulin secretion is antagonized by the AMPK inhibitor compound C

Previous studies showed that TZDs inhibit glucose metabolism in muscle (35, 36) and activate AMPK (21). Thus, rosiglitazone rapidly increases the AMP/ATP ratio in H-2K^b muscle cells, leading to the activation of AMPK (21). A 20-min exposure of INS 832/13 cells to Pio increased AMPK phosphorylation (Fig. 3A) and activated this enzyme as evidenced by the phosphorylation of its downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC) (Fig. 3A). Thus, Pio reversed the effect of increasing glucose concentrations (from 1 to 10 mM) to reduce the ACC phosphorylation state.

To assess whether the effects of Pio on insulin secretion is mediated via AMPK we used the AMPK inhibitor compound C. Low concentrations (5 and 10 μ M) of compound C restored GIIS inhibited by 50 μ M Pio. In the presence of 10 mM glucose, this restoration was complete (Fig. 3B, upper panel). Compound C alone amplified GIIS in INS 832/13 cells. This finding is in part anticipated since activation and inhibition of AMPK in the β -cell are thought to be associated with inhibition and stimulation of insulin secretion, respectively (37). As shown in representative immunoblots, treatment with compound C reduced the phosphorylation status of both AMPK and ACC (Fig. 3B, lower panel).

Pioglitazone action on GIIS is mimicked by the AMPK activators metformin and berberine

To determine if other antidiabetic agents known to activate AMPK (38, 39) have similar effects as Pio on GIIS INS 832/13 cells were acutely exposed to berberine or metformin. Similarly to Pio, both compounds inhibited GIIS particularly at submaximal glucose concentrations, without affecting basal or KCl-induced insulin release (Fig. 3C,D).

Pioglitazone inhibits fatty acid esterification into complex lipids and lipolysis

AMPK affects lipid partitioning (40). Thus, ACC phosphorylation at Ser79 by AMPK reduces malonyl-CoA (41), an allosteric inhibitor of carnitine-palmitoyltransferase-1 (CPT-1), which regulates the rate-limiting long-chain fatty acyl-CoAs (LC-CoA) entry into mitochondria for β -oxidation. Moreover, AMPK also inhibits glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) (42), responsible for the first committed step of glycerolipid (GL) biosynthesis. Therefore, it might be anticipated that activation of AMPK in INS 832/13 cells would favor fatty acid oxidation at the expense of their incorporation into complex lipids.

At intermediate glucose (6 mM), Pio reduced palmitate incorporation into diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TG) and phospholipids (PL) in INS cells (Fig. 4). However, at 10 mM glucose the inhibitory effect of Pio on palmitate incorporation into complex lipid species was almost totally relieved. The predicted enhancement of palmitate oxidation in the presence of Pio was not noticed (Fig. 4D). In fact, there was a small decrease in palmitate oxidation at low glucose by 50 μ M Pio. As anticipated, increasing glucose concentration (from 1 to 10 mM) did lower palmitate oxidation (Fig. 4D).

Results from our and other laboratories suggest that GL/FFA cycling, in which there is coupling of FFA esterification and lipolysis processes, plays an important role in GIIS (43, 44). In addition, both hormone sensitive lipase and adipose triglyceride lipase appear to be regulated by AMPK (45, 46). Whether reduced net incorporation of palmitate into GL in the presence of Pio was accompanied by altered lipolysis was examined. As observed earlier (31, 47-49), in the absence of Pio, there was an increase in the release of glycerol at elevated glucose

in INS 832/13 cells (Fig. 5A). Pio inhibited glucose-induced glycerol release in a dose-dependent manner (Fig. 5A).

Exogenous FFA enhance both lipolysis and insulin secretion in pioglitazone-treated β -cells

Lipolysis and insulin secretion were measured from control and Pio-treated INS 832/13 β -cells in the presence and absence of 0.2 mM palmitate. In control cells, incubation in the presence of palmitate was associated with marked increases in both glycerol release and GIIS (Fig. 5A,B). Glycerol release from Pio treated cells was also substantially higher in the presence of palmitate at 6 and 10 mM glucose for the 10 μ M Pio and at 10 mM glucose for the 50 μ M Pio (Fig. 5A). These palmitate-induced increases in glycerol release also paralleled increases in insulin secretion in Pio-treated cells with complete recovery of secretion at 10 μ M Pio and partial recovery at 50 μ M Pio (Fig. 5B). Of note, there was a remarkably strong correlation between glycerol release and insulin secretion when combining all the data of this experiment (Fig. 5C).

Because Pio inhibits both net fatty acid esterification and glycerol release, an index of lipolysis, we conclude that Pio acutely impairs both the esterification and lipolysis arms of GL/FFA cycling in the β -cell. At low to moderate concentrations, the inhibitory effect of Pio on GL/FFA cycling is partially recovered at high glucose. Provision of exogenous FFA to Pio treated cells also promotes some recovery of GL/FFA cycling and GIIS.

DISCUSSION

The results indicate that Pio reduces GIIS in the β -cell at intermediate glucose concentrations by shifting the dose dependence curve of glucose responsiveness to the right. Thus, Pio at the lower 10 and 25 μ M doses had no influence on insulin secretion at the maximal stimulatory glucose concentration of 10 mM in INS 832/13 cells. In this β -cell line, 16 mM glucose could overcome the inhibitory effect of 50 μ M Pio on GIIS. In isolated rat islets, Pio (both 25 and 50 μ M) reduced GIIS by \approx 60% at 8 mM glucose but did not affect secretion at 22 mM glucose. It is interesting

to note that a similar right-shift in GIIS with increasing glucose infusion rates was reported in a 12-week rosiglitazone clinical trial in insulin resistant non-diabetic subjects (50).

What are the mechanism(s) involved in Pio action to acutely reduce GIIS only at intermediate concentrations of the sugar?

We will first consider Pio actions on energy metabolism and mitochondrial function. Pio decreased the ATP content of INS 832/13 cells, likely due to the partial dissipation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). This effect of the drug on ATP content and $\Delta\Psi_m$ was noticed within 10 min of incubation, thus ruling-out the involvement of the transcription factor PPAR γ . It is possible that reduced ATP levels could have resulted from the known inhibitory effect of TZDs on complex I of the respiratory chain (51). Another TZD, troglitazone, was also found to dissipate the mitochondrial potential and to activate AMPK within 10 min in muscle cells (24). Interestingly, berberine and metformin, which also inhibit complex I and activate AMPK (24, 38, 52), caused a right-shift in the glucose dose-response curve of insulin secretion in INS 832/13 cells, similar to that seen with Pio.

Earlier attempts (53, 54) to delineate the role of AMPK in the acute regulation of GIIS have led to contradictory observations. The present study performed under acute conditions is in accordance with the view that AMPK activation reduces GIIS, whereas its inhibition promotes insulin release (37). Thus pharmacological inhibition of AMPK using compound C led to elevated insulin secretion whereas activation of AMPK by three unrelated compounds, metformin, pioglitazone and berberine, was able to lower the sensitivity of INS 832/13 cells to glucose for insulin secretion. It is interesting to note that there is residual and significant AMPK phosphorylation at 10 mM glucose in INS 832/13 cells, which also reflects in the phosphorylation status of ACC (see Fig 3B). This residual activity of AMPK likely keeps insulin secretion under 'check' even at 10 mM glucose, as the addition of low amounts of the chemical inhibitor of AMPK, compound C, led to a steep increase in insulin secretion. Similarly, lowering glucose concentration to less than 6 mM, with a decrease in insulin secretion, does not fully activate AMPK (see Fig. 3A) as addition of Pio further increases AMPK phosphorylation and decreases insulin secretion. The other

AMPK activators used, metformin and berberine, yielded essentially similar insulin secretion results.

Pio may also inhibit pyruvate dehydrogenase (PDH), as a similar compound, troglitazone has been reported to acutely inhibit PDH activity in L6 myotubes (36) in an AMPK-independent manner. Inhibition of PDH by Pio could explain the reduced CO₂ production from glucose (at 6 mM) in INS 832/13 cells. Finally, glucokinase itself could be implicated in Pio action. AMPK has been shown to block the translocation of glucokinase from nucleus to cytosol in hepatocytes and to inhibit glucose metabolism (55). Considering a similar situation in β -cells, the reduction in glucose metabolism could be due in part to Pio-activated AMPK (either directly or indirectly via mitochondrial metabolism inhibition), reducing flux through glucokinase, glucose oxidation, ATP levels and GIIS.

To explain the mild effect of Pio at high glucose on both β -cell metabolism and GIIS, we propose that at elevated concentration of the sugar the mitochondrial and AMPK effects of the drug listed above are dampened and overridden due to the "push" of elevated substrate on metabolic pathways, with gradual re-establishment of energy metabolism and GIIS. An increase in ATP/ADP ratio acts as a coupling factor between glucose metabolism and insulin secretion, via the closure of K⁺_{ATP} channels (34). Thus, the right-shift in the glucose dose-response curve observed with Pio can be explained at least in part by a reduction in the glucose-induced increase in cellular ATP.

Besides an action on energy metabolism, the data are compatible with a role of altered lipid metabolism and signaling in Pio action to reduce GIIS. AMPK activation promotes energy-producing catabolic pathways (e.g. β -oxidation) and inhibits energy-consuming anabolic pathways (e.g. complex lipid synthesis) (56). Acute treatment of isolated muscles with troglitazone was shown to stimulate fatty acid oxidation via activation of AMPK (22). However, in the present study, Pio did not enhance fat oxidation in INS 832/13 cells. It is perplexing that in spite of ACC phosphorylation (which decreases its activity) and anticipated reduced malonyl-CoA levels, acute Pio treatment did not accelerate palmitate oxidation. It is possible that in the β -cell, decreased glucose metabolism induced by Pio and AMPK activation,

might have resulted in reduced availability of anaplerotic sparkers for Krebs cycle activity, thereby alleviating any AMPK-mediated stimulation of β -oxidation. Thus, optimal operation of the Krebs cycle requires the continuous supply of glucose-derived cycle intermediates via anaplerosis.

We have proposed that GL/FFA cycling plays a role in the lipid amplification of GIIS (43, 44, 57). Some of the intermediates of this pathway, particularly DAG and fatty acyl-CoA, are thought to stimulate insulin granule exocytosis (58). The extent of GL/FFA cycling can be indirectly assessed by measuring the dynamic pool of GL and lipolysis. Pio decreased palmitate incorporation in DAG, TG and PL at intermediate (6 mM) glucose. High glucose overcame this inhibition, as for glucose and energy metabolism, and GIIS. GPAT, which catalyzes the first step of GL biosynthesis, is negatively modulated by AMPK (42). Thus, Pio/AMPK mediated inhibition of GPAT may underlie the action of this TZD on β -cell lipid esterification processes. In addition, since lipid esterification processes require two ATP molecules per fatty-acyl moiety added on the glycerol backbone, the possibility exists that reduced GL synthesis by Pio results from reduced energy production.

Whether Pio also affects the lipolysis segment of GL/FFA cycling was examined by measuring the release of glycerol, an end product of GL hydrolysis. Results showed that Pio markedly inhibited glycerol release in INS 832/13 cells, indicating that it affects GL/FFA cycling because it also inhibited fatty acid esterification. Interestingly, at the lower dose of 10 and 25 μ M Pio for which GIIS was normalized at 10 mM glucose, there was evidence of partial recovery of lipolytic activity at this higher concentration of the sugar. Further recovery from Pio inhibition of both lipolysis and GIIS occurred with the addition of palmitate to the incubation medium. This was even observed with the highest Pio dose (50 μ M) that, in the absence of palmitate, had completely and almost abolished lipolysis and GIIS, respectively. The very large effect of Pio to reduce lipolysis may be due to inhibition by AMPK of hormone-sensitive lipase (45) and/or ATGL (46) and lower ATP/ADP and ATP/AMP ratios, which would curtail the esterification arm of the energy-dependent GL/FFA cycling. A significant correlation between glycerol release and GIIS, shown earlier by Winzell et al. (47), is strongly supported by our present results

using Pio with and without palmitate. These data, while not proving cause and effect relationship, add substantial support to previous studies that have indicated an important role for GL/FFA cycling in GIIS (43, 44, 57).

In conclusion and as illustrated in Fig 6, Pio acutely reduces GIIS only at intermediate concentrations of glucose, without affecting basal or maximal secretion induced by the sugar. Collectively, the data are compatible with the view that this action of the TZD is due to alterations in mitochondrial energy metabolism, ATP production and the K^+_{ATP}/Ca^{2+} triggering pathway of insulin secretion and AMPK activity, as well as a reduced activity of the amplification arm of glucose signaling that implicates GL/FFA cycling and lipid metabolites such as DAG.

A direct and PPAR γ -independent protection of β -cells by pioglitazone?

Pio concentrations used in this study are higher than the maximal blood concentrations (3 to 6 μ M) reported in humans (59, 60). But they are not unreasonable because threshold effects on the various studied processes occurred at 10-25 μ M. Even after chronic administration in rats, Pio and its metabolites did not accumulate in plasma and white adipose tissue (61). However, the intracellular distribution of the compound *in vivo* could be higher than the reported blood values.

The acute effects of Pio on fuel metabolism and GIIS might be beneficial for β -cell function and glucose homeostasis. Pio-mediated reduction of GIIS might prevent hyperinsulinemia, a possible cause for the development of both insulin resistance and T2D (1, 62, 63). Although it sounds in part counterintuitive to decrease insulin secretion in hyperinsulinemic pre-diabetics or in patients with T2D, one must consider that both GIIS in the presence of elevated glucose and fatty acid amplification of GIIS are not affected by Pio. Fatty acid amplification is likely an important characteristic of β -cell hyper-secretion during insulin resistance (1). Thus, a right shift in the glucose response curve of insulin secretion likely ensures that the elevated blood FFA will not lead to excess insulin secretion at low and intermediate glucose concentrations, thereby protecting the β -cell from exhaustion. Thus, the potential harmful effect (endoplasmic reticulum and oxidative stresses) of overstimulating the β -cell in the pathogenesis of T2D (63) and beneficial effect of pausing insulin secretion (64) begin to be recognized. The possibility that TZD might work in

part through the prevention of β -cell "burnout" in the face of a fuel surfeit (57) needs being considered.

Therapeutic implications

Finally, the results suggest that Pio, metformin and berberine share at least in part common mechanisms as antidiabetic agents since all appear to be AMPK activators, mild mitochondrial inhibitors, cause a right shift in the dose dependence of GHS and have been shown to restore glycemic control (65). Thus, we would like to propose that mild mitochondrial inhibition is an attractive avenue of drug development to preserve mitochondria and the functional state of various tissues in the (pre)diabetic/metabolic syndrome glucolipotoxic environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (MP) and the Canadian Diabetes Association (MP), grant DK019514-26 from the National Institute of Health (NR and MP) and a special program grant from the Juvenile Diabetes Research Foundation and National Health and Medical Research Council (ID 427695) (CN). JL is supported by a training award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and received support from Diabète Québec. We thank Dr Marie-Soleil Gauthier for helpful discussions. MP and VP hold the Canada Research Chairs in Diabetes and Metabolism, and Diabetes and Pancreatic β -cell Function, respectively.

REFERENCES

1. **Leahy JL** 2005 Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36:197-209
2. **Prentki M, Nolan CJ** 2006 Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812
3. **Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA** 1995 An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand

- for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-12956
4. **Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S** 2006 PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116:581-589
 5. **Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW** 2004 Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 47:1306-1313
 6. **Morino K, Petersen KF, Shulman GI** 2006 Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55 Suppl 2:S9-S15
 7. **Campbell IW, Mariz S** 2007 Beta-cell preservation with thiazolidinediones. *Diabetes Res Clin Pract* 76:163-176
 8. **Higa M, Zhou YT, Ravazzola M, Baetens D, Orci L, Unger RH** 1999 Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11513-11518
 9. **Ishida H, Takizawa M, Ozawa S, Nakamichi Y, Yamaguchi S, Katsuta H, Tanaka T, Maruyama M, Katahira H, Yoshimoto K, Itagaki E, Nagamatsu S** 2004 Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress. *Metabolism* 53:488-494
 10. **Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K** 2005 Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in db/db mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E510-518
 11. **Chicco A, Basabe JC, Karabatas L, Ferraris N, Fortino A, Lombardo YB** 2000 Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. *Metabolism* 49:1346-1351
 12. **Diani AR, Sawada G, Wyse B, Murray FT, Khan M** 2004 Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E116-122

13. **Shimabukuro M, Zhou YT, Lee Y, Unger RH** 1998 Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats. *J Biol Chem* 273:3547-3550
14. **Vandewalle B, Moerman E, Lefebvre B, Defrance F, Gmyr V, Lukowiak B, Kerr Conte J, Pattou F** 2008 PPARgamma-dependent and -independent effects of Rosiglitazone on lipotoxic human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 366:1096-1101
15. **Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, Herman WH, Holman RR, Jones NP, Kravitz BG, Lachin JM, O'Neill MC, Zinman B, Viberti G** 2006 Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 355:2427-2443
16. **Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, Al-Haddad W, Dhindsa S, Dandona P** 2004 Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2728-2735
17. **Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W** 1996 Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology* 137:354-366
18. **Dubois M, Pattou F, Kerr-Conte J, Gmyr V, Vandewalle B, Desreumaux P, Auwerx J, Schoonjans K, Lefebvre J** 2000 Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells. *Diabetologia* 43:1165-1169
19. **Feinstein DL, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavrilyuk V, Dello Russo C** 2005 Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol* 70:177-188
20. **Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB** 2004 Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 314:580-585
21. **Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D** 2002 The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277:25226-25232

22. **Lebrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E** 2006 Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*
23. **Wang X, Zhou L, Shao L, Qian L, Fu X, Li G, Luo T, Gu Y, Li F, Li J, Zheng S, Luo M** 2007 Troglitazone acutely activates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells. *Life Sci* 81:160-165
24. **Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C** 2004 Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53:1052-1059
25. **Ruderman N, Prentki M** 2004 AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3:340-351
26. **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** 2004 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
27. **Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB** 2000 Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49:424-430
28. **Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP** 1987 Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 43:725-730
29. **Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M** 2007 A Role for ATP-Citrate Lyase, Malic Enzyme, and Pyruvate/Citrate Cycling in Glucose-induced Insulin Secretion. *J Biol Chem* 282:35657-35665
30. **Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Le BN** 1951 Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191:833-841

31. **Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M** 2004 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
32. **Blumentrath J, Neye H, Verspohl EJ** 2001 Effects of retinoids and thiazolidinediones on proliferation, insulin release, insulin mRNA, GLUT 2 transporter protein and mRNA of INS-1 cells. *Cell Biochem Funct* 19:159-169
33. **Bollheimer LC, Troll S, Landauer H, Wrede CE, Scholmerich J, Buettner R** 2003 Insulin-sparing effects of troglitazone in rat pancreatic islets. *J Mol Endocrinol* 31:61-69
34. **Prentki M** 1996 New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134:272-286
35. **Furnsinn C, Brunmair B, Neschen S, Roden M, Waldhausl W** 2000 Troglitazone directly inhibits CO(2) production from glucose and palmitate in isolated rat skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 293:487-493
36. **Fediuc S, Pimenta AS, Gaidhu MP, Ceddia RB** 2008 Activation of AMP-activated protein kinase, inhibition of pyruvate dehydrogenase activity, and redistribution of substrate partitioning mediate the acute insulin-sensitizing effects of troglitazone in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 215:392-400
37. **Rutter GA, Leclerc I** 2009 The AMP-regulated kinase family: enigmatic targets for diabetes therapy. *Mol Cell Endocrinol* 297:41-49
38. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE** 2001 Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108:1167-1174
39. **Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB** 2006 Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 55:2256-2264

40. **Carling D, Zammit VA, Hardie DG** 1987 A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223:217-222
41. **Winder WW, Hardie DG** 1996 Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270:E299-304
42. **Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA** 1999 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
43. **Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M** 2006 Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:S16-23
44. **Prentki M, Murthy Madiraju SR** 2008 Glycerolipid Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Endocr Rev*
45. **Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE, Febbraio MA** 2006 Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E500-508
46. **Narbonne P, Roy R** 2009 *Caenorhabditis elegans* dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival. *Nature* 457:210-214
47. **Winzell MS, Strom K, Holm C, Ahren B** 2006 Glucose-stimulated insulin secretion correlates with beta-cell lipolysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 Suppl 1:S11-16
48. **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** 2006 Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49:2120-2130
49. **Mulder H, Yang S, Winzell MS, Holm C, Ahren B** 2004 Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* 53:122-128

50. **Kim SH, Abbasi F, Chu JW, McLaughlin TL, Lamendola C, Polonsky KS, Reaven GM** 2005 Rosiglitazone reduces glucose-stimulated insulin secretion rate and increases insulin clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 54:2447-2452
51. **Konrad D, Rudich A, Bilan PJ, Patel N, Richardson C, Witters LA, Klip A** 2005 Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. *Diabetologia* 48:954-966
52. **Turner N, Li JY, Gosby A, To SW, Cheng Z, Miyoshi H, Taketo MM, Cooney GJ, Kraegen EW, James DE, Hu LH, Li J, Ye JM** 2008 Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action. *Diabetes* 57:1414-1418
53. **Rutter GA** 2001 Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Mol Aspects Med* 22:247-284
54. **Wang CZ, Wang Y, Di A, Magnuson MA, Ye H, Roe MW, Nelson DJ, Bell GI, Philipson LH** 2005 5-amino-imidazole carboxamide riboside acutely potentiates glucose-stimulated insulin secretion from mouse pancreatic islets by KATP channel-dependent and -independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 330:1073-1079
55. **Mukhtar MH, Payne VA, Arden C, Harbottle A, Khan S, Lange AJ, Agius L** 2008 Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R766-774
56. **Hardie DG, Carling D** 1997 The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246:259-273
57. **Nolan CJ, Prentki M** 2008 The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 19:285-291

58. **Kwan EP, Xie L, Sheu L, Nolan CJ, Prentki M, Betz A, Brose N, Gaisano HY** 2006 Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes* 55:1421-1429
59. **Budde K, Neumayer HH, Fritsche L, Sulowicz W, Stompor T, Eckland D** 2003 The pharmacokinetics of pioglitazone in patients with impaired renal function. *Br J Clin Pharmacol* 55:368-374
60. **Sripalakit P, Neamhom P, Saraphanchotiwitthaya A** 2006 High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 843:164-169
61. **Fujita Y, Yamada Y, Kusama M, Yamauchi T, Kamon J, Kadowaki T, Iga T** 2003 Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 136:85-94
62. **Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J** 2008 Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S262-268
63. **Aston-Mourney K, Proietto J, Morahan G, Andrikopoulos S** 2008 Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin. *Diabetologia* 51:540–545
64. **Sargsyan E, Ortsater H, Thorn K, Bergsten P** 2008 Diazoxide-induced beta-cell rest reduces endoplasmic reticulum stress in lipotoxic beta-cells. *J Endocrinol* 199:41-50
65. **Yin J, Xing H, Ye J** 2008 Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 57:712-717

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Pioglitazone reduces β -cell glucose sensitivity for insulin secretion. A-C, Insulin secretion from INS 832/13 cells incubated in the presence of (A) the indicated glucose concentrations and 0 (*open squares*), 10 (*open triangles*), 25 (*closed triangles*) or 50 μ M pioglitazone (Pio) (*closed squares*) or (B) 1 mM glucose with or without 35 mM KCl and 0 or 50 μ M Pio or (C) 6 mM glucose (6G), the indicated Pio concentrations and 0 (*open circles*) or 0.3 mM palmitate (Pal) (*closed circles*). Means \pm SEM, $n = 9$ (9 different cell wells in 3 separate experiments). Two-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ vs vehicle at same glucose concentration. D, Insulin secretion from groups of 10 rat islets treated as above. Means \pm SEM, $n = 11$ (11 different islet incubations in 3 separate experiments). Two-way ANOVA: Pio treatment effect $P = 0.02$; One-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.01$ vs vehicle for both 25 and 50 μ M Pio conditions.

FIG. 2. Pioglitazone reduces glucose oxidation, the mitochondrial membrane potential and ATP content of INS 832/13 cells. A, Glucose oxidation measured after 45 min using D-[U- 14 C]glucose. Means \pm SEM, $n = 9$ (9 different cell wells in 3 separate experiments), except 25 μ M pioglitazone (Pio) where $n = 6$ (2 separate experiments). Two-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.001$ vs vehicle at same glucose concentration. B, Changes in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) measured with rhodamine 123 after 10 min incubation. Data are expressed as changes in rhodamine 123 fluorescence versus changes measured in presence of 1 mM glucose plus DMSO. Means \pm SEM, $n = 18$ (18 different cell wells in 3 separate experiments). One-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ vs vehicle at 6 mM glucose. FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone 5 μ M. C, Total ATP content measured after 10 min incubation. Data are expressed as fold change over basal (1 mM glucose) control condition. Means \pm SEM, $n = 3$ (3 experiments done with 6 replicates). Two-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.001$ vs vehicle at same glucose concentration. Oligo, oligomycin 2 μ M and Glc, glucose.

FIG. 3. Pioglitazone inhibitory effect on GIIS involves AMPK activation in INS 832/13 cells. A, Representative immunoblots for pioglitazone (Pio)-induced AMPK α (Thr172) and ACC (Ser79) phosphorylation after 20 min incubation. B, Graph: Insulin secretion from INS 832/13 cells incubated in the presence of 10 mM glucose with (*black bars*) or without (*white bars*) 50 μ M Pio and the indicated compound C (CC) concentrations. Means \pm SEM, n = 16 (16 different cell wells in 5 separate experiments) except when compound C is used alone where n = 10 in 3 separate experiments. One-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ vs vehicle. Immunoblots: AMPK α and ACC phosphorylation status in cells collected at the end of the incubations. C-D, Insulin secretion from INS 832/13 cells incubated in the presence of the indicated glucose concentrations and (C) 0 (*open squares*), 5 (*open triangles*) or 10 μ M berberine (BBR) (*closed squares*), or (D) 0 (*open squares*), 1 (*open triangles*) or 5 mM metformin (Metf) (*closed squares*). Right to each graph: Insulin release induced by 1 mM glucose and 35 mM KCl with (*black bars*) or without (*white bars*) (C) 10 μ M BBR or (D) 5 mM Metf. Means \pm SEM, n = 9 (9 different cell wells in 3 separate experiments). Two-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ vs vehicle at same glucose concentration. Glc, glucose.

FIG. 4. Pioglitazone reduces palmitate incorporation into complex lipids in INS 832/13 cells and does not increase β -oxidation. A-C, [$1\text{-}^{14}\text{C}$] palmitate incorporation into (A) diacylglycerols (DAG), (B) triacylglycerols (TG), and (C) phospholipids (PL) was determined after 45 min incubation. Data are expressed as fold change over basal (1 mM glucose) control condition. D, Total palmitate oxidation into CO_2 plus acid soluble products calculated from the oxidation of [$1\text{-}^{14}\text{C}$]palmitate after 45 min incubation. Means \pm SEM, n = 9 (9 different cell wells in 3 separate experiments). Two-way ANOVA post-hoc analyses: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs vehicle at same glucose concentration. Pio, pioglitazone and Glc, glucose.

FIG. 5. Effect of pioglitazone in the presence and absence of exogenous palmitate on glycerol release and glucose-induced insulin secretion in INS 832/13 cells. A, Glycerol release. B, Insulin secretion. C, Relationship of glycerol release and insulin

secretion. Glycerol release and insulin secretion measured in the same experiments. Pioglitazone (Pio) concentrations of 0 (*squares*), 10 μM (*triangles*) and 50 μM (*circles*) in the absence of palmitate (*open symbols*) and presence of 0.2 mM palmitate (Pal) (*closed symbols*). Means \pm SEM, $n = 9$ (9 different cell wells in 3 separate experiments). Pio effect: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ vs vehicle at same glucose and palmitate concentrations. Palmitate effect: #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ vs same glucose and Pio concentrations in the absence of palmitate. Glc, glucose.

FIG. 6. Proposed mechanism for pioglitazone's PPAR γ -independent effects in the β -cell. Pio reduces the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), possibly via complex I inhibition in the electron transport chain (ETC), thereby reducing the rate of ATP synthesis. Consequent increase in AMP/ATP ratio may be the cause of the AMPK activation and increased ADP/ATP ratio restrains the closure of K_{ATP} channels and therefore the triggering Ca^{2+} pathway for GIIS. Reduced glucose oxidation could be the result of ETC inhibition coupled to reduced Krebs cycle activity, or a consequence of AMPK activation (via inhibition of glucokinase translocation to plasma membrane (55) or due to the inhibition of pyruvate dehydrogenase by pioglitazone (36)). Inhibition of glucose oxidation is associated with reduced pyruvate cycling and mitochondrial metabolism that generate mitochondria-derived signals such as NADPH and ROS, instrumental in the amplification pathways for GIIS (29). AMPK activation and possibly reduced ATP/ADP and ATP/AMP ratios inhibit FFA esterification, and AMPK activation inhibits lipolysis (45, 46). FFA incorporation into glycerolipids (GL) and their subsequent lipolysis are parts of the GL/FFA cycle that generates lipid signaling molecules such as free fatty acids (FA), long chain fatty acyl-CoA (LC-CoA), phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG) involved in the amplification pathways for GIIS (43). At high glucose the substrate "push" counteracts the mild metabolic inhibition of Pio. It is likely that metformin (Metf) and berberine (BBR) affect the β -cell via the same processes stemming from reduced mitochondrial function.

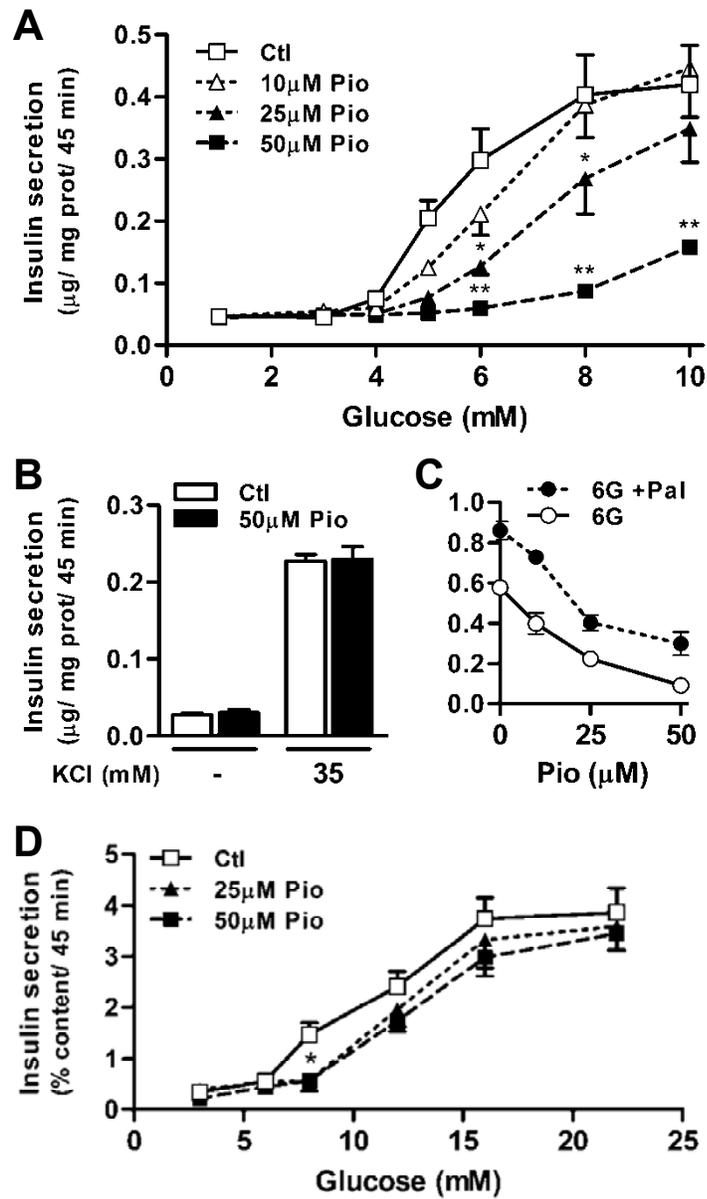


Figure 1

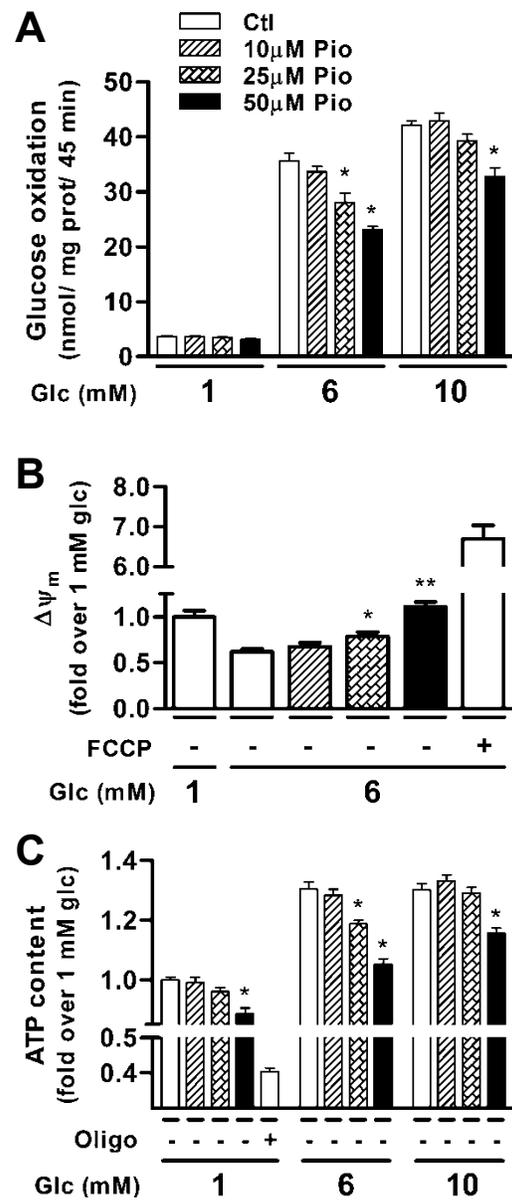


Figure 2

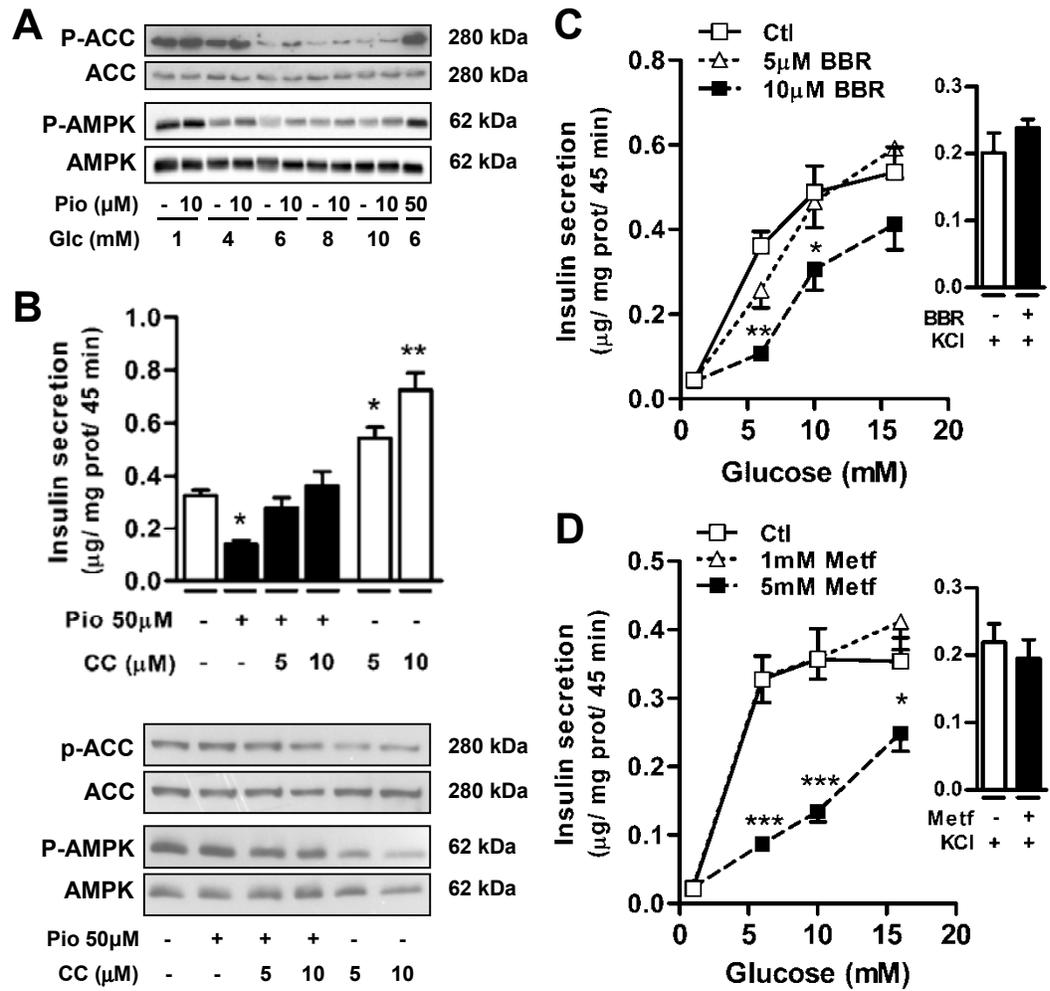


Figure 3

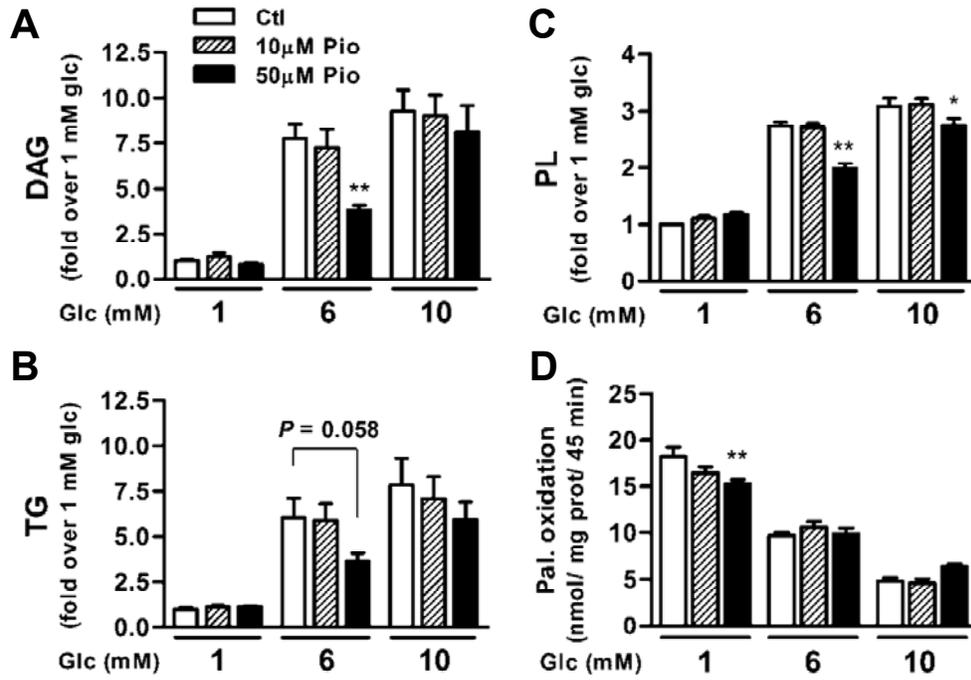


Figure 4

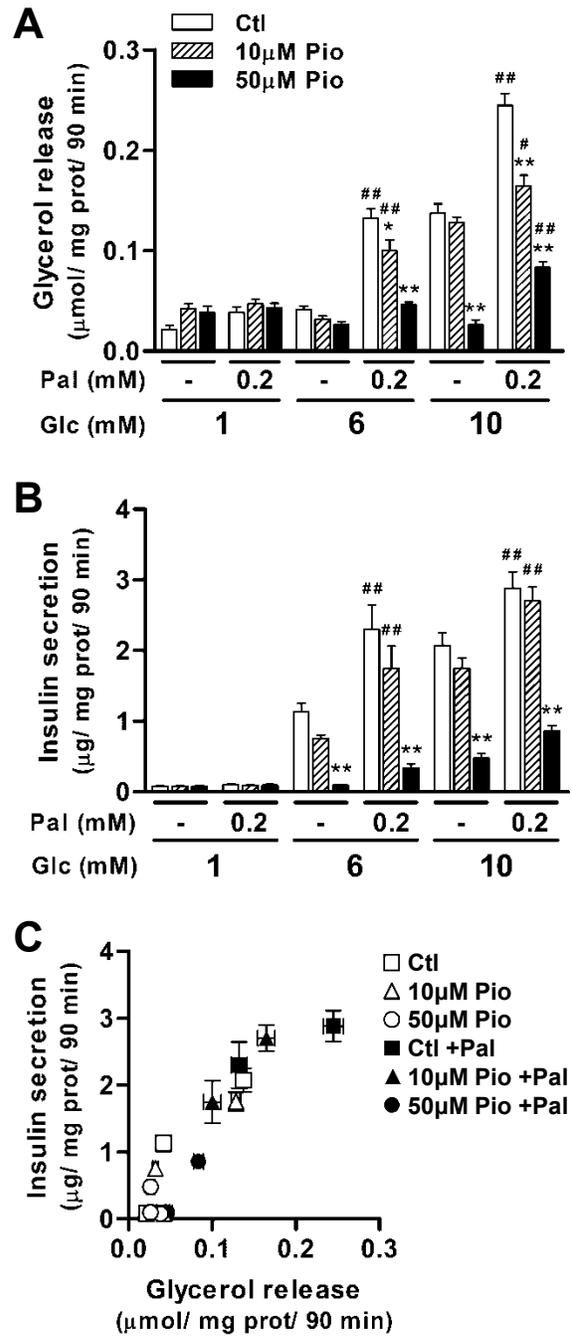


Figure 5

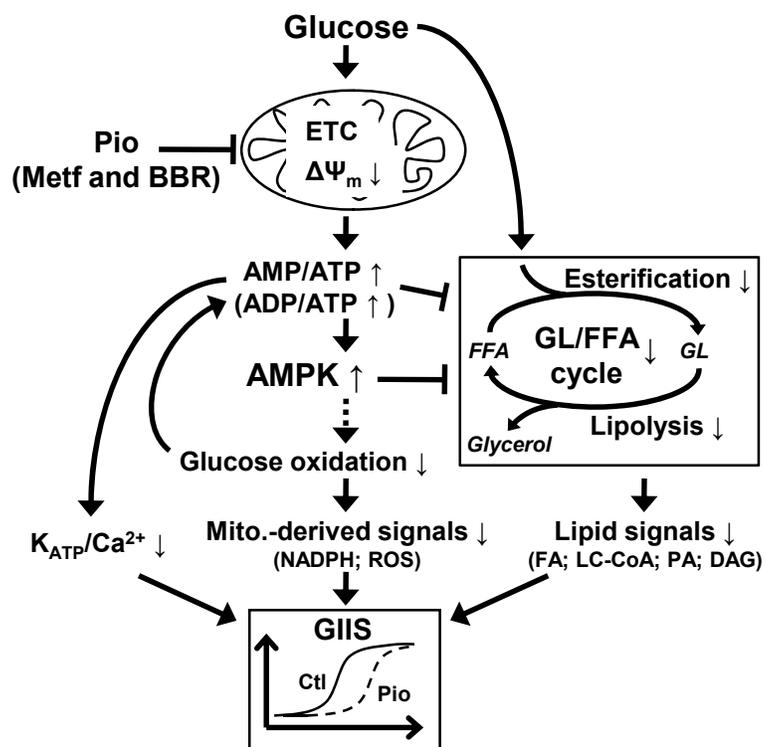


Figure 6

5.3. Effets aigus de la metformine sur la fonction et le métabolisme de la cellule β – résultats supplémentaires accompagnant le premier article

Lors de la caractérisation des effets aigus de la pioglitazone sur la cellule β et de l'identification de la décélération métabolique comme mode d'action, nous avons également généré une série de résultats avec la metformine. À l'exception des effets de la metformine sur la sécrétion d'insuline, ces données n'ont pas été incluses dans l'article de 2009, mais présentent un intérêt certain. En effet, les deux médicaments, les deux seuls (avec la rosiglitazone) utilisés en Occident pour améliorer la sensibilité à l'insuline, partagent des effets communs. Ils seraient notamment en mesure d'inhiber le complexe I de la chaîne de transport d'électrons et activent rapidement l'AMPK. Nous avons donc voulu caractériser d'avantage les effets de la metformine sur le métabolisme de la cellule β . D'après ces résultats, les deux composés sont effectivement en mesure de causer une décélération métabolique. Ce ne sont toutefois pas nécessairement les mêmes voies métaboliques qui sont affectées, bien que les résultats fonctionnels (diminution de la sécrétion d'insuline) soient semblables.

Les expériences avec la metformine ont été réalisées sur des cellules INS 832/13, traitées plus longtemps et avec une dose plus importante qu'elles l'avaient été avec la pioglitazone. Ces changements au protocole ont été nécessaires dû au fait que la metformine pénètre et s'accumule lentement dans les cellules (Davidoff 1971; van de Merbel et coll. 1998). Dans une série d'expériences pilotes, nous avons d'ailleurs tenté de déterminer quelle concentration la metformine peut atteindre à l'intérieur des cellules INS 832/13 et de quelle façon son effet se développe. La **figure S1** présente l'accumulation intracellulaire de metformine dans les conditions utilisées pour mesurer la sécrétion d'insuline dans le premier article (article 1 à la section 5.2, figure 3D). D'après ce résultat, la concentration de metformine pourrait atteindre environ 25 nmol par mg de protéines cellulaires. Suivant deux méthodes différentes de calculs présentées à l'**annexe A**, cela représenterait entre 5,7 et 14,7 mmol/L de metformine intracellulaire après 3,5 heures de traitement.

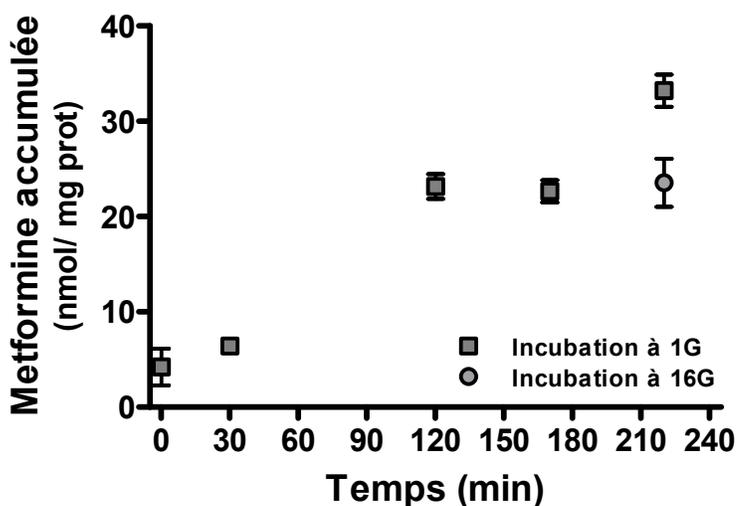


Figure S1 – La metformine s’accumule lentement dans les cellules INS 832/13.

Accumulation intracellulaire de metformine dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées pour mesurer la sécrétion d’insuline (voir premier article (section 5.2), section *Materials and Methods*). De la ^{14}C -metformine (Moravek Biochemicals, Brea, CA, États-Unis d’Amérique) a été utilisée comme traceur avec une activité spécifique de 206 cpm/nmol de metformine. Des cellules ont été récoltées après différents temps d’incubation durant la période de sevrage en glucose (après 0, 30 et 120 min de sevrage), à la fin de la période de préincubation et à la fin de la période d’incubation (effectuée à 1 et 16 mmol/L glucose). La collecte des cellules s’est déroulée comme suit : au temps désiré, les cellules en plaques de 24 puits ont été placées sur glace; du RPMI 1640 froid ne contenant pas de glucose ni autres additifs (RPMI incomplet) a été ajouté dans les puits; les cellules ont été décollées par quelques cycles d’aspiration/éjection et transférées dans des tubes de 2 mL contenant du RPMI incomplet froid; 2 lavages au RPMI incomplet froid ont été effectués avec centrifugations à 350 g, 2 min à 4 °C; le culot a ensuite été resuspendu dans une petite quantité d’eau; les cellules ont été lysées par ultrasons puis transférées dans une fiole à scintillation pour dosage de la radioactivité; des puits ne contenant pas de cellules ont été traités comme des échantillons et ont été utilisés comme blanc pour tous les temps expérimentaux étudiés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur type de la moyenne. $n=4$ réplicats au sein d’une seule expérience. Metf, metformine; Ctl, contrôle; prot, protéines.

En suivant ce protocole expérimental, nous avons répété une partie des expériences effectuées avec la pioglitazone afin de comparer les effets des deux médicaments sur le métabolisme de la cellule β . La pioglitazone inhibe l’oxydation du glucose en CO_2 en suivant le patron de la décélération métabolique (section 5.2, figure 2A). La metformine est également en mesure d’inhiber l’oxydation du glucose des cellules β mais l’effet ne disparaît pas avec l’augmentation de la concentration de

glucose jusqu'à 25 mmol/L (**figure S2A**). L'inhibition de l'oxydation du glucose par la metformine ne suit donc pas le modèle de la décélération métabolique. La metformine semble également en mesure de diminuer l'oxydation complète du palmitate en CO₂ lorsque les cellules sont exposées à de faibles concentrations de glucose (**figure S2B**). Cette tendance est semblable à celle qui avait été observée avec la pioglitazone, c'est-à-dire une inhibition de l'oxydation du palmitate mesurable seulement en présence d'une concentration non stimulante de glucose (section 5.2, figure 4D). Lorsque tous les produits résultants de l'oxydation du palmitate sont quantifiés (le CO₂ et les métabolites générés par l'oxydation incomplète du palmitate), la metformine n'a aucun effet (**figure S2C**). La **figure S2D** regroupe les résultats de l'oxydation en CO₂ des deux substrats, glucose et palmitate, exprimés en valeurs relatives aux mesures obtenues respectivement à 25 mmol/L glucose (oxydation du glucose) et 1 mmol/L glucose (oxydation du palmitate) en condition contrôle. D'après ce graphique, le traitement à la metformine diminue l'oxydation des carburants en CO₂ de 20 à 40 % sans égard au carburant utilisé. En ce qui a trait au palmitate, l'effet n'a ainsi lieu qu'à des concentrations faibles de glucose (inférieures à 6 mmol/L).

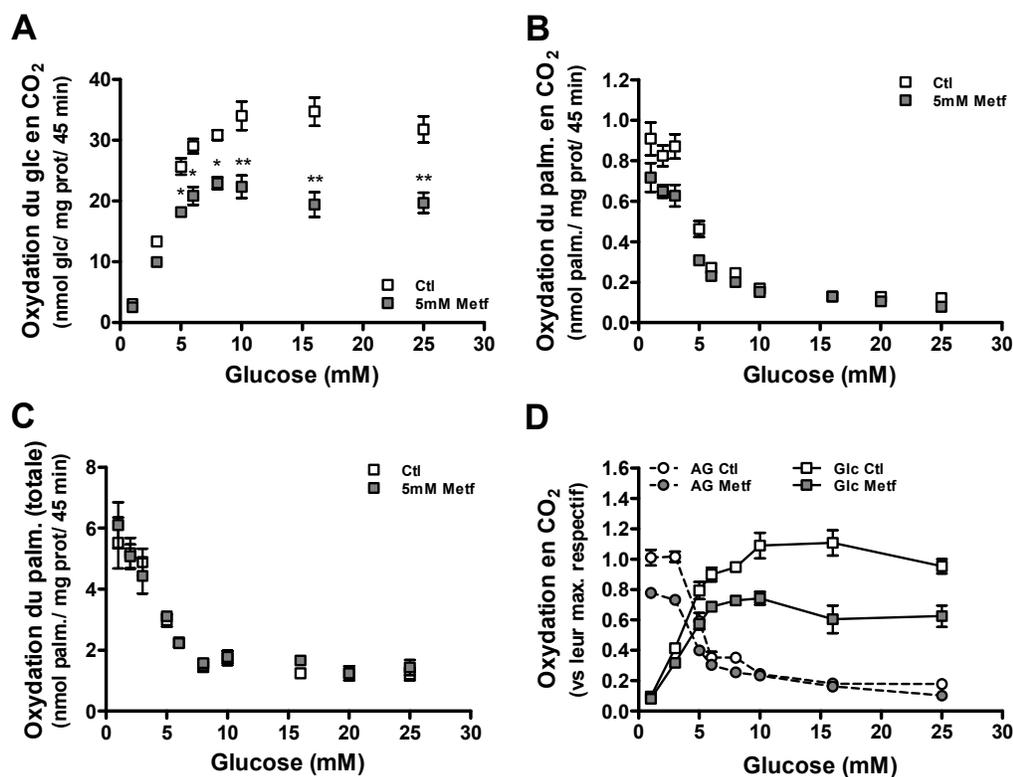


Figure S2 – La metformine inhibe l’oxydation des carburants en CO₂ des cellules INS 832/13. A-C, Oxydation du glucose (glc) en CO₂ (A), du palmitate (palm.) en CO₂ (B) et oxydation totale du palmitate (CO₂ et métabolites solubles dans l’acide qui résultent de l’oxydation incomplète du palmitate) (C). Les expériences ont été effectuées tel que décrit dans la section *Materials and Methods* du premier article (section 5.2) en utilisant de la metformine (metf.) et de l’eau comme véhicule plutôt que de la pioglitazone et du DMSO. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur type de la moyenne. n=6 différents échantillons au sein de 3 expériences indépendantes pour l’oxydation du glucose et n=4 différents échantillons au sein de 2 expériences indépendantes pour l’oxydation du palmitate. Test *post hoc* de Bonferroni suivant une analyse ANOVA à deux voies pour l’effet de la metformine à une concentration de glucose donnée : *, $P < 0,01$; **, $P < 0,001$. D, Oxydation du glucose et du palmitate exprimée en valeurs relatives à l’oxydation maximale (max.) pour chacun des substrats en conditions contrôles (25 mmol/L glucose pour l’oxydation du glucose; 1 mmol/L glucose pour l’oxydation du palmitate) et présentées sur le même graphique. Ctl, contrôle; prot, protéines.

Les effets de la metformine sur le potentiel de membrane mitochondrial des cellules β ont également été étudiés à l’aide du fluorochrome rhodamine 123 et sont présentés à la **figure S3**. Les mesures effectuées en absence de metformine permettent d’apprécier l’augmentation du potentiel de membrane suivant

l'augmentation de la concentration de glucose. Cette courbe est similaire à celles obtenues pour la sécrétion d'insuline avec les mêmes cellules (voir par exemple la **figure S5A**). L'ajout de metformine diminue de façon importante le potentiel de membrane mitochondrial en présence de concentrations intermédiaires de glucose. Néanmoins, lorsque la concentration de glucose atteint 25 mmol/L, l'effet est nettement atténué, respectant en cela le concept de décélération métabolique. La courbe obtenue en présence de metformine est encore ici presque similaire à celle obtenue pour la sécrétion d'insuline (**figure S5A**).

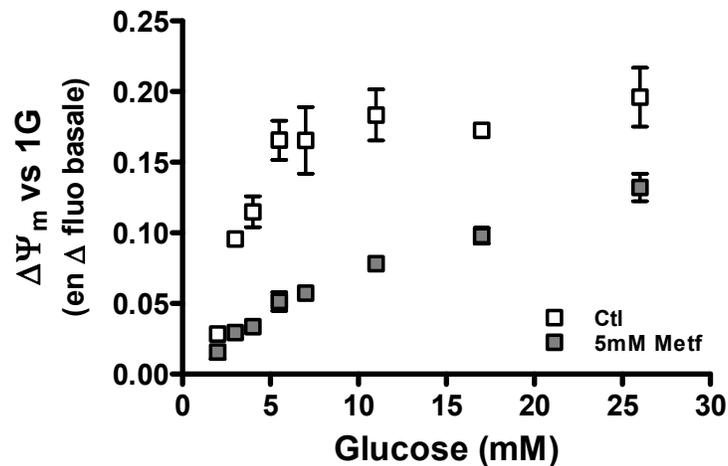


Figure S3 – La metformine diminue le potentiel de membrane mitochondrial des cellules INS 832/13 selon le patron de la décélération métabolique. Le potentiel de membrane mitochondrial a été mesuré à l'aide du fluorochrome rhodamine 123 en utilisant les mêmes milieux et produits que ceux utilisés dans le premier article (section 5.2), mais en suivant un design expérimental différent : les cellules ont été cultivées dans une plaque de 12 puits; sevrées de glucose 2 h dans du RPMI complet contenant 3 mmol/L glucose, en présence ou non de 5 mmol/L metformine; lavées et préincubées 25 min avec/dans du KRBH contenant 1 mmol/L glucose et 0,5 % P/V d'albumine sérique bovine (BSA) en présence ou non de 5 mmol/L metformine (KRBH 1G/0,5% BSA ± metf); préincubées une seconde fois 20 min dans du KRBH 1G/0,5% BSA ± metf contenant 10 µg/mL de rhodamine; lavées et incubées avec/dans 500 µL de KRBH 1G/0,5% BSA ± metf, et placées dans un lecteur de plaques FLUOstar; des lectures basales ont été effectuées à chaque 30 sec durant 25 min; 20 µL de KRBH contenant du glucose concentré a ensuite été ajouté manuellement dans les puits (à l'extérieur de l'appareil) pour atteindre la concentration de glucose indiquée; les lectures ont ensuite repris durant 35 min; la différence de fluorescence entre les lectures basales et après stimulation au glucose a été calculée (Δ basale). Les résultats indiquent la différence entre la moyenne des Δ basales obtenues entre la 55,5^e et 60^e minute de lecture de fluorescence en présence

de X mmol/L glucose et celles obtenues en présence de 1 mmol/L glucose pour un même traitement (metformine (Metf) ou contrôle (Ctl)). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur type de la moyenne. n=6 différents puits au sein de 2 expériences effectuées pour chacune des concentrations de glucose (16 expériences au total). Analyse ANOVA à deux voies pour l'effet de la metformine : $P < 0,0001$.

L'augmentation de l'oxydation du glucose et du potentiel de membrane ont été associées par plusieurs à une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène dans les cellules β (Pi et coll. 2007; Leloup et coll. 2009). En diminuant ces paramètres, la metformine devrait également diminuer la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène. Nous avons tenté d'évaluer leur quantité en utilisant entre autres le fluorochrome dihydroéthidium (HE) pour les détecter par cytométrie en flux. D'après le fabricant du produit, l'HE réagit principalement avec l'anion superoxyde. Dans ces expériences, présentées à la **figure S4**, l'augmentation des concentrations de glucose a diminué la détection des dérivés réactifs de l'oxygène, principalement entre 1 et 6 mmol/L. Comme attendu, l'ajout de metformine entraîne une légère diminution du signal à toutes les concentrations de glucose étudiées.

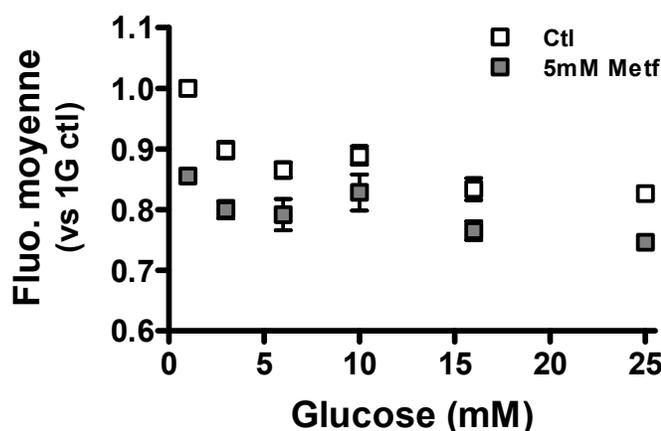


Figure S4 – La metformine diminue la détection des dérivés réactifs de l'oxygène dans les cellules INS 832/13. La détection des dérivés réactifs de l'oxygène intracellulaires a été effectuée à l'aide du fluorochrome dihydroéthidium (Invitrogen, Eugene, OR, États-Unis d'Amérique) détecté par cytométrie en flux (FACSCanto, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) selon la procédure suivante : les cellules ont été cultivées dans une plaque de 12 puits; sevrées de glucose 2 h dans du RPMI complet contenant 3 mmol/L glucose, en présence ou non de 5 mmol/L metformine; lavées et préincubées 45 min avec/dans du KRBH contenant 1 mmol/L glucose et 0,5 % P/V d'albumine sérique bovine (BSA) en présence ou non de 5 mmol/L

metformine; incubées 15 min dans du KRBH contenant la concentration indiquée de glucose et 0,5 % P/V de BSA, 2,5 $\mu\text{mol/L}$ de dihydroéthidium, en présence ou non de 5 mmol/L metformine; le milieu a ensuite été retiré; les cellules ont été décollées avec de la trypsine (2 min de digestion) et récupérées dans un tampon phosphate contenant 3 % V/V de sérum fœtal bovin (PBS 3% FBS); après centrifugation 3 min à 1200 g, les cellules ont été resuspendues dans du PBS 3 % FBS et conservées sur glace; le signal du dihydroéthidium a été détecté en cytométrie de flux à 515-545 nm après excitation à 488 nm; la population de cellules vivantes a été sélectionnée pour l'analyse de leur fluorescence moyenne; la fluorescence moyenne des cellules d'une condition a ensuite été exprimée en valeur relative à la fluorescence moyenne des cellules contrôles incubées en présence de 1 mmol/L glucose. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. $n=3$ différentes expériences. Analyse ANOVA à deux voies pour l'effet de la metformine : $P<0,0001$.

Enfin, nous avons poursuivi l'étude des effets de la metformine sur le métabolisme des lipides en quantifiant la libération de glycérol, une mesure indicatrice de l'activité lipolytique des cellules. La libération de glycérol est la mesure de l'activité métabolique la plus affectée par la pioglitazone parmi les paramètres mesurés (section 5.2, figure 5A). Dans une série d'expériences, nous avons parallèlement dosé le glycérol et l'insuline sécrétés par les cellules INS 832/13 stimulées par du glucose (**figure S5**). Les résultats de sécrétion d'insuline sont similaires à ceux présentés dans le premier article (section 5.2) à la figure 3D et ressemblent ainsi à ceux obtenus avec la pioglitazone. La metformine n'est toutefois pas en mesure d'affecter la libération de glycérol, et ce, pour toutes les concentrations de glucose testées. Il est intéressant d'ajouter que lors d'expériences pilotes, la metformine n'a pas non plus été en mesure de diminuer l'incorporation de palmitate à des glycérolipides, des phospholipides ou du cholestérol (données non présentées). Ces expériences se sont déroulées d'une manière identique à celles effectuées avec la pioglitazone (section 5.2, figure 4A-C). Il est à noter que la pioglitazone diminue grandement l'activité du cycle GL/AGL alors que ce n'est pas le cas pour la metformine.

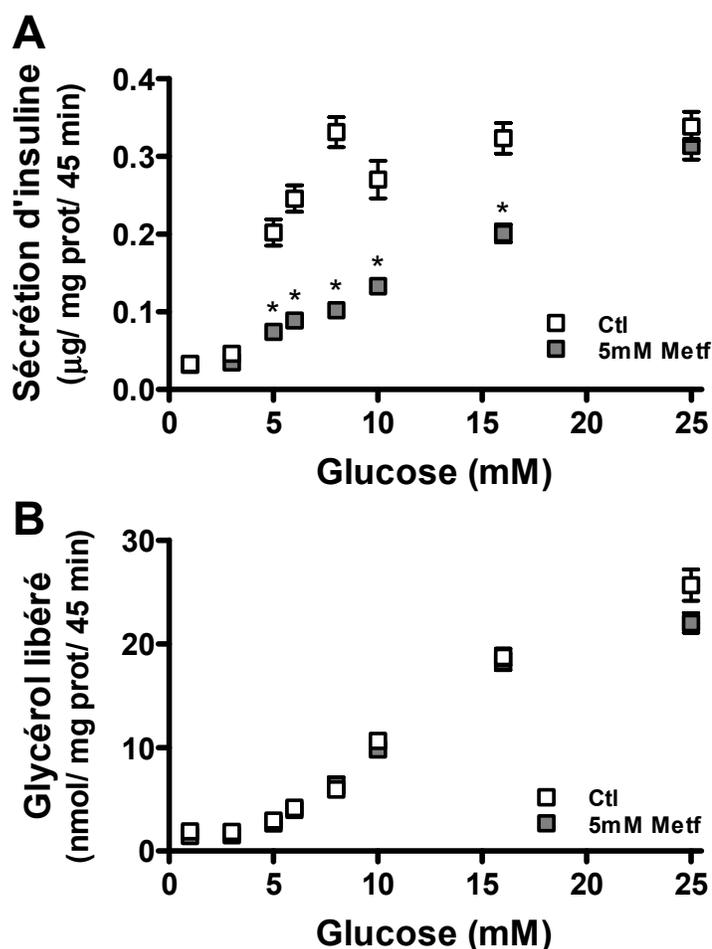


Figure S5 – La metformine inhibe la sécrétion d’insuline induite par le glucose selon le patron de la décélération métabolique, mais est sans effet sur la libération de glycérol par les cellules INS 832/13. Insuline et glycérol ont été dosés sur les mêmes échantillons. A, Sécrétion d’insuline induite par le glucose mesurée comme indiqué dans la section *Materials and Methods* du premier article (section 5.2). B, Glycérol dosé comme indiqué dans la section *Materials and Methods* du premier article (section 5.2). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur type de la moyenne. $n=9$ différents échantillons au sein de 3 expériences indépendantes. Test *post hoc* de Bonferroni suivant une analyse ANOVA à deux voies pour l’effet de la metformine à une concentration de glucose donnée : * $P<0,001$.

5.4. Retour critique sur le premier article

Nouveauté et portée des résultats

Dans cet article nous proposons, pour la première fois, la décélération métabolique comme mécanisme d’action pour la pioglitazone et suggérons que le

concept pourrait également s'appliquer à la metformine et à la berbérine, deux autres agents insulinosensibilisateurs. Dans un contexte de surabondance de nutriments et de stress métabolique, la décélération métabolique de la cellule β et la diminution aigüe de la sécrétion d'insuline en présence de concentrations intermédiaires de glucose pourraient s'avérer bénéfiques pour la cellule β et l'homéostasie glucidique. Le phénomène pourrait également s'avérer bénéfique à d'autres types cellulaires éventuellement touchés directement par la décélération métabolique.

Le concept et le nom que nous lui avons donné a été repris par Sof Andrikopoulos dans une revue l'année suivant la publication de notre article (Andrikopoulos 2010). Le concept est particulièrement attrayant du fait qu'il propose un mécanisme commun par lequel les deux médicaments antidiabétiques insulinosensibilisateurs pourraient agir. Ces deux médicaments sont parmi les plus efficaces de la pharmacopée pour rétablir l'homéostasie glucidique.

Notre étude souligne aussi clairement l'intérêt d'étudier la physiologie de la cellule β sur toute la gamme de leur courbe de sensibilité au glucose. Si nous avons utilisé seulement deux concentrations de glucose (typiquement 3,3 et 16,7 mmol/L), comme le font beaucoup d'études, nous n'aurions observé aucun effet inhibiteur de la pioglitazone et serions passé à côté d'un mécanisme potentiellement clé dans les effets thérapeutiques du médicament.

Forces du premier article

L'utilisation d'un modèle cellulaire (cellules INS 832/13) *in vitro* a permis d'étudier en profondeur les effets de la pioglitazone et de la metformine sur la fonction et le métabolisme de la cellule β . Cette étude aurait été impossible à faire *in situ*, dans un organisme vivant et plus difficile à réaliser et à interpréter en utilisant seulement des cultures primaires (îlots isolés de rongeurs). En effet, certaines expériences ont demandé d'importantes quantités de matériel et l'interprétation des résultats générés avec des îlots isolés est compliquée par le fait qu'il ne s'agit pas de structures homogènes en terme de types cellulaires. L'approche était idéale pour nous permettre d'identifier un mécanisme d'action pour les médicaments insulinosensibilisateurs, qui peut ensuite être testé dans un modèle plus complexe. Nous avons vérifié notre principale conclusion avec des îlots de rats, à savoir que la

pioglitazone inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose selon le modèle de la décélération métabolique.

Un élément particulièrement important de notre étude réside dans le fait que les résultats ont été générés sur une large gamme de concentrations de glucose. La plupart des études *in vitro* réalisées sur la cellule β se contentent de tester deux concentrations de glucose : une concentration non stimulante (quand ce n'est pas en absence de glucose) et une concentration élevée de glucose (qui correspond *in vivo* à une hyperglycémie marquée). La façon avec laquelle nous avons procédé dans cet article mérite d'être utilisée plus souvent pour l'étude de la cellule β .

Limites du premier article

Les cellules INS 832/13 sont, fonctionnellement, un bon modèle de cellule β , mais demeurent des cellules transformées, qui sont dérivées d'un insulinome et qui possèdent une copie du gène de l'insuline humain. Bref, les résultats obtenus devaient être confirmés dans un autre modèle, ce qui a été accompli en partie dans le deuxième article.

Des doutes demeurent sur les doses utilisées pour la pioglitazone et la metformine relativement aux concentrations cliniquement efficaces. Dans les deux cas, les concentrations utilisées *in vitro* sont élevées par rapport à ce qui est rapporté *in vivo* chez l'humain et même chez les rongeurs. Il est toutefois difficile de déterminer les véritables concentrations auxquelles sont exposées les cellules *in situ* et, dans le cas de la metformine, d'avoir une idée des concentrations intracellulaires atteintes chez l'humain. Néanmoins, si les doses utilisées devaient s'avérer trop élevées par rapport à ce qui est nécessaire pour observer un bénéfice clinique, nous croyons que la décélération métabolique garde son intérêt comme approche thérapeutique et mérite d'être considérée dans le développement de nouveaux agents antidiabétiques.

Questions en suspens – suites à donner au projet

Notre étude *in vitro* laisse plusieurs questions en suspens. Nous ne savons toujours pas quelle est la cible première de la pioglitazone, ni quel est le rôle de l'AMPK dans les effets observés. À ce sujet, il aurait été intéressant de connaître non seulement la quantité totale d'ATP présent dans les cellules mais également celle des autres nucléotides à adénine. Étant donné que l'activation de l'AMPK est un effet

partagé par de nombreuses interventions bénéfiques pour l'homéostasie du glucose, nous pourrions déterminer si elle a un rôle à jouer dans la décélération métabolique en utilisant des approches de biologie moléculaire pour modifier son expression. Par exemple, nous pourrions diminuer l'expression de l'AMPK dans les cellules INS 832/13 et déterminer si la pioglitazone et la metformine ont toujours les mêmes effets sur la sécrétion d'insuline, puis sur le métabolisme mitochondrial, l'oxydation du glucose et la répartition lipidique.

Le ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ mitochondrial est une autre donnée qui serait utile pour identifier l'origine des effets observés. À défaut de mesurer ce ratio, le profil d'acétylation des protéines mitochondriales pourrait être indicateur de la quantité de NAD^+ disponible (puisque'il régule l'activité des sirtuines (voir la section 8.1)). Pour identifier la cible première de la pioglitazone, nous pourrions tenter de déterminer si elle inhibe directement l'activité des déshydrogénases dans notre système expérimental, en particulier l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase, de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et du complexe I de la chaîne de transport d'électrons.

Les courbes de sécrétion d'insuline ou du métabolisme sont basées sur des mesures statiques, effectuées dans un même milieu pendant une période de temps donnée – un milieu dans lequel des métabolites s'accumulent. Il serait pertinent de vérifier qu'il est possible d'observer le phénomène de la décélération métabolique dans des expériences de périfusion, lorsque les deux phases de sécrétion sont mesurées dans un milieu continuellement renouvelé. Les expériences *in vivo* présentées plus loin répondent en partie à cette interrogation. C'est-à-dire qu'ils démontrent qu'il est possible d'observer *in vivo* une diminution de la sécrétion d'insuline lors d'un traitement aigu à la pioglitazone, mais on ne sait toujours pas si l'inhibition suit le profil de la décélération métabolique ou non.

6. Deuxième article

6.1. Présentation du deuxième article

Le deuxième article inséré dans cette thèse a été soumis pour publication en avril 2012 à la revue *Diabetes* et a reçu des critiques positives. Les auteurs sont les mêmes que ceux du premier article. J'ai réalisé la majorité des expériences et contribué à l'écriture de l'article. Émilie Pepin a contribué à la mise au point des techniques utilisées pour mesurer la consommation d'oxygène (figure 5) et a révisé l'article. Marie-Line Peyot, Neil B. Ruderman, Christopher J. Nolan, Erik Joly et Vincent Poitout ont révisé l'article. S.R. Murthy Madiraju et Marc Prentki ont contribué à l'écriture de l'article. Les expériences qui y sont présentées ont été réalisées pour faire directement suite au premier article et déterminer s'il était possible d'observer un ralentissement du métabolisme et une inhibition de la sécrétion d'insuline *in vivo*, à l'échelle d'un organisme. Nous avons choisi le rat Wistar comme modèle expérimental. Afin de demeurer dans des conditions aigües, les rats ont reçu la pioglitazone par gavage 45 min avant différentes mesures de l'homéostasie glucidique et de la dépense énergétique.

L'effet aigu de la pioglitazone sur la sécrétion d'insuline a été déterminé par des clamps hyperglycémiques à deux paliers (8,3 et 16,7 mmol/L), alors que des clamps hyperinsulinémiques-euglycémiques ont été effectués pour évaluer son effet sur la sensibilité à l'insuline. Deux approches ont été employées pour déterminer si la pioglitazone pouvait ralentir le métabolisme à l'échelle de l'organisme : la calorimétrie indirecte et la mesure de la température corporelle par biotélémetrie.

D'après les résultats des clamps glucidiques, un traitement aigu à la pioglitazone diminue de façon importante la sécrétion d'insuline, augmente légèrement la clairance de l'insuline et affecte peu la sensibilité à l'insuline. Le traitement diminue également la dépense énergétique des animaux (diminue leur consommation d'oxygène et leur production de CO₂), mais demeure sans effet sur leur quotient respiratoire et leur température corporelle. Suite aux résultats de calorimétrie indirecte, nous avons également mesuré les effets de la pioglitazone sur la consommation d'oxygène des cellules INS 832/13 en culture. L'exposition des

cellules à 25 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone réduit considérablement leur taux de consommation d'oxygène et leur sécrétion d'insuline en présence de 8 mmol/L glucose. En accord avec le concept de décélération métabolique, l'effet est moins prononcé lorsque les cellules se trouvent en présence de 25 mmol/L glucose. Pour déterminer si l'activation de PPAR γ avait un rôle à jouer dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline, les cellules INS 832/13 ont également été traitées avec deux agonistes de PPAR γ , qui ne sont pas des TZDs et qui sont de structure chimique différentes. Aucun des deux agonistes ne diminue la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Un traitement aigu à la pioglitazone est ainsi en mesure de ralentir le métabolisme à l'échelle de l'organisme et de diminuer la sécrétion d'insuline, avant que la sensibilité à l'hormone soit augmentée. Les résultats renforcent l'idée que la décélération métabolique de la cellule β (et d'autres types cellulaires) puisse être instrumentale dans les effets de la pioglitazone. La décélération métabolique pourrait contribuer à la diminution de l'insulinémie observée lors d'un traitement à la pioglitazone et faire partie de l'ensemble des causes qui font de la pioglitazone un bon agent antidiabétique.

6.2. Deuxième article

Pioglitazone acutely reduces *in vivo* energy metabolism and insulin secretion in rats

Short running title: Pioglitazone and metabolic deceleration

Authors:

Julien Lamontagne, Émilie Pepin, Marie-Line Peyot, Neil B. Ruderman, Christopher J. Nolan, Erik Joly, S. R. Murthy Madiraju, Vincent Poitout and Marc Prentki

Affiliations:

J.L., É.P., M.-L.P., E.J., S.R.M.M. and M.P.: Molecular Nutrition Unit and Montreal Diabetes Research Center (MDRC) at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), and Departments of Nutrition (M.P.) and Biochemistry (M.P. and J.L.) and Program of Molecular Biology (É.P.), University of Montreal, Montréal, QC, Canada

N.B.R.: Departments of Medicine and Physiology and Biophysics, Boston University School of Medicine and Diabetes Unit, Section of Endocrinology, Boston University School of Medicine and Boston Medical Center, Boston, MA, USA

C.J.N.: The Australian National University Medical School, Canberra, Australia

V.P.: MDRC at the CRCHUM and Departments of Medicine, Biochemistry and Nutrition, University of Montreal, Montréal, QC, Canada

Corresponding author:

Dr. Marc Prentki, Montreal Diabetes Research Center,
CRCHUM, Montréal, QC, Canada

ABSTRACT

Our objective was to determine if the insulin-sensitizing drug pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration *in vivo* independently of change in insulin sensitivity. We assessed glucose homeostasis by hyperinsulinemic-euglycemic (HIEC) and hyperglycemic (HGC) clamp studies, and energy expenditure by indirect calorimetry and biotelemetry in male Wistar rats 45 min after a single oral dose of pioglitazone (30 mg/kg). The effects of pioglitazone on insulin secretion and oxygen consumption were also measured in INS 832/13 β -cells. *In vivo* insulin secretion in response to clamped hyperglycemia during HGC was dramatically reduced and insulin clearance was slightly increased following acute pioglitazone treatment. Insulin sensitivity assessed by the HIEC, however, was minimally affected by pioglitazone at this early time point. Pioglitazone also reduced energy expenditure without altering respiratory exchange ratio or core body temperature. Glucose-induced insulin secretion and oxygen consumption were reduced by pioglitazone in INS 832/13 cells. In conclusion, pioglitazone acutely induces whole body metabolic slowing and reduces glucose-induced insulin secretion, the latter being largely independent from the insulin-sensitizing action of the drug. The results suggest that pioglitazone has direct metabolic deceleration effects on the β -cell that may contribute to its insulin-lowering capacity and anti-diabetic action.

INTRODUCTION

Major drugs developed to treat type 2 diabetes aim at either increasing insulin secretion or reducing insulin resistance (1-4). Two classes of insulin-sensitizing agents are currently used: the biguanides (metformin) and the thiazolidinediones (TZDs), of which the only one still recommended for use in some countries is pioglitazone (5). TZDs are peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonists. They stimulate adipocyte differentiation, relieving other tissues from fat excess, thereby reducing their resistance to insulin (6; 7). TZDs' beneficial effects are not limited to increased insulin sensitivity but also include preservation of β -cell

function (8). It is thought that the beneficial effect of TZDs on β -cell function *in vivo* is indirect and occurs via a relief of the need for insulin hypersecretion due to their insulin sensitizing action. We should however consider the possibility that the classical anti-diabetic insulin sensitizers pioglitazone and metformin might also have beneficial effects on glucose homeostasis via direct reduction of insulin hypersecretion independently of insulin resistance.

We previously demonstrated *in vitro* that pioglitazone acutely slows down glucose and lipid metabolism in the β -cell and inhibits glucose-induced insulin secretion (GIIS) primarily at submaximal and much less at maximal glucose concentrations (right shift in the glucose dose response) via a PPAR γ -independent mechanism (9). These acute effects of pioglitazone are likely due to complex I inhibition of the electron transport chain (10) and involve reduced glucose oxidation, decreased ATP levels and increased AMPK activation (9). Interestingly, metformin causes similar effects (JL and MP, unpublished). Hence, we proposed the novel concept of “metabolic deceleration” as a mode of action of some anti-diabetic drugs and suggested that the action of pioglitazone to reduce glucose metabolism and insulin secretion in the β -cell may partly explain its beneficial effects (9). In fact, earlier studies on the role of Foxo1 in the β -cells suggested that this transcription factor induces a state of “metabolic diapause” in β -cells by repressing the processes related to glycolysis, and ROS production, thus reducing GIIS (11; 12). The concept that metabolic deceleration protects the β -cell from both oxidative and endoplasmic reticulum stress has recently been reviewed (13; 14).

In the present study we carried out *in vivo* experiments in normal rats to better understand how acute treatment with pioglitazone improves glucose homeostasis, with particular focus on how it reduces hyperinsulinemia. The following questions were asked: 1) can we confirm *in vivo* our previous *in vitro* findings in isolated rat islet and β -cell line that pioglitazone acutely reduces insulin secretion?; 2) is this acute effect of pioglitazone on insulin secretion independent of its effects on insulin sensitivity or clearance?; and 3) does pioglitazone acutely slow down whole body energy metabolism?

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Materials

Tissue and cell culture supplies were from Corning (Corning, NY). Pioglitazone-HCl (Toronto Research Chemicals, North York, ON, Canada) was suspended at 5 mg/ml in 0.5% methyl-cellulose (Sigma, St. Louis, MO) prepared in autoclaved tap water. Stock solutions of pioglitazone, GW1929 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) and CAY10599 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) were prepared in DMSO at 10, 1.2, and 15 mmol/l, respectively. Glycemia was monitored using an Accu-Chek (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) glucometer. Total plasma insulin, total insulin content and media insulin concentrations were determined by radioimmunoassay using human insulin standards (Linco Research, St. Charles, MO). ELISA was used to determine rat plasma C-peptide concentrations (both I and II; Mercodia AB, Uppsala, Sweden). Protein content was determined using the bicinchoninic acid assay from Pierce (Rockford, IL).

Animals and pioglitazone administration

All procedures were approved by the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals. 300-350 g-male Wistar rats (Charles River, St-Constant, QC, Canada) were housed under controlled temperature on a 12-h light–dark cycle with unrestricted access to water and standard chow. For glucose clamp procedures, animals underwent catheterization of the jugular vein and carotid artery as described (15) and recovered for 6 days. For indirect calorimetry studies, rats were acclimatized for 36 h in acrylic chambers bedded with hardwood chips. For biotelemetry studies, C50-PT probes (Data Sciences International, St. Paul, MN) were implanted with a catheter inserted through the femoral artery up to the abdominal aorta and the telemetry device body fixed to the muscle wall as described (16). Rats were allowed 10-13 days to recover and received 5 mg/kg carprofen subcutaneous in the first 3 days. On experimental days, food was withdrawn at 07:00 and pioglitazone (30 mg/kg) or vehicle was administered by gavage (6 ml/kg) at 09:00. All animals were sacrificed at the end of procedures by pentobarbital overdose.

Hyperglycemic clamps (HGC)

Conscious rats were subjected to two-step HGC followed by an arginine bolus, in a technique modified from (15). The clamp procedure was started 45 min after the rats were gavaged with pioglitazone or vehicle. Blood glucose was clamped at 8.3 mmol/l for 30 min and 16.7 mmol/l for another 30 min. A bolus of arginine (174 mg/kg; Sandoz, Boucherville, QC, Canada) was injected at 121 min to assess total β -cell secretory capacity. Plasma samples (150 μ l of blood) were collected from the carotid artery for insulin and C-peptide determinations at 0 (before glucose infusion), 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 121 and 131 min. Insulin clearance was estimated by the C-peptide/insulin molar ratio (17).

Hyperinsulinemic-euglycemic clamps (HIEC)

On the day of the experiment, the jugular vein catheter was connected to two syringes containing either insulin (Humulin-R®; Eli Lilly, Indianapolis, IN) or 20% dextrose (Baxter Corporation, Mississauga, ON, Canada), installed on a Harvard 33 Twin Syringe Pump (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Insulin was prepared as follows: 20 μ l of insulin 100 U/ml was added to 20 μ l of rat plasma and diluted to 200 mU/l with saline. The clamp procedure was started 45 min after the gavage of pioglitazone or vehicle in conscious animals by an insulin bolus (time 0 min) of 75 mU/kg/min for 45 s and 37.5 mU/kg/min for another 45 s, and the insulin infusion was then reduced to 5 mU/kg/min for the rest of the procedure. After 5 min, a blood sample was collected and a 20% dextrose infusion was started to clamp blood glucose at pre-clamp level (6.5 mmol/l). Glycemia was monitored from samples collected every 5 min. Plasma samples (150 μ l of blood) were collected from the carotid artery for insulin determination at 0 (before any infusion), 60, 90 and 120 min. The M/I index of insulin sensitivity was calculated by dividing the average glucose infusion rate during the last 60 min of the clamp ("M" expressed in μ mol/kg/min) by the average circulating insulin value ("I" expressed in pmol/l) during the same time period (17).

Indirect calorimetry

Gas exchanges were measured for 6 h following gavage by pioglitazone or vehicle in an open circuit calorimeter with ambulatory activity monitoring using PhysioScan and VersaMax systems (AccuScan Instruments, Columbus, OH). Oxygen

and carbon dioxide concentrations were analyzed in each cage by sequential readings from gas samples continuously withdrawn from cages at a rate of 2.0 l/min. Gas samples were compared to ambient air composition for VO_2 and VCO_2 calculations. The oxygen analyzer was calibrated before each experiment by adjusting respiratory quotient (VCO_2/VO_2) readings to 0.7 using two 24 h-fasted rats (not included in the study). Ambulatory activity was continuously monitored based on infrared beam interruptions in horizontal and vertical positions. Gas fractions and flow rate were used to calculate energy expenditure (EE) as follows: $\text{EE} = ((4.33 * \text{VO}_2) + (0.67 * \text{VCO}_2)) * \text{BW}(\text{in kg}) * 60$, where gas fractions are expressed in ml/kg/min.

Biotelemetry

The C50-PT probe implanted rats had their core body temperature, heart rate and blood pressure values recorded every minute using Data Sciences system and averaged over 30 or 60 min for clarity. This was a cross-over study with all animals receiving pioglitazone and placebo in an alternating order, with a 10-day washout period in between. For each experimental period, data was collected for a total of 68 h from 19:00 with food being removed after 36 h, pioglitazone or vehicle being given by gavage after 38 h, and food being returned after 46 h.

Cell culture

INS 832/13 cells (18) were cultured as described (9). Experiments were conducted in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mmol/l HEPES (pH 7.4) (KRBH) except during measurement of the oxygen consumption rate, where bicarbonate was omitted in order to maintain a stable pH.

Oxygen consumption and insulin secretion in INS 832/13 cells

Oxygen consumption rate (OCR) *in vitro* was measured using a XF24 respirometer (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). INS 832/13 cells were seeded a day before the experiments at 7×10^4 cells/well in XF 24 well microplates. Media were changed to RPMI 1640 complete containing 3 mmol/l glucose 2 h prior to the experiments. Cells were then washed and pre-incubated for 1 h in KRBH containing no bicarbonate, 2 mmol/l glucose and 0.07% BSA (KRBH-XF) at 37°C under atmospheric CO_2 concentrations. After basal measurement for 20 min, pioglitazone or DMSO was added by 3 successive automatic injections of KRBH-XF to reach

25 $\mu\text{mol/l}$ pioglitazone or equivalent DMSO volume. Glucose was added after another 20 min by a fourth injection of medium to reach 8 or 25 mmol/l . OCR was measured for another 50 min after which media and cells were collected to measure accumulated insulin secretion over the time of the total incubation (~ 150 min).

Experiments testing PPAR γ agonists on INS 832/13 cells were performed as previously described for pioglitazone (9).

Islet isolation and ex vivo insulin secretion measurement

The islet isolation procedure was started 90 min after gavage in Wistar rats as indicated above and performed as previously described (9; 19). Batches of 10 islets were used for static insulin secretion measurements in KRBH as previously described (9).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism version 5.01 and InStat version 3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA) with two-tailed unpaired Student's test, repeated measures ANOVA or two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test for multiple comparisons, or one-way ANOVA followed by a Tukey post-hoc test. Differences between groups were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Pioglitazone acutely inhibits insulin secretion and causes a modest increase in insulin clearance in vivo

First we assessed the acute effect of pioglitazone on *in vivo* insulin secretion using HGC (**Fig. 1A**). Pioglitazone-treated animals showed a lower insulinemia starting from the 75th min and throughout the second step of the clamp (**Fig. 1B**). During the latter, insulin levels in pioglitazone-treated rats were only about 50% of those of the vehicle-treated rats. The effect of the arginine bolus on insulinemia was not significantly changed by pioglitazone treatment (**Fig. 1C**). Similarly, plasma C-peptide was markedly reduced during the HGC (**Fig. 1B**) but not in response to arginine (**Fig. 1C**). This indicates an acute *in vivo* inhibitory effect of pioglitazone on GIIS. The glucose infusion rate during the hyperglycemic clamp was the same in both groups (**Fig. 1E**).

The C-peptide/insulin molar ratio, an index of insulin clearance (20), was slightly elevated in pioglitazone-treated animals in comparison to control rats in the second step of the clamp (**Fig. 1D**), suggesting that increased insulin clearance could contribute to the lowered insulinemia observed in the pioglitazone-treated animals.

Acute pioglitazone administration has minimal effect on *in vivo* insulin sensitivity

In order to interpret the acute effects of pioglitazone on *in vivo* insulin secretion, it is important to also assess its effect on insulin sensitivity as the two are integrally linked. TZDs are well known to enhance insulin sensitivity under chronic treatment conditions (21). We therefore performed HIEC to measure insulin sensitivity *in vivo*. Both control and pioglitazone-treated groups required similar rates of glucose infusion (**Fig. 2B**) to maintain euglycemia (**Fig. 2A**). However, the achieved insulinemia during the 60 min clamp period was slightly lower in the pioglitazone treated rats (**Fig. 2C**) such that the M/I measure of insulin sensitivity trended higher in the pioglitazone group, although the difference was not significant (**Fig. 2D**). The mildly reduced insulinemia achieved in pioglitazone-treated rats (at times 90 and 120 min) (**Fig. 2C**) occurred despite equivalent rates of insulin infusion. This could be due to the increased insulin clearance in the pioglitazone treated animals (**Fig. 1D**).

Pioglitazone administration acutely reduces whole body energy expenditure

In our previous study employing isolated islets and INS 832/13 β -cells, we hypothesized that pioglitazone-induced inhibition of GIIS could be due to metabolic deceleration of the β -cell (9). We therefore assessed if acute reduction in whole body energy metabolism occurs *in vivo* in response to acute pioglitazone administration.

A first approach was to use indirect calorimetry. Energy expenditure (**Fig. 3C**), calculated from VO_2 (**Fig. 3A**) and VCO_2 (**Fig. 3B**) values, was significantly reduced in pioglitazone-treated animals. The effect began to develop 1 h after gavage with the drug, and was sustained for at least the next 5 h. During this time period, there was no difference in the respiratory exchange ratio calculated as VCO_2/VO_2 (**Fig. 3D**) indicating a lack of acute impact by pioglitazone administration on fuel selection. Reduced energy expenditure could not be attributed to reduced

ambulatory activity, as the distance traveled by the animals during data collection was the same in the control and pioglitazone-treated groups (**Fig. 3E**).

To further characterize the acute *in vivo* effects of pioglitazone on factors that may influence energy metabolism, biotelemetry was carried out. Pioglitazone administration did not acutely change body temperature (**Fig. 4A**), heart rate (**Fig. 4B**) and blood pressure (**Fig. 4C**) in the 4 hours immediately following the gavage. Panels **4D** to **4F** show the average measures obtained in the time window corresponding to the last hour of the glucose clamps previously performed on other animals. Core body temperature, heart rate and blood pressure are not altered by acute pioglitazone therapy at this time.

On a longer time scale, a single administration of pioglitazone caused a small increase in heart rate (**Fig. 4B**), an effect that becomes statistically significant 4 h post gavage and is sustained for at least 24 h (**Fig. S1B**). Blood pressure was also significantly altered on this time scale, with a reduction 24 h post-gavage (**Fig. S1C**). However, core body temperature was not changed (**Fig. S1A**).

Pioglitazone reduces oxygen consumption rate in INS 832/13 β -cells

Energy metabolism cannot currently be measured in β -cells *in vivo*. To complement the *in vivo* experiments on whole body energy metabolism with *in vitro* work in β -cells, oxygen consumption was measured in INS 832/13 cells. In control cells, a rise in glucose from 2 to 8 mmol/l and from 2 to 25 mmol/l elicited a very similar and rapid increase in oxygen consumption rate (OCR) (**Fig. 5A**). When 25 μ mol/l pioglitazone was added to the cells, OCR in the presence of 8 mmol/l glucose was reduced by approximately 30%. The inhibitory effect of pioglitazone on OCR was partially alleviated when glucose concentration was increased to 25 mmol/l glucose, in accordance with the concept of metabolic deceleration. Insulin secreted during these measurements followed the same pattern (**Fig. 5B**). Thus, in control conditions, 8 and 25 mmol/l glucose induced similar levels of GIIS, which were inhibited in the presence of pioglitazone. Pioglitazone inhibition of GIIS (secretion above basal) was about 85% at the intermediate 8 mmol/l glucose concentration, but only about 35% at the high 25 mmol/l glucose concentration.

Pioglitazone effect on insulin secretion is PPAR γ -independent

Because the effects of pioglitazone *in vivo* and *in vitro* in this series of experiments are acute (less than 4 h post drug) it is unlikely that they are mediated via PPAR γ and gene expression changes. In an attempt to further substantiate that the acute effects of pioglitazone on insulin secretion are PPAR γ -independent, two structurally-unrelated non-TZD PPAR γ agonists were tested. Treatment of INS 832/13 cells with GW1929 and CAY10599, at concentrations ranging from 15 to 600 times their EC₅₀ for PPAR γ transactivation (22; 23), did not alter GIIS or KCl-induced insulin release (**Fig. 6**).

DISCUSSION

Long term treatment with pioglitazone lowers fasting insulinemia (21). Whether this effect is entirely indirect due to a reduction in insulin resistance or, in part, a consequence of a direct effect on the β -cell is unknown. Here, we report the surprising ability of pioglitazone to acutely inhibit GIIS *in vivo* prior to any significant change in insulin sensitivity. Besides inhibiting insulin secretion, pioglitazone also caused a small rise in insulin clearance. The results provide evidence for a novel acute TZD effect to lower insulinemia, which is not due to changes in insulin sensitivity or PPAR γ activation (see below). The development of new drugs for treating type 2 diabetes focuses on potential agents to either enhance insulin secretion or reduce insulin resistance. However, here we show an effective anti-diabetic agent reducing insulin secretion, a finding of particular interest considering the view that hyperinsulinemia may in some instances drive obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (1; 3). Thus, the possibility of a contribution to the beneficial effect of TZDs (24) and metformin (25) on glucose homeostasis via a direct action on the β -cell to reduce insulinemia might have been overlooked.

What is the evidence that pioglitazone acutely reduces GIIS *in vivo*? During the HGC, insulinemia was reduced by 50% by pioglitazone treatment. This was quite remarkable considering that pioglitazone was given as a single oral dose only 135 min earlier. The fact that both insulin and C-peptide levels were reduced is consistent with this effect being a consequence of reduced insulin secretion.

In the short time frame after oral pioglitazone dosing that the clamp studies were performed, insulin sensitivity was not significantly altered in HIEC. There was, however, a trend for insulinemia in the pioglitazone-treated animals to be slightly lower, which could have been the result of increased insulin clearance or reduced endogenous insulin secretion. An effect on clearance is supported by the fact that human insulin (measured with a specific antibody) infused at identical rates in both groups, also tended to be lower with pioglitazone treatment (not shown). Considering the lower insulin levels, insulin sensitivity according to the M/I measure was slightly higher in the pioglitazone group, although this difference was not significant. This should not acutely affect the response of pancreatic islets to hyperglycemia and, therefore, the interpretation that pioglitazone has an acute direct effect to reduce *in vivo* insulin secretion.

Chronic and acute TZD treatments increase insulin clearance in humans (26-28). A rapid TZD effect on insulin clearance has been reported by Farret *et al.* in healthy volunteers undergoing a hyperglycemic clamp following single-dose rosiglitazone administration (27). However, the authors could not measure significant changes in C-peptide level in their subjects. A careful look at the C-peptide figure does show a slightly lower (15%) C-peptide level in the rosiglitazone *vs* the control group, suggesting a modest effect of acute rosiglitazone treatment on GIIS in humans. Even though the present work cannot be directly compared to the study of Farret *et al.* (27) both studies show that TZDs can acutely modify glucose homeostasis *in vivo* due to, at least in part, an effect of TZDs to reduce GIIS. It is also interesting to note that intraperitoneal administration of troglitazone increased AMPK activity in rat liver, muscle and adipose tissue within 15 min (29), showing an acute effect of a TZD *in vivo*.

The current study was carried out with a reasonable dose of pioglitazone for rodents (30 mg/kg body weight). Experiments in rodents with chronic daily administration have been carried out with pioglitazone doses between 2.3 (30) and 35 mg/kg (31), with most studies using 10 mg/kg. It represents roughly 50 times what a patient of 70 kg would receive with a 45 mg pill. Although it seems disproportionate, TZDs are cleared approximately ten times faster by rats when

compared to human due to higher CYP2C expression (32). In addition, these experiments were performed with a single administration of pioglitazone.

What is the biochemical basis of pioglitazone action to reduce GIIS *in vivo*? Inasmuch as the *in vitro* results obtained earlier (9) indicated that the reduced GIIS by pioglitazone was related to reduced metabolic activation and ATP production in the β -cell, we examined the possibility that this holds true *in vivo*. Thus we assessed the effect of pioglitazone on whole body energy expenditure. It was found that pioglitazone acutely reduces whole body energy metabolism, as assessed by oxygen consumption and CO₂ production, without changing fuel selection, as indicated by determination of the respiratory exchange ratio. Pioglitazone did not change rat body temperature or ambulatory activity. The fact that body temperature did not fall does not preclude an effect of pioglitazone to reduce body heat production, as homeostatic mechanisms could result in improved conservation of body heat.

It is not technically possible to investigate β -cell metabolism *in vivo* in its normal environment. The long duration of the islet isolation procedure (about 4 h) also precludes any conclusion related to acute pioglitazone effects on islet energy metabolism *ex vivo*. The demonstration of reduced whole body energy metabolism fits with the view that pioglitazone may reduce β -cell energy metabolism as well, and cause its metabolic deceleration *in vivo*. In accordance with this possibility, results obtained with INS 832/13 cells showed that β -cells oxygen consumption is rapidly reduced by pioglitazone, most efficiently at intermediate glucose concentrations. Similar reduction in oxygen consumption is likely to occur *in vivo* in the main organs.

What may be the significance of this study to our understanding of the mode of action of the main insulin action sensitizers, TZDs and biguanides? First, these compounds may in addition be direct “insulin secretion decelerators”. Second, they may act by being mild restrictors of energy production. In our earlier work (9) we suggested metabolic deceleration as a possible mode of action of pioglitazone characterized by: 1) lack of effect at low fuel levels; 2) metabolic inhibition at sub-maximal substrate concentrations, and 3) the relief of inhibition in the presence of elevated fuel levels. Thus, the direct action of pioglitazone on the β -cell may be via restriction of energy production. Interestingly, metformin appears to act on liver gluconeogenesis via reducing the hepatic energy state independently of AMPK (33;

34). We also found that metformin, similarly to pioglitazone, acutely reduces insulin secretion (9), glucose oxidation, oxygen consumption and counteracts the hyperpolarization of the mitochondrial membrane, most efficiently at intermediate glucose concentrations (JL and MP, unpublished). Thus, our earlier results *in vitro* suggested the possibility that pioglitazone and metformin share a common mode of action by restricting energy production (9). Moreover, certain aspects of this action resemble those of an acute exercise bout in muscle (reduction in ATP, increase in AMP and AMPK activation) (35). Therefore, interventions that cause a mild decrease in cellular energy status may be useful approaches to improve glucose homeostasis in type 2 diabetes by simultaneously and directly increasing insulin sensitivity and reducing hyperinsulinemia. We speculate that this dual action of these drugs that tackle the two characteristic features of type 2 diabetes is the reason why they are so efficient. Reduction of energy status at both cellular and whole-body level and the pharmacological agents that lead to such effects are of great interest, not only for type 2 diabetes, but also for cancer (36), myocardial infarction (37) and lifespan (38).

In conclusion, we propose that reduction of β -cell energy metabolism helps by protecting the cells from fuel surfeit that causes β -cell dysfunction and possibly death via several factors, including mitochondrial dysfunction, ROS production, endoplasmic reticulum stress and overstimulation of fuel-induced insulin secretion leading to the depletion of insulin stores (39). We report that pioglitazone exerts a direct action on the β -cell to reduce insulin secretion most likely by causing mild metabolic restriction/deceleration. Thus, pharmacologically-induced metabolic deceleration represents an attractive avenue to prevent β -cell loss due to their exhaustion, to reduce insulin resistance and treat type 2 diabetes. Indeed, metformin and pioglitazone, the only two insulin-sensitizing agents currently in widespread use, appear to share this mechanism of action.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Canadian Diabetes Association (to M.P.), and the US National Institutes of Health to N.B.R. and M.P. (grant R01DK019514-31). J.L. was supported

by a training award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and a fellowship from Diabète Québec. M.P. and V.P. hold the Canada Research Chairs in Diabetes and Metabolism, and Diabetes and Pancreatic β -cell Function, respectively.

J.L. performed experiments, contributed to discussions, wrote the manuscript and reviewed/edited the manuscript. E.P. performed experiments and reviewed/edited the manuscript. M.-L.P., N.B.R., C.J.N and E.J. contributed to discussion and edited the manuscript. S.R.M.M. contributed to discussion, wrote the manuscript and reviewed/edited the manuscript. V.P. contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. M.P. contributed to discussion, wrote the manuscript and reviewed/edited the manuscript. M.P. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Parts of this study were presented at the 71st Scientific Sessions of the American Diabetes Association, San Diego, California, 24-28 June 2011.

We thank Mélanie Ethier, Grace Fergusson and Catherine Michel, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), for technical expertise and Drs. Thierry Alquier, Junzheng Peng and Johanne Tremblay, CRCHUM, for helpful discussions.

REFERENCES

1. Corkey BE: Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? *Diabetes* 2012;61:4-13
2. Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1802-1812
3. Shanik MH, Xu Y, Skrha J, Dankner R, Zick Y, Roth J: Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 2008;31 Suppl 2:S262-268
4. Nolan CJ, Damm P, Prentki M: Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet* 2011;378:169-181

5. Nyenwe EA, Jerkins TW, Umpierrez GE, Kitabchi AE: Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2011;60:1-23
6. Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW: Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia* 2004;47:1306-1313
7. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S: PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006;116:581-589
8. Gupta D, Kono T, Evans-Molina C: The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in pancreatic beta cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:1036-1047
9. Lamontagne J, Pepin E, Peyot ML, Joly E, Ruderman NB, Poitout V, Madiraju SR, Nolan CJ, Prentki M: Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology* 2009;150:3465-3474
10. Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C: Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 2004;53:1052-1059
11. Buteau J, Shlien A, Foisy S, Accili D: Metabolic diapause in pancreatic beta-cells expressing a gain-of-function mutant of the forkhead protein Foxo1. *J Biol Chem* 2007;282:287-293
12. Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA: Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes* 2008;57:846-859
13. Andrikopoulos S: Obesity and type 2 diabetes: slow down!--Can metabolic deceleration protect the islet beta cell from excess nutrient-induced damage? *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:140-146

14. Aston-Mourney K, Proietto J, Morahan G, Andrikopoulos S: Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin. *Diabetologia* 2008;51:540-545
15. Hagman DK, Latour MG, Chakrabarti SK, Fontes G, Amyot J, Tremblay C, Semache M, Lausier JA, Roskens V, Mirmira RG, Jetton TL, Poitout V: Cyclical and alternating infusions of glucose and intralipid in rats inhibit insulin gene expression and Pdx-1 binding in islets. *Diabetes* 2008;57:424-431
16. Dutil J, Deng AY: Further chromosomal mapping of a blood pressure QTL in Dahl rats on chromosome 2 using congenic strains. *Physiol Genomics* 2001;6:3-9
17. Goh TT, Mason TM, Gupta N, So A, Lam TK, Lam L, Lewis GF, Mari A, Giacca A: Lipid-induced beta-cell dysfunction in vivo in models of progressive beta-cell failure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E549-560
18. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB: Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 2000;49:424-430
19. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Bonner-Weir S, O'Hara CJ, Monaco AP: Reproducible high yield of rat islets by stationary in vitro digestion following pancreatic ductal or portal venous collagenase injection. *Transplantation* 1987;43:725-730
20. Uwaifo GI, Parikh SJ, Keil M, Elberg J, Chin J, Yanovski JA: Comparison of insulin sensitivity, clearance, and secretion estimates using euglycemic and hyperglycemic clamps in children. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2899-2905
21. Campbell IW: Long-term glycaemic control with pioglitazone in patients with type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 2004;58:192-200
22. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL, Harrington WW, Jr., Hashim MA, Hull-Ryde EA, Kaldor I, Kliewer SA, Lake DH, Leesnitzer LM, Lehmann JM, Lenhard JM, Orband-Miller LA, Miller JF, Mook RA, Jr., Noble SA, Oliver W, Jr., Parks DJ, Plunket KD, Szewczyk JR, Willson TM: N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR γ agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J Med Chem* 1998;41:5020-5036

23. Lin CH, Peng YH, Coumar MS, Chittimalla SK, Liao CC, Lyn PC, Huang CC, Lien TW, Lin WH, Hsu JT, Cheng JH, Chen X, Wu JS, Chao YS, Lee HJ, Juo CG, Wu SY, Hsieh HP: Design and structural analysis of novel pharmacophores for potent and selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Med Chem* 2009;52:2618-2622
24. Campbell IW, Mariz S: Beta-cell preservation with thiazolidinediones. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;76:163-176
25. Patane G, Piro S, Rabuazzo AM, Anello M, Vigneri R, Purrello F: Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2000;49:735-740
26. Kim SH, Abbasi F, Chu JW, McLaughlin TL, Lamendola C, Polonsky KS, Reaven GM: Rosiglitazone reduces glucose-stimulated insulin secretion rate and increases insulin clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2005;54:2447-2452
27. Farret A, Chevassus H, Roux B, Petit P, Galtier F: Direct rosiglitazone-induced modifications in insulin secretion, action and clearance: a single-dose hyperglycaemic clamp study. *Diabetologia* 2007;50:1384-1387
28. Osei K, Gaillard T, Schuster D: Thiazolidinediones increase hepatic insulin extraction in African Americans with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. A pilot study of rosiglitazone. *Metabolism* 2007;56:24-29
29. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E: Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E175-181
30. Blalock EM, Phelps JT, Pancani T, Searcy JL, Anderson KL, Gant JC, Popovic J, Avdiushko MG, Cohen DA, Chen KC, Porter NM, Thibault O: Effects of long-term pioglitazone treatment on peripheral and central markers of aging. *PLoS One* 2010;5:e10405
31. Syversen U, Stunes AK, Gustafsson BI, Obrant KJ, Nordsletten L, Berge R, Thommesen L, Reseland JE: Different skeletal effects of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha agonist fenofibrate and the PPARgamma agonist pioglitazone. *BMC Endocr Disord* 2009;9:10

32. Calixto LA, de Oliveira AR, Jabor VA, Bonato PS: In vitro characterization of rosiglitazone metabolites and determination of the kinetic parameters employing rat liver microsomal fraction. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2011;36:159-166
33. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, van der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B: Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 2011;54:3101-3110
34. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B: Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 2010;120:2355-2369
35. 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* 2003;178:435-442
36. Wei S, Kulp SK, Chen CS: Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones. *J Biol Chem* 2010;285:9780-9791
37. Gohil VM, Sheth SA, Nilsson R, Wojtovich AP, Lee JH, Perocchi F, Chen W, Clish CB, Ayata C, Brookes PS, Mootha VK: Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. *Nat Biotechnol* 2010;28:249-255
38. Dhahbi JM, Mote PL, Fahy GM, Spindler SR: Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling. *Physiol Genomics* 2005;23:343-350
39. Nolan CJ, Prentki M: The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:285-291

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Pioglitazone administration acutely inhibits insulin secretion and increases insulin clearance in Wistar rats. Two-step hyperglycemic clamps were performed in animals 45 min after pioglitazone (Pio = black symbols or bars; 30 mg/kg) or vehicle (Ctl = white symbols or bars) administration by gavage. Glycemia was clamped consecutively at 8.3 mmol/l (1st step, from min 30 to 60) and 16.7 mmol/l (2nd step, from min 90 to 120) as represented by dotted areas, then an arginine bolus (174 mg/kg) was administered (min 120, after last sampling). A, Plasma glucose values during the procedures; B, Plasma insulin (circles) and C-peptide (squares) concentrations during the procedures. Two-way ANOVA *post-hoc* analyses: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle-treated group; C, increment (Inc.) in plasma insulin and C-peptide concentrations 1 min after arginine (Arg) administration; D, insulin clearance estimated via C-peptide (C-pep) over insulin (Ins) molar ratio for first and second step of the clamps. Unpaired t-test: * $P < 0.05$ vs vehicle-treated group; E, Glucose infusion rate (GIR) during the procedures. Data expressed as means \pm SEM, $n = 7-8$ animals. Ctl, control.

Fig. 2 Pioglitazone administration does not acutely change insulin sensitivity in Wistar rats. Hyperinsulinemic-euglycemic clamps were performed in animals 45 min after pioglitazone (Pio = black circles or bar; 30 mg/kg) or vehicle (Ctl = white circles or bar) administration by gavage. Glycemia was clamped at 6.5 mmol/l. A, Plasma glucose values during the procedures; B, Glucose infusion rate (GIR) during the procedures; C, Total (human plus endogenous) plasma insulin measured from samples collected at the indicated time points; D, M/I index of insulin sensitivity calculated from GIR and total plasma insulin. Data expressed as means \pm SEM, $n = 6-5$. Ctl, control; n.s., not significant.

Fig. 3 Pioglitazone administration acutely reduces whole body energy expenditure in Wistar rats. Pioglitazone (Pio = black circles or bar; 30 mg/kg) or vehicle (Ctl = white circles or bar) was administered 2 h after food withdrawal and data collected during the following 6 h. A, Oxygen consumption (VO_2); B, Carbon

dioxide production (VCO_2); C, Energy expenditure (EE) calculated from VO_2 and VCO_2 ; D, Respiratory exchange ratio (RER) measured as VCO_2/VO_2 ; E, Total horizontal and vertical distance traveled by the animals during the 6-h air sampling. Data expressed as means \pm SEM, $n = 7-6$ for calorimetry and $n = 13$ for locomotor activity. Repeated measures ANOVA: * $P < 0.05$ vs vehicle-treated group. Ctl, control.

Fig. 4 Short term assessment of the action of pioglitazone on body temperature, heart rate and blood pressure in Wistar rats. Core body temperature (A), heart rate (B) and blood pressure (C) were monitored by biotelemetry. Pioglitazone (Pio = black circles or bars; 30 mg/kg) or vehicle (Ctl = white circles or bars) was administered 2 h after food withdrawal. Horizontal bold lines correspond to clamp's last hour (performed with other animals in Figures 1 and 2); D-F, Averaged values of data corresponding to clamp's last hour. Data expressed as means \pm SEM, $n = 6$, where animals were all used as both treated and control rats alternatively, with 10 days washout in between experiments. Repeated measures ANOVA: * $P < 0.05$ vs vehicle-treated group. BPM, beats per minute; Ctl, control.

Fig. 5 Pioglitazone reduces oxygen consumption rate in INS 832/13 cells. A, Oxygen consumption rate (OCR). Pioglitazone (Pio = black symbols or bars; 25 μ mol/l) or vehicle (Ctl = white symbols or bars) was added at the time indicated by the bold vertical arrow after basal measurements, and glucose (2 mmol/l (2G) = circles; 8 mmol/l (8G) = squares; 25 mmol/l (25G) = triangles) was added 20 min later (thin vertical arrow). Data expressed as means \pm SEM, $n = 8$ (8 different wells in 2 separate experiments, except for 2 mmol/l glucose conditions where $n = 6$). Repeated measures ANOVA *post-hoc* analyses: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle-treated cells at same glucose concentration; One-way ANOVA *post-hoc* analyses: # $P < 0.05$ vs 8 mmol/l glucose group in presence of Pio. B, Insulin secreted during OCR measurements. Two-way ANOVA *post-hoc* analyses: * $P < 0.001$ vs vehicle-treated cells at same glucose concentration; Unpaired t-test: # $P < 0.001$ vs 8 mmol/l glucose in presence of Pio. Ctl, control.

Fig. 6 Lack of effect on insulin secretion of non thiazolidione PPAR γ agonists in INS 832/13 cells. Cells were incubated in the presence of the indicated glucose concentrations (Glc) and a non TZD PPAR γ agonist (A, GW1929; B, CAY10599) or vehicle (Ctl = white bars), at concentrations equal to 15 (lightly hatched bars), 60 (heavily hatched bars) or 600 (black bars) times its EC₅₀ for PPAR γ transactivation. Data expressed as means \pm SEM, n = 9 (9 different wells in 3 separated experiments) with GW1929 and n = 6 (6 different wells in 2 separated experiments) with CAY10599. Ctl, control; prot, proteins.

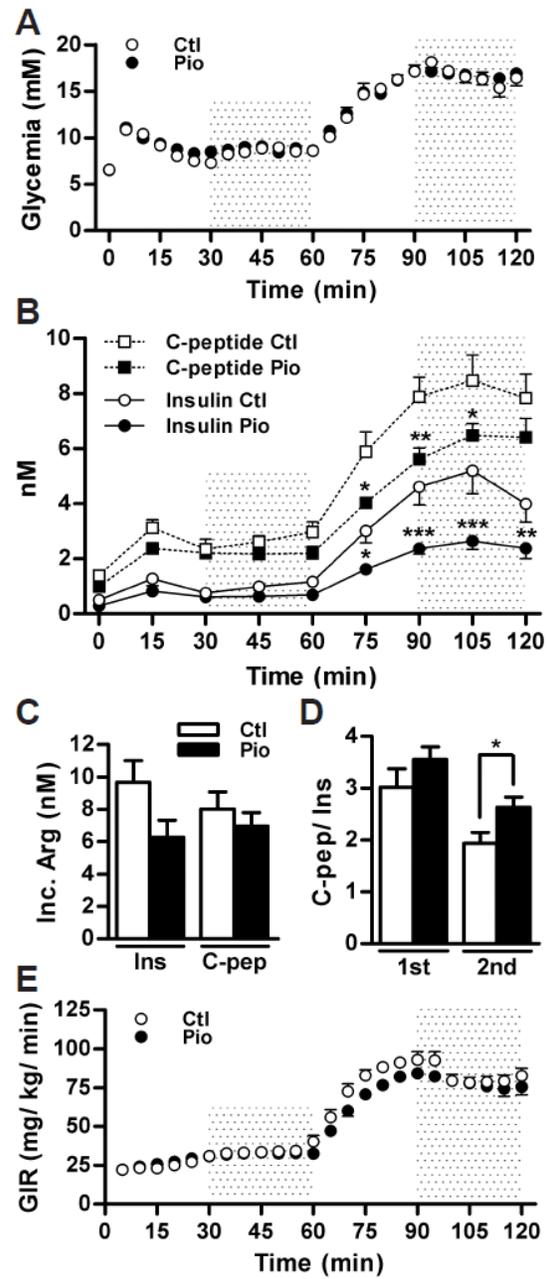


Figure 1

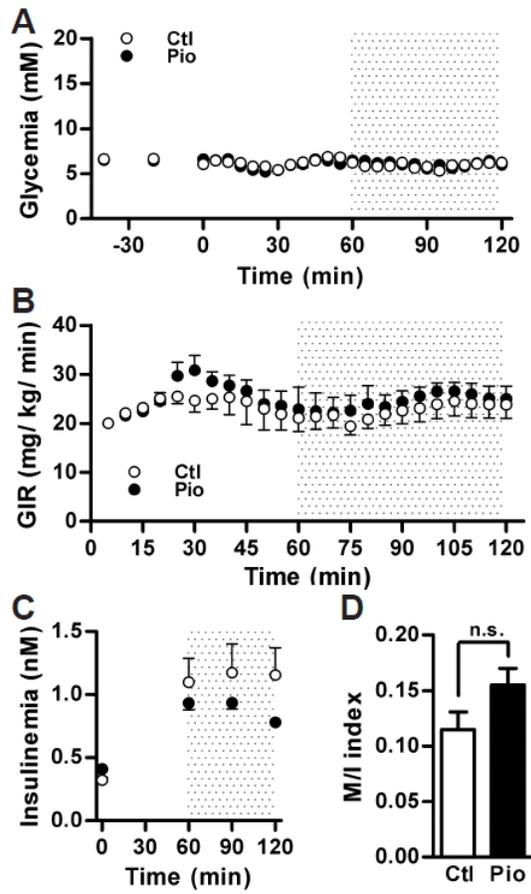


Figure 2

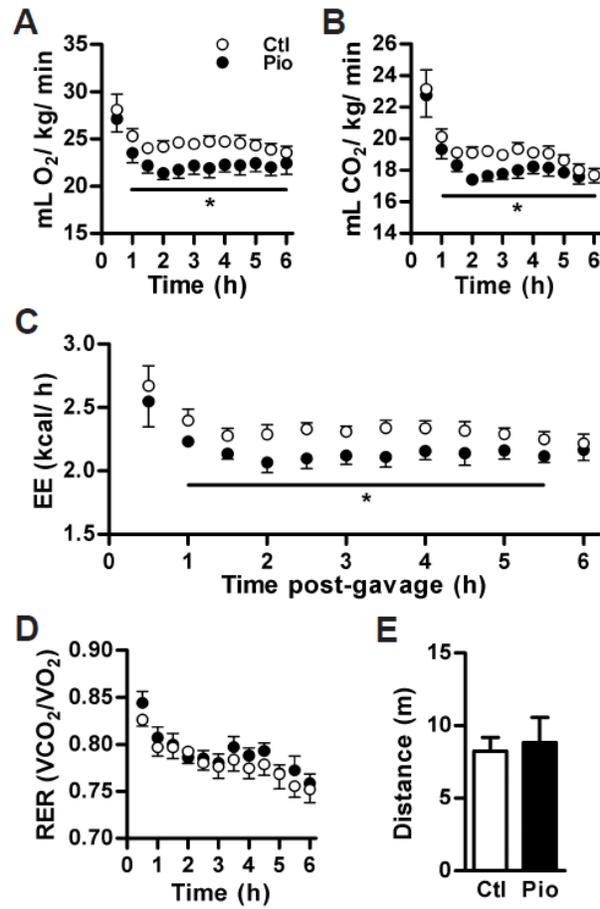


Figure 3

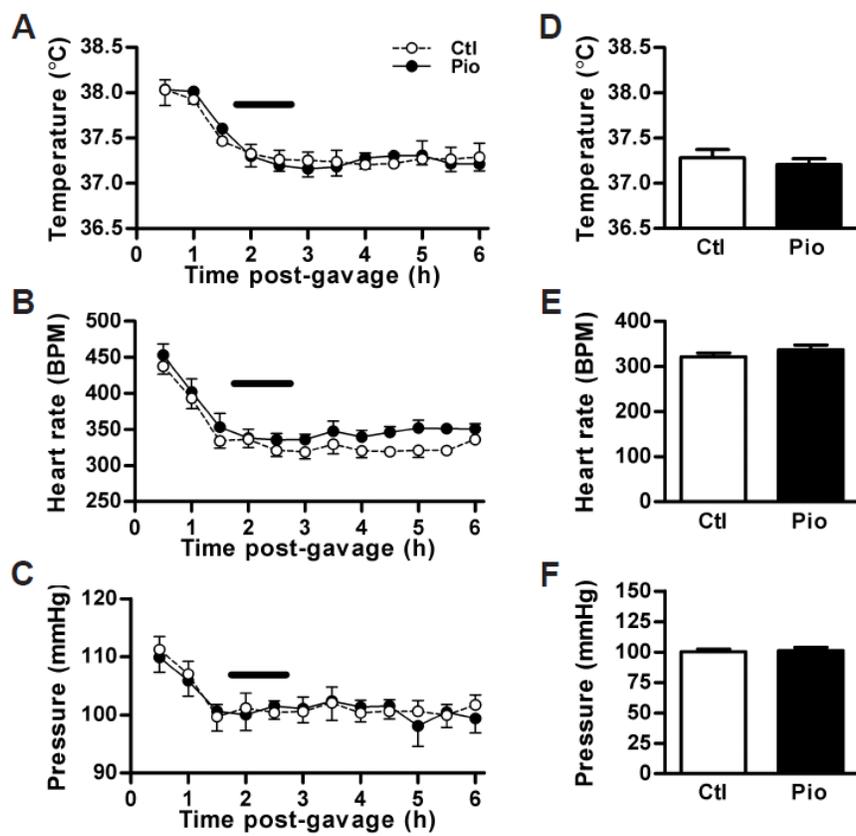


Figure 4

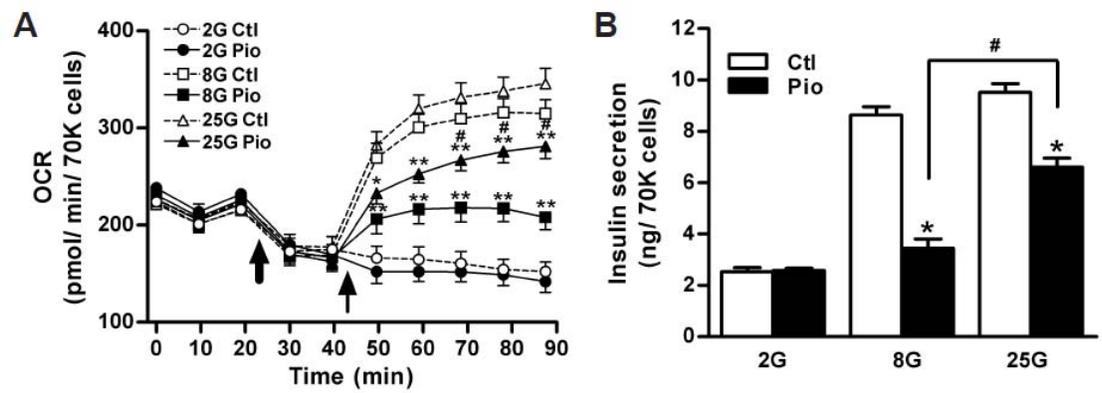


Figure 5

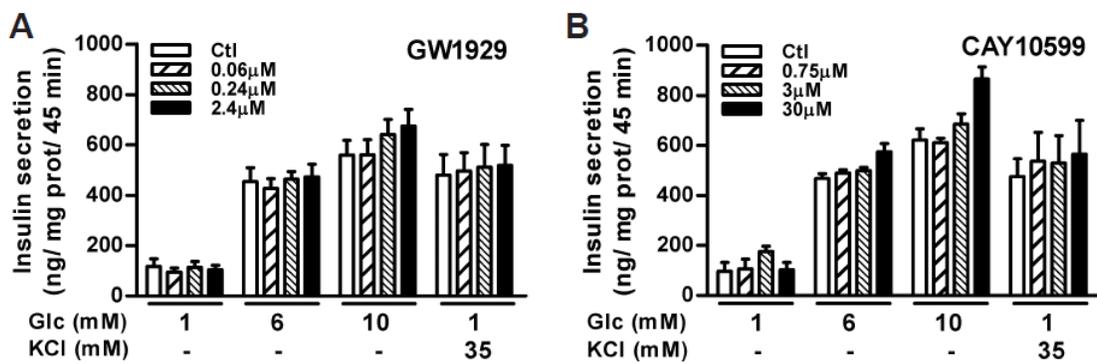


Figure 6

SUPPLEMENTAL DATA

Fig. S1 A single pioglitazone administration increases heart rate and reduces blood pressure in Wistar rats. Core body temperature (A), heart rate (B) and blood pressure (C) were monitored by biotelemetry. Pioglitazone (Pio = black circles; 30 mg/kg) or vehicle (Ctl = white circles) was administered 2 h after food withdrawal (indicated as “gavage”). Data expressed as means +/- SEM, n = 6. Repeated measures ANOVA: * P<0.05 vs vehicle-treated group. Ctl, control.

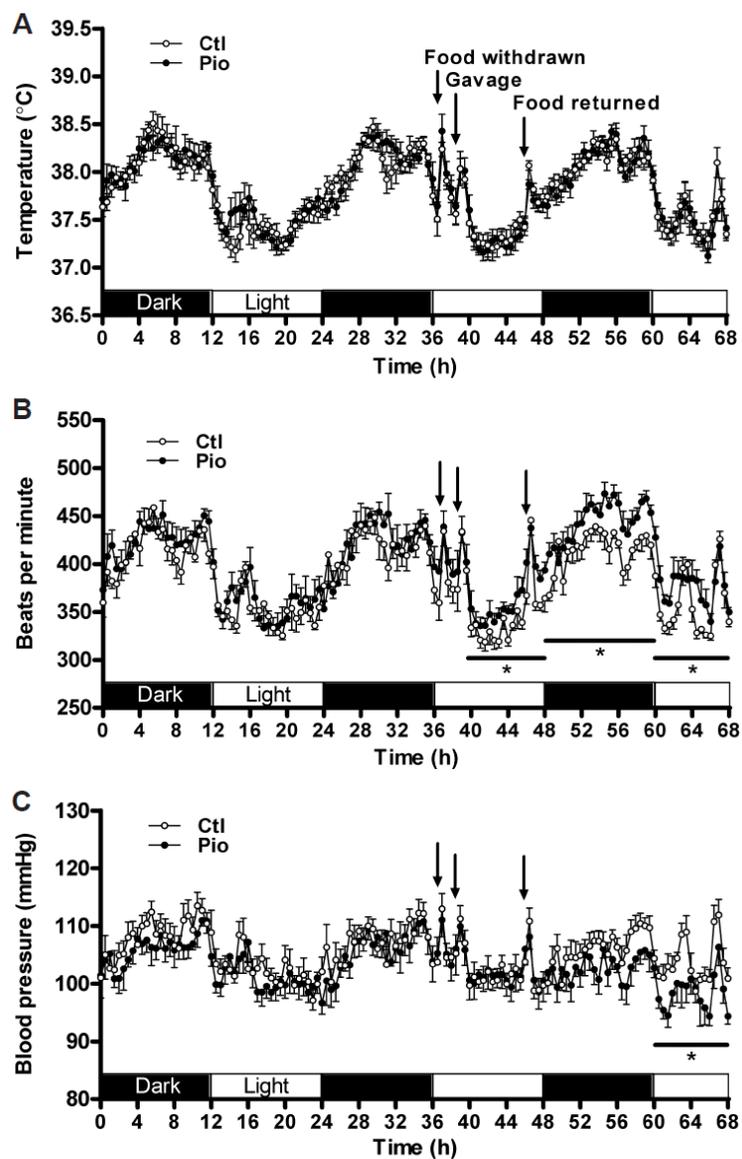


Figure S1

6.3. Résultats supplémentaires accompagnant le deuxième article

Durant la rédaction du manuscrit, le Dr Chris Nolan, co-auteur, a soulevé la question suivante : est-ce que la diminution de la sécrétion d'insuline observée chez les animaux traités à la pioglitazone durant les clamps hyperglycémiques ne pourrait pas s'expliquer par une diminution de la concentration d'acides gras en circulation? Nous avons effectué ce dosage sur les échantillons de plasma recueillis vers la fin du clamp, lorsque les effets du médicament sur l'insulinémie sont importants. Les concentrations d'acides gras libres et de triacylglycérols ont été mesurées et sont présentées à la **figure S6**. Les triacylglycérols sont présents dans les lipoprotéines et peuvent être hydrolysés à la surface des cellules β pour fournir des acides gras capables de moduler la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Pappan et coll. 2005). Le traitement tend à diminuer les concentrations circulantes des deux espèces lipidiques, mais les différences ne sont pas significatives (**figure S6**).

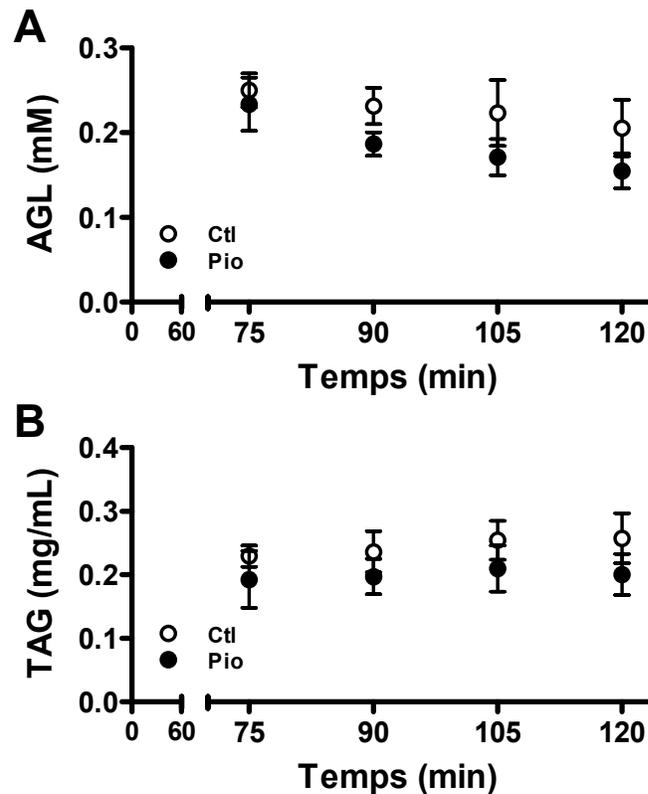


Figure S6 – L'administration aigüe de pioglitazone tend à diminuer la concentration d'acides gras libres et de triacylglycérols en circulation chez le rat Wistar au cours de clamps hyperglycémiques. Acides gras libres plasmatiques

(AGL, graphique A) et triacylglycérols plasmatiques (TAG, graphique B) en circulation aux temps indiqués des clamps hyperglycémiques chez les animaux traités à la pioglitazone (Pio) ou avec le véhicule (Ctl) (voir section 6.2, figure 1). Les AGL ont été dosés par la méthode colorimétrique NEFA-HR(2) de WAKO (Richmond, VA, États-Unis d'Amérique). Les TAG ont été dosés par la méthode colorimétrique GPO Trinder de Sigma Diagnostics (Saint-Louis, MO, États-Unis d'Amérique). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur type de la moyenne. $n=7$ (Ctl) ou 8 (Pio). Le traitement à la pioglitazone est sans effet d'après une analyse ANOVA à deux voies.

6.4. Retour critique sur le deuxième article

Nouveauté et portée des résultats

Les observations du deuxième article ajoutent de la crédibilité à la possibilité que la décélération métabolique de la cellule β soit un mécanisme d'action impliqué dans les bienfaits cliniques de la pioglitazone. Ils offrent également un début d'explication mécanistique aux résultats de la seule étude clinique que nous avons pu retracer qui se soit penchée sur les effets aigus d'un TZD. Lors de cet essai croisé, Farret et coll. ont effectué des clamps hyperglycémiques chez une douzaine de sujets masculins en santé, 45 min après qu'ils aient reçu une dose de rosiglitazone ou d'un placebo. Le traitement aigu à la rosiglitazone tendait à réduire l'insulinémie (Farret et coll. 2007). Ainsi, l'inhibition légère et réversible du métabolisme mitochondrial, au moins dans la cellule β , apparaît comme une approche thérapeutique à développer.

Forces du deuxième article

Les observations de ce deuxième article soutiennent en grande partie nos résultats *in vitro* en démontrant qu'un traitement aigu à la pioglitazone inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose et que cette inhibition peut être associée à une diminution du métabolisme oxydatif des nutriments.

Les mesures de l'homéostasie glucidique ont été réalisées avec les meilleures techniques expérimentales disponibles pour répondre aux questions posées : le clamp hyperglycémique pour mesurer la sécrétion d'insuline et le clamp hyperinsulinémique-euglycémique pour mesurer la sensibilité à l'insuline.

La mesure d'une diminution du métabolisme oxydatif concomitante aux mesures de l'homéostasie glucidique fournit une explication plausible à l'inhibition de la sécrétion d'insuline, à savoir une inhibition du métabolisme mitochondriale

similaire à celle rapportée dans le premier article. Le fait que la pioglitazone est en mesure d'inhiber la consommation d'oxygène induite par le glucose des cellules INS 832/13 renforce cette possibilité.

Nous avons démontré dans cet article que l'effet inhibiteur des TZDs sur la sécrétion d'insuline *in vitro* n'est pas dû à leur qualité d'agonistes de PPAR γ , puisque le traitement de cellules INS 832/13 avec deux agonistes de PPAR γ qui ne sont pas des TZDs ne reproduit pas les effets de la pioglitazone.

Limites du deuxième article

Les clamps glucidiques ont été de relativement courte durée, avec des paliers de 30 min pour les clamps hyperglycémiques. Nous avons introduit cette contrainte de façon à s'en tenir aux effets aigus du médicament. Or, les clamps glucidiques s'analysent généralement lorsqu'un état d'équilibre dynamique est atteint entre la quantité d'insuline en circulation et les besoins en insuline et que le taux d'infusion de glucose est stable. Muniyappa et coll. suggèrent d'utiliser comme définition de l'état d'équilibre dynamique une période de plus de 30 min pendant laquelle le coefficient de variation de la glycémie, de l'insulinémie et du taux d'infusion de glucose est inférieur à 5 % (Muniyappa et coll. 2008). Cet état n'a pas été atteint dans notre étude et ne l'a probablement pas été non plus dans l'étude de Farret et coll. (Farret et coll. 2007). Il est ainsi difficile de déterminer de façon définitive si l'administration aiguë de pioglitazone affecte la sensibilité à l'insuline. C'est-à-dire que dans les clamps glucidiques, la sensibilité à l'insuline s'évalue à partir du taux d'infusion de glucose. Or, ce taux d'infusion de glucose ne s'est pas stabilisé durant nos expériences. Cette limitation ne pouvait pas être contournée en allongeant la durée des clamps pour deux raisons. D'abord parce qu'une exposition plus longue aurait fait intervenir les effets génomiques de la pioglitazone, compliquant l'interprétation des résultats. Ensuite parce que l'état d'équilibre dynamique entre la sécrétion d'insuline et l'action de l'insuline est constamment modifié par l'évolution des effets du médicament (ne serait-ce qu'à cause des variations dans sa concentration sanguine).

La dose de pioglitazone utilisée pour cette étude est supérieure d'environ 50 fois à la plus forte dose thérapeutique employée chez l'humain de façon chronique. Les rats n'ont cependant reçu cette dose qu'une seule fois et, en ce qui concerne les

clamps glucidiques, y ont été exposés durant une courte période de temps. De plus, ces animaux métabolisent les TZDs environ dix fois plus rapidement que l'humain grâce à une surexpression des cytochromes P450 CYP2C (Calixto et coll. 2011).

Enfin, l'approche expérimentale utilisée ne permet pas d'affirmer avec certitude que tous les effets aigus observés sont indépendants de l'activation de PPAR γ ou d'un quelconque effet impliquant la liaison de la pioglitazone à PPAR γ . Il est néanmoins fort peu probable que PPAR γ soit impliqué dans l'effet inhibiteur de la pioglitazone sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (voir à ce sujet la section 8.3).

Questions en suspens – suites à donner au projet

La première question laissée en suspens est à savoir si la décélération métabolique s'observe effectivement *in vivo*. Les clamps hyperglycémiques ont été planifiés dans le but de déterminer si la pioglitazone pouvait inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose *in vivo* en suivant le patron de la décélération métabolique. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la pioglitazone inhiberait la sécrétion au premier palier, alors que la glycémie est clampée à une concentration intermédiaire de glucose (8,3 mmol/L) et serait sans effet au second palier, lorsque la glycémie est élevée (16,7 mmol/L). Malheureusement, la sécrétion d'insuline au premier palier a été trop faible pour juger adéquatement de l'effet de la pioglitazone et il est impossible de conclure au sujet de l'aspect de l'inhibition de la sécrétion en fonction de la glycémie. Pour ce faire il faudra reprendre les expériences avec des glycémies intermédiaire et maximale plus élevées (11 et 25 mmol/L par exemple).

Ensuite, l'étude a été réalisée avec des animaux jeunes et sains, avec de la pioglitazone. L'étape suivante est de déterminer les effets aigus de la pioglitazone sur l'homéostasie glucidique dans un contexte de dérangements métaboliques qui se rapproche des conditions dans lesquelles le médicament est utilisé pour prévenir ou traiter le DT2. Nous voulons d'abord confirmer nos observations chez le rat *Zucker diabetic fatty* (les études sont en cours). Si les résultats sont concluants, il serait ensuite pertinent de répéter les expériences chez l'humain, dans des conditions thérapeutiques. De plus, nous ne savons pas si la metformine et la berbérine ont les mêmes effets aigus *in vivo* que la pioglitazone. La question des effets des médicaments sur le quotient respiratoire est particulièrement intrigante. Elle pourrait

distinguer *in vivo* les effets de la metformine de ceux de la pioglitazone (voir la section 8.6).

Afin de mieux comprendre pourquoi les médicaments insulinosensibilisateurs sont si efficaces, il faudrait déterminer *in vitro* quels types cellulaires subissent une restriction énergétique suivant un traitement avec la metformine ou la pioglitazone et quel est l'aspect de cette inhibition en fonction des concentrations de glucose. Le foie est particulièrement intéressant pour les effets de la metformine, mais les autres tissus insulinosensibles, de même que les macrophages (associés aux processus inflammatoires) méritent d'être étudiés.

L'effet de la pioglitazone sur la clairance de l'insuline mérite plus d'attention. Il pourrait bien être instrumental dans l'effet hypoinsulinémiant du médicament et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Nos résultats suggèrent en effet une contribution non négligeable d'une augmentation de la clairance de l'insuline pour expliquer la diminution de l'insulinémie après un traitement aigu à la pioglitazone. Or, l'obésité et le DT2 sont associés à une diminution de la clairance de l'insuline impliquée dans l'hyperinsulinémie (Erdmann et coll. 2012) et éventuellement la résistance à l'insuline (voir section 9.5). De plus, l'enzyme qui dégrade l'insuline (IDE) a également comme substrat la protéine β -amyloïde (Valera Mora et coll. 2003), qui s'accumule dans les îlots des individus atteints de DT2 (Leahy 2005). L'augmentation de la dégradation de l'insuline s'accompagne-t-elle d'une augmentation de la dégradation de la protéine β -amyloïde dans la cellule β ? Et dans le cerveau? Un traitement aux TZDs diminue en effet la formation de plaques amyloïdes dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer (Heneka et coll. 2005; Escibano et coll. 2010) et ralentit le développement de la maladie induite chez la souris (Heneka et coll. 2005; Jiang, Heneka et Landreth 2008).

Discussion

Dans cette discussion, nous revenons d'abord brièvement sur les résultats au chapitre 7. Nous tentons ensuite au chapitre 8 d'unifier les observations et de déterminer le mécanisme par lequel chacun des deux médicaments étudiés affecte le métabolisme et la fonction des cellules β . Enfin au chapitre 9, nous abordons l'implication qu'ont nos observations sur l'utilisation de la pioglitazone et de la metformine, de même que sur le développement de nouveaux agents antidiabétiques. Nous tentons plus particulièrement de déterminer comment les effets observés peuvent intervenir dans les bienfaits des médicaments, principalement sur la cellule β du pancréas.

7. Retour sur les résultats

7.1. Observations *in vitro*

Nous avons étudié les effets aigus de deux médicaments antidiabétiques insulinosensibilisateurs sur le métabolisme et la fonction des cellules β du pancréas. *In vitro* avec les cellules INS 832/13, nous avons observé que la pioglitazone et la metformine inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose en diminuant la sensibilité des cellules au glucose (déplacement vers la droite de la courbe dose réponse). C'est-à-dire que les médicaments inhibent la sécrétion d'insuline en présence de concentrations intermédiaires de glucose seulement, mais demeurent sans effets en conditions basales et lorsque la concentration de glucose est suffisamment élevée. Dans les mêmes conditions, les traitements inhibent aussi plusieurs paramètres du métabolisme mitochondrial des nutriments et, pour la pioglitazone, du métabolisme des lipides. Les composés affectent le métabolisme en suivant un modèle d'inhibition similaire à celui observé pour la sécrétion d'insuline, à savoir un effet qui se manifeste principalement lorsque les concentrations de glucose sont intermédiaires. Nous avons nommé « décélération métabolique » de la cellule β pancréatique ce patron d'inhibition, commun aux deux principaux médicaments insulinosensibilisants. Le phénomène s'observe également avec des îlots isolés de rat traités de façon aiguë avec de la pioglitazone. Les deux composés sont connus pour activer l'AMPK, ce qui a été vérifié dans nos conditions avec la pioglitazone. Les

résultats suggèrent qu'un traitement aigu à la pioglitazone ou à la metformine inhibe directement le métabolisme mitochondrial des cellules β et active l'AMPK, des effets associés à une diminution de la sensibilité au glucose des cellules β pour la sécrétion d'insuline.

Dans le cas de la pioglitazone, les effets décrits sont en toute probabilité indépendants de l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ , puisque les temps d'incubation étaient très courts et que le traitement de cellules INS 832/13 avec deux ligands de PPAR γ , dont les structures chimiques ne sont pas reliées entre elles ni avec celle des TZDs, ne parvient pas à inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

7.2. Observations *in vivo*

La capacité d'un traitement aigu à la pioglitazone à inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose a été confirmée chez le rat Wistar. L'insulinémie des animaux traités est aussi diminuée grâce à une augmentation de la clairance de l'insuline. L'effet inhibiteur de la pioglitazone sur la sécrétion d'insuline *in vivo* apparaît avant une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez des animaux sains. Dans les premières heures suivant l'administration du médicament par gavage, il provoque de plus une inhibition du métabolisme oxydatif des nutriments de tout l'organisme qui ne s'accompagne pas d'un changement du quotient respiratoire. Cette diminution de la dépense énergétique est trop faible pour changer la température corporelle des animaux. Les observations *in vivo* corroborent les résultats obtenus avec les cellules INS 832/13 en démontrant qu'un traitement aigu à la pioglitazone inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose et que cette inhibition peut être associée à une inhibition du métabolisme oxydatif des nutriments.

8. Origines et conséquences des effets aigus de la pioglitazone et de la metformine sur le métabolisme et la fonction des cellules β

8.1. Inhibition du complexe I par les agents insulinosensibilisateurs

Quelle est la cible première d'un traitement aigu à la pioglitazone ou à la metformine dans les cellules β ? Dans l'état actuel de nos connaissances, le complexe I de la chaîne de transport d'électron est généralement accepté comme étant une cible des TZDs et la cible première de la metformine (El-Mir et coll. 2000; Owen, Doran et Halestrap 2000; Brunmair et coll. 2004; Dykens et coll. 2008; Stephenne et coll. 2011) (**figure 7**). Une inhibition de la fonction mitochondriale peut effectivement expliquer nos résultats. Nous avons observés *in vitro* avec les cellules INS 832/13 que les deux médicaments diminuent le potentiel de membrane mitochondrial et diminuent la consommation d'oxygène en présence de glucose. Ces effets correspondent à ceux attendus d'une inhibition du transfert d'électrons au complexe I. En effet, le transfert d'électrons aux complexes I, III et IV permet le déplacement de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui crée une différence de potentiel entre les deux espaces séparées par la membrane interne des mitochondries. Les électrons sont ultimement transférés à l'oxygène au complexe IV, dans une réaction qui produit de l'eau. Le gradient de protons permet quant à lui la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase (complexe V) (Nicholls et Ferguson 2002) (**figure 7**). De fait, nous avons aussi mesuré une diminution du contenu total en ATP dans les cellules traitées avec la pioglitazone (section 5.2, figure 2C) (**figure 8**) surtout à des concentrations intermédiaires de glucose.

Nous n'avons pas effectué la mesure du contenu en ATP des cellules INS 832/13 traitées à la metformine. Cette donnée et le ratio des différents nucléotides à adénine (voir section 8.5) devront être déterminés pour bien comprendre le mécanisme d'action de la metformine. Le traitement d'hépatocytes et de myocytes avec de la metformine a donné lieu à des résultats mitigés à ce sujet. Le traitement d'hépatocytes HepG2 (62,5 $\mu\text{mol/L}$, 24 h (Dykens et coll. 2008)) et de myocytes H-2K^b (2 mmol/L, 3 h (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002)) avec de la

metformine ne diminue pas le contenu en ATP des cellules étudiées. Pourtant, la metformine (0,25 mmol/L, 8 h; 5 mmol/L, 1 h) diminue la concentration en ATP dans des cultures primaires d'hépatocytes (Foretz et coll. 2010; Stephenne et coll. 2011). Nous revenons à la section 8.5 sur l'effet de la metformine sur le ratio des nucléotides à adénines et l'activation de l'AMPK.

Les deux médicaments diminuent aussi l'oxydation du glucose en CO_2 *in vitro*, un effet encore compatible avec une inhibition du complexe I. Puisque les électrons du NADH sont peu ou pas transférés au complexe I, il est en effet concevable qu'il y ait une diminution du ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ dans les matrices mitochondriales. Or le NAD^+ est un cofacteur pour trois réactions enzymatiques qui génèrent du CO_2 dans les mitochondries. Ces réactions sont catalysées par 1) le complexe pyruvate déshydrogénase et deux enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, 2) l'isocitrate déshydrogénase et 3) le complexe de l' α -cétoglutarate déshydrogénase (Nelson, Cox et Lehninger 2008) (**figure 7**). De plus, les trois réactions sont inhibées par le NADH, qui inhibe aussi l'activité d'une autre enzyme du cycle de Krebs, la citrate synthase (Voet et Voet 1998). En accord avec nos observations *in vitro*, une diminution de la consommation d'oxygène et de la production de CO_2 a également été observée *in vivo* chez les rats traités avec la pioglitazone (section 6.2, figures 3A et 3B). Les effets de la metformine sur la quantité de NADH ont été documentés avec des préparations de mitochondries isolés de foie de rats Wistar, perfusés 20 minutes avec un tampon contenant ou non 10 mmol/L metformine. Contrairement à notre hypothèse, Batandier et coll. ont observé que la quantité de NADH produite par les préparations de mitochondries traitées à la metformine est similaire à celle produite dans les préparations témoins lorsque du glutamate et du malate servent de substrats (Batandier et coll. 2006). Ces chercheurs n'ont toutefois pas mesuré le ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$.

Il est intéressant d'ajouter qu'une diminution du ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ mitochondrial devrait réduire l'activité des sirtuines. Les sirtuines sont des protéine lysine déacétylases qui utilisent le NAD^+ comme cofacteur (Houtkooper, Pirinen et Auwerx 2012). L'activité des sirtuines modifie l'état d'acétylation de nombreuses protéines, dont des histones et des facteurs de transcription, ce qui relie l'état énergétique d'une cellule à l'activité transcriptionnelle (Houtkooper, Pirinen et

Auwerx 2012). Les facteurs de transcription ne sont toutefois pas les seules cibles des sirtuines. L'activité de nombreuses protéines mitochondriales est modulée en fonction de leur état d'acétylation dont la plupart des complexes de la chaîne de transport d'électrons et au moins une enzyme impliquée dans la β -oxydation (Lombard, Tishkoff et Bao 2011). Ces dernières protéines sont toutes régulées négativement par acétylation (Lombard, Tishkoff et Bao 2011).

La diminution du métabolisme lipidique dans les cellules exposées à la pioglitazone peut aussi s'expliquer par une inhibition mitochondriale. La β -oxydation des acides gras, qui s'effectue dans la mitochondrie, demande du NAD^+ (étape de la β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase) et génère de l'acétyl-CoA dont l'oxydation en CO_2 peut se poursuivre dans le cycle de Krebs de la même façon que si les carbones provenaient du glucose (Nelson, Cox et Lehninger 2008) (**figure 7**). Cette partie du métabolisme des lipides semble aussi inhibée par la metformine dans nos expériences (**figure S2B**). Palenickova et coll. ont d'ailleurs mesuré une inhibition de la consommation d'oxygène due à la metformine en utilisant la palmityl-carnitine comme substrat pour la respiration dans des homogénats de foie et avec des mitochondries isolées (Palenickova et coll. 2011). De plus, les acides gras libres doivent d'abord être activés en acyls-CoA pour être utilisés dans les voies d'oxydation ou d'estérification. Or, la synthèse d'acyls-CoA par les enzymes acyls-CoA synthétases requiert l'hydrolyse d'ATP en AMP (Nelson, Cox et Lehninger 2008). Dans un contexte où la production d'énergie est perturbée par l'inhibition du complexe I, il est envisageable que l'incorporation de palmitate à des glycérolipides soit réduite. C'est ce que nous avons observé, modestement, avec la pioglitazone (section 5.2, figure 4A à 4C).

Avec les doses utilisées, la metformine ne semble pas en mesure de faire de même dans les cellules INS 832/13 (données préliminaires, non présentées), tout comme elle est sans effet sur la libération de glycérol (**figure S5**). Au contraire, la pioglitazone inhibe presque totalement la libération de glycérol par les cellules INS 832/13 (section 5.2, figure 5A). Dans la cellule β , la plupart des glycérolipides ne s'accumulent pas, mais sont plutôt hydrolysés dans le cycle GL/AGL en produisant ultimement du glycérol, libéré dans le milieu extracellulaire (Nolan et Prentki 2008). Une diminution de l'incorporation de palmitate à des glycérolipides impliquerait ainsi

une diminution de l'hydrolyse des glycérolipides et de la libération de glycérol, comme nous l'avons observé. L'inhibition de la libération de glycérol en présence de pioglitazone est toutefois nettement plus prononcée que celle de l'incorporation de palmitate radiomarqué à des glycérolipides. Cette différence d'amplitude entre les deux effets pourrait provenir du fait que le glycérol libéré est dosé en totalité dans le milieu alors que la mesure de l'estérification des lipides n'est qu'une mesure de la capacité des cellules à intégrer du palmitate exogène à des glycérolipides. Ce ne sont peut-être pas tous les pools lipidiques intracellulaires qui sont accessibles à ce palmitate exogène. De plus, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que le glycérol soit en partie produit par l'hydrolyse du glycérol-3-phosphate en glycérol, ce qui découplerait la libération de glycérol du cycle GL/AGL. Bref, il est possible de concevoir que l'inhibition du complexe I mène à une inhibition de la libération de glycérol au moins en partie suite à une diminution de la production d'ATP et des concentrations d'acyls-CoA.

Mais alors, comment expliquer l'incapacité de la metformine à produire le même effet? Des informations au sujet des effets du médicament sur le contenu en ATP des cellules et les ratios AMP:ATP et ADP:ATP permettraient de mieux évaluer la situation. À partir des données disponibles, nous pouvons néanmoins émettre trois hypothèses pour expliquer pourquoi la pioglitazone et la metformine ont des effets différents sur le métabolisme des lipides. Mentionnons d'abord qu'aucune autre cible directe de la metformine n'a à notre connaissance été proposée pour expliquer une inhibition du métabolisme mitochondrial. Une première hypothèse est que l'inhibition du complexe I par la metformine ne provoque pas d'altération de la répartition lipidique parce que les traitements n'ont pas été assez longs pour diminuer l'énergie cellulaire disponible au point de ralentir directement, ou indirectement par l'AMPK (voir sections 8.5 et 8.6), les voies métaboliques. Contrairement à la pioglitazone, liposoluble, la metformine est hydrosoluble et pénètre difficilement les cellules (van de Merbel et coll. 1998). Or pour atteindre le complexe I, elle doit traverser deux ou trois membranes (la membrane plasmique, la membrane externe des mitochondries et peut-être la membrane interne (le site de liaison de la metformine au complexe I n'a pas été identifié)). Une seconde hypothèse, qui n'est pas incompatible avec la première, est que la pioglitazone affecte directement des réactions enzymatiques du

de transport d'électrons; DHAP, dihydroxyacétone phosphate; Gly-3-P, glycérol-3-phosphate; Gly-3-PDH, glycérol-3-phosphate déshydrogénase; IDH, isocitrate déshydrogénase; MDH, malate déshydrogénase; OAA, oxaloacétate; PDH, pyruvate déshydrogénase; succ-CoA, succinyl-CoA; UQ, ubiquinone.

8.2. Autres cibles mitochondriales pour les thiazolidinediones

La pioglitazone pourrait-elle avoir une autre cible que le complexe I ou bien une cible additionnelle? L'article original qui décrit l'inhibition de l'activité du complexe I par les TZDs n'est pas particulièrement convaincant au sujet de la pioglitazone (Brunmair et coll. 2004). L'activité du complexe I, mesurée dans des homogénats de foie et de muscle de rats, n'était pas changée en présence de 30 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone et n'était diminuée que d'environ 15 % en présence de 100 $\mu\text{mol/L}$ pioglitazone (Brunmair et coll. 2004). À la différence de la metformine, la pioglitazone ne semble pas s'accumuler dans les tissus pour atteindre des concentrations élevées (Fujita et coll. 2003). La possibilité demeure donc que la cible première de la pioglitazone ne soit pas le complexe I ou pas uniquement le complexe I. Parmi les autres cibles directes connues ou proposées pour les TZDs, qui pourraient intervenir dans notre système, il y a le récepteur nucléaire PPAR γ et deux protéines mitochondriales : la protéine CISD1/mitoNEET et le complexe pyruvate déshydrogénase (**figure 7**).

Le complexe pyruvate déshydrogénase

L'inhibition de l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase par un TZD n'a été rapportée qu'une seule fois à notre connaissance, par Fediuc et coll. en 2008. En utilisant des myotubes exposés 1 h à 50 $\mu\text{mol/L}$ troglitazone, ces chercheurs ont noté une inhibition presque totale de la décarboxylation oxydative du pyruvate – un effet qui était indépendant de l'activité de l'AMPK (Fediuc et coll. 2008). L'inhibition de l'activité pyruvate déshydrogénase (**figure 7**) pourrait à elle seule expliquer la plupart de nos résultats (diminution de la production de CO_2 à partir des carbones du glucose, diminution de la consommation d'oxygène, diminution du potentiel de membrane mitochondriale, diminution du contenu cellulaire en ATP, diminution de l'estérification des lipides et de la lipolyse due à une diminution de l'énergie disponible). Alors que l'inhibition du complexe I devrait diminuer le ratio

NAD⁺:NADH dans la mitochondrie, l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase devrait au contraire l'augmenter, avec pour conséquence une diminution de l'activité du complexe I (moins de NADH disponible) et une activation des sirtuines mitochondriales (qui utilisent le NAD⁺). Cette dernière possibilité offre une autre piste pour expliquer les effets différents des agents insulinosensibilisateurs sur le métabolisme. La metformine augmenterait l'état d'acétylation des protéines mitochondriales alors que la pioglitazone le diminuerait. Le profil d'acétylation des protéines des cellules INS 832/13 après chacun des deux traitements mériterait d'être comparé.

L'inhibition de l'enzyme pyruvate déshydrogénase par la pioglitazone soulève la possibilité que d'autres déshydrogénases qui utilisent le NAD⁺/NADH comme cofacteur subissent le même sort, comme par exemple l'isoforme cytosolique de l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase (**figure 7**). Pareille inhibition expliquerait l'importante diminution de la libération de glycérol que nous observons. À ce sujet, il faut ajouter que le complexe I de la chaîne de transport d'électrons possède une activité NADH déshydrogénase (Nicholls et Ferguson 2002). Nous n'avons pas mesuré les effets directs ou indirects de la pioglitazone sur les enzymes ayant une activité déshydrogénase dans les cellules β .

La protéine CISD1/mitoNEET

Une autre cible mitochondriale candidate pour expliquer les effets aigus de la pioglitazone est la protéine mitoNEET. Elle a été identifiée pour la première fois en 2004 par un groupe qui cherchait précisément des cibles mitochondriales pour les TZDs (Colca et coll. 2004). Il s'agit d'une protéine fer-soufre localisée à la membrane externe des mitochondries et faisant face au cytosol (Wiley et coll. 2007) (**figure 7**). La liaison de la pioglitazone permet de stabiliser le centre fer-soufre de la protéine, qui autrement est labile à $\text{pH} \leq 8$ (Paddock et coll. 2007). Les conséquences fonctionnelles de cette interaction ne sont toutefois pas encore clairement établies. La seule information disponible à ce sujet concerne la capacité de la protéine à agir comme agent réducteur. En absence de ligand TZD, la protéine mitoNEET se retrouve principalement sous sa forme réduite. L'interaction de la protéine avec la pioglitazone ou la rosiglitazone stabilise sa forme oxydée et en fait un meilleur agent réducteur (Bak et coll. 2009). Les auteurs de l'étude suggèrent que la capacité

réductrice du complexe mitoNEET-TZD puisse protéger les cellules contre le stress oxydatif. Ils n'ont cependant mené aucune expérience pour déterminer les conséquences fonctionnelles du changement de potentiel d'oxydoréduction de la protéine mitoNEET en présence d'un TZD. Mentionnons que la délétion génique de la protéine mitoNEET chez la souris diminue la respiration oxydative dépendante du complexe I (la seule qui ait été étudiée) (Wiley et coll. 2007).

Les recherches sur la protéine mitoNEET ne sont donc pas encore assez avancées pour se prononcer au sujet de son implication ou non dans les effets aigus de la pioglitazone qui sont décrits dans cette thèse. Dans l'état actuel des connaissances, un seul argument peut être amené contre cette possibilité : la protéine mitoNEET ne serait pas exprimée dans le pancréas (endocrine et exocrine) d'après une détection immunohistochimique effectuée sur des tissus de souris (Wiley et coll. 2007). Pourtant, selon le *Beta Cell Gene Atlas*, le gène est fortement exprimé dans les îlots (T1DBase 2012). Nous n'avons pas tenté de détecter l'expression de la protéine CISD1/mitoNEET dans les cellules INS 832/13 ou dans les îlots de rat. Des nouvelles données provenant du groupe du Dr Scherer devraient nous éclairer bientôt sur la fonction de cette protéine et son implication dans les effets des TZDs. D'après les présentations récentes du Dr Scherer, la surexpression de mitoNEET chez la souris récapitulerait les effets d'un traitement avec un TZD : amélioration de la sensibilité à l'insuline, amélioration du profil lipidique et augmentation du poids corporel (notes personnelles du Dr Marc Prentki).

8.3. Liaison des thiazolidinediones à PPAR γ

Les TZDs sont des ligands et agonistes du récepteur nucléaire et facteur de transcription PPAR γ . Il est donc possible qu'une partie des effets que nous observons en présence de pioglitazone fasse intervenir la liaison du médicament à PPAR γ . Trois faits rendent cependant cette éventualité fort peu probable. Premièrement les conditions expérimentales utilisées impliquaient des temps d'exposition d'au plus 90 min *in vitro* et 2h45 *in vivo*. *In vitro*, les effets de la pioglitazone sur le potentiel de membrane mitochondrial et le contenu en ATP ont été mesurés après seulement 10 min d'incubation. Ces durées d'exposition sont très courtes pour observer un changement important dans le profil d'expression génique, susceptible d'affecter

profondément le métabolisme. Pour observer une modification du métabolisme due à un effet transcriptionnel de la pioglitazone, il faut qu'il y ait liaison du ligand au facteur de transcription PPAR γ , transcription d'un gène cible, maturation de l'ARNm transcrit, traduction de l'ARNm et maturation d'une quantité suffisante de protéines pour influencer le métabolisme. Ces processus peuvent être rapides. Par exemple, une quantité importante de protéine c-Fos est détectable après une heure d'induction dans des cellules eucaryotes (Bravo et coll. 1985). Cela dit, une incubation de 10 min nous apparaît insuffisante pour provoquer des changements critiques dans le profil d'expression des gènes, susceptibles d'affecter le métabolisme mitochondrial. Deuxièmement, nous avons détecté l'ARNm de PPAR γ dans les cellules INS 832/13, mais n'avons pas été en mesure de détecter une augmentation de l'expression de l'ARNm de gènes transactivés par PPAR γ (gènes codant pour le récepteur CD36 (*CD36*), pour l'enzyme malique (*ME1*), pour l'enzyme pyruvate carboxylase (*PC*) et pour l'adipophiline (*PLIN2*)) après 24 h d'exposition à la pioglitazone ou à deux autres agonistes de PPAR γ , avec ou sans acide rétinoïque (GW1929 et CAY10599; données non présentées). Troisièmement, les agonistes de PPAR γ GW1929 et CAY10599, qui ne sont pas des thiazolidinediones et qui ont des structures chimiques différentes, ne parviennent pas à inhiber la sécrétion d'insuline des cellules INS 832/13, même à des doses très élevées (section 6.2, figure 6). Ce dernier point ne nous informe pas directement sur les effets des agonistes PPAR γ sur le métabolisme. Néanmoins, si les effets aigus de la pioglitazone s'expliquaient par l'activation de PPAR γ , les deux agonistes devraient diminuer fortement l'énergie disponible dans les cellules β et inhiber la sécrétion d'insuline.

Le groupe de Bruce Spiegelman a récemment proposé un nouveau modèle pour expliquer les effets des TZDs sur l'expression génique dépendante de PPAR γ . D'après ce modèle, la liaison des TZDs au récepteur nucléaire PPAR γ nuirait à la phosphorylation du récepteur nucléaire par la kinase dépendante des cyclines CDK5 (Choi et coll. 2010). Les chercheurs ont entre autres présenté une corrélation négative entre les changements de phosphorylation de PPAR γ dans le tissu adipeux et les changements de sensibilité à l'insuline chez des patients traités durant 6 mois à la rosiglitazone (Choi et coll. 2010). Le gène de l'adiponectine est l'un de ceux dont l'expression est affectée à la baisse par la phosphorylation de PPAR γ . La

rosiglitazone augmente ainsi l'expression de l'adiponectine en empêchant la phosphorylation de PPAR γ (Choi et coll. 2010). La kinase CDK5 est exprimée dans les îlots pancréatiques d'après le *Beta Cell Gene Atlas*, particulièrement chez les rongeurs (T1DBase 2012). Lorsque nous avons étudié les effets de la glucolipotoxicité sur le profil d'expression des gènes des cellules INS 832/13 (El-Assaad et coll. 2010), nous avons détecté la CDK5 et noté que son expression varie en présence de fortes concentrations de glucose et de palmitate (données non présentées). Précisons que pour que ce modèle s'applique à notre système, il faudrait que la CDK5 soit active en condition contrôle et que son action soit bloquée dans les cellules traitées. Ce nouveau mode d'action est très intéressant pour expliquer les effets à long terme des TZDs, dans un contexte d'augmentation de l'activité CDK5, mais n'est probablement pas impliqué dans nos observations, pour les mêmes raisons que celles avancées au sujet de l'activation de PPAR γ .

Dans un second article, le groupe du Dr Spiegelman a présenté les propriétés antidiabétiques du composé SR1664, qui est un ligand de PPAR γ sans en être un agoniste (Choi et coll. 2011). Le SR1664 est en mesure de bloquer la phosphorylation du récepteur nucléaire par la CDK5. Utilisé *in vivo*, le composé améliore la sensibilité à l'insuline en quelques jours dans deux modèles murins de DT2 sans causer les effets indésirables des agonistes de PPAR γ (prise de poids et rétention d'eau) (Choi et coll. 2011). Les chercheurs n'ont pas abordé la question des effets indépendants de PPAR γ dans leurs études. Il sera intéressant de déterminer si cette nouvelle classe de ligands non agonistes de PPAR γ a aussi des effets aigus sur le métabolisme énergétique et sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

8.4. Autre cible potentielle pour la metformine

Une autre cible directe a aussi été proposée pour la metformine. La metformine inhibe directement l'activité AMP déaminase dans des myocytes en culture (Ouyang, Parakhia et Ochs 2011). Cette cible est particulièrement intéressante pour expliquer les conséquences d'un traitement à la metformine dans le muscle squelettique où le médicament provoque une augmentation de l'oxydation des acides gras. En effet, une augmentation de l'oxydation mitochondriale des acides gras s'explique mal si la metformine inhibe de façon importante le complexe I de la chaîne

de transport d'électrons dans le muscle car une accumulation de NADH devrait diminuer la β -oxydation et nuire au cycle de Krebs qui utilise l'acétyl-CoA généré par la β -oxydation (voir section 8.1). En inhibant l'AMP déaminase, la metformine augmente les concentrations d'AMP, active l'AMPK et favorise la β -oxydation (Ouyang, Parakhia et Ochs 2011). Les chercheurs qui ont fait cette découverte n'ont cependant pas effectué de mesures du métabolisme mitochondrial. Si ce mécanisme intervient dans nos conditions expérimentales, il s'accompagne d'une inhibition du métabolisme mitochondrial.

L'augmentation de la β -oxydation en présence de metformine peut néanmoins s'expliquer autrement. Les électrons nécessaires à la respiration et à la synthèse d'ATP peuvent être fournis en aval du complexe I, ce qui permet l'oxydation des acides gras. Les travaux de la compagnie *Seahorse Bioscience* illustrent clairement cette possibilité : en présence de metformine, la consommation d'oxygène par des myocytes C2C12 est fortement inhibée lorsque le substrat utilisé est le glucose, mais fortement augmentée lorsque du palmitate est utilisé comme substrat (Wu et coll. 2007). Vraisemblablement, la réoxydation du NADH n'est pas une réaction limitante pour la β -oxydation dans les myocytes.

8.5. Activation de l'AMPK par les agents insulinosensibilisateurs

Les effets importants des agents insulinosensibilisateurs sur l'activité mitochondriale (diminution du potentiel de membrane, de l'oxydation des substrats en CO_2 et de la synthèse d'ATP) impliquent une diminution de l'énergie disponible dans les cellules et une réponse cellulaire pour tenter de préserver l'homéostasie énergétique. L'activation de l'AMPK fait partie de cette réponse cellulaire. La capacité des agents insulinosensibilisateurs à activer l'AMPK était connue depuis les travaux de Zhou et coll. en 2001 (Zhou et coll. 2001) pour la metformine et ceux de Fryer et coll. en 2002 pour les TZDs (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002). Les données de 2002 au sujet des TZDs permettaient de relier l'activation de l'AMPK à une augmentation très prononcée des ratios AMP:ATP et ADP:ATP dans les cellules traitées à la rosiglitazone (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002). L'origine de l'activation de l'AMPK dans ces cellules peut ainsi s'expliquer par une inhibition du complexe I, comme proposé en 2004 (Brunmair et coll. 2004).

Le mécanisme derrière l'activation de l'AMPK par la metformine est par contre moins évident. D'après des expériences effectuées avec des enzymes purifiées, la metformine n'active pas directement l'AMPK (Zhou et coll. 2001; Hawley et coll. 2002) ni l'activité AMPKK (Hawley et coll. 2002). L'inhibition du complexe I par la metformine avait bien déjà été proposée comme cible (El-Mir et coll. 2000; Owen, Doran et Halestrap 2000), mais deux publications ont rapidement semé le doute. Dans ces articles, écrits chacun par un des codécouvreurs de l'AMPK, on peut lire que l'activation de l'AMPK en présence de metformine n'est pas due à une augmentation du ratio AMP:ATP (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002) ou ADP:ATP (Hawley et coll. 2002). Les conclusions de Fryer et coll. peuvent aujourd'hui être réconciliées avec un rôle des ratios des différents nucléotides à adénine dans l'activation de l'AMPK. En effet, d'après leurs résultats, obtenus à partir de myotubes murins H-2K^b incubés 30 minutes en présence de 2 mmol/L metformine, le médicament augmente clairement le ratio ADP:ATP (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002). Or, le ratio ADP:ATP serait beaucoup plus significatif pour le contrôle de l'activité de l'AMPK dans un contexte physiologique que le ratio AMP:ATP ou même que la concentration d'AMP (Oakhill, Scott et Kemp 2012). En effet, les nucléotides à adénine partagent deux sites de liaison sur la sous-unité γ (régulatrice) de l'AMPK et ont des affinités similaires pour ces sites. La liaison de l'ATP nuit à l'activité de l'AMPK (en favorisant la déphosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité catalytique) alors que la liaison de l'ADP ou de l'AMP favorise cette activité. À moins d'un stress énergétique important, les concentrations d'ADP sont toujours plus importantes que celles de l'AMP, d'où le rôle clé du ratio ADP:ATP pour l'activité de l'AMPK (Oakhill, Scott et Kemp 2012).

Le cas du second article est plus intrigant. Hawley et coll. n'ont pas noté de changement dans le ratio ADP:ATP de cellules H4IIE (hépatome de rat) traités 18 heures avec 2 mmol/L metformine, alors que l'AMPK était clairement activée (Hawley et coll. 2002). En utilisant de l'oligomycine pour inhiber la synthèse d'ATP, ils ont également démontré qu'il y a un seuil à partir duquel le ratio ADP:ATP est suffisamment augmenté pour activer l'AMPK dans leur système. Ce seuil était assez élevé pour conclure que de petites variations indétectables du ratio ADP:ATP en

présence de metformine ne pouvaient pas expliquer l'activation de l'AMPK (Hawley et coll. 2002). Les chercheurs n'ont pas proposé un autre mécanisme.

Nous n'avons pas mesuré les effets de la metformine sur les concentrations relatives des différents nucléotides à adénine dans nos conditions expérimentales. Nous n'avons d'ailleurs pas vérifié l'activation de l'AMPK dans ces conditions, la jugeant hautement probable et dispensable à l'introduction de la théorie de la décélération métabolique. Il demeure ainsi envisageable que le traitement à la metformine n'ait pas permis d'activer l'AMPK dans nos conditions expérimentales.

8.6. Effets de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme

L'activité AMPK intervient-elle dans les effets des agents insulinosensibilisateurs sur le métabolisme de la cellule β ? Les paragraphes qui suivent présentent les différentes voies métaboliques qui pourraient être affectées par l'activité AMPK dans nos modèles expérimentaux. Toutefois, ces modèles ne permettent pas de déterminer l'importance du rôle de l'activité AMPK dans les effets des agents insulinosensibilisateurs, ni même si l'AMPK a un rôle à y jouer. Le portrait est compliqué par le fait que la cause de l'activation de l'AMPK est liée aux effets négatifs des médicaments sur le métabolisme énergétique, alors que l'activité AMPK devrait avoir un effet positif sur les mêmes voies métaboliques, productrices d'énergie. Pour sortir de l'impasse, il faudrait reprendre les expériences en modulant l'activité de l'AMPK par des approches moléculaires. Et encore, l'interprétation des résultats serait compliquée par le fait que ces approches altèrent le profil d'expression génique du modèle.

Activation de l'AMPK et métabolisme des lipides

Du côté du métabolisme des lipides, l'activité AMPK inhibe trois enzymes anaboliques clés : l'acétyl-CoA carboxylase (Carling, Zammit et Hardie 1987), présentée plus haut et qui catalyse la première étape de la synthèse des acides gras; l'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (Carling, Zammit et Hardie 1987), étape limitante de la voie de synthèse du cholestérol; et la glycérol-3-phosphate acyltransférase (Muoio et coll. 1999), étape limitante de la voie de synthèse des glycérolipides. De ces voies anaboliques, nous n'avons étudié que celle de la synthèse des glycérolipides, en mesurant l'incorporation du $[1-^{14}\text{C}]$ palmitate à différentes

espèces lipidiques (triacylglycérol, diacylglycérol, phospholipides et esters de cholestérol) durant 45 min dans les cellules INS 832/13. En présence d'une concentration intermédiaire de glucose (6 mmol/L), 50 μ mol/L pioglitazone diminue d'environ 50 % l'incorporation du traceur au diacylglycérol et d'environ 25 % aux phospholipides. Dans les mêmes conditions expérimentales, 5 mmol/L metformine ne semble pas en mesure de changer l'incorporation de palmitate à ces espèces lipidiques (n=4 puits au sein de 2 expériences – données non présentées).

Tout en freinant la biosynthèse des acides gras, l'inhibition de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase stimule aussi le catabolisme des lipides. En effet, l'acétyl-CoA carboxylase produit du malonyl-CoA qui est un inhibiteur de l'enzyme carnitine-palmitoyltransférase-1, responsable de l'entrée des acyls-CoA à longue chaîne dans la mitochondrie (McGarry et Foster 1979). L'activation de l'AMPK devrait ainsi favoriser la voie métabolique de la β -oxydation. Pourtant, dans nos expériences *in vitro*, ni la metformine (**figure S2B**), ni la pioglitazone (section 5.2, figure 4D) ne parviennent à stimuler l'oxydation des lipides. La même incapacité de la pioglitazone à augmenter l'oxydation des lipides a été observée *in vivo* lors des mesures de calorimétrie indirecte (section 6.2, figure 3D). Dans ces expériences, le quotient respiratoire est demeuré inchangé dans les heures suivant l'administration de la pioglitazone. Pourtant, l'administration de metformine par gavage semble en mesure de diminuer l'oxydation des acides gras chez des rats Sprague-Dawley (Cool et coll. 2006). Il sera intéressant de déterminer quel est l'effet de la metformine sur le quotient respiratoire dans nos conditions expérimentales, puisqu'elle est aussi en mesure de réduire la production de CO₂ *in vitro*. Une explication envisageable pour nos observations vient de l'inhibition du métabolisme mitochondrial observée *in vitro*. Même si l'activation de l'AMPK favorise la β -oxydation, les dernières étapes de cette oxydation demeurent la production de CO₂ dans le cycle de Krebs, un paramètre clairement réduit dans nos expériences. La cause pourrait en être l'accumulation de NADH suite à l'inhibition du complexe I (voir section 8.1).

La lipolyse est une autre voie catabolique régulée par l'AMPK, du moins dans les adipocytes et les myocytes. Le rôle fonctionnel de cette régulation n'est toutefois pas totalement élucidé. L'activité AMPK stimule la lipolyse en activant directement la lipase adipocytaire du triacylglycérol (Ahmadian et coll. 2011) et l'absence

d'activité AMPK nuit à la capacité lipolytique d'adipocytes en culture (Yin, Mu et Birnbaum 2003). Dans l'étude d'Ahmadian et coll., la concentration d'acides gras en circulation est augmentée 5 heures après l'administration d'AICAR (un activateur de l'activité AMPK) *in vivo*, en accord avec une augmentation de la lipolyse (Ahmadian et coll. 2011). D'autres chercheurs ont néanmoins documenté une inhibition de la lipolyse dans les muscles et les adipocytes lorsque l'activité AMPK est augmentée *in vitro* par des approches pharmacologiques ou moléculaires (Sullivan et coll. 1994; Watt et coll. 2004; Daval et coll. 2005; Watt et coll. 2006; Anthony, Gaidhu et Ceddia 2009; Bourron et coll. 2010). Les travaux de Bourron et coll., effectués avec des adipocytes humains en culture, décrivent même l'effet inhibiteur d'un traitement de 1 heure à la metformine ou à la pioglitazone sur la lipolyse stimulée par un activateur β -adrénergique ou le facteur natriurétique auriculaire (Bourron et coll. 2010). Dans nos expériences, la pioglitazone inhibe de façon importante la libération de glycérol stimulée par le glucose *in vitro*, et diminue légèrement la concentration d'acides gras en circulation chez les rats traités (**figure S6A**), suggérant une inhibition de la lipolyse. Cela dit, la question du rôle de l'AMPK dans la régulation aiguë de la lipolyse doit encore être clarifiée, non seulement dans la cellule β mais également dans les adipocytes.

Activation de l'AMPK et métabolisme du glucose

Les conséquences de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme du glucose sont documentées principalement dans les muscles et le foie. L'activité AMPK stimule le transport du glucose et inhibe la synthèse de glycogène dans les muscles, stimule la glycolyse dans le cœur et inhibe la gluconéogenèse hépatique (Carling 2004; Kahn et coll. 2005). Pour activer la glycolyse dans les cardiomyocytes, l'AMPK phosphoryle et active directement l'enzyme 6-phosphofructo-2-kinase (Marsin et coll. 2000). Cette enzyme produit du fructose 2,6-bisphosphate, un activateur allostérique de l'enzyme glycolytique phosphofruktokinase (Nelson, Cox et Lehninger 2008). Il existe au moins quatre isoformes de cette enzyme qui seraient toutes exprimées dans la cellule β d'après le *Beta Cell Gene Atlas* (T1DBase 2012). Ainsi, si cette voie de signalisation devait être opérationnelle dans la cellule β , l'activation de l'AMPK par les agents insulinosensibilisateurs devraient y augmenter l'utilisation du glucose. D'un autre côté, si ces agents inhibent en premier lieu le

complexe I de la chaîne de transport d'électrons, l'augmentation attendue du ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ devrait au contraire freiner la glycolyse puisque l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, sixième réaction de la voie glycolytique, utilise le NAD^+ comme cofacteur. Nous avons tenté de mesurer *in vitro* l'utilisation du glucose dans les cellules β traités avec de la pioglitazone, mais pour une raison qui nous échappe, la méthode employée (formation d'eau tritiée à partir de $[5\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$) n'a pas permis de générer des données fiables.

La capacité de l'AMPK à stimuler la glycolyse ne s'observe pas dans tous les tissus. Dans le cerveau de rats carencés en cuivre à la naissance, l'AMPK est clairement activée alors que la concentration de fructose 2,6-bisphosphate est diminuée et que la glycolyse est ralentie (Gybina et Prohaska 2008). Dans des cultures primaires d'hépatocytes de rongeurs (des cellules qui, comme les cellules β , expriment le couple de protéines GLUT2-glucokinase), l'activité AMPK a même plutôt été associée à une diminution de la glycolyse provoquée par une diminution de la présence cytoplasmique de l'enzyme glucokinase. Mukhtar et coll. ont en effet rapporté qu'un traitement à l'AICAR inhibe la translocation de la glucokinase du noyau au cytoplasme, autrement induite par le glucose (Mukhtar et coll. 2008). La diminution de la localisation cytoplasmique de la glucokinase coïncide avec une diminution de la phosphorylation du glucose (Mukhtar et coll. 2008). Pareil effet dans notre modèle expérimental pourrait contribuer à la diminution de l'oxydation du glucose, du potentiel de membrane mitochondrial et du contenu en ATP des cellules. La question demeure donc ouverte à savoir si la glycolyse est augmentée, diminuée ou inchangée dans les cellules β traitées de façon aigüe avec de la pioglitazone.

Autres considérations au sujet de l'activation de l'AMPK

In vivo, l'activation de l'AMPK dans l'hypothalamus est en mesure de réguler l'homéostasie énergétique à l'échelle de l'organisme, entre autres en stimulant la prise alimentaire (Andersson et coll. 2004; Minokoshi et coll. 2004). De plus, il est clair que l'activation de l'AMPK implique une modification du profil d'expression génique qui intervient forcément dans les effets des médicaments insulinosensibilisateurs utilisés de façon chronique. Notamment, l'activation de l'AMPK conduit à une augmentation de la biogenèse mitochondriale et participe au contrôle de la qualité mitochondriale (Hardie 2011).

8.7. Inhibition de la voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline

Les effets des agents insulinosensibilisateurs sur le métabolisme offrent plusieurs pistes pour expliquer l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ces effets suivent généralement le même modèle d'inhibition avec les cellules INS 832/13 : aucun changement en présence de concentrations non stimulantes de glucose; une inhibition marquée lorsque les concentrations de glucose sont intermédiaires (entre 3-5 mmol/L et 10-16 mmol/L); une perte de l'inhibition lorsque les concentrations de glucose sont élevées ($\geq 10-16$ mmol/L). Nous avons appelé « décélération métabolique » ce patron d'inhibition. Ce ne sont pas tous les paramètres mesurés qui le suivent. Par exemple, l'oxydation du glucose en CO_2 en présence de metformine (**figure S2A**) ne le respecte pas. Néanmoins, le patron est suivi pour les effets de la pioglitazone sur l'oxydation du glucose et le contenu total en ATP des cellules, de même que pour les effets de la metformine sur le potentiel de membrane mitochondrial (**figure S3**). L'inhibition de ces paramètres suffit à expliquer une diminution de la production d'énergie mitochondriale qui se fait selon le modèle de la décélération métabolique. Or, les mécanismes de sécrétion d'insuline dépendent d'abord du métabolisme mitochondrial du glucose (Antinozzi et coll. 2002; Malmgren et coll. 2009).

Une diminution de la production d'énergie devrait influencer le ratio ADP:ATP, qui est le facteur de couplage entre le métabolisme du glucose et la voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Pour déclencher la sécrétion d'insuline, le métabolisme du glucose entraîne la diminution du ratio ADP:ATP, ce qui provoque la fermeture des canaux K_{ATP} , la dépolarisation de la membrane plasmique, l'ouverture des canaux calciques qui dépendent du potentiel de membrane et l'influx de calcium nécessaire à la libération des granules contenant l'insuline (Prentki 1996). Les agents insulinosensibilisateurs inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose en suivant le patron de la décélération métabolique. Les effets mitochondriaux de ces médicaments, qui augmentent probablement le ratio ADP:ATP, suffisent ainsi à expliquer pourquoi ils inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Il serait pertinent de vérifier l'effet des traitements sur le ratio ADP:ATP.

8.8. Inhibition des voies d'amplification de la sécrétion d'insuline

La voie de déclenchement permet l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique indispensable à l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline (Henquin 2000). L'inhibition de cette voie rend donc inopérants les mécanismes d'amplification de la sécrétion. Néanmoins, puisque nous mesurons une sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence des agents insulinosensibilisateurs, il est probable que ces agents influencent aussi les voies d'amplification de la sécrétion d'insuline. Le modèle expérimental que nous avons utilisé pour mesurer la sécrétion d'insuline ne permet pas d'identifier la contribution spécifique des voies d'amplification. Voici tout de même comment ces voies pourraient être impliquées dans l'inhibition de la sécrétion d'insuline ou dans son rétablissement en présence de concentrations élevées de glucose.

Modulation de la répartition lipidique

Différentes voies métaboliques permettent de moduler la sécrétion d'insuline induite par le glucose de façon à l'adapter aux besoins en insuline réels et instantanés de l'organisme (Nolan et Prentki 2008). Notre laboratoire étudie depuis plusieurs années le rôle du métabolisme des lipides dans l'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et a proposé le modèle de la voie du malonyl-CoA/acyls-CoA à longue chaîne. D'après ce modèle, le métabolisme mitochondrial du glucose mène à une augmentation du malonyl-CoA cytosolique qui freine la β -oxydation des acides gras à longue chaîne et les redirige vers d'autres voies où ils servent de molécules de signalisation (Prentki et coll. 1992). En particulier, le cycle GL/AGL intègre plusieurs voies métaboliques qui génèrent des molécules identifiées ou proposées comme modulateurs de la sécrétion (Prentki et Madiraju 2008). La partie lipolytique du cycle semble particulièrement importante. En effet, la diminution de l'expression de la lipase adipocytaire du triacylglycérol dans les cellules INS 832/13 et l'ablation génique de cette lipase chez la souris ont été associées à une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Peyot et coll. 2009). Au contraire, chez le rat *Zucker fatty*, un modèle de compensation des cellules β , l'hypersécrétion d'insuline corrèle avec une augmentation importante de la lipolyse (Nolan et coll. 2006).

La capacité de la pioglitazone à activer l'AMPK et éventuellement à modifier la répartition des lipides et la sécrétion d'insuline induite par le glucose était à la base de notre projet (voir section 4.1). Cette manipulation pharmacologique devait favoriser la β -oxydation et diminuer l'incorporation des lipides à des molécules de signalisation. Suivant notre première hypothèse, la diminution des molécules de signalisation lipidique en présence de pioglitazone devait diminuer la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Malgré l'activation de l'AMPK, la pioglitazone n'a pas augmenté la β -oxydation. Par contre, le traitement diminue l'incorporation du palmitate à des glycérolipides (section 5.2, figure 4) et inhibe fortement la libération de glycérol par les cellules INS 832/13 (section 5.2, figure 5A). La première mesure donne une indication sur l'activité anabolique du cycle GL/AGL, alors que la seconde est un indicateur de l'activité lipolytique. L'inhibition concomitante de ces deux paramètres suggère fortement que le cycle GL/AGL est ralenti dans les cellules β traitées avec de la pioglitazone. Les résultats au sujet de la libération de glycérol ne permettent pas de déterminer s'il s'agit de décélération métabolique ou non; il aurait fallu ajouter des conditions avec des concentrations de glucose supérieures à 10 mmol/L. L'inhibition de la glycérolipogenèse n'est toutefois apparente qu'en présence de concentrations intermédiaires de glucose, là où l'inhibition de la sécrétion d'insuline est la plus prononcée. Ces éléments permettent d'envisager que l'inhibition du cycle GL/AGL par la pioglitazone suit le patron de la décélération métabolique et participe à l'inhibition de la sécrétion d'insuline.

En présence de metformine par contre, le cycle GL/AGL ne semble pas du tout affecté malgré la nette inhibition de la sécrétion d'insuline. Les conséquences fonctionnelles de cette différence entre les effets des deux agents antidiabétiques sur le métabolisme lipidique ne sont pas évidentes. Les courbes de sécrétion d'insuline induite par le glucose ont des aspects légèrement différents selon que les cellules sont traitées avec la pioglitazone ou avec la metformine. Les effets des médicaments sur le métabolisme lipidique ont-ils quelque chose à y voir? La question demeure ouverte.

Les résultats concernant le métabolisme des lipides réfutent donc en partie l'hypothèse initiale : l'activation pharmacologique de l'AMPK par des agents insulinosensibilisateurs ne parvient pas à stimuler la β -oxydation comme nous l'avions prévu. Néanmoins, le traitement aigu de cellules INS 832/13 avec de la

pioglitazone diminue l'estérification des lipides et la lipolyse, des effets qui pourraient participer à l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Quant à l'objectif de déterminer le rôle de l'AMPK dans les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose, il ne peut clairement pas être atteint par l'approche pharmacologique employée. D'abord parce que les outils ne sont pas spécifiques (l'activation de l'AMPK par les agents insulinosensibilisateurs est indirecte et n'est impliquée que dans une partie de leurs effets) et ensuite à cause de la fonction même de l'AMPK, qui est de réguler l'homéostasie énergétique, elle-même intimement liée aux mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose. En fait, on ne peut manipuler artificiellement l'activité de l'AMPK sans altérer la sécrétion d'insuline, que l'activité de l'AMPK soit indispensable ou accessoire dans la régulation physiologique de la sécrétion d'insuline. L'identification de nouveaux substrats de l'AMPK directement impliqués dans les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose (par exemple des protéines nécessaires au déplacement ou à l'exocytose des granules de sécrétion) est une approche qui permettrait de se rapprocher de l'objectif que nous nous étions fixé.

Augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène ont aussi été proposées comme facteur de couplage impliquées dans l'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Pi et coll. 2007; Leloup et coll. 2009). Plusieurs expériences ont été menées au laboratoire pour quantifier les dérivés réactifs de l'oxygène parallèlement à la sécrétion d'insuline. Récemment, deux fluorophores sensibles aux dérivés réactifs de l'oxygène ont été employés : le dihydroéthidium (HE; utilisé d'avantage pour détecter l'anion superoxyde) et le diacétate de chlorométhyl-dichlorodihydrofluorescéine (CM-H₂DCFDA; qui réagit avec de nombreuses molécules dont le peroxyde d'hydrogène). Les expériences ont été réalisées avec des cellules INS 832/13 et des îlots de souris, en ajoutant les fluorophores avant ou après les traitements, en présence ou non d'inhibiteurs des canaux associés à la multirésistance aux médicaments (capables de pomper les fluorophores à l'extérieur de la cellule), et la fluorescence a été détectée par deux techniques : en cytométrie de flux (**figure S4**) et en microscopie confocale (expériences réalisées par Émilie Pepin). Dans toutes les expériences effectuées, l'augmentation de la concentration de glucose

a été associée à une diminution de la détection des dérivés réactifs de l'oxygène, comme présenté à la **figure S4** (cellules INS 832/13 chargées avec le HE).

D'autres groupes ont fait le même constat avec les mêmes fluorophores (Martens et coll. 2005; Lacraz et coll. 2009; Rebelato et coll. 2011; Sarre et coll. 2012). Pour expliquer cet effet, Rebelato et coll. ont proposé qu'en présence de concentrations stimulantes de glucose, il y a une augmentation de la voie des pentoses phosphates et de la production de NADPH, ce qui crée un environnement favorable à la réduction des espèces réactives dérivées de l'oxygène (Rebelato et coll. 2011). Ces données sont difficilement réconciliables avec la proposition selon laquelle les dérivés réactifs de l'oxygène agissent comme facteur de couplage pour stimuler la sécrétion d'insuline.

Dans nos expériences, l'exposition des cellules INS 832/13 à la metformine a mené à une diminution de la détection des espèces réactives dérivées de l'oxygène, particulièrement de l'anion superoxyde (**figure S4**). La même observation a été faite par Ouslimani et coll. en 2005 dans des cellules endothéliales (Ouslimani et coll. 2005). Si les dérivés réactifs de l'oxygène devaient se révéler être effectivement des molécules de signalisation pour la sécrétion d'insuline, alors une partie de l'effet inhibiteur de la metformine pourrait être associée à leur diminution.

8.9. Activation des voies qui freinent la sécrétion d'insuline

Il a été question jusqu'ici de voies métaboliques qui amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Cependant, pour ajuster parfaitement la sécrétion d'insuline aux besoins de l'organisme, la cellule β possède probablement aussi des mécanismes qui la régulent à la baisse (Pepin et coll. 2010). D'ailleurs, à l'origine de cette thèse, nous voulions utiliser la pioglitazone et la metformine comme outils pour activer l'AMPK et favoriser la β -oxydation dans les cellules β . Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle cette altération de la répartition lipidique diminuerait la sécrétion d'insuline induite par le glucose. L'oxydation des lipides, qui autrement pourraient servir de molécules de signalisation, a en effet été proposée comme un signal d'arrêt de la sécrétion (Nolan et Prentki 2008).

Modulation de la répartition lipidique

L'augmentation de la β -oxydation a récemment été associée à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans un modèle animal de DT2 étudié au laboratoire, les souris rendues obèses par la diète (souris DIO, pour *diet-induced obesity*). Les îlots des souris obèses sécrètent moins d'insuline que les souris témoins lorsqu'ils sont stimulés par le glucose. Or, les îlots des animaux obèses oxydent significativement plus le palmitate et semblent avoir un cycle GL/AGL moins important (Peyot et coll. 2010). Cela dit, ni le traitement à la pioglitazone, ni celui à la metformine est en mesure de stimuler l'oxydation du palmitate dans les cellules INS 832/13. Cette incapacité a même été observée *in vivo*, puisque le gavage des rats avec la pioglitazone n'a pas pu modifier leur quotient respiratoire (section 6.2, figure 3D). Ainsi, les agents insulinosensibilisateurs ne diminuent pas la sécrétion d'insuline de façon aigüe en augmentant la β -oxydation, une voie qui agit comme modulateur négatif de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Pourtant, traiter les cellules β à la pioglitazone active l'AMPK, ce qui devrait favoriser la β -oxydation (sauf si le médicament provoque une accumulation de NADH due à l'inhibition du complexe I (voir section 8.1)).

Effets toxiques

Est-ce que l'inhibition par la pioglitazone et la metformine de la sécrétion d'insuline induite par le glucose peut être provoquée par des effets toxiques de ces médicaments ou qui ne sont pas reliés au métabolisme? Nous n'avons pas directement mesuré la viabilité des cellules INS 832/13 dans les conditions expérimentales utilisées. Par contre, quelques faits permettent d'affirmer que la viabilité des cellules n'est pas affectée. Premièrement, la libération basale d'insuline est normale, comme l'est la sécrétion d'insuline induite par des concentrations élevées de glucose (section 5.2, figure 1D et **figure S5A**) et son amplification par le palmitate (section 5.2, figure 1C). De même, ces médicaments insulinosensibilisateurs affectent peu ou pas la libération d'insuline induite par le potassium (35 mmol/L KCl, *in vitro* (section 5.2, figure 1B et 3D)) et l'arginine (environ 16,7 mmol/L, *in vivo* (section 6.2, figure 1C)). Ces conditions expérimentales court-circuitent le contrôle des canaux K_{ATP} sur la sécrétion d'insuline en dépolarisant directement la membrane plasmique des cellules β et permettent d'étudier l'état des mécanismes d'exocytose des granules de sécrétion.

Deuxièmement, l'inhibition provoquée par la pioglitazone est levée ou tend à l'être pour tous les paramètres métaboliques mesurés (section 5.2). Troisièmement, le contenu en insuline des cellules n'est pas affecté par les traitements (donnée non présentée). Enfin, les différents traitements n'affectent pas l'aspect des cellules au microscope à contraste de phase.

8.10. Modèles proposés

La **figure 8** résume schématiquement les éléments discutés plus haut en les intégrant dans un modèle qui décrit comment la pioglitazone et la metformine peuvent altérer le métabolisme et la fonction des cellules β . En voici une présentation détaillée. Les résultats présentés dans cette thèse sont en accord avec un effet aigu de la pioglitazone et de la metformine qui fait d'abord intervenir une cible mitochondriale. L'interaction des agents antidiabétiques avec cette cible provoque une inhibition du métabolisme mitochondrial. Dans le cas de la metformine, cette cible est probablement le complexe I de la chaîne de transport d'électrons. Dans le cas de la pioglitazone, la ou les cibles n'ont pas été clairement identifiées. L'inhibition du complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase ou de plusieurs déshydrogénases est une avenue particulièrement attrayante, sur laquelle nous miserions pour poursuivre les recherches.

La liaison des composés avec cette ou ces cibles implique une diminution du transport d'électrons et de la translocation de protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire. Cet effet entraîne une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (établi par le gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne des mitochondries) (article 1 à la section 5.2, figure 2B pour la pioglitazone et **figure S3** pour la metformine) et une diminution de la consommation d'oxygène (qui est l'accepteur final des électrons au complexe IV (Nicholls et Ferguson 2002)) (article 2 à la section 6.2, figure 5A pour la pioglitazone). L'inhibition du complexe I nuit à la réoxydation du NADH en NAD^+ , ce qui diminue le ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ au détriment de l'activité des déshydrogénases mitochondriales qui dépendent du NAD^+ comme cofacteur et qui, pour certaines, sont inhibées par le NADH. Trois de ces déshydrogénases sont également des décarboxylases qui libèrent du CO_2 . En admettant que la pioglitazone inhibe des activités déshydrogénases dans

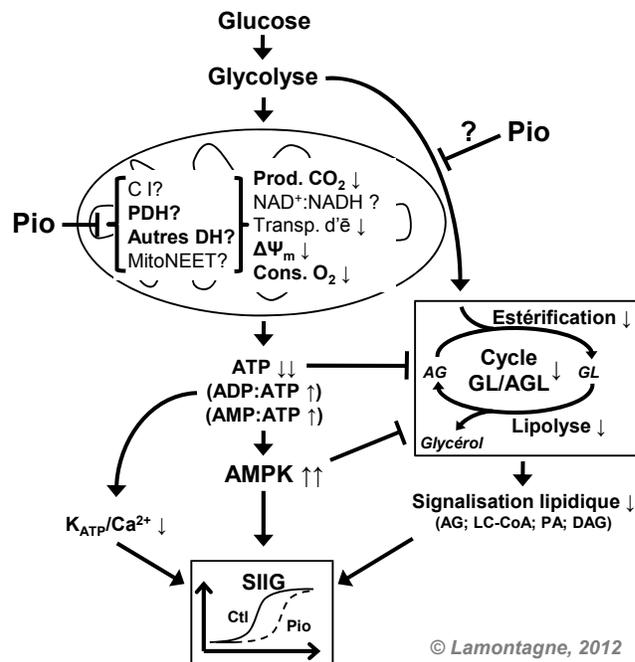
notre système, et en particulier l'activité pyruvate déshydrogénase, elle diminue directement la production de CO_2 et augmente le ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$. L'augmentation du ratio $\text{NAD}^+:\text{NADH}$ par la pioglitazone active les sirtuines, alors que la metformine, qui cause une diminution de ce ratio, les inhibe. Ces différences, si elles se vérifient, devraient s'accompagner d'un profil d'acétylation différent pour les deux traitements (davantage de protéines acétylées lors d'un traitement à la metformine). Plusieurs déshydrogénases mitochondriales du cycle de Krebs (ce n'est pas le cas du complexe pyruvate déshydrogénase) font partie d'une voie métabolique qui est commune à l'oxydation complète du glucose et à celle des acides gras (Nelson, Cox et Lehninger 2008). La production de CO_2 à partir des deux substrats est donc diminuée dans les conditions où ces substrats sont utilisés comme principale source de carburant (l'oxydation du glucose est inhibée en présence de fortes concentrations de glucose et l'oxydation du palmitate est inhibée en présence de faibles concentrations de glucose) (article 1 à la section 5.2, figures 2A et 4D pour la pioglitazone et **figure S2** pour la metformine).

La diminution du potentiel de membrane mitochondrial provoque une diminution de la synthèse d'ATP (qui utilise le gradient de protons (Nicholls et Ferguson 2002)) (article 1 à la section 5.2, figure 2C) et entraîne une augmentation des ratios AMP:ATP et ADP:ATP. Il y a ainsi moins d'énergie disponible dans la cellule. La diminution de l'énergie disponible, principalement le ratio ADP:ATP, active l'AMPK. En présence de metformine, la diminution de l'énergie disponible n'est pas suffisante pour inhiber les voies anaboliques des lipides et le cycle GL/AGL n'est pas affecté (**figure S5B**). Par contre en présence de pioglitazone, la diminution de l'énergie disponible est plus importante et inhibe l'incorporation des acides gras à des glycérolipides (article 1 à la section 5.2, figure 4). L'augmentation de l'activité AMPK diminue également cette voie en inhibant l'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransférase. La diminution de la libération de glycérol (article 1 à la section 5.2, figure 5A), qui provient de l'activité lipolytique, est une conséquence de l'inhibition de la synthèse de glycérolipides puisque ces deux mécanismes sont liés par le cycle GL/AGL.

La diminution de l'énergie disponible, plus particulièrement l'augmentation du ratio ADP:ATP, nuit à la sécrétion d'insuline induite par le glucose en empêchant

le déclenchement de la sécrétion d'insuline. En présence de pioglitazone, le cycle GL/AGL est inhibé, ce qui réduit la production de molécules de signalisation lipidique qui pourraient autrement amplifier la sécrétion d'insuline. Cette chaîne d'événements se manifeste lorsque la concentration de glucose est modérée. Lorsque les cellules font face à une concentration élevée de glucose, le métabolisme oxydatif est assez important pour permettre le rétablissement du potentiel de membrane mitochondrial et la production d'énergie nécessaire à une sécrétion d'insuline normale.

A PIOGLITAZONE



Ghani 2011). L'utilisation de la metformine (Kitabchi et coll. 2005; Kahn et coll. 2006) ou d'un TZD (Cavaghan et coll. 1997; Buchanan et coll. 2000; Buchanan et coll. 2002; Kahn et coll. 2006; Xiang et coll. 2006; Gastaldelli et coll. 2007) pourraient avoir des effets protecteurs sur la fonction des cellules β dans un contexte de stress métabolique. Les bienfaits sur la fonction β pancréatique d'une pause de la sécrétion d'insuline à l'aide d'agents qui la bloquent ont été évoqués à la section 3.1. La **figure 9** présente trois autres interventions, réelles ou hypothétiques, qui diminuent la sécrétion d'insuline induite par le glucose et pourraient protéger la fonction β pancréatique de la surabondance de nutriments. Les effets de ces interventions sur la courbe de sécrétion d'insuline induite par le glucose et sur la production et l'accumulation de métabolites potentiellement toxiques y sont schématisés et sont discutés dans les prochains paragraphes.

La restriction calorique

La **figure 9B** décrit les effets de la restriction calorique. Il s'agit d'une approche thérapeutique éprouvée pour améliorer rapidement le contrôle glycémique, la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline chez des patients obèses et atteints de DT2 (Day et Bailey 2012). La diminution de l'insulinémie en est une de ses caractéristiques (Ingram et coll. 2006). Dans une étude effectuée chez des patients diabétiques et obèses, 7 jours d'une diète très faible en calories (400 kcal par jour) ont été suffisants pour améliorer la fonction des cellules β et de plusieurs autres paramètres métaboliques, et ce, avant que la sensibilité à l'insuline soit améliorée (Malandrucco et coll. 2012). En fait, cette diète extrême diminue forcément la sécrétion d'insuline et pourrait avoir les mêmes effets que ceux obtenus de façon pharmacologique avec du diazoxide, de la somatostatine ou des agonistes inverses du récepteur CB1 (voir section 3.1) (Greenwood, Mahler et Hales 1976; Laedtke et coll. 2000; Lynch et coll. 2011). Rappelons qu'un traitement avec l'une ou l'autre de ces molécules inhibe la sécrétion d'insuline et améliore le contrôle glycémique chez des individus atteints de DT2 ou des animaux utilisés comme modèle pour le DT2 (Greenwood, Mahler et Hales 1976; Laedtke et coll. 2000; Lynch et coll. 2011). La restriction calorique est donc une intervention très efficace, mais elle est difficile à appliquer étant donné le sacrifice important qu'elle exige sur la qualité de vie.

La restriction énergétique

La deuxième intervention, présentée à la **figure 9C**, est celle hypothétique où un agent pharmacologique diminue l'énergie intracellulaire disponible (phénomène aussi appelé restriction énergétique) peu importe la quantité de nutriments à laquelle la cellule β est exposée. Parmi les articles les plus récents concernant le mécanisme d'action de la metformine, on en retrouve quelques-uns qui ramènent les bienfaits du médicament sur l'homéostasie glucidique à la diminution de l'énergie disponible dans les hépatocytes (Foretz et coll. 2010; Stephenne et coll. 2011; Viollet et coll. 2012). La restriction énergétique a également été proposée comme mode d'action alternatif des TZDs (Wei, Kulp et Chen 2010). Il y a d'ailleurs clairement un intérêt ces dernières années pour l'identification d'agents capables de provoquer une restriction énergétique à l'échelle cellulaire, ou plus précisément qui reproduisent les effets de la restriction calorique (Ingram et coll. 2006; Lebel et coll. 2012). Ces composés intéressent les diabétologues, mais ont leur pertinence dans plusieurs autres domaines dont le traitement du cancer (Dhahbi et coll. 2005; Wei, Kulp et Chen 2010), la prévention des dommages de l'ischémie-reperfusion (Gohil et coll. 2010) ou l'augmentation de l'espérance de vie (Dhahbi et coll. 2005). Les études ou revues que nous avons consultées qui traitent de la restriction énergétique ou des agents qui tentent de reproduire les effets de la restriction calorique ne mentionnent pas de profil particulier d'inhibition selon la concentration des nutriments disponibles. Cette revue de la littérature n'a pas été exhaustive, mais il faut admettre que les études *in vitro* de composés pharmacologiques, effectuées sur des modèles cellulaires, testent généralement différentes concentrations d'un composé durant différents temps d'incubation et se soucient peu des différents états énergétiques du modèle. Hypothétiquement, la restriction énergétique devrait empêcher une sécrétion d'insuline importante, peu importe la quantité de glucose, étant donnée l'absence de quantités suffisantes de molécules de signalisation (**figure 9C**).

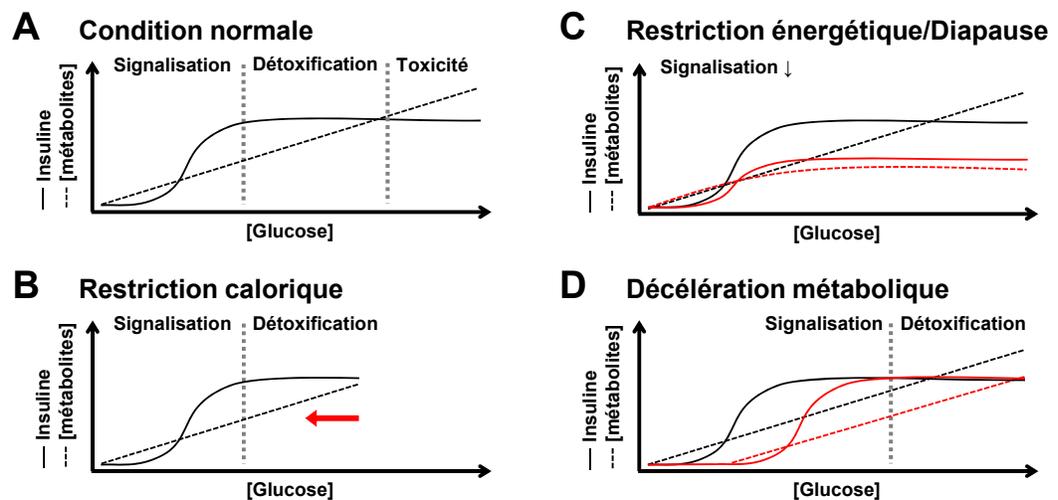
La diapause métabolique

La diapause, pause métabolique ou encore dépression du métabolisme (traduction libre de *metabolic rate depression*) est un mécanisme de protection qui permet à un organisme ou à une cellule de ralentir, voire d'arrêter son métabolisme dans des conditions qui mettent sa survie en danger (Storey et Storey 2007). Les cellules β (INS 832/13) peuvent se mettre dans un état de diapause métabolique *in*

in vitro si l'expression du facteur de transcription Foxo1 est fortement augmentée (Buteau et coll. 2007). Avec des cellules INS 832/13, cet état a entre autres été caractérisé par une diminution du métabolisme du glucose à 16 mmol/L glucose (une concentration élevée pour ces cellules) et une absence totale de sécrétion d'insuline induite par le glucose (Buteau et coll. 2007). La diapause métabolique s'apparente ainsi à la restriction énergétique (**figure 9C**).

La décélération métabolique

Le concept de décélération métabolique a été proposé dans le premier article présenté dans cette thèse pour décrire les effets inhibiteurs de la pioglitazone sur le métabolisme des cellules β et la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Ce nouveau concept d'inhibition comprend les trois éléments suivants : 1) l'absence d'effet lorsque la concentration de substrat est faible; 2) l'inhibition du métabolisme en présence de concentrations sous maximales de substrat et 3) la levée de l'inhibition lorsque la concentration de substrat est élevée (**figure 9D**). Il s'agit d'un type particulier de restriction énergétique, où la diminution de l'énergie intracellulaire est transitoire et peut être rétablie en fonction de la quantité de substrat disponible. La décélération métabolique tire probablement sa source d'une inhibition douce et réversible du métabolisme mitochondrial.



© Lamontagne, 2012

Figure 9 – Schéma des effets de différentes interventions qui modifient l'énergie intracellulaire disponible sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose et l'accumulation de métabolites dans la cellule β . A, Courbe normale de sécrétion

d'insuline induite par le glucose et accumulation hypothétique* des métabolites dans la cellule β . B, Effet de la restriction calorique sur les courbes de sécrétion d'insuline et d'accumulation des métabolites : la concentration de glucose n'atteint pas le seuil où des métabolites toxiques s'accumulent. C, Effets théoriques de la restriction énergétique et de la diapause métabolique sur le métabolisme : l'apparition des métabolites est limitée à toutes les concentrations de glucose. Il n'y a pas d'accumulation toxique de métabolites, mais leur concentration est insuffisante pour la signalisation. D, Effet de la décélération métabolique : il y a un déplacement vers la droite de la sensibilité au glucose. La concentration minimale de glucose nécessaire pour signaler la sécrétion d'insuline est augmentée, mais la cellule est protégée contre l'accumulation toxique de métabolites.

*À noter que l'allure linéaire de la courbe de l'accumulation des métabolites ne sert qu'à simplifier le concept. Plusieurs allures sont envisageables pour ces courbes en fonction des métabolites et des nutriments présents.

Origine de la levée de l'inhibition de la décélération métabolique à haute concentration de glucose

Parmi les paramètres métaboliques que nous avons mesurés, la grande majorité de ceux que les agents insulinosensibilisateurs inhibent sont rétablis en présence de concentrations élevées de glucose. Quel mécanisme permet de lever l'inhibition? La ou les cibles inhibées pourraient être contournées par d'autres voies ou alors il pourrait s'agir d'un effet de masse des substrats enzymatiques due à l'augmentation de leur concentration. C'est-à-dire que la probabilité que l'enzyme inhibée utilise son substrat augmente avec l'augmentation de la concentration du substrat, jusqu'à l'atteinte de la vitesse maximale de la réaction permise dans le contexte (Nelson, Cox et Lehninger 2008). À ce sujet, le modèle de la décélération métabolique, comme il apparaît pour l'inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose en présence de pioglitazone, ressemble à une inhibition enzymatique de type compétitive, où l'affinité apparente d'une enzyme pour son substrat (K_M') est diminuée sans que la vitesse maximale de la réaction soit affectée par l'inhibiteur. Cette ressemblance pourrait être exploitée pour identifier la cible directe de la pioglitazone : le médicament provoque peut-être l'inhibition compétitive de l'activité d'une des cibles envisagées (complexe I de la chaîne de transport d'électrons, pyruvate déshydrogénase ou autre activité déshydrogénase)?

La voie inhibée pourrait aussi être simplement contournée. L'explication est plausible pour l'inhibition du complexe I par la metformine, puisque les électrons qui

permettent d'établir le gradient de protons n'ont pas à rejoindre la chaîne de transport en passant nécessairement par les complexes I ou II (le complexe II fait partie des enzymes du cycle de Krebs (Nelson, Cox et Lehninger 2008)). Ainsi, le potentiel de membrane mitochondrial pourrait être rétabli sans que l'activité du cycle de Krebs et la production de CO₂ ne soient totalement normalisées, comme nous l'avons observé en présence de metformine. En effet, deux flavoprotéines transfèrent des électrons directement à l'ubiquinone sans passer par les complexes I ou II : il s'agit de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (impliquée dans la navette glycérol-3-phosphate) et de l'oxidoréductase ETF-ubiquinone (ETF : *electron-transferring flavoprotein*), qui reçoit des électrons de nombreuses déshydrogénases, dont certaines impliquées dans le catabolisme des acides aminés et des acides gras (Nicholls et Ferguson 2002; Nelson, Cox et Lehninger 2008). Les électrons transférés à l'ubiquinone par ces flavoprotéines et par les complexes I et II continuent leur parcours le long de la chaîne de transport et permettent le déplacement de protons aux complexes III et IV (Nicholls et Ferguson 2002). Ainsi, le rétablissement de l'énergie intracellulaire en présence de concentrations élevées de glucose pourrait se faire en partie grâce à la navette glycérol-3-phosphate. Selon cette hypothèse, l'inhibition du complexe I par la metformine entraîne une diminution du ratio NAD⁺:NADH cytosolique, une inhibition de la glycolyse à l'étape de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une accumulation des intermédiaires qui précèdent et une redirection des carbones vers le glycérol-3-phosphate et la navette glycérol-3-phosphate. Cela dit, il est peu probable que le catabolisme des acides aminés et des acides gras soit impliqué dans la levée de l'inhibition de la décélération métabolique en présence de fortes concentrations de glucose, ne serait-ce que parce que les milieux de culture utilisés pour réaliser les expériences n'en contenaient généralement pas.

9.2. Limites de l'application du concept de la décélération métabolique

Le concept de la décélération métabolique a été établi à partir d'observations obtenues *in vitro*, dans des conditions aiguës et statiques (les milieux expérimentaux ne sont pas renouvelés durant les temps d'incubation), principalement avec une lignée

immortalisée de cellules β de rat traitées avec différentes concentrations de glucose. Il n'est pas certain que le concept puisse être généralisé à d'autres types cellulaires, aux effets des autres nutriments sur le métabolisme et aux effets *in vivo* des médicaments insulinosensibilisateurs utilisés quotidiennement. La section qui suit présente ces limites.

Le concept est-il spécifique à certains types cellulaires?

En ne considérant que l'inhibition du métabolisme mitochondrial, probablement à la base de nos observations, la plupart des types cellulaires peuvent être affectées par un traitement aigu aux agents insulinosensibilisateurs. Toutefois, ils ne seront probablement pas affectés selon le patron de la décélération métabolique. Les adipocytes, les myocytes et les cardiomyocytes n'expriment pas le couple GLUT2-glucokinase et surtout, n'utilisent pas le glucose de la même façon que les hépatocytes ou que les cellules β . Les effets aigus des agents insulinosensibilisateurs sur le métabolisme de ces types cellulaires n'en demeurent pas moins dignes d'intérêt dans un contexte diabétique et sont discutés à la section 9.4.

Les cellules β , les hépatocytes, les cellules qui détectent le glucose dans la veine porte et dans l'hypothalamus (Thorens 2001) expriment toutes la protéine GLUT2 et probablement toutes le couple GLUT2-glucokinase (Lynch et coll. 2000; Roncero et coll. 2000) qui permet une modulation du flux glycolytique sur une large gamme de concentrations de glucose. Étant donnée la concentration élevée de glucose requise pour lever l'inhibition des agents insulinosensibilisateurs sur certains paramètres mesurés, il n'est ainsi pas évident que la décélération du métabolisme glucidique puisse s'observer avec d'autres types cellulaires. Le cas des hépatocytes est particulièrement intéressant. La décélération métabolique pourrait expliquer, au-delà de l'expression du transporteur OCT1, pourquoi la metformine agit principalement sur la production hépatique de glucose. D'ailleurs, l'importance du transporteur OCT1 dans l'accumulation hépatique et les effets systémiques de la metformine a tout récemment été mise en doute (Higgins, Bedwell et Zamek-Gliszczyński 2012).

Le concept est-il spécifique au métabolisme du glucose?

Dans la définition que nous proposons, le terme général « substrat » est utilisé, mais nous n'avons pas encore tenté de déterminer si le concept de décélération

métabolique s'applique à d'autres carburants cellulaires que le glucose (acides aminés, acides gras et corps cétoniques). Pour étudier cette possibilité, il faudra déterminer les effets des agents insulinosensibilisateurs sur des courbes dose réponse établies avec différents substrats, comme des acides gras et certains acides aminés sécrétagogues (principalement le duo d'acides aminés glutamine-leucine, l'alanine et l'acide cétoisocaproïque). Pour que le métabolisme d'un substrat puisse être « décéléré », il faudrait que son transport à l'intérieur de la cellule et son métabolisme soient possibles sur une large gamme de concentrations, permettant un effet de masse ou l'utilisation d'une voie de contournement moins efficace.

Il est possible d'élaborer à ce sujet sur le cas des acides aminés sécrétagogues. La sécrétion d'insuline induite par l'alanine et le duo glutamine-leucine dépend en bonne partie de leur métabolisme mitochondrial et de leur capacité à augmenter le ratio ATP:ADP (Newsholme et coll. 2005). Il est ainsi fort probable que les agents insulinosensibilisateurs, en ralentissant le métabolisme mitochondrial, inhibent également l'effet de ces acides aminés sur la sécrétion d'insuline. Dans le cas de l'alanine, cette inhibition pourrait suivre le patron de la décélération métabolique puisque 1) le K_M pour le transport de l'alanine à l'intérieur des îlots de rats est environ dix fois plus élevé que sa concentration plasmatique (Prentki et Renold 1983), offrant une marge de manœuvre à la levée d'une éventuelle inhibition par effet de masse, 2) les cellules β sont en mesure d'en consommer de grandes quantités (Dixon et coll. 2003) et 3) l'alanine est directement transaminée en pyruvate, utilisable dans les mitochondries pour produire de l'ATP (Nelson, Cox et Lehninger 2008).

Nous avons noté dans le premier article que la pioglitazone est sans effet sur l'amplification par les acides gras de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (section 5.2, figure 1C). Le résultat peut s'expliquer par le fait que l'effet amplificateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline provient en partie à leur métabolisme et en partie à l'activation de récepteurs membranaires (Latour et coll. 2007). Les conséquences négatives d'un ralentissement du métabolisme lipidique sur l'amplification de la sécrétion d'insuline sont peut-être trop faibles pour être mesurées. Néanmoins, ces expériences ont été réalisées en n'utilisant qu'une seule concentration de palmitate. Est-ce que l'inhibition du métabolisme lipidique par la

pioglitazone, observée en présence de concentrations de glucose faibles (dans le cas de la β -oxydation (et observée aussi en présence de metformine)) ou intermédiaires (estérification), pourrait dépendre de la concentration de palmitate utilisée? Autrement dit, est-il possible qu'une concentration élevée de palmitate puisse contrecarrer une inhibition du métabolisme lipidique provoquée par les agents insulinosensibilisateurs?

Il sera intéressant d'étudier ces questions puisque la disponibilité des différents substrats *in vivo* modifie sans aucun doute les effets des médicaments sur le métabolisme énergétique et la fonction des cellules β . Une inhibition pharmacologique de type « décélération métabolique » pourrait ainsi n'être observable *in vivo* que dans certains contextes nutritionnels (concentration intermédiaire de glucose, peu d'acides gras et peu d'acides aminés par exemple).

L'effet des agents insulinosensibilisateurs dépend-il de l'état nutritionnel?

Si la décélération métabolique de la cellule β devait jouer un rôle clé dans les effets thérapeutiques de la pioglitazone et de la metformine, il faudrait tenir compte de l'état nutritionnel lors de la prise des médicaments. Dans l'état postprandial, les patients résistants à l'insuline et intolérants au glucose ont une glycémie élevée, qui risque d'empêcher en partie la plupart des effets des médicaments sur le métabolisme et sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Pour bénéficier de façon optimale des effets d'une réduction de la sécrétion d'insuline et d'une augmentation de l'activité de l'AMPK dans les cellules β , il faudrait que les agents insulinosensibilisateurs soient administrés de façon à ce que leur concentration circulante soit importante lorsque la glycémie n'est pas à son maximum, par exemple à la fin de la période postprandiale le soir. Les médicaments insulinosensibilisateurs sont-ils plus efficaces lorsque pris le soir, après les repas? Aucune recommandation n'est faite quant aux conditions à privilégier pour prendre un comprimé de pioglitazone (Takeda 2004). Quant à la metformine, la dose quotidienne est généralement divisée en deux ou trois administrations dû aux fortes quantités nécessaires pour observer des bénéfices, et avec les repas, de façon à réduire ses effets secondaires sur le système digestif, particulièrement importants au début d'une thérapie (Bailey et Krentz 2010). Si les médicaments insulinosensibilisateurs devaient

être utilisés le soir, de façon à diminuer l'hyperinsulinémie postprandiale, il faudrait surveiller la glycémie des patients afin de s'assurer qu'elle n'augmente pas trop.

La décélération métabolique durant un traitement chronique

Les effets aigus observés pour les médicaments insulinosensibilisateurs s'observent-ils après chaque administration lors d'un traitement quotidien ou s'agit-il seulement d'un effet ponctuel, observable chez des sujets naïfs au médicament? La question n'a pas du tout été abordée dans nos travaux. Une possibilité développée à la section 9.4 est qu'une partie des bienfaits de ces médicaments provienne d'une adaptation de l'organisme à la décélération métabolique; une adaptation à l'inhibition répétée du métabolisme mitochondriale et à la diminution de l'énergie disponible dans les cellules. La diminution de l'énergie disponible provoquée pharmacologiquement pourrait peut-être se comparer à une séance d'entraînement physique, lorsque la quantité d'énergie disponible chute, au moins dans les muscles et le cœur.

9.3. Bénéfices de la décélération métabolique pour la cellule β

Quels sont les avantages à l'échelle cellulaire d'un ralentissement du métabolisme? De par sa fonction, la cellule β est en mesure de métaboliser d'importantes concentrations de nutriments de façon à adapter la sécrétion d'insuline aux besoins de l'organisme (Nolan et Prentki 2008). Les voies impliquées dans le métabolisme des nutriments produisent des métabolites qui servent de signaux pour déclencher ou moduler la sécrétion d'insuline. Les mêmes voies génèrent toutefois des métabolites potentiellement dommageables pour la cellule, comme le peroxyde d'hydrogène (Sakai et coll. 2003) ou les céramides (Lang, Ullrich et Gulbins 2011). Au laboratoire, nous avons ainsi émis l'hypothèse selon laquelle la cellule β possède des mécanismes de détoxification, auxquels participe le cycle GL/AGL, qui lui permettent de gérer sans danger une grande quantité de nutriments (Prentki et Madiraju 2012). Ainsi, le cycle GL/AGL permet non seulement de générer des molécules de signalisation lipidique, mais il facilite en plus la gestion des nutriments. Le cycle GL/AGL y parvient notamment en consommant de l'énergie par un cycle futile d'estérification et d'hydrolyse d'acides gras et en libérant du glycérol provenant de la glycolyse (Prentki et Madiraju 2012). En présence de concentrations très élevées

de nutriments, de façon chronique, certains métabolites peuvent modifier les activités cellulaires ou devenir toxiques en s'accumulant ou en causant des dommages qui dépassent les capacités de détoxification de la cellule β . De plus, les réactions enzymatiques génèrent des métabolites aberrants qui sont normalement éliminés par des enzymes dédiées (Van Schaftingen, Rzem et Veiga-da-Cunha 2009; Linster et coll. 2011). La métabolisation d'une quantité importante de nutriments favorise sans doute l'accumulation de métabolites erronés potentiellement toxiques.

Il y a donc trois stades de gestion des métabolites qui se dessinent selon la concentration de nutriments à laquelle fait face la cellule β (**figure 9A**). Au premier stade, le métabolisme des nutriments génère des molécules de signalisation qui stimulent la sécrétion d'insuline. Au second stade, les concentrations de nutriments ne stimulent pas d'avantage la sécrétion d'insuline, mais les métabolites intracellulaires produits sont gérés grâce à des mécanismes de détoxification. Au troisième stade, les concentrations de nutriments sont trop élevées pour les capacités cellulaires de gestion des métabolites et des effets toxiques apparaissent. On retrouve à la **figure 9** une tentative de schématisation de ces différents stades de gestion des nutriments ainsi que des effets des interventions mentionnées sur ces stades.

En présence d'un composé pharmacologique qui provoque la décélération métabolique (**figure 9D**), la courbe dose réponse pour la sécrétion d'insuline est déplacée vers la droite et c'est probablement aussi le cas pour celle de l'accumulation des métabolites (peu importe l'allure de cette courbe). Il faut ainsi des concentrations plus importantes de glucose pour induire la sécrétion d'insuline, mais en revanche la cellule β peut faire face à des concentrations plus importantes de nutriments avant d'en subir la toxicité, notamment celle liée aux dérivés réactifs de l'oxygène (voir plus bas).

Concrètement, quels peuvent être les bénéfices de la décélération métabolique sur la cellule β ? Dans le cas de la pioglitazone, les changements à la répartition des lipides, en particulier la diminution de l'estérification du palmitate, pourrait avoir un effet positif dans la prévention des dommages liés à la glucolipotoxicité. Nous n'avons pas mesuré les effets de la pioglitazone sur la survie des cellules INS 832/13 en conditions glucolipotoxiques. La metformine (0,5 mmol/L, 24h) protège toutefois ces cellules de l'apoptose lorsqu'elles sont cultivées en présence de concentrations

élevées de glucose et de palmitate (El-Assaad et coll. 2003). Lorsque prolongée sur 24 heures, l'exposition des cellules à la metformine parvient probablement à modifier la répartition lipidique.

Effets sur le stress oxydatif

La détérioration de la fonction β pancréatique dans un contexte diabétique a été associée par plusieurs aux effets nocifs du stress oxydatif (Brownlee 2003; Robertson 2004). L'utilisation d'agents antidiabétiques capables d'atténuer ce stress est ainsi d'un grand intérêt. Selon le dogme qui prévaut, un ralentissement du métabolisme mitochondrial devrait diminuer la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène. Le traitement de modèles animaux de DT2 avec de la pioglitazone atténue effectivement les marqueurs de stress oxydatif dans les îlots (Ishida et coll. 2004; Kanda et coll. 2010). Un traitement *in vitro* à la metformine parvient aussi à diminuer certains marqueurs de stress oxydatif dans des îlots humains de donneurs atteints de DT2 (Marchetti et coll. 2004). Il est tentant d'y voir les bienfaits de la décélération métabolique sur la surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène dans les cellules β . Dans les conditions expérimentales que nous utilisons, l'augmentation de la concentration de glucose (qui stimule le métabolisme mitochondrial) diminue toutefois la détection de dérivés réactifs de l'oxygène. La situation serait peut-être différente si nous utilisions des îlots provenant d'un modèle animal de diabète, qui font face à une hyperglycémie chronique. D'ailleurs, dans l'étude de Kanda et coll. citée plus haut, lorsque des souris saines sont traitées avec de la pioglitazone, aucun changement n'est observé dans les marqueurs de stress oxydatif (Kanda et coll. 2010).

Effets sur le stress au réticulum endoplasmique

En conditions de surabondance de nutriments et d'hypersécrétion d'insuline, une importante pression est mise sur la machinerie de maturation des protéines des cellules β . L'homéostasie du réticulum endoplasmique devient alors fragile et des protéines défectueuses, mal repliées, risquent de s'accumuler et d'activer une réponse cellulaire qui peut mener à l'apoptose (Fonseca, Gromada et Urano 2011). Les agents insulinosensibilisateurs devraient diminuer ce stress sur le réticulum endoplasmique des cellules β puisqu'ils sont en mesure d'inhiber la sécrétion d'insuline induite par le

glucose et d'activer l'AMPK, dont la voie de signalisation freine la synthèse protéique (Hardie 2011).

Deux études effectuées chez des rongeurs viennent soutenir cette possibilité dans le cas d'un traitement avec un TZD. Dans un modèle de souris susceptibles au stress au réticulum endoplasmique (souris *WFS1*^{-/-} et porteuse d'un allèle *agouti*), un traitement à la pioglitazone protège la structure du réticulum endoplasmique des cellules β , prévient la perte de la masse des cellules β et le déclenchement du diabète (Akiyama et coll. 2009). Les îlots de rats qui reçoivent de la cyclosporine A sont eux aussi soumis à un stress important au réticulum endoplasmique qui est corrigé par un traitement à la rosiglitazone, avec des conséquences positives sur la masse des cellules β et la tolérance au glucose des animaux (Kim et coll. 2009). Ajoutons que des effets bénéfiques relatifs au stress au réticulum endoplasmique ont également été observés dans le foie de souris soumises à une diète riche en saccharose et en gras, mais traitées à la pioglitazone (Yoshiuchi et coll. 2009). Quant à la metformine, elle prévient l'apoptose de cellules β en culture (cellules NIT-1) traitées avec de la thapsigargine, un composé utilisé pour induire un stress au réticulum endoplasmique (Jung et coll. 2012).

Activation de l'AMPK

Il est envisageable que l'activation de l'AMPK ait un rôle à jouer dans les effets protecteurs des agents insulinosensibilisateurs sur la cellule β dans un contexte de stress métabolique. L'activation de l'AMPK dans la cellule β est un effet qui est partagé par de nombreuses molécules ou interventions associées à une amélioration du contrôle glycémique et à une diminution de l'insulinémie. La pioglitazone (section 5.2, figure 3A), la metformine (Leclerc et coll. 2004), l'adiponectine (Lee et coll. 2011) et l'exercice (Calegari et coll. 2011) parviennent à activer l'AMPK dans la cellule β . Ajoutons néanmoins que la protection des cellules β par ces différentes approches pourrait simplement provenir d'une diminution de la sécrétion d'insuline puisqu'elle a été observée dans tous les cas mentionnés (à l'exception de l'adiponectine), en plus d'être présente durant la restriction calorique et provoquée par la leptine (Ingram et coll. 2006; Calegari et coll. 2011; Lee et coll. 2011). D'ailleurs, la possibilité d'un rôle protecteur pour l'activation de l'AMPK dans les cellules β a été sérieusement mise en doute par Guy Rutter dans une revue de

la littérature publiée en 2009 (Rutter et Leclerc 2009). À l'échelle de l'organisme toutefois, la situation pourrait être différente. La section suivante explique pourquoi.

9.4. Bénéfices de la décélération métabolique pour l'organisme

Notre étude des effets aigus de la pioglitazone ne permet pas encore de saisir l'étendue du phénomène de la décélération métabolique à l'échelle de l'organisme (voir section 9.2). Néanmoins, nos résultats de calorimétrie indirecte (diminution de la dépense énergétique (section 6.2, figure 3)) suggèrent fortement que l'inhibition du métabolisme mitochondrial ne se limite pas à la cellule β . Ainsi, plusieurs types cellulaires font sans doute face à une diminution de leur énergie intracellulaire disponible et à une activation de l'AMPK. L'activation de l'AMPK est d'ailleurs reconnue comme un effet aigu d'un traitement aux TZDs dans de nombreux types cellulaires *in vitro* et *in vivo* (Fryer, Parbu-Patel et Carling 2002; Saha et coll. 2004; LeBrasseur et coll. 2006). Elle est aussi partagée par de nombreuses molécules ou interventions associées à une amélioration de la sensibilité à l'insuline et à une diminution de l'insulinémie. C'est le cas lors d'un traitement avec des agents insulinosensibilisateurs, en présence des adipokines leptine et adiponectine, lors d'une restriction calorique et suite à un exercice physique (Ruderman et Prentki 2004). De plus, l'utilisation d'activateurs de l'AMPK est une approche thérapeutique envisagée pour traiter le syndrome métabolique et le DT2 (Ruderman et Prentki 2004; Cool et coll. 2006; Rutter et Leclerc 2009). La stratégie semble prometteuse à la lumière d'une étude parue en 2006, dans laquelle l'activation pharmacologique de l'AMPK durant cinq jours permettait de réduire la glycémie dans un modèle murin d'hyperglycémie chronique (souris *ob/ob*) (Cool et coll. 2006). De même, chez les rats *Zucker diabetic fatty*, qui développent spontanément le diabète, un traitement à l'AICAR ou un programme d'entraînement (interventions de huit semaines) retardent de façon identique l'apparition de l'hyperglycémie (Pold et coll. 2005). Dans ce modèle, le traitement à l'AICAR protège l'architecture et la fonction des îlots des rats traités (Pold et coll. 2005). Notre laboratoire a récemment confirmé les effets bénéfiques de l'exercice sur la fonction β -pancréatique et l'homéostasie du glucose de ce modèle animal sans toutefois mesurer l'activité de l'AMPK (Delghingaro-Augusto et coll. 2012).

Est-ce que les thiazolidinediones miment les effets de l'exercice?

Narkar et coll. ont publié en 2008 une étude qui suggérait la possibilité de reproduire pharmacologiquement une partie des bienfaits de l'exercice en activant l'AMPK et le récepteur nucléaire PPAR β . Dans leur article, ces chercheurs démontrent que l'activation de l'AMPK par l'AICAR, durant quatre semaines, améliore de façon importante l'endurance à l'effort de souris sédentaires (Narkar et coll. 2008). En outre, le traitement augmente le métabolisme oxydatif des nutriments (Narkar et coll. 2008). Certains résultats laissent croire que les TZDs pourraient également reproduire certains bienfaits de l'exercice. En effet, la consommation d'oxygène, indicatrice de l'oxydation des nutriments, est augmentée à l'effort chez des individus atteints de DT2 qui sont traités avec de la rosiglitazone durant 4 ou 6 mois (Regensteiner, Bauer et Reusch 2005; Kadoglou et coll. 2008). Du côté de la metformine, des expériences effectuées chez des individus sains font plutôt état d'une légère diminution de la consommation d'oxygène à l'effort après sept à neuf jours de traitement (Braun et coll. 2008) ou encore d'une absence d'effet trois heures après l'administration d'une dose unique (Johnson et coll. 2008). En inhibant le métabolisme mitochondrial (déficit temporaire en ATP) et en activant l'AMPK, les TZDs pourraient stimuler une réponse adaptative dans les muscles squelettiques qui évoque certains aspects de l'entraînement.

Un traitement à la pioglitazone (Mudaliar et Henry 2008) et l'entraînement physique (Novelli et coll. 2004; Lamontagne et coll. 2007) ont également en commun de réduire les concentrations circulantes d'acides gras libres et de triacylglycérol. La diminution des acides gras libres et du triacylglycérol en circulation diminue la pression sur la sécrétion d'insuline et diminue le stress lipotoxique sur les cellules β (Higa et coll. 1999; McGarry 2002; Prentki et coll. 2002).

La décélération métabolique et les hépatocytes

La décélération métabolique pourrait-elle avoir des bénéfices directs sur les principaux organes sensibles à l'insuline et qui participent à l'homéostasie glucidique? La dernière théorie concernant l'origine des bienfaits de la metformine sur l'homéostasie glucidique dans un contexte diabétique explique que le médicament freine la production hépatique de glucose (qui n'est plus régulée par l'insuline) en diminuant l'énergie disponible dans les hépatocytes (Foretz et coll. 2010; Stephenne

et coll. 2011; Viollet et coll. 2012). Il pourrait très bien s'agir d'une manifestation de la décélération métabolique. De même, la diminution de la production hépatique de glucose lors d'une thérapie aux TZDs (Mudaliar et Henry 2008), qui se mesure malgré une diminution de l'insulinémie, pourrait faire intervenir une inhibition mitochondriale et la décélération métabolique.

La décélération métabolique et les myocytes

Un changement dans la répartition lipidique qui inclut une diminution de l'anabolisme lipidique présente également un intérêt dans les myocytes, puisque l'accumulation de lipides y est associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Morino, Petersen et Shulman 2006). La diminution des dépôts ectopiques de lipides est un mécanisme d'action majeur proposé pour expliquer l'effet insulinosensibilisateur des TZDs (Ye et coll. 2004). Alors que cet effet a été attribué à l'activation de PPAR γ dans les tissus adipeux, il pourrait bien provenir d'une diminution de l'estérification des lipides liée à l'inhibition du métabolisme mitochondrial. Dans le cas des muscles, cette inhibition pourrait être de type « restriction énergétique », comme présentée schématiquement à la **figure 9C**. La décélération métabolique y demeure toutefois envisageable, mais provoquée indirectement par les variations d'insulinémie qui suivent les effets des agents insulinosensibilisateurs sur la cellule β . En effet, si le patron de la décélération métabolique s'observe *in vivo* pour l'insulinémie, il pourrait se traduire dans les myocytes par une inhibition du transport du glucose suivant la même tendance.

L'activation de l'AMPK dans les muscles offre également un intérêt particulier étant donné que la kinase pourrait servir de médiateur entre la diminution de l'énergie disponible et une réponse adaptative qui rappelle les effets de l'exercice physique (voir plus haut). Par contre, il n'est pas clair que l'augmentation de la β -oxydation (qui devrait suivre l'activation de l'AMPK) augmente la sensibilité à l'insuline dans les muscles et le cœur (Zhang et coll. 2010). L'augmentation de la β -oxydation dans un contexte de surabondance de nutriments risque plutôt de favoriser l'oxydation incomplète des acides gras, un phénomène qui a été associé à une diminution de la sensibilité à l'insuline (Koves et coll. 2008). De plus, l'inhibition du métabolisme mitochondrial devrait participer à une diminution de l'oxydation complète des acides gras en CO₂. Ainsi, les répercussions du ralentissement du

métabolisme mitochondrial par la pioglitazone, comme elles s'observent dans la cellule β , sont incertaines dans les muscles : la pioglitazone pourrait y favoriser l'oxydation incomplète des acides gras (néfaste pour la sensibilité à l'insuline), tout en diminuant leur estérification et leur accumulation (bénéfiques).

La décélération métabolique et le tissu adipeux

L'inhibition du métabolisme mitochondrial et la diminution de l'insulinémie devraient freiner l'anabolisme lipidique des adipocytes. Pourtant, les patients qui utilisent des TZDs stockent d'avantage de lipides et prennent du poids (Mudaliar et Henry 2008). À long terme, les conséquences de l'activation de PPAR γ dans les tissus adipeux sont probablement plus importantes que celle de l'inhibition douce du métabolisme mitochondrial et de la diminution de l'insulinémie. Cela dit, les adipocytes ne sont pas les seules cibles d'intérêt pour les agents insulinosensibilisateurs dans les tissus adipeux. Les cellules du système immunitaire qui y résident représentent aussi une cible intéressante puisqu'ils participent à la création d'un état inflammatoire qui nuit à la sensibilité à l'insuline (Donath et Shoelson 2011). Un lien a été proposé entre l'activation du récepteur PPAR γ dans les macrophages et une diminution de l'inflammation et de la résistance à l'insuline non seulement dans les tissus adipeux, mais également dans les muscles et le foie (Hevener et coll. 2007). Un ralentissement de l'activité métabolique des macrophages par la metformine et les TZDs pourrait participer à ces effets.

Ajoutons que l'hypoxie a été proposée comme élément déclencheur de la réponse inflammatoire dans les tissus adipeux en expansion (Pasarica et coll. 2009). Diminuer l'hypoxie dans des masses cellulaires qui prolifèrent semble une tâche idéale pour des médicaments qui ralentissent l'activité mitochondriale et la consommation d'oxygène. Et voilà un autre mécanisme par lequel les agents insulinosensibilisateurs pourraient protéger les îlots pancréatiques. En effet, les îlots prennent aussi de l'expansion dans un contexte de stress métabolique (Prentki et Nolan 2006), consomment beaucoup d'oxygène en présence de concentrations stimulantes de glucose (Sato et coll. 2011; Bensellam et coll. 2012) et sont infiltrés par des macrophages chez les patients atteints de DT2 (Ehse et coll. 2007).

La décélération métabolique et les cardiomyocytes

En période de stress métabolique, la résistance à l'insuline affecte aussi les cardiomyocytes (Gray et Kim 2011). Les cardiomyocytes résistants à l'insuline utilisent moins de glucose, oxydent d'avantage les acides gras et accumulent du triacylglycérol (Bugger et Abel 2010). L'altération du métabolisme énergétique s'accompagne d'une augmentation de la consommation d'oxygène et d'une diminution de l'efficacité du travail cardiaque (diminution du ratio travail cardiaque:oxygène consommé) (Bugger et Abel 2010). Les agents insulinosensibilisateurs pourraient offrir aux cardiomyocytes les mêmes bénéfices que ceux qui ont été proposés pour les myocytes.

Cependant, le fait de ralentir l'activité cardiaque n'est peut-être pas sans danger. Nous n'avons pas mesuré l'activité des cardiomyocytes après un traitement à la pioglitazone. Nos résultats de télémétrie indiquent toutefois qu'une seule administration de pioglitazone augmente significativement le rythme cardiaque des rats quelques heures après l'administration (section 6.2, figure S1). Y a-t-il un lien entre cet effet et une diminution de l'activité des cardiomyocytes; une compensation à l'échelle de l'organe à l'activité réduite de chacune des cellules? Quoi qu'il en soit, cet effort supplémentaire du muscle cardiaque pourrait s'avérer néfaste chez des individus obèses (Kenchiah et coll. 2002), résistants à l'insuline (Ingelsson et coll. 2005) ou atteints de DT2 (Giles et Sander 2004), car ces états ont tous été associés à une augmentation du risque d'insuffisance cardiaque. Il n'y a toutefois pas de consensus dans la littérature au sujet des effets des TZDs sur le rythme cardiaque, sinon qu'ils sont plutôt modestes (Shargorodsky et coll. 2003; Festuccia et coll. 2009).

9.5. Cibler l'hyperinsulinémie dans le traitement du diabète de type 2?

Le concept de la décélération métabolique de la cellule β implique que les agents insulinosensibilisateurs diminuent la sécrétion d'insuline induite par des concentrations intermédiaires de glucose. Nous avons pu confirmer *in vivo* la capacité de la pioglitazone à inhiber la sécrétion d'insuline chez le rat lors d'un traitement aigu et une diminution de l'insulinémie fait partie des effets à long terme des agents insulinosensibilisateurs chez les patients atteints de DT2 (Prigeon, Kahn et Porte

1998; Buchanan et coll. 2000; Kitabchi et coll. 2005; Bailey et Krentz 2010). Il a été question plus haut des possibles bienfaits d'une inhibition de la sécrétion d'insuline pour la cellule β et ces bienfaits se vérifient *in vivo* sur la fonction β pancréatique dans des expériences où la sécrétion d'insuline est réduite avec du diazoxide (Greenwood, Mahler et Hales 1976; Laedtke et coll. 2000; Lynch et coll. 2011). Cela dit, l'intérêt de directement réduire la sécrétion d'insuline comme approche thérapeutique pour le DT2 n'est pas une évidence. L'approche semble même contreproductive lorsqu'on considère le point de vue généralement accepté selon lequel la pathophysiologie du DT2 implique une sécrétion d'insuline insuffisante par rapport à la résistance à l'insuline de l'organisme.

Pour répondre à cette interrogation, il faut d'abord se rappeler que la caractéristique principale du modèle d'inhibition de la décélération métabolique est le rétablissement du métabolisme (et de la sécrétion d'insuline) lorsque les concentrations de glucose sont élevées, mais pas maximales. De plus, la capacité du palmitate à amplifier la sécrétion d'insuline n'est pas du tout affectée par les traitements à la pioglitazone (section 5.2, figure 1C). Or, les concentrations circulantes d'acides gras libres et triacylglycérol sont généralement élevées chez les patients obèses et contribuent à la compensation des cellules β (Nolan, Damm et Prentki 2011).

Ensuite, de nombreux faits soutiennent l'idée qu'il peut être pertinent de réduire directement l'insulinémie dans un contexte de stress métabolique. Ces faits doivent être considérés sous deux rapports, à savoir que 1) l'hyperinsulinémie représente une cause potentielle de résistance à l'insuline et d'obésité (Shanik et coll. 2008; Corkey 2012) et que 2) l'hypersécrétion chronique d'insuline peut entraîner l'« épuisement » de la cellule β (Aston-Mourney et coll. 2008; Andrikopoulos 2010) et la décompensation de la fonction β pancréatique dans le développement du DT2 (Prentki et Nolan 2006; Nolan, Damm et Prentki 2011). Premièrement, l'hyperinsulinémie à jeun est un facteur de risque dans le développement d'un défaut de tolérance au glucose, un état qui conduit souvent au DT2 (Dankner et coll. 2009). Deuxièmement, les hawaïens d'origine japonaise ont une insulinémie plus élevée que leurs concitoyens caucasiens et sont plus à risque de développer le DT2 (Nakanishi et coll. 2004). Troisièmement, les individus hétérozygotes pour une mutation du facteur

de transcription HNF-4 α (gène responsable de la forme monogénique de diabète MODY1) sont d'abord hyperinsulinémiques aux états foetal et nouveau-né. Ils développent un diabète de type MODY lié à une sécrétion d'insuline déficiente plus tard dans leur vie (Pearson et coll. 2007). Quatrièmement, les patients atteints d'insulinome présentent une résistance élevée à l'insuline. La résistance à l'insuline se corrige avec l'élimination de la tumeur (Pontiroli et coll. 1990; Skrha, Hilgertova et Justova 1993). Cinquièmement, l'induction expérimentale d'une hyperinsulinémie mène à la résistance à l'insuline dans de nombreux modèles animaux (Kobayashi et Olefsky 1978; Martin, Desai et Steiner 1983; Marban, DeLoia et Gearhart 1989; Liu et coll. 2009) et même chez l'humain (Rizza et coll. 1985). Dans cette dernière étude, l'hyperinsulinémie induite était d'une ampleur comparable à celle retrouvée chez des individus obèses.

Le fait que l'hyperinsulinémie puisse provoquer la résistance à l'insuline et conduire à l'obésité et au DT2 ne veut pas dire qu'il s'agisse d'un élément pathogénique essentiel, ni même fréquent. Il a déjà été question en introduction de l'importante hétérogénéité étiologique du DT2. D'après Ele Ferrannini, la relation entre hyperinsulinémie et résistance à l'insuline n'est pas très forte chez l'humain. Dans un article paru en 2002, il faisait remarquer que ce ne sont pas tous les individus résistants à l'insuline qui sont hyperinsulinémiques et que réciproquement, ce ne sont pas toutes les personnes hyperinsulinémiques qui sont résistantes à l'insuline (Ferrannini et Balkau 2002). De plus, même si des individus présentent une hyperinsulinémie basale et une résistance importante à l'insuline, la compensation de leurs cellules β et leur tolérance au glucose peuvent demeurer parfaites (Prentki et Nolan 2006).

Dans une perspective thérapeutique, des composés pharmacologiques qui causent la décélération métabolique apparaissent ainsi particulièrement pertinents pour certaines sous-populations d'individus à risque de développer un DT2 : des individus à risque qui sont hyperinsulinémiques à l'état basal, avec ou sans résistance à l'insuline. À l'opposé, si le défaut est d'abord une incapacité à sécréter correctement l'insuline, comme observé de façon extrême dans la plupart des types de MODY (Vaxillaire et Froguel 2010), la décélération métabolique risque d'être, au mieux inutile, sinon dangereuse au maintien de l'homéostasie glucidique.

9.6. Rôle de l'activation de PPAR γ dans la cellule β

L'effet protecteur des TZDs sur la fonction β pancréatique et l'inhibition de la sécrétion d'insuline pourraient découler en partie d'une activation du récepteur nucléaire PPAR γ . PPAR γ est exprimé dans la plupart des lignées de cellules β , de même que dans les îlots humains et de rongeurs (Braissant et coll. 1996; Dubois et coll. 2000; Rosen et coll. 2003). Son activation pourrait protéger les cellules β du stress oxydatif et diminuer l'expression du gène de l'insuline. L'activation de PPAR γ ralentit toutefois la prolifération des cellules β dans un contexte métabolique normal.

D'après Chung et coll., l'activation de PPAR γ pourrait protéger les cellules β du stress oxydatif. Ces chercheurs ont soumis durant trois jours des lignées β et des îlots de porcs à un stress oxydatif généré à l'extérieur des cellules. Dans leurs expériences, l'ajout de TZDs au milieu de culture diminue la détection intracellulaire des espèces réactives dérivées de l'oxygène, améliore la survie des différents modèles cellulaires et protège leur fonction (Chung et coll. 2011). L'activation de PPAR γ serait impliquée dans l'effet antioxydant des TZDs (diminution de la détection des espèces réactives dérivées de l'oxygène) puisque cet effet est inhibé par l'ajout d'un antagonistes de PPAR γ au milieu de culture des cellules β TC3 (Chung et coll. 2011).

L'activation de PPAR γ a des effets négatifs sur la prolifération des cellules β . En effet, l'activation du récepteur nucléaire par 10 μ mol/L troglitazone (Ohtani et coll. 1998; Rosen et coll. 2003), de même que la surexpression de PPAR γ dans la lignée INS-1 diminue la prolifération (Rosen et coll. 2003). De plus, les îlots de souris dont le gène codant pour PPAR γ a été éliminé spécifiquement dans les cellules β (souris β -spécifique PPAR γ KO) sont hyperplasiques lorsque les animaux reçoivent une diète normale (Rosen et coll. 2003). Cependant, les TZDs sont utilisés dans un contexte de stress métabolique et, paradoxalement, lorsque les souris β -spécifique PPAR γ KO sont soumises à une diète riche en gras, l'augmentation de la taille de leurs îlots est moins importante que chez les souris témoins. Cette dernière observation a aussi été réalisée chez les souris *ob/ob* avec délétion génique de PPAR γ 2 (souris POKO) (Medina-Gomez et coll. 2007). Ainsi, dans un contexte de stress métabolique, l'activation de PPAR γ aurait un effet positif sur la prolifération

des cellules β , ce qui pourrait expliquer une partie des bienfaits à long terme des TZDs sur la masse et la fonction des îlots pancréatiques.

La surexpression de PPAR γ et son activation par la pioglitazone ont aussi pour effet de diminuer la biosynthèse de l'insuline dans les cellules MIN6 (Nakamichi et coll. 2003). Les auteurs de cette étude n'ont pas tenté de déterminer si l'inhibition était spécifique à l'insuline. Dans le cas contraire, l'inhibition de la synthèse protéique pourrait expliquer un ralentissement de la prolifération cellulaire. Ces auteurs ont aussi mesuré la sécrétion d'insuline et noté une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose dans les cellules MIN6 qui surexpriment PPAR γ , avec ou sans traitement avec de la pioglitazone (Nakamichi et coll. 2003). Un traitement à la rosiglitazone (1-100 $\mu\text{mol/L}$, 24 h), diminue également l'expression du gène de l'insuline de façon dépendante de PPAR γ dans les cellules HIT-T15 (Schinner et coll. 2009). Une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose a aussi été observée avec des cellules INS-1E transfectées depuis 24 heures avec un adénovirus de façon à surexprimer PPAR γ (Ravnskjaer et coll. 2005). Les expériences sur les souris β -spécifiques PPAR γ KO ont néanmoins démontré que PPAR γ est dispensable pour observer l'effet hypoinsulinémiant de la rosiglitazone sur des souris rendues obèses par une diète riche en gras (Rosen et coll. 2003). Que cet effet soit dû à la diminution de la résistance à l'insuline seulement ou qu'il fasse intervenir la décélération métabolique de la cellule β n'est pas clair.

Au sujet des effets de l'activation de PPAR γ sur la sécrétion d'insuline, plusieurs études *in vitro* ont plutôt conclu que les agonistes de PPAR γ stimulent la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Masuda et coll. 1995; Ohtani et coll. 1996; Ohtani et coll. 1998; Shimabukuro et coll. 1998; Santini et coll. 2004; Zhang et coll. 2009). Un aperçu de la documentation disponible sur les effets aigus et à plus long terme des TZDs sur la fonction des cellules β a déjà été présenté à la section 3.5. À notre connaissance, une seule étude démontre l'implication de PPAR γ dans un effet stimulant des TZDs et il s'agit de l'étude de la souris β -spécifique PPAR γ KO. Le traitement durant 16 heures des îlots de ces souris avec 10 $\mu\text{mol/L}$ troglitazone ne parvient pas à augmenter la sécrétion d'insuline alors que l'augmentation est observée dans les souris de type sauvage (Rosen et coll. 2003). Les travaux d'Eleonora Santini et coll. décrivent non seulement une stimulation de la sécrétion d'insuline en présence

d'un agoniste PPAR γ (Ro4389679-000-001) durant 48 heures, mais également une diminution de la sécrétion d'insuline en présence d'un antagoniste (Santini et coll. 2004). L'agoniste utilisé n'est toutefois probablement pas un TZD (l'information n'a pu être trouvée). Nous avons aussi mesuré les effets sur la sécrétion d'insuline de deux agonistes de PPAR γ qui ne sont pas des TZDs (section 6.2, figure 6). L'incubation aigüe (90 minutes) des cellules INS 832/13 avec ces agonistes tend effectivement à stimuler la sécrétion d'insuline, bien que l'effet ne soit pas significatif. Ainsi, l'inhibition aigüe du métabolisme mitochondrial et de la sécrétion d'insuline provoquée par les TZDs indépendamment de l'activation de PPAR γ n'est pas incompatible avec un rôle positif (à plus long terme) de l'activation du récepteur PPAR γ sur la sécrétion d'insuline, bien que ce rôle soit contesté.

9.7. Mise à jour du modèle du mode d'action des thiazolidinediones

Nos résultats nous permettent de proposer une mise à jour du modèle qui explique le mode d'action des thiazolidinediones dans la prévention et le traitement du DT2 (**figure 10**). Dans ce modèle, les bienfaits des TZDs sur la sensibilité à l'insuline et sur la fonction β pancréatique ont deux origines : 1) la liaison des TZDs au récepteur nucléaire et facteur de transcription PPAR γ et 2) l'inhibition du métabolisme mitochondrial et du métabolisme lipidique. Ils ont également deux cibles physiologiques distinctes, bien que reliées entre elles : 1) ils augmentent la sensibilité à l'insuline par des effets à long terme, dépendants de PPAR γ , et à moins long terme grâce à une inhibition aigüe de la sécrétion d'insuline et 2) ils diminuent la sécrétion d'insuline à court terme principalement en inhibant le métabolisme mitochondrial et le métabolisme lipidique et, à plus long terme, en améliorant la sensibilité à l'insuline.

En se liant au récepteur nucléaire PPAR γ , les TZDs modifient le profil d'expression génique des adipocytes et remodelent l'ensemble des masses adipeuses de l'organisme (Anghel et Wahli 2007). La liaison des TZDs au récepteur nucléaire PPAR γ possède deux composantes distinctes. D'abord, les TZDs sont des agonistes de PPAR γ et cette activation favorise la différenciation des préadipocytes en adipocytes et régule positivement l'expression d'un ensemble de gènes lipogéniques (Anghel et Wahli 2007). Ensuite, la liaison des TZDs à PPAR γ nuit à la

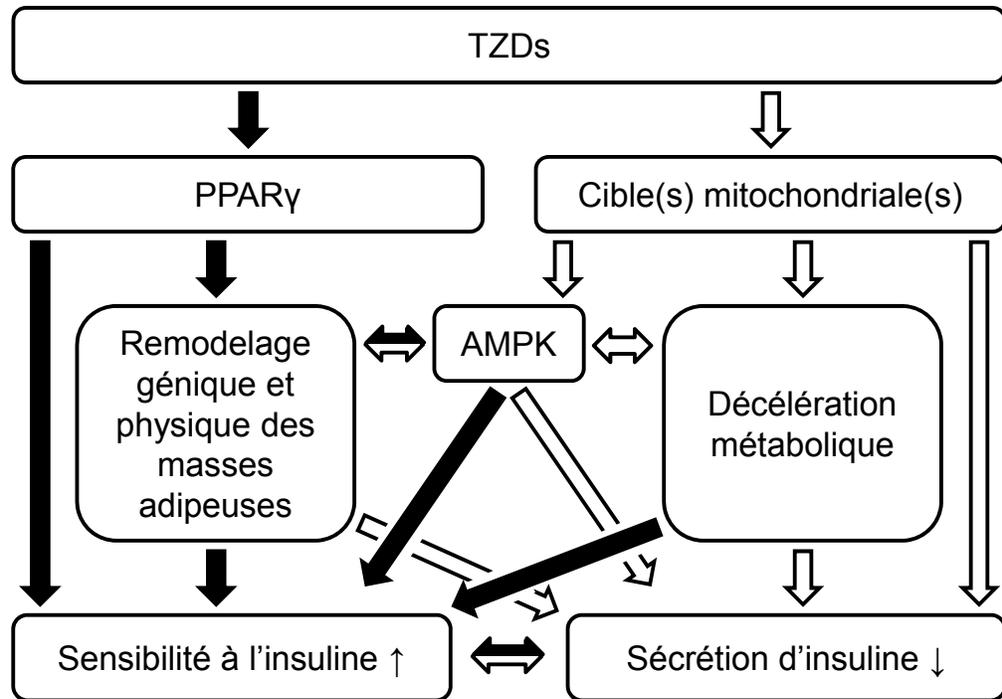
phosphorylation du récepteur nucléaire par la kinase CDK5 (Choi et coll. 2010). Dans un contexte où PPAR γ est phosphorylé, comme cela semble être le cas chez les individus obèses (Choi et coll. 2010), cet effet remodèle favorablement le profil d'expression génique des adipocytes. Par exemple, la diminution de l'état de phosphorylation de PPAR γ augmente l'expression de l'adiponectine (Choi et coll. 2010; Choi et coll. 2011), une hormone qui active l'AMPK et augmente la sensibilité à l'insuline (Tishinsky, Robinson et Dyck 2012). L'activation de PPAR γ entraîne aussi un remodelage physique des masses adipeuses qui libère le foie et les organes périphériques d'une partie de leurs dépôts ectopiques de lipides. Ces changements favorisent la sensibilité à l'insuline (Ye et coll. 2004) et diminuent les concentrations d'acides gras libres et de triacylglycérol en circulation (He et coll. 2003). La diminution des lipides circulants réduit l'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et réduit le stress lipotoxique pour les cellules β (Higa et coll. 1999; McGarry 2002; Prentki et coll. 2002). En améliorant la sensibilité à l'insuline à long terme, les TZDs diminuent la demande pour la sécrétion d'insuline, ce qui est bénéfique pour la cellule β . L'activation de PPAR γ dans les muscles (Hevener et coll. 2003) et le cerveau (Lu et coll. 2011) a probablement également des effets positifs sur l'homéostasie glucidique, qui ne font pas intervenir les adipocytes.

Le récepteur nucléaire PPAR γ n'est pas la seule cible des TZDs. Trois protéines ou complexes enzymatiques ont été identifiés ou proposés comme cibles des TZDs dans les mitochondries. Les TZDs lient et stabilisent la protéine mitochondriale mitoNEET (Colca et coll. 2004; Paddock et coll. 2007), ils inhiberaient l'activité du complexe I de la chaîne de transport d'électrons (Brunmair et coll. 2004) et inhiberaient l'activité du complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase (Fediuc et coll. 2008). Les conséquences fonctionnelles de la liaison des TZDs à la protéine mitoNEET sont incertaines, mais l'inhibition d'une seule des deux autres cibles suffit à provoquer l'inhibition du métabolisme mitochondrial (voir sections 8.1 et 8.2). L'inhibition du métabolisme mitochondrial et de la production d'énergie active l'AMPK. L'activation de l'AMPK dans les organes insulinosensibles est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ruderman et Prentki 2004) et dans les cellules β , à une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Rutter et Leclerc 2009). L'effet inhibiteur de l'AMPK sur la sécrétion

d'insuline peut passer par une diminution du déplacement des granules de sécrétion (Tsuboi et coll. 2003) ou par un changement dans la répartition lipidique (section 5.2).

Dans la cellule β , l'inhibition du métabolisme mitochondrial, de la production d'énergie et du métabolisme des lipides (en particulier le cycle GL/AGL) affectent plusieurs voies métaboliques impliquées dans le déclenchement et l'amplification de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Il en résulte une inhibition de la sécrétion d'insuline et une inhibition du métabolisme qui suivent le patron particulier de la décélération métabolique (section 5.2). Dans un contexte pathologique, la décélération métabolique devrait avoir pour effet de diminuer la sécrétion d'insuline (section 6.2) principalement en dehors des repas, lorsque la concentration sanguine de glucose est supérieure à la concentration basale (>5 mmol/L) sans être pas trop élevée. La diminution de l'insulinémie à court terme est bénéfique pour la sensibilité à l'insuline.

Il est impossible de déterminer pour l'instant si la décélération métabolique contribue réellement aux effets bénéfiques de la pioglitazone dans la prévention ou le traitement du DT2. Il est néanmoins établi que la pioglitazone n'est pas qu'un ligand pour le récepteur nucléaire PPAR γ , mais qu'elle est également en mesure de ralentir rapidement le métabolisme mitochondrial et d'inhiber la sécrétion d'insuline *in vitro* et *in vivo*.



© Lamontagne, 2012

Figure 10 – Modèle révisé des effets des thiazolidinediones sur l'homéostasie glucidique. Voir la section 9.7 pour la description détaillée du modèle. Les flèches noires indiquent des effets à long terme, alors que les flèches blanches réfèrent à des effets d'abord à court terme ayant peut-être un impact à long terme aussi. La relation entre la sensibilité à l'insuline et la sécrétion d'insuline comprend à la fois des mécanismes aigus et chroniques d'adaptation. Figure inspirée de *Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro* de Clemens Fürnsinn et Werner Waldhäusl (Fürnsinn et Waldhäusl 2002).

10. Conclusions

10.1. Retour sur les principaux résultats

Dans cette thèse nous proposons la décélération métabolique de la cellule β pancréatique comme nouveau mode d'action pour la pioglitazone et la metformine, des agents antidiabétiques insulinosensibilisateurs. Ce concept d'inhibition aigüe possède trois caractéristiques : 1) une absence d'effet en conditions basales, lorsque les concentrations de substrats sont faibles; 2) l'inhibition du métabolisme en présence de concentrations stimulantes, mais sous maximales de substrats; 3) la levée de l'inhibition lorsque les concentrations de substrats sont élevées. Le patron de la décélération métabolique a été observé *in vitro* avec des cellules INS 832/13 et des

îlots isolés de rat, traités de façon aigüe avec de la pioglitazone ou de la metformine, pour différents paramètres du métabolisme intermédiaire et pour la sécrétion d'insuline induite par le glucose. En particulier, les deux agents provoquent une inhibition légère du métabolisme mitochondrial, qui est sans doute à l'origine de la plupart des effets décrits. La capacité de la pioglitazone à inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose de façon aigüe a été confirmée *in vivo*, chez le rat Wistar, tout comme sa capacité à inhiber le métabolisme oxydatif des nutriments. L'effet inhibiteur de la pioglitazone sur la sécrétion d'insuline *in vivo* apparaît avant une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez des animaux sains.

10.2. Originalité, intérêt des découvertes et contribution à l'avancement des connaissances

Nous avons introduit le concept de décélération métabolique de la cellule β dans le premier article (section 5.2). Le concept et son nom ont été repris par Sof Andrikopoulos dans une revue publiée l'année suivant la publication de notre article (Andrikopoulos 2010). La décélération métabolique est un mode d'action attrayant pour trois raisons majeures : 1) elle est commune aux deux principaux médicaments antidiabétiques insulinosensibilisateurs encore utilisés, la metformine et la pioglitazone; 2) elle implique des effets directs sur la sécrétion d'insuline qui viennent s'ajouter aux effets connus de ces médicaments sur la sensibilité à l'insuline. L'action concomitante des médicaments sur les deux composantes clés du DT2 pourrait expliquer pourquoi ils sont parmi les plus efficaces de la pharmacopée pour rétablir l'homéostasie glucidique; 3) elle pourrait expliquer en partie l'effet protecteur de la metformine et de la pioglitazone sur la cellule β dans un contexte de stress métabolique.

Nos travaux ont aussi un intérêt particulier d'un point de vue méthodologique. Nos découvertes soulignent l'intérêt d'étudier la physiologie de la cellule β sur toute la gamme de leur courbe de sensibilité au glucose, et même au-delà. Il nous semble pertinent d'étudier les effets de médicaments ou d'interventions qui affectent le métabolisme de la cellule β (et sans doute d'autres types cellulaires) avec en tête la situation *in vivo* où la concentration des nutriments varie grandement, surtout dans un contexte de dérèglements métaboliques.

Nos découvertes pavent la voie à l'élaboration d'une nouvelle approche thérapeutique pour le DT2, basée sur une inhibition douce du métabolisme mitochondrial.

10.3. Considérations sur de nouvelles approches thérapeutiques

Il est intrigant de constater que la berbérine et deux des médicaments antidiabétiques les plus puissants de la pharmacopée occidentale, les seuls qui améliorent la sensibilité à l'insuline (avec la rosiglitazone), sont en mesure de provoquer une légère inhibition du métabolisme mitochondrial, d'activer l'AMPK et d'inhiber la sécrétion d'insuline induite par le glucose selon un patron d'inhibition similaire. Le fait que la pioglitazone et la metformine partagent la décélération métabolique comme mode d'action sur la fonction des cellules β , un élément clé pour l'apparition et la progression du DT2, le rend particulièrement intéressant pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Les travaux sur les agents qui reproduisent les effets de la restriction calorique ou de l'exercice sont déjà sur cette voie. À la lumière de nos travaux, les recherches dans ce domaine auraient intérêt à approfondir la relation entre l'effet des composés et la quantité et la qualité des nutriments présents dans les milieux expérimentaux. La capacité des composés identifiés à opérer selon le modèle de la décélération métabolique est peut-être une caractéristique essentielle à leur efficacité dans un contexte de stress métabolique.

Si cette dernière possibilité se vérifie, il serait pertinent de revoir la manière d'administrer les médicaments insulinosensibilisateurs. Leur efficacité serait peut-être améliorée si leur concentration plasmatique maximale était atteinte au cours de périodes d'hyperglycémies modérées, assez faibles pour permettre une inhibition du métabolisme.

Dans une optique « cellule- β -centrique » où l'effet principal d'un nouveau médicament est d'inhiber la sécrétion d'insuline lors d'épisodes d'hyperinsulinémie basale chez des patients obèses, la combinaison de ce médicament hypothétique avec un inhibiteur du SGLT2 semble judicieuse, puisqu'elle permettrait de mettre en veille la cellule β tout en éliminant sans risque les surplus de glucose (et de calories). Il y a sans doute déjà un grand intérêt à combiner un inhibiteur du SGLT2 à un TZD pour traiter un patient obèse et atteint de DT2. L'inhibiteur du SGLT2 devrait en effet

diminuer la rétention d'eau et réduire la prise de poids en provoquant une perte de calories par l'urine, deux effets indésirables importants des TZDs.

10.4. Suite à donner aux travaux

Les possibilités de suites à donner à nos travaux sont nombreuses. Plusieurs questions et nouvelles pistes de recherche ont déjà été abordées à la suite de la présentation des articles (sections 5.4 et 6.4) et dans les sections de discussion. À notre avis, les objectifs de recherche qui concernent les applications thérapeutiques éventuelles de nos découvertes sont les plus stimulantes, et ce à cause de l'importante utilisation des médicaments insulinosensibilisateurs, surtout de la metformine, et de l'ampleur de l'épidémie de DT2. Les nouveaux objectifs de recherche pourraient être les suivants : 1) identifier la source des effets aigus de la pioglitazone; 2) identifier un « décélérateur métabolique » pur; 3) déterminer l'implication des effets aigus des médicaments dans leurs bienfaits cliniques; 4) valider l'utilisation d'un décélérateur métabolique comme approche thérapeutique; 5) évaluer l'intérêt de l'approche thérapeutique pour d'autres maladies.

Identifier la source des effets aigus de la pioglitazone

L'identification de la cible des effets aigus de la pioglitazone permettrait de mieux comprendre les phénomènes observés et faciliterait le développement de nouveaux outils pour approfondir cette compréhension et son importance dans les bienfaits des médicaments insulinosensibilisateurs. Chacune des cibles mentionnées dans cette thèse devraient d'abord être considérées : le complexe I de la chaîne de transport d'électron, la protéine mitoNEET et les activités déshydrogénases, surtout celles du complexe pyruvate déshydrogénase et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. L'étude de l'implication de l'inhibition du complexe I pourrait se faire en comparant les effets de la pioglitazone à ceux de faibles concentrations de roténone, un inhibiteur du complexe I. L'étude de l'implication de mitoNEET pourrait se faire en diminuant son expression par la technologie de l'ARN interférant (à condition que la protéine soit bien exprimée dans les cellules β). En absence de mitoNEET, la pioglitazone ne parvient peut-être pas à inhiber le métabolisme mitochondrial des cellules β . L'étude de l'implication des déshydrogénases pourrait aisément se faire par des expériences en absence de cellules à partir d'enzymes purifiées ou de préparations enrichies en déshydrogénases par immunoprécipitation. Ces activités se suivent en dosant l'absorbance du NADH. La pioglitazone pourrait inhiber directement certaines activités déshydrogénases.

Identifier un décélérateur métabolique

Pour apprécier pleinement l'intérêt (ou non) de la décélération métabolique comme approche thérapeutique et déterminer si elle est instrumentale dans les effets de la metformine et de la pioglitazone, les recherches à venir seraient facilitées par l'identification d'un nouvel agent (criblage d'une librairie de composés) qui serait purement un décélérateur métabolique. L'identification de la cible première de la pioglitazone serait un atout dans cette quête. La structure du composé pourrait être optimisée pour son effet inhibiteur sur la cible identifiée.

Déterminer le rôle des effets aigus des médicaments dans leurs bienfaits

Avant d'aller plus loin avec le concept de décélération métabolique, les recherches devraient vérifier qu'il s'observe *in vivo*, dans un contexte de stress métabolique. Si la décélération métabolique opère dans ce contexte, nous devrions pouvoir l'observer par des clamps hyperglycémiques effectués sur des modèles

animaux de DT2. Les clamps hyperglycémiques pourraient être repris avec des rats *Zucker diabetic fatty*, qui deviennent spontanément diabétiques à l'âge de 8 semaines (Ikeda et coll. 1981). Les expériences devraient être effectuées avec des animaux à jeun depuis plus longtemps que lors de nos clamps précédents (par exemple cinq heures de jeûne, pour s'assurer d'une insulinémie basale minimale) et repris avec deux concentrations de glucose (deux séries d'expériences distinctes), par exemple 11 mmol/L et 16,7 mmol/L. Si le concept de décélération métabolique de la cellule β s'applique *in vivo*, l'inhibition de la sécrétion d'insuline devrait être beaucoup plus importante à 11 mmol/L glucose qu'à 16,7 mmol/L.

En parallèle, la caractérisation des effets aigus de la metformine et de la berbérine devraient être menée *in vivo*. La berbérine est un produit naturel qui pourrait être utilisé à moindre coût que les TZDs. La comparaison des effets de la metformine et de la berbérine à ceux de la pioglitazone permettrait de déterminer si la décélération métabolique de la cellule β est bien un effet commun aux agents insulinosensibilisateurs.

Il serait ensuite pertinent de vérifier si le concept s'applique chez l'humain dans un contexte thérapeutique (dose habituelle, circonstances habituelles d'administration). L'étude chez l'humain devrait débuter en vérifiant dans les dossiers des patients si les agents insulinosensibilisateurs sont plus efficaces chez les individus hyperinsulinémiques à jeun, chez qui la décélération métabolique risque d'avoir le plus d'effet. Ou chez des patients qui prennent la pioglitazone le soir. Si la décélération métabolique est instrumentale dans les effets des médicaments, ceux-ci devraient s'avérer plus efficaces dans les deux cas.

Valider l'utilisation d'un décélérateur métabolique comme outil thérapeutique

Dans l'éventualité où un décélérateur métabolique est identifié, il sera très excitant de le valider comme nouvel outil thérapeutique. L'utilisation d'un modèle animal de DT2 serait encore ici à privilégier pour effectuer les tests, en comparant les effets de ce produit à ceux de la pioglitazone et de la metformine. Un décélérateur métabolique devrait diminuer la sécrétion d'insuline induite par le glucose après une administration aiguë et diminuer la dépense énergétique.

Évaluer l'approche thérapeutique dans d'autres contextes

Les composés qui ralentissent le métabolisme attirent l'attention dans d'autres contextes physiologiques ou pathophysiologiques que celui du DT2 (Ingram et coll. 2006). Ils ont entre autres de l'intérêt pour ralentir la progression des masses cancéreuses (Dhahbi et coll. 2005; Gohil et coll. 2010; Wei, Kulp et Chen 2010), pour prévenir les conséquences néfastes de l'ischémie-reperfusion (Riepe et coll. 1997; Gohil et coll. 2010) et pour prolonger l'espérance de vie (Lane, Ingram et Roth 2002; Dhahbi et coll. 2005; Blalock et coll. 2010; Lebel et coll. 2012). La décélération métabolique pourrait bien être instrumentale dans ces autres maladies ou contextes physiologiques. Un éventuel décélérateur métabolique pourrait ainsi intéresser de nombreux domaines de recherche en santé.

Bibliographie

- ACD (2008). "Lignes directrices de pratique clinique 2008 de l'Association canadienne du diabète pour la prévention et le traitement du diabète au Canada." Canadian Journal of Diabetes **32**(Suppl. 2): S1-S225.
- Ahmadian, M., et coll. (2011). "Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype." Cell Metabolism **13**(6): 739-48.
- Akiyama, M., et coll. (2009). "Increased insulin demand promotes while pioglitazone prevents pancreatic beta cell apoptosis in Wfs1 knockout mice." Diabetologia **52**(4): 653-63.
- Alberts, B. (1989). Molecular biology of the cell. New York, Garland Pub. 1219 pages.
- Alcazar, O., et coll. (1997). "Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid." Diabetes **46**(7): 1153-8.
- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I. et Nadal, A. (2011). "Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol **7**(6): 346-53.
- Altshuler, D., et coll. (2000). "The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes." Nat Genet **26**(1): 76-80.
- Andersson, U., et coll. (2004). "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake." J Biol Chem **279**(13): 12005-8.
- Andrikopoulos, S. (2010). "Obesity and type 2 diabetes: slow down!--Can metabolic deceleration protect the islet beta cell from excess nutrient-induced damage?" Molecular and Cellular Endocrinology **316**(2): 140-6.
- Anghel, S. I. et Wahli, W. (2007). "Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma." Cell Research **17**(6): 486-511.
- Anthony, N. M., Gaidhu, M. P. et Ceddia, R. B. (2009). "Regulation of visceral and subcutaneous adipocyte lipolysis by acute AICAR-induced AMPK activation." Obesity (Silver Spring) **17**(7): 1312-7.
- Antinozzi, P. A., et coll. (2002). "Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues." J Biol Chem **277**(14): 11746-55.
- Ashcroft, F. M. et Rorsman, P. (1990). "ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion." Biochem Soc Trans **18**(1): 109-11.
- ASPC (2009). "Le diabète au Canada : Rapport du Système national de surveillance du diabète, 2009." Page consultée le 24 novembre 2010 à l'adresse <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2009/ndssdic-snsddac-09/2-fra.php>.
- Aston-Mourney, K., et coll. (2008). "Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin." Diabetologia **51**(4): 540-5.
- Bailey, C. J. et Day, C. (2004). "Metformin: its botanical background." Practical Diabetes International **21**(3): 115-7.
- Bailey, C. J. et Krentz, A. J. (2010). Oral Antidiabetic Agents. Textbook of diabetes. R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg et B. Goldstein. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell: 452-477.
- Bailey, C. J. et Turner, R. C. (1996). "Metformin." New England Journal of Medicine **334**(9): 574-9.

- Bak, D. W., et coll. (2009). "Redox characterization of the FeS protein MitoNEET and impact of thiazolidinedione drug binding." Biochemistry **48**(43): 10193-5.
- Batandier, C., et coll. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **38**(1): 33-42.
- Beaser, R. S. (2007). The Approach to Diagnosis and Treatment. Joslin's diabetes deskbook : a guide for primary care providers. R. S. Beaser et J. D. Center. Boston, MA, Joslin Diabetes Center: 25-44.
- Beaser, R. S. (2007). Definition and Pathophysiology. Joslin's diabetes deskbook : a guide for primary care providers. R. S. Beaser et J. D. Center. Boston, MA, Joslin Diabetes Center: 1-24.
- Ben-Haroush, A., Yogev, Y. et Hod, M. (2004). "Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes." Diabet Med **21**(2): 103-13.
- Bender, K., et coll. (2006). "The importance of redox shuttles to pancreatic beta-cell energy metabolism and function." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 811-4.
- Bensellam, M., et coll. (2012). "Glucose-induced O₂ consumption activates hypoxia inducible factors 1 and 2 in rat insulin-secreting pancreatic beta-cells." PLoS ONE **7**(1): e29807.
- Bergman, R. N., et coll. (2002). "Accurate assessment of beta-cell function: the hyperbolic correction." Diabetes **51 Suppl 1**: S212-20.
- Blalock, E. M., et coll. (2010). "Effects of long-term pioglitazone treatment on peripheral and central markers of aging." PLoS ONE **5**(4): e10405.
- Bloch, C. A., Clemons, P. et Sperling, M. A. (1987). "Puberty decreases insulin sensitivity." Journal of Pediatrics **110**(3): 481-7.
- Bollheimer, L. C., et coll. (2003). "Insulin-sparing effects of troglitazone in rat pancreatic islets." Journal of Molecular Endocrinology **31**(1): 61-9.
- Bonora, E. (2008). "Protection of pancreatic beta-cells: is it feasible?" Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases **18**(1): 74-83.
- Borowiec, M., et coll. (2009). "Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(34): 14460-5.
- Bourron, O., et coll. (2010). "Biguanides and thiazolidinediones inhibit stimulated lipolysis in human adipocytes through activation of AMP-activated protein kinase." Diabetologia **53**(4): 768-78.
- Braissant, O., et coll. (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." Endocrinology **137**(1): 354-66.
- Braun, B., et coll. (2008). "Impact of metformin on peak aerobic capacity." Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism **33**(1): 61-7.
- Bravo, R., et coll. (1985). "Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc proto-oncogenes." EMBO Journal **4**(5): 1193-7.
- Brownlee, M. (2003). "A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction." J Clin Invest **112**(12): 1788-90.

- Brunmair, B., et coll. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" Diabetes **53**(4): 1052-9.
- Buchanan, T. A. et Xiang, A. H. (2005). "Gestational diabetes mellitus." J Clin Invest **115**(3): 485-91.
- Buchanan, T. A., et coll. (2000). "Response of pancreatic beta-cells to improved insulin sensitivity in women at high risk for type 2 diabetes." Diabetes **49**(5): 782-8.
- Buchanan, T. A., et coll. (2002). "Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women." Diabetes **51**(9): 2796-803.
- Buckingham, R. E. et Hanna, A. (2008). "Thiazolidinedione insulin sensitizers and the heart: a tale of two organs?" Diabetes, Obesity and Metabolism **10**(4): 312-28.
- Bugger, H. et Abel, E. D. (2010). "Mitochondria in the diabetic heart." Cardiovascular Research **88**(2): 229-40.
- Burant, C. F. et Bell, G. I. (1992). "Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins." Biochemistry **31**(42): 10414-20.
- Burant, C. F., et coll. (1997). "Troglitazone action is independent of adipose tissue." J Clin Invest **100**(11): 2900-8.
- Burcelin, R., et coll. (2011). "Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective." Acta Diabetologica **48**(4): 257-73.
- Buteau, J., et coll. (2007). "Metabolic diapause in pancreatic beta-cells expressing a gain-of-function mutant of the forkhead protein Foxo1." J Biol Chem **282**(1): 287-93.
- Butler, A. E., et coll. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes **52**(1): 102-10.
- Calegari, V. C., et coll. (2011). "Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets." Journal of Endocrinology **208**(3): 257-64.
- Calixto, L. A., et coll. (2011). "In vitro characterization of rosiglitazone metabolites and determination of the kinetic parameters employing rat liver microsomal fraction." European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics **36**(3): 159-66.
- Campbell, I. W. (1984). "Metformin and glibenclamide: comparative risks." Br Med J (Clin Res Ed) **289**(6440): 289.
- Campbell, I. W. et Mariz, S. (2007). "Beta-cell preservation with thiazolidinediones." Diabetes Research and Clinical Practice **76**(2): 163-76.
- Capeau, J. (2003). "[Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]." Med Sci (Paris) **19**(8-9): 834-9.
- Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." Trends in Biochemical Sciences **29**(1): 18-24.
- Carling, D., Zammit, V. A. et Hardie, D. G. (1987). "A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis." FEBS Lett **223**(2): 217-22.

- Carr, A., et coll. (1998). "Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance." Lancet **351**(9119): 1881-3.
- Cauchi, S., et coll. (2007). "TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis." J Mol Med (Berl) **85**(7): 777-82.
- Cavaghan, M. K., et coll. (1997). "Treatment with the oral antidiabetic agent troglitazone improves beta cell responses to glucose in subjects with impaired glucose tolerance." J Clin Invest **100**(3): 530-7.
- Chen, S., et coll. (1994). "More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling." Diabetes **43**(7): 878-83.
- Chiasson, J. L., et coll. (1994). "The efficacy of acarbose in the treatment of patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. A multicenter controlled clinical trial." Annals of Internal Medicine **121**(12): 928-35.
- Choi, J. H., et coll. (2010). "Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPARgamma by Cdk5." Nature **466**(7305): 451-6.
- Choi, J. H., et coll. (2011). "Antidiabetic actions of a non-agonist PPARgamma ligand blocking Cdk5-mediated phosphorylation." Nature **477**(7365): 477-81.
- Chung, S. S., et coll. (2011). "Mechanism for antioxidative effects of thiazolidinediones in pancreatic beta-cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(5): E912-21.
- Cline, G. W., et coll. (2004). "¹³C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathways in INS-1 cells." J Biol Chem **279**(43): 44370-5.
- Colca, J. R., et coll. (2004). "Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E252-60.
- Collectif (1993). "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group." N Engl J Med **329**(14): 977-86.
- Cool, B., et coll. (2006). "Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome." Cell Metabolism **3**(6): 403-16.
- Corkey, B. E. (2012). "Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence?" Diabetes **61**(1): 4-13.
- Corkey, B. E., et coll. (1989). "A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells." J Biol Chem **264**(36): 21608-12.
- Dankner, R., et coll. (2009). "Basal-state hyperinsulinemia in healthy normoglycemic adults is predictive of type 2 diabetes over a 24-year follow-up: a preliminary report." Diabetes Care **32**(8): 1464-6.
- Daval, M., et coll. (2005). "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes." J Biol Chem **280**(26): 25250-7.
- Davidoff, F. (1971). "Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. 3. The mechanism of phenethylbiguanide accumulation and its relationship to in vitro respiratory inhibition." J Biol Chem **246**(12): 4017-27.

- Davidson, H. W. (2004). "(Pro)Insulin processing: a historical perspective." Cell Biochem Biophys **40**(3 Suppl): 143-58.
- Day, C. (1999). "Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs." Diabetic Medicine **16**(3): 179-92.
- Day, C. et Bailey, C. J. (2012). "The hypocaloric diet in type 2 diabetes - déjà vu." The British Journal of Diabetes & Vascular Disease **12**(1): 48-51.
- Deeney, J. T., et coll. (2000). "Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells)." J Biol Chem **275**(13): 9363-8.
- DeFronzo, R. A. (2004). "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Med Clin North Am **88**(4): 787-835, ix.
- DeFronzo, R. A. et Abdul-Ghani, M. A. (2011). "Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **96**(8): 2354-66.
- DeFronzo, R. A., et coll. (2011). "Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance." New England Journal of Medicine **364**(12): 1104-15.
- Delghingaro-Augusto, V., et coll. (2012). "Voluntary running exercise prevents beta-cell failure in susceptible islets of the Zucker diabetic fatty rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(2): E254-64.
- Derosa, G. et Maffioli, P. (2012). "Efficacy and safety profile evaluation of acarbose alone and in association with other antidiabetic drugs: a systematic review." Clin Ther **34**(6): 1221-36.
- Dhabhi, J. M., et coll. (2005). "Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling." Physiol Genomics **23**(3): 343-50.
- Dixon, G., et coll. (2003). "A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11 - the functional significance of L-alanine." Journal of Endocrinology **179**(3): 447-54.
- Donath, M. Y. et Shoelson, S. E. (2011). "Type 2 diabetes as an inflammatory disease." Nature Reviews. Immunology **11**(2): 98-107.
- Drucker, D. J. (2006). "The biology of incretin hormones." Cell Metab **3**(3): 153-65.
- Dubois, M., et coll. (2000). "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in normal human pancreatic islet cells." Diabetologia **43**(9): 1165-9.
- Duckworth, W. C., Bennett, R. G. et Hamel, F. G. (1998). "Insulin degradation: progress and potential." Endocr Rev **19**(5): 608-24.
- Dupuis, J., et coll. (2010). "New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk." Nature Genetics **42**(2): 105-16.
- Dykens, J. A., et coll. (2008). "Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro." Toxicol Appl Pharmacol **233**(2): 203-10.
- Edghill, E. L., et coll. (2008). "Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood." Diabetes **57**(4): 1034-42.

- Ehse, J. A., et coll. (2007). "Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes." Diabetes **56**(9): 2356-70.
- El-Assaad, W., et coll. (2003). "Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death." Endocrinology **144**(9): 4154-63.
- El-Assaad, W., et coll. (2010). "Glucolipototoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells." Endocrinology **151**(7): 3061-73.
- El-Mir, M. Y., et coll. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem **275**(1): 223-8.
- Erdmann, J., et coll. (2012). "Disturbances of Basal and postprandial insulin secretion and clearance in obese patients with type 2 diabetes mellitus." Horm Metab Res **44**(1): 60-9.
- Escribano, L., et coll. (2010). "Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology." Neuropsychopharmacology **35**(7): 1593-604.
- Farfari, S., et coll. (2000). "Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion." Diabetes **49**(5): 718-26.
- Farret, A., et coll. (2007). "Direct rosiglitazone-induced modifications in insulin secretion, action and clearance: a single-dose hyperglycaemic clamp study." Diabetologia **50**(7): 1384-7.
- Fediuc, S., et coll. (2008). "Activation of AMP-activated protein kinase, inhibition of pyruvate dehydrogenase activity, and redistribution of substrate partitioning mediate the acute insulin-sensitizing effects of troglitazone in skeletal muscle cells." Journal of Cellular Physiology **215**(2): 392-400.
- Feinstein, D. L., et coll. (2005). "Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?" Biochemical Pharmacology **70**(2): 177-88.
- Fernandez-Zapico, M. E., et coll. (2009). "MODY7 gene, KLF11, is a novel p300-dependent regulator of Pdx-1 (MODY4) transcription in pancreatic islet beta cells." J Biol Chem **284**(52): 36482-90.
- Ferrannini, E. et Balkau, B. (2002). "Insulin: in search of a syndrome." Diabetic Medicine **19**(9): 724-9.
- Festuccia, W. T., et coll. (2009). "Rosiglitazone-induced heart remodelling is associated with enhanced turnover of myofibrillar protein and mTOR activation." J Mol Cell Cardiol **47**(1): 85-95.
- Fonseca, S. G., Gromada, J. et Urano, F. (2011). "Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death." Trends Endocrinol Metab **22**(7): 266-74.
- Fonseca, S. G., et coll. (2010). "Stress hypERactivation in the beta-cell." Islets **2**(1): 1-9.
- Foretz, M., et coll. (2010). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." J Clin Invest **120**(7): 2355-69.
- Forman, B. M., et coll. (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." Cell **83**(5): 803-12.

- Frayling, T. M. (2007). "Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology." *Nat Rev Genet* **8**(9): 657-62.
- Froguel, P., et coll. (1993). "Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus." *N Engl J Med* **328**(10): 697-702.
- Fryer, L. G., Parbu-Patel, A. et Carling, D. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(28): 25226-32.
- Fujita, T., et coll. (1983). "Reduction of insulin resistance in obese and/or diabetic animals by 5-[4-(1-methylcyclohexylmethoxy)benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (ADD-3878, U-63,287, ciglitazone), a new antidiabetic agent." *Diabetes* **32**(9): 804-10.
- Fujita, Y., et coll. (2003). "Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats." *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology and Pharmacology* **136**(1): 85-94.
- Furnsinn, C. et Waldhausl, W. (2002). "Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro." *Diabetologia* **45**(9): 1211-23.
- Gallwitz, B. et Nauck, M. (2008). Treatment Strategies for Type 2 Diabetes Based on Incretin Action. *Type 2 diabetes : principles and practice*. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 159-169.
- Garber, A., et coll. (2011). "Liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, provides sustained improvements in glycaemic control and weight for 2 years as monotherapy compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* **13**(4): 348-56.
- Gastaldelli, A., et coll. (2007). "Thiazolidinediones improve beta-cell function in type 2 diabetic patients." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(3): E871-83.
- Gauthier, M. S. et Ruderman, N. B. (2010). "Adipose tissue inflammation and insulin resistance: all obese humans are not created equal." *Biochem J* **430**(2): e1-4.
- Gembal, M., Gilon, P. et Henquin, J. C. (1992). "Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells." *J Clin Invest* **89**(4): 1288-95.
- Gerstein, H. C., et coll. (2006). "Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomised controlled trial." *Lancet* **368**(9541): 1096-105.
- Giles, T. D. et Sander, G. E. (2004). "Diabetes mellitus and heart failure: basic mechanisms, clinical features, and therapeutic considerations." *Cardiology Clinics* **22**(4): 553-68.
- Gohil, V. M., et coll. (2010). "Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis." *Nat Biotechnol* **28**(3): 249-55.
- Gouda, H. N., et coll. (2010). "The association between the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis." *Am J Epidemiol* **171**(6): 645-55.
- Gray, S. et Kim, J. K. (2011). "New insights into insulin resistance in the diabetic heart." *Trends Endocrinol Metab* **22**(10): 394-403.
- Greeley, S. A., et coll. (2010). "Neonatal diabetes mellitus: a model for personalized medicine." *Trends Endocrinol Metab* **21**(8): 464-72.

- Greenwood, R. H., Mahler, R. F. et Hales, C. N. (1976). "Improvement in insulin secretion in diabetes after diazoxide." Lancet **1**(7957): 444-7.
- Gregorio, F., et coll. (1989). "Metformin potentiates B-cell response to high glucose: an in vitro study on isolated perfused pancreas from normal rats." Diabete Metab **15**(3): 111-7.
- Guay, C., et coll. (2007). "A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion." J Biol Chem **282**(49): 35657-65.
- Gybina, A. A. et Prohaska, J. R. (2008). "Fructose-2,6-bisphosphate is lower in copper deficient rat cerebellum despite higher content of phosphorylated AMP-activated protein kinase." Exp Biol Med (Maywood) **233**(10): 1262-70.
- Haddad, P. S., et coll. (2012). "Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 893426.
- Halimi, S. (2010). "Acute consequences of hypoglycaemia in diabetic patients." Diabetes Metab **36 Suppl 3**: S75-83.
- Hanefeld, M. (2008). Alpha-Glucosidase Inhibitors. Type 2 diabetes : principles and practice. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 121-134.
- Hardie, D. G. (2011). "AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function." Genes Dev **25**(18): 1895-908.
- Harding, H. P., et coll. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Mol Cell **7**(6): 1153-63.
- Hawley, S. A., et coll. (2002). "The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism." Diabetes **51**(8): 2420-5.
- He, W., et coll. (2003). "Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(26): 15712-7.
- Hellman, B. (2009). "Pulsatility of insulin release--a clinically important phenomenon." Ups J Med Sci **114**(4): 193-205.
- Heneka, M. T., et coll. (2005). "Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice." Brain **128**(Pt 6): 1442-53.
- Henquin, J. C. (2000). "Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose." Diabetes **49**(11): 1751-60.
- Henquin, J. C. (2009). "Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation." Diabetologia **52**(5): 739-51.
- Henquin, J. C., et coll. (2011). "Long in the shade, glucagon re-occupies centre court." Diabetes Obes Metab **13 Suppl 1**: v-viii.
- Henriksen, K., et coll. (2011). "Efficacy and safety of the PPARgamma partial agonist balaglitazone compared with pioglitazone and placebo: a phase III, randomized, parallel-group study in patients with type 2 diabetes on stable insulin therapy." Diabetes/Metabolism Research and Reviews **27**(4): 392-401.

- Herder, C. et Roden, M. (2011). "Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance." European Journal of Clinical Investigation **41**(6): 679-92.
- Herrero, L., et coll. (2005). "Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion." Diabetes **54**(2): 462-71.
- Hevener, A. L., et coll. (2003). "Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance." Nature Medicine **9**(12): 1491-7.
- Hevener, A. L., et coll. (2007). "Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones." J Clin Invest **117**(6): 1658-69.
- Higa, M., et coll. (1999). "Troglitazone prevents mitochondrial alterations, beta cell destruction, and diabetes in obese prediabetic rats." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(20): 11513-8.
- Higgins, J. W., Bedwell, D. W. et Zamek-Gliszczynski, M. J. (2012). "Ablation of Both Oct1 and Oct2 Alters Metformin Pharmacokinetics But Has No Effect on Tissue Drug Exposure and Pharmacodynamics." Drug Metabolism and Disposition.
- Hinke, S. A., et coll. (2007). "Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic beta-cells through restoration of mitochondrial electron transfer." Br J Pharmacol **150**(8): 1031-43.
- Holman, R. R. (2006). "Long-term efficacy of sulfonylureas: a United Kingdom Prospective Diabetes Study perspective." Metabolism **55**(5 Suppl 1): S2-5.
- Horikawa, Y., et coll. (1997). "Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY." Nat Genet **17**(4): 384-5.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E. et Auwerx, J. (2012). "Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan." Nature Reviews. Molecular Cell Biology **13**(4): 225-38.
- Ikeda, H., et coll. (1981). "A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty)." Diabetes **30**(12): 1045-50.
- Ingelsson, E., et coll. (2005). "Insulin resistance and risk of congestive heart failure." JAMA **294**(3): 334-41.
- Ingram, D. K., et coll. (2006). "Calorie restriction mimetics: an emerging research field." Aging Cell **5**(2): 97-108.
- Irwin, N., et coll. (2011). "Acute and long-term effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on the function and insulin secretory responsiveness of clonal beta-cells." Hormone and Metabolic Research **43**(4): 244-9.
- Ishida, H., et coll. (2004). "Pioglitazone improves insulin secretory capacity and prevents the loss of beta-cell mass in obese diabetic db/db mice: Possible protection of beta cells from oxidative stress." Metabolism: Clinical and Experimental **53**(4): 488-94.
- Ishihara, H., et coll. (2004). "Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion." Hum Mol Genet **13**(11): 1159-70.

- Jensen, M. V., et coll. (2006). "Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of glucose-stimulated insulin secretion." J Biol Chem **281**(31): 22342-51.
- Jiang, Q., Heneka, M. et Landreth, G. E. (2008). "The role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in Alzheimer's disease: therapeutic implications." CNS Drugs **22**(1): 1-14.
- Johnson, S. T., et coll. (2008). "Acute effect of metformin on exercise capacity in active males." Diabetes, Obesity and Metabolism **10**(9): 747-54.
- Jones, P. M. et Persaud, S. J. (2010). Islet Function and Insulin Secretion. Textbook of diabetes. R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg et B. Goldstein. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell: 87-103.
- Jung, T. W., et coll. (2012). "Metformin prevents endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through AMPK-PI3K-c-Jun NH2 pathway." Biochemical and Biophysical Research Communications **417**(1): 147-52.
- Kadoglou, N. P., et coll. (2008). "Beneficial effects of rosiglitazone on novel cardiovascular risk factors in patients with Type 2 diabetes mellitus." Diabetic Medicine **25**(3): 333-40.
- Kahn, B. B., et coll. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." Cell Metabolism **1**(1): 15-25.
- Kahn, S. E. (2003). "The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes." Diabetologia **46**(1): 3-19.
- Kahn, S. E., et coll. (2006). "Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy." N Engl J Med **355**(23): 2427-43.
- Kahn, S. E., et coll. (1993). "Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function." Diabetes **42**(11): 1663-72.
- Kanda, Y., et coll. (2010). "Molecular mechanism by which pioglitazone preserves pancreatic beta-cells in obese diabetic mice: evidence for acute and chronic actions as a PPARgamma agonist." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(2): E278-86.
- Karunakaran, U., et coll. (2012). "Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and beta-cell failure in type II diabetes." Exp Diabetes Res **2012**: 639762.
- Kasai, H., et coll. (2010). "Exocytosis in islet beta-cells." Adv Exp Med Biol **654**: 305-38.
- Katada, S., Imhof, A. et Sassone-Corsi, P. (2012). "Connecting threads: epigenetics and metabolism." Cell **148**(1-2): 24-8.
- Kefas, B. A., et coll. (2004). "Metformin-induced stimulation of AMP-activated protein kinase in beta-cells impairs their glucose responsiveness and can lead to apoptosis." Biochemical Pharmacology **68**(3): 409-16.
- Kelpe, C. L., et coll. (2003). "Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis." J Biol Chem **278**(32): 30015-21.
- Kenchiah, S., et coll. (2002). "Obesity and the risk of heart failure." New England Journal of Medicine **347**(5): 305-13.

- Kim, J. K., et coll. (2003). "Differential effects of rosiglitazone on skeletal muscle and liver insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice." Diabetes **52**(6): 1311-8.
- Kim, J. W., et coll. (2009). "Rosiglitazone protects the pancreatic beta-cell death induced by cyclosporine A." Biochemical and Biophysical Research Communications **390**(3): 763-8.
- Kishore, P., et coll. (2011). "Activation of KATP channels suppresses glucose production in humans." J Clin Invest **121**(12): 4916-20.
- Kitabchi, A. E., et coll. (2005). "Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin." Diabetes **54**(8): 2404-14.
- Kobayashi, M. et Olefsky, J. M. (1978). "Effect of experimental hyperinsulinemia on insulin binding and glucose transport in isolated rat adipocytes." American Journal of Physiology **235**(1): E53-62.
- Konrad, D., et coll. (2005). "Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells." Diabetologia **48**(5): 954-66.
- Koves, T. R., et coll. (2008). "Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance." Cell Metabolism **7**(1): 45-56.
- Laakso, M. (2008). Epidemiology of Type 2 Diabetes. Type 2 diabetes : principles and practice. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 1-11.
- Lacruz, G., et coll. (2009). "Diabetic beta-cells can achieve self-protection against oxidative stress through an adaptive up-regulation of their antioxidant defenses." PLoS ONE **4**(8): e6500.
- Ladiges, W. C., et coll. (2005). "Pancreatic beta-cell failure and diabetes in mice with a deletion mutation of the endoplasmic reticulum molecular chaperone gene P58IPK." Diabetes **54**(4): 1074-81.
- Laedtke, T., et coll. (2000). "Overnight inhibition of insulin secretion restores pulsatility and proinsulin/insulin ratio in type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(3): E520-8.
- Lamontagne, J. (2006). Effet de la modification du métabolisme des acides gras sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Mémoire de maîtrise. département de biochimie, Université de Montréal. 66 pages.
- Lamontagne, J., et coll. (2007). "Circulating lipids are lowered but pancreatic islet lipid metabolism and insulin secretion are unaltered in exercise-trained female rats." Appl Physiol Nutr Metab **32**(2): 241-8.
- Lamontagne, J., et coll. (2009). "Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations." Endocrinology **150**(8): 3465-74.
- Lane, M. A., Ingram, D. K. et Roth, G. S. (2002). "The serious search for an anti-aging pill." Scientific American **287**(2): 36-41.
- Lang, F., Ullrich, S. et Gulbins, E. (2011). "Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function." Expert Opin Ther Targets **15**(9): 1061-71.
- Latour, M. G., et coll. (2007). "GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo." Diabetes **56**(4): 1087-94.

- Leahy, J. L. (2005). "Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." Arch Med Res **36**(3): 197-209.
- Leahy, J. L., Bumbalo, L. M. et Chen, C. (1994). "Diazoxide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats." Diabetes **43**(2): 173-9.
- Lebel, M., et coll. (2012). "Drugs, nutrients, and phytoactive principles improving the health span of rodent models of human age-related diseases." Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences **67**(2): 140-51.
- LeBrasseur, N. K., et coll. (2006). "Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(1): E175-81.
- Leclerc, I., et coll. (2004). "Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E1023-31.
- Ledermann, H. M. (1995). "Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed?" Lancet **345**(8950): 648.
- Lee, Y. H., et coll. (2011). "Effects of leptin and adiponectin on pancreatic beta-cell function." Metabolism: Clinical and Experimental **60**(12): 1664-72.
- Lee, Y. S., et coll. (2006). "Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states." Diabetes **55**(8): 2256-64.
- Lehmann, J. M., et coll. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." J Biol Chem **270**(22): 12953-6.
- Leloup, C., et coll. (2009). "Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion." Diabetes **58**(3): 673-81.
- Lin, H. Z., et coll. (2000). "Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice." Nature Medicine **6**(9): 998-1003.
- Linster, C. L., et coll. (2011). "Ethylmalonyl-CoA decarboxylase, a new enzyme involved in metabolite proofreading." J Biol Chem **286**(50): 42992-3003.
- Liu, H. Y., et coll. (2009). "Insulin is a stronger inducer of insulin resistance than hyperglycemia in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM)." J Biol Chem **284**(40): 27090-100.
- Lombard, D. B., Tishkoff, D. X. et Bao, J. (2011). "Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation." Handb Exp Pharmacol **206**: 163-88.
- Loubatieres, A., Mariani, M. M. et Alric, R. (1968). "The action of diazoxide on insulin secretion, medullo-adrenal secretion, and the liberation of catecholamines." Annals of the New York Academy of Sciences **150**(2): 226-41.
- Lu, M., et coll. (2011). "Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones." Nature Medicine **17**(5): 618-22.
- Lupi, R., et coll. (2002). "Lipotoxicity in human pancreatic islets and the protective effect of metformin." Diabetes **51** Suppl 1: S134-7.

- Lupi, R., et coll. (2004). "Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPARgamma2 in the modulation of insulin secretion." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(4): E560-7.
- Lupi, R., et coll. (1999). "The biguanide compound metformin prevents desensitization of human pancreatic islets induced by high glucose." European Journal of Pharmacology **364**(2-3): 205-9.
- Lupi, R., et coll. (1997). "Effects of glibenclamide and metformin (alone or in combination) on insulin release from isolated human pancreatic islets." Acta Diabetologica **34**(1): 46-8.
- Lynch, C. J., et coll. (2011). "Some Cannabinoid Receptor Ligands and Their Distomers Are Direct Acting Openers of Sur1 K-ATP Channels." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(5): E540-51.
- Lynch, R. M., et coll. (2000). "Localization of glucokinase gene expression in the rat brain." Diabetes **49**(5): 693-700.
- Maassen, J. A. (2002). "Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis." Am J Med Genet **115**(1): 66-70.
- MacDonald, M. J. (1993). "Glucose enters mitochondrial metabolism via both carboxylation and decarboxylation of pyruvate in pancreatic islets." Metabolism **42**(10): 1229-31.
- MacDonald, M. J. (2003). "The export of metabolites from mitochondria and anaplerosis in insulin secretion." Biochim Biophys Acta **1619**(1): 77-88.
- Maechler, P., et coll. (2010). "Role of mitochondria in beta-cell function and dysfunction." Advances in Experimental Medicine and Biology **654**: 193-216.
- Maeda, N., et coll. (2001). "PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein." Diabetes **50**(9): 2094-9.
- Malaisse, W. J., et coll. (1979). "Insulin release: the fuel hypothesis." Metabolism **28**(4): 373-86.
- Malandrucco, I., et coll. (2012). "Very-low-calorie diet: a quick therapeutic tool to improve beta cell function in morbidly obese patients with type 2 diabetes." American Journal of Clinical Nutrition **95**(3): 609-13.
- Malecki, M. T., et coll. (1999). "Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus." Nat Genet **23**(3): 323-8.
- Malmgren, S., et coll. (2009). "Tight coupling between glucose and mitochondrial metabolism in clonal beta-cells is required for robust insulin secretion." J Biol Chem **284**(47): 32395-404.
- Marban, S. L., DeLoia, J. A. et Gearhart, J. D. (1989). "Hyperinsulinemia in transgenic mice carrying multiple copies of the human insulin gene." Developmental Genetics **10**(5): 356-64.
- Marchetti, P., et coll. (2004). "Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **89**(11): 5535-41.
- Marsin, A. S., et coll. (2000). "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." Current Biology **10**(20): 1247-55.

- Martens, G. A., et coll. (2005). "Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells." J Biol Chem **280**(21): 20389-96.
- Martin, C., Desai, K. S. et Steiner, G. (1983). "Receptor and postreceptor insulin resistance induced by in vivo hyperinsulinemia." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **61**(8): 802-7.
- Masini, M., et coll. (2009). "Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells." Diabetologia **52**(6): 1083-6.
- Masuda, K., et coll. (1995). "Effects of Troglitazone (CS-045) on insulin secretion in isolated rat pancreatic islets and HIT cells: an insulinotropic mechanism distinct from glibenclamide." Diabetologia **38**(1): 24-30.
- Matschinsky, F. M. (1990). "Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes." Diabetes **39**(6): 647-52.
- Matschinsky, F. M., et coll. (2011). "Research and development of glucokinase activators for diabetes therapy: theoretical and practical aspects." Handb Exp Pharmacol(203): 357-401.
- Matsumura, K., et coll. (2007). "Aquaporin 7 is a beta-cell protein and regulator of intraislet glycerol content and glycerol kinase activity, beta-cell mass, and insulin production and secretion." Mol Cell Biol **27**(17): 6026-37.
- Matveyenko, A. V., et coll. (2009). "Beneficial endocrine but adverse exocrine effects of sitagliptin in the human islet amyloid polypeptide transgenic rat model of type 2 diabetes: interactions with metformin." Diabetes **58**(7): 1604-15.
- Mayhew, D. A., Wright, P. H. et Ashmore, J. (1969). "Regulation of insulin secretion." Pharmacological Reviews **21**(3): 183-212.
- McGarry, J. D. (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes." Diabetes **51**(1): 7-18.
- McGarry, J. D. et Dobbins, R. L. (1999). "Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion." Diabetologia **42**(2): 128-38.
- McGarry, J. D. et Foster, D. W. (1979). "In support of the roles of malonyl-CoA and carnitine acyltransferase I in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis." J Biol Chem **254**(17): 8163-8.
- McNurlan, M. A. et Garlick, P. J. (2000). Protein Synthesis and Degradation. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. M. H. Stipanuk. Philadelphia ; Montréal, W.B. Saunders: 211-232.
- Medina-Gomez, G., et coll. (2007). "PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism." PLoS Genetics **3**(4): e64.
- Mehnert, H. et Seitz, W. (1958). "[Further results of diabetes therapy with blood sugar lowering biguanides]." Munch Med Wochenschr **100**(47): 1849-51.
- Michael, M. D., et coll. (2000). "Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction." Mol Cell **6**(1): 87-97.
- Minokoshi, Y., et coll. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." Nature **428**(6982): 569-74.

- Molven, A., et coll. (2008). "Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody-negative type 1 diabetes." Diabetes **57**(4): 1131-5.
- Morino, K., Petersen, K. F. et Shulman, G. I. (2006). "Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction." Diabetes **55 Suppl 2**: S9-S15.
- Mudaliar, S. et Henry, R. R. (2008). Thiazolidinediones. Type 2 diabetes : principles and practice. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 135-157.
- Mukhtar, M. H., et coll. (2008). "Inhibition of glucokinase translocation by AMP-activated protein kinase is associated with phosphorylation of both GKRP and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **294**(3): R766-74.
- Muniyappa, R., et coll. (2008). "Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(1): E15-26.
- Muoio, D. M., et coll. (1999). "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." Biochemical Journal **338 (Pt 3)**: 783-91.
- Murphy, R., et coll. (2008). "Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation." Diabet Med **25**(4): 383-99.
- Nakamichi, Y., et coll. (2003). "PPAR-gamma overexpression suppresses glucose-induced proinsulin biosynthesis and insulin release synergistically with pioglitazone in MIN6 cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **306**(4): 832-6.
- Nakanishi, S., et coll. (2004). "A comparison between Japanese-Americans living in Hawaii and Los Angeles and native Japanese: the impact of lifestyle westernization on diabetes mellitus." Biomed Pharmacother **58**(10): 571-7.
- Narkar, V. A., et coll. (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." Cell **134**(3): 405-15.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. et Lehninger, A. L. (2008). Lehninger principles of biochemistry. New York, W.H. Freeman. 1158 pages.
- Newgard, C. B. et McGarry, J. D. (1995). "Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction." Annu Rev Biochem **64**: 689-719.
- Newsholme, P., et coll. (2005). "New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes." Clin Sci (Lond) **108**(3): 185-94.
- Newsholme, P., Gaudel, C. et McClenaghan, N. H. (2010). "Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity." Adv Exp Med Biol **654**: 91-114.
- Newsholme, P., et coll. (2007). "Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity." J Physiol **583**(Pt 1): 9-24.
- Nicholls, D. G. et Ferguson, S. J. (2002). Bioenergetics 3. London, Academic Press. 297 pages.

- Nielsen, E. M., et coll. (2003). "The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes." Diabetes **52**(2): 573-7.
- Nies, A. T., et coll. (2011). "Organic cation transporters (OCTs, MATEs), in vitro and in vivo evidence for the importance in drug therapy." Handb Exp Pharmacol(201): 105-67.
- Nissen, S. E. et Wolski, K. (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." New England Journal of Medicine **356**(24): 2457-71.
- Noel, R. J., et coll. (1997). "Engineering of glycerol-stimulated insulin secretion in islet beta cells. Differential metabolic fates of glucose and glycerol provide insight into mechanisms of stimulus-secretion coupling." J Biol Chem **272**(30): 18621-7.
- Nolan, C. J., Damm, P. et Prentki, M. (2011). "Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management." Lancet **378**(9786): 169-81.
- Nolan, C. J., et coll. (2006). "Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling." Diabetologia **49**(9): 2120-30.
- Nolan, C. J., et coll. (2006). "Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion." Diabetes **55 Suppl 2**: S16-23.
- Nolan, C. J. et Prentki, M. (2008). "The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable." Trends Endocrinol Metab **19**(8): 285-91.
- Novelli, M., et coll. (2004). "Effects of life-long exercise on circulating free fatty acids and muscle triglyceride content in ageing rats." Experimental Gerontology **39**(9): 1333-40.
- O'Rahilly, S., Barroso, I. et Wareham, N. J. (2005). "Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning?" Science **307**(5708): 370-3.
- Oakhill, J. S., Scott, J. W. et Kemp, B. E. (2012). "AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase." Trends Endocrinol Metab **23**(3): 125-32.
- Ohtani, K., et coll. (1996). "Pioglitazone hydrochloride stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells by inducing Ca²⁺ influx." Journal of Endocrinology **150**(1): 107-11.
- Ohtani, K. I., et coll. (1998). "Troglitazone (CS-045) inhibits beta-cell proliferation rate following stimulation of insulin secretion in HIT-T 15 cells." Endocrinology **139**(1): 172-8.
- Olofsson, C. S., et coll. (2004). "Palmitate increases L-type Ca²⁺ currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells." J Physiol **557**(Pt 3): 935-48.
- OMS (2011). "Liste modèle de l'OMS des médicaments essentiels." Page consultée le 23 janvier 2012 à l'adresse http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95968_fre.pdf.
- Ouslimani, N., et coll. (2005). "Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells." Metabolism: Clinical and Experimental **54**(6): 829-34.
- Ouyang, J., Parakhia, R. A. et Ochs, R. S. (2011). "Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase." J Biol Chem **286**(1): 1-11.

- Owen, M. R., Doran, E. et Halestrap, A. P. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-14.
- Owen, O. E., Kalhan, S. C. et Hanson, R. W. (2002). "The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function." J Biol Chem **277**(34): 30409-12.
- Paddock, M. L., et coll. (2007). "MitoNEET is a uniquely folded 2Fe 2S outer mitochondrial membrane protein stabilized by pioglitazone." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(36): 14342-7.
- Palenickova, E., et coll. (2011). "Inhibitory effect of metformin on oxidation of NADH-dependent substrates in rat liver homogenate." Physiological Research **60**(5): 835-9.
- Paolisso, G., et coll. (1995). "Opposite effects of short- and long-term fatty acid infusion on insulin secretion in healthy subjects." Diabetologia **38**(11): 1295-9.
- Pappan, K. L., et coll. (2005). "Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion." J Biol Chem **280**(10): 9023-9.
- Pasarica, M., et coll. (2009). "Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response." Diabetes **58**(3): 718-25.
- Patane, G., et coll. (2000). "Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells." Diabetes **49**(5): 735-40.
- Pearson, E. R., et coll. (2007). "Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene." PLoS Medicine **4**(4): e118.
- Pepin, E., et coll. (2010). "Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 beta-cells." J Diabetes **2**(3): 157-67.
- Perriello, G., et coll. (1994). "Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production." Diabetes **43**(7): 920-8.
- Peyot, M. L., et coll. (2009). "Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion." J Biol Chem **284**(25): 16848-59.
- Peyot, M. L., et coll. (2010). "Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass." Diabetes **59**(9): 2178-87.
- Pfeiffer, A. F. H. (2008). Oral Hypoglycemic Agents: Sulfonylureas and Meglitinides. Type 2 diabetes : principles and practice. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 97-105.
- Pi, J., et coll. (2007). "Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion." Diabetes **56**(7): 1783-91.
- Piccinni, C., et coll. (2011). "Assessing the association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting." Diabetes Care **34**(6): 1369-71.

- Plengvidhya, N., et coll. (2007). "PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young." J Clin Endocrinol Metab **92**(7): 2821-6.
- Poitout, V., et coll. (2006). "Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids." J Nutr **136**(4): 873-6.
- Pold, R., et coll. (2005). "Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats." Diabetes **54**(4): 928-34.
- Pontiroli, A. E., et coll. (1990). "The glucose clamp technique for the study of patients with hypoglycemia: insulin resistance as a feature of insulinoma." Journal of Endocrinological Investigation **13**(3): 241-5.
- Prentki, M. (1996). "New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion." Eur J Endocrinol **134**(3): 272-86.
- Prentki, M., et coll. (1979). "Actin microfilaments, cell shape, and secretory processes in isolated rat hepatocytes. Effect of phalloidin and cytochalasin D." Journal of Cell Biology **81**(3): 592-607.
- Prentki, M. et Corkey, B. E. (1996). "Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM?" Diabetes **45**(3): 273-83.
- Prentki, M., et coll. (2002). "Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes." Diabetes **51 Suppl 3**: S405-13.
- Prentki, M. et Madiraju, S. R. (2008). "Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease." Endocr Rev **29**(6): 647-76.
- Prentki, M. et Madiraju, S. R. (2012). "Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes." Mol Cell Endocrinol.
- Prentki, M. et Nolan, C. J. (2006). "Islet beta cell failure in type 2 diabetes." J Clin Invest **116**(7): 1802-12.
- Prentki, M. et Renold, A. E. (1983). "Neutral amino acid transport in isolated rat pancreatic islets." J Biol Chem **258**(23): 14239-44.
- Prentki, M., et coll. (1992). "Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion." J Biol Chem **267**(9): 5802-10.
- Prigeon, R. L., Kahn, S. E. et Porte, D., Jr. (1998). "Effect of troglitazone on B cell function, insulin sensitivity, and glycemic control in subjects with type 2 diabetes mellitus." Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **83**(3): 819-23.
- Raeder, H., et coll. (2006). "Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction." Nat Genet **38**(1): 54-62.
- Rasouli, N., et coll. (2007). "Effects of pioglitazone and metformin on beta-cell function in nondiabetic subjects at high risk for type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(1): E359-65.
- Ravnskjaer, K., et coll. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) potentiates, whereas PPARgamma attenuates, glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells." Endocrinology **146**(8): 3266-76.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-607.

- Rebelato, E., et coll. (2011). "Control of the intracellular redox state by glucose participates in the insulin secretion mechanism." PLoS ONE **6**(8): e24507.
- Regensteiner, J. G., Bauer, T. A. et Reusch, J. E. (2005). "Rosiglitazone improves exercise capacity in individuals with type 2 diabetes." Diabetes Care **28**(12): 2877-83.
- Regenthal, R., et coll. (1999). "Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs." J Clin Monit Comput **15**(7-8): 529-44.
- Rhee, S. G. (2006). "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling." Science **312**(5782): 1882-3.
- Riche, D. M. et King, S. T. (2010). "Bone loss and fracture risk associated with thiazolidinedione therapy." Pharmacotherapy **30**(7): 716-27.
- Riepe, M. W., et coll. (1997). "Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning"." Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism **17**(3): 257-64.
- Rizza, R. A., et coll. (1985). "Production of insulin resistance by hyperinsulinaemia in man." Diabetologia **28**(2): 70-5.
- Robert, P., Rey, A. et Rey-Debove, J. (1990). Dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française : le Petit Robert 1. Paris Montréal, Le Robert ; Robert-Canada. 2171 pages.
- Robertson, R. P. (2004). "Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes." J Biol Chem **279**(41): 42351-4.
- Robertson, R. P. (2009). "Beta-cell deterioration during diabetes: what's in the gun?" Trends Endocrinol Metab **20**(8): 388-93.
- Robertson, R. P., et coll. (2004). "Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes." Diabetes **53** Suppl 1: S119-24.
- Roduit, R., et coll. (2004). "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**(4): 1007-19.
- Roncero, I., et coll. (2000). "Functional glucokinase isoforms are expressed in rat brain." Journal of Neurochemistry **74**(5): 1848-57.
- Rosen, E. D., et coll. (2003). "Targeted elimination of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in beta cells leads to abnormalities in islet mass without compromising glucose homeostasis." Molecular and Cellular Biology **23**(20): 7222-9.
- Ruderman, N. et Prentki, M. (2004). "AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome." Nat Rev Drug Discov **3**(4): 340-51.
- Rutter, G. A. et Leclerc, I. (2009). "The AMP-regulated kinase family: enigmatic targets for diabetes therapy." Molecular and Cellular Endocrinology **297**(1-2): 41-9.
- Saha, A. K., et coll. (2004). "Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 580-5.
- Saitoh, Y., et coll. (2008). "Pioglitazone attenuates fatty acid-induced oxidative stress and apoptosis in pancreatic beta-cells." Diabetes, Obesity and Metabolism **10**(7): 564-73.

- Sakai, K., et coll. (2003). "Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells." Biochem Biophys Res Commun **300**(1): 216-22.
- Santini, E., et coll. (2004). "Effect of PPAR-gamma activation and inhibition on glucose-stimulated insulin release in INS-1e cells." Diabetes **53 Suppl 3**: S79-83.
- Sarre, A., et coll. (2012). "Reactive oxygen species are produced at low glucose and contribute to the activation of AMPK in insulin-secreting cells." Free Radic Biol Med **52**(1): 142-50.
- Sato, Y., et coll. (2011). "Cellular hypoxia of pancreatic beta-cells due to high levels of oxygen consumption for insulin secretion in vitro." J Biol Chem **286**(14): 12524-32.
- Schinner, S., et coll. (2009). "Inhibition of human insulin gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and thiazolidinedione oral antidiabetic drugs." Br J Pharmacol **157**(5): 736-45.
- Schuit, F., et coll. (1997). "Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells." J Biol Chem **272**(30): 18572-9.
- Shanik, M. H., et coll. (2008). "Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?" Diabetes Care **31 Suppl 2**: S262-8.
- Shargorodsky, M., et coll. (2003). "Treatment with rosiglitazone reduces hyperinsulinemia and improves arterial elasticity in patients with type 2 diabetes mellitus." Am J Hypertens **16**(8): 617-22.
- Shaw, J. E., Sicree, R. A. et Zimmet, P. Z. (2010). "Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030." Diabetes Res Clin Pract **87**(1): 4-14.
- Shaw, R. J., et coll. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science **310**(5754): 1642-6.
- Shekelle, P. G., et coll. (2005). "Are Ayurvedic herbs for diabetes effective?" Journal of Family Practice **54**(10): 876-86.
- Sheng, H.-P. (2000). Body Fluids and Water Balance. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. M. H. Stipanuk. Philadelphia ; Montréal, W.B. Saunders: 843-865.
- Shimabukuro, M., et coll. (1998). "Troglitazone lowers islet fat and restores beta cell function of Zucker diabetic fatty rats." J Biol Chem **273**(6): 3547-50.
- Shu, L., et coll. (2008). "Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets." Diabetes **57**(3): 645-53.
- Shu, Y., et coll. (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." J Clin Invest **117**(5): 1422-31.
- Silbernagl, S. et Despopoulos, A. (2001). Atlas de poche de physiologie. Paris, Flammarion médecine-sciences. 436 pages.
- Skrha, J., Hilgertova, J. et Justova, V. (1993). "Insulin action in patients with insulinoma influenced by pharmacological and surgical therapy." Experimental and Clinical Endocrinology **101**(6): 360-4.
- Sohda, T., Ikeda, H. et Meguro, K. (1995). "Studies on antidiabetic agents. XII. Synthesis and activity of the metabolites of (+/-)-5(-)[p(-)][2-(5-ethyl-2-pyridyl)ethoxy]benzyl]-2,4- thiazolidinedione (pioglitazone)." Chemical and Pharmaceutical Bulletin **43**(12): 2168-72.

- Somerville, R. (2009). Un tsunami économique: le coût du diabète au Canada. ACD. 22 pages. Décembre 2009.
- Steck, A. K. et Winter, W. E. (2011). "Review on monogenic diabetes." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **18**(4): 252-8.
- Stein, D. T., et coll. (1996). "Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat." J Clin Invest **97**(12): 2728-35.
- Steiner, D. F. (2004). "The proinsulin C-peptide--a multirole model." Exp Diabetes Res **5**(1): 7-14.
- Stephane, X., et coll. (2011). "Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status." Diabetologia **54**(12): 3101-10.
- Stoffers, D. A., et coll. (1997). "Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1." Nat Genet **17**(2): 138-9.
- Storey, K. B. et Storey, J. M. (2007). "Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause'--molecular regulation of hypometabolism." Journal of Experimental Biology **210**(Pt 10): 1700-14.
- Stumvoll, M., Häring, H.-U. et Matthaei, S. (2008). Metformin. Type 2 diabetes : principles and practice. B. J. Goldstein et D. Müller-Wieland. New York, Informa Healthcare: 107-119.
- Sullivan, J. E., et coll. (1994). "Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase." FEBS Letters **353**(1): 33-6.
- Sunaga, Y., et coll. (1999). "Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K(+) channel activity." European Journal of Pharmacology **381**(1): 71-6.
- Surampudi, P. N., John-Kalarickal, J. et Fonseca, V. A. (2009). "Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus." Mt Sinai J Med **76**(3): 216-26.
- T1DBase (2012). "Beta Cell Gene Atlas." Page consultée le 15 mars 2012 à l'adresse <http://t1dbase.org/page/AtlasHome>.
- Takeda (2004). Actos (pioglitazone hydrochloride) Tablets. 3 pages. Août 2004.
- Thorens, B. (2001). "GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review)." Molecular Membrane Biology **18**(4): 265-73.
- Thorens, B. (2010). "Central control of glucose homeostasis: the brain--endocrine pancreas axis." Diabetes Metab **36 Suppl 3**: S45-9.
- Tishinsky, J. M., Robinson, L. E. et Dyck, D. J. (2012). "Insulin-sensitizing properties of adiponectin." Biochimie.
- Tonooka, N., et coll. (2007). "Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation." Clin Transplant **21**(6): 767-72.
- Tontonoz, P., Hu, E. et Spiegelman, B. M. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-56.
- Trube, G., Rorsman, P. et Ohno-Shosaku, T. (1986). "Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K+ channel in mouse pancreatic beta-cells." Pflugers Archiv (European Journal of Physiology) **407**(5): 493-9.
- Tsuboi, T., et coll. (2003). "5'-AMP-activated protein kinase controls insulin-containing secretory vesicle dynamics." J Biol Chem **278**(52): 52042-51.

- Turner, N., et coll. (2008). "Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action." Diabetes **57**(5): 1414-8.
- Ungar, G., Freedman, L. et Shapiro, S. L. (1957). "Pharmacological studies of a new oral hypoglycemic drug." Proc Soc Exp Biol Med **95**(1): 190-2.
- Unger, R. H. et Cherrington, A. D. (2012). "Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover." J Clin Invest **122**(1): 4-12.
- Unger, R. H. et Grundy, S. (1985). "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**(3): 119-21.
- Valera Mora, M. E., et coll. (2003). "Insulin clearance in obesity." J Am Coll Nutr **22**(6): 487-93.
- van de Merbel, N., et coll. (1998). "LC phases improve, but not all assays do: Metformin bioanalysis revisited." Chromatographia **47**(9): 542-546.
- Van Schaftingen, E., Rzem, R. et Veiga-da-Cunha, M. (2009). "L-2-Hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair." Journal of Inherited Metabolic Disease **32**(2): 135-42.
- Vaxillaire, M. et Froguel, P. (2010). The Genetics of Type 2 Diabetes: From Candidate Gene Biology to Genome-wide Studies. Textbook of diabetes. R. I. G. Holt, C. Cockram, A. Flyvbjerg et B. Goldstein. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell: 191-214.
- Viollet, B., et coll. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." Clin Sci (Lond) **122**(6): 253-70.
- Voet, D. et Voet, J. G. (1998). Biochimie. Paris, De Boeck Université. 1361 pages.
- Wajchenberg, B. L. (2010). "Clinical approaches to preserve beta-cell function in diabetes." Adv Exp Med Biol **654**: 515-35.
- Walter, H. et Lubben, G. (2005). "Potential role of oral thiazolidinedione therapy in preserving beta-cell function in type 2 diabetes mellitus." Drugs **65**(1): 1-13.
- Wang, D. S., et coll. (2002). "Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin." J Pharmacol Exp Ther **302**(2): 510-5.
- Wang, D. S., et coll. (2003). "Involvement of organic cation transporter 1 in the lactic acidosis caused by metformin." Molecular Pharmacology **63**(4): 844-8.
- Wang, X., et coll. (2007). "Troglitazone acutely activates AMP-activated protein kinase and inhibits insulin secretion from beta cells." Life Sciences **81**(2): 160-5.
- Wang, Z. et Thurmond, D. C. (2009). "Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins." J Cell Sci **122**(Pt 7): 893-903.
- Watford, M. et Goodridge, A. G. (2000). Regulation of Fuel Utilization. Biochemical and physiological aspects of human nutrition. M. H. Stipanuk. Philadelphia ; Montréal, W.B. Saunders: 384-407.
- Watt, M. J., et coll. (2006). "Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E500-8.

- Watt, M. J., et coll. (2004). "Beta-adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling." FASEB Journal **18**(12): 1445-6.
- Wei, S., Kulp, S. K. et Chen, C. S. (2010). "Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones." J Biol Chem **285**(13): 9780-91.
- Weir, G. C. et Bonner-Weir, S. (2004). "Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes." Diabetes **53 Suppl 3**: S16-21.
- Wiley, S. E., et coll. (2007). "MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(13): 5318-23.
- Wu, M., et coll. (2007). "Metformin-Induced Inhibition of Mitochondrial Complex I Activity Stimulates Fatty Acid Oxidation and Glycolysis While Blunting Glucose Oxidation in C2C12 Myocytes." Page consultée le 10 novembre 2012 à l'adresse http://www.seahorsebio.com/resources/posters/2007-06-17_wu_metformin-induced.pdf.
- Xiang, A. H., et coll. (2006). "Effect of pioglitazone on pancreatic beta-cell function and diabetes risk in Hispanic women with prior gestational diabetes." Diabetes **55**(2): 517-22.
- Yamagata, K., et coll. (1996). "Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1)." Nature **384**(6608): 458-60.
- Yamagata, K., et coll. (1996). "Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3)." Nature **384**(6608): 455-8.
- Yang, L. X., et coll. (2011). "Research progress on the mechanism of single-Chinese medicinal herbs in treating diabetes mellitus." Chin J Integr Med **17**(3): 235-40.
- Ye, J. M., et coll. (2004). "Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin." Diabetologia **47**(7): 1306-13.
- Yin, J., Xing, H. et Ye, J. (2008). "Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus." Metabolism: Clinical and Experimental **57**(5): 712-7.
- Yin, W., Mu, J. et Birnbaum, M. J. (2003). "Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes." J Biol Chem **278**(44): 43074-80.
- Yoa, R. G., et coll. (1993). "Demonstration of defective glucose uptake and storage in erythrocytes from non-insulin dependent diabetic patients and effects of metformin." Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **20**(9): 563-7.
- Yoshiuchi, K., et coll. (2009). "Pioglitazone reduces ER stress in the liver: direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice." Endocrine Journal **56**(9): 1103-11.
- Youos, J. G. (2011). "The role of alpha-, delta- and F cells in insulin secretion and action." Diabetes Research and Clinical Practice **93 Suppl 1**: S25-6.
- Yu, L., et coll. (2012). "Rosiglitazone selectively inhibits K(ATP) channels by acting on the K(IR) 6 subunit." Br J Pharmacol.

- Zang, M., et coll. (2004). "AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells." J Biol Chem **279**(46): 47898-905.
- Zhang, F., et coll. (2009). "BLX-1002, a novel thiazolidinedione with no PPAR affinity, stimulates AMP-activated protein kinase activity, raises cytosolic Ca²⁺, and enhances glucose-stimulated insulin secretion in a PI3K-dependent manner." Am J Physiol Cell Physiol **296**(2): C346-54.
- Zhang, F., Sjöholm, A. et Zhang, Q. (2006). "Pioglitazone acutely influences glucose-sensitive insulin secretion in normal and diabetic human islets." Biochemical and Biophysical Research Communications **351**(3): 750-5.
- Zhang, L., et coll. (2010). "Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle." Biochimica et Biophysica Acta **1801**(1): 1-22.
- Zhou, G., et coll. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-74.

Annexe A – Estimation de la concentration intracellulaire de metformine

Méthode 1 :

Si les protéines contribuent à 17% du poids humide d'un tissu (McNurlan et Garlick 2000), alors :

$$\begin{aligned} 1 \text{ mg de protéines} &= (1 \text{ mg protéines} * 100 \text{ mg matériel}) / 17 \text{ mg protéines} \\ &\approx 6 \text{ mg de matériel} \end{aligned}$$

Et si l'eau représente 73% de la masse d'un tissu (Sheng 2000), alors :

$$\begin{aligned} 6 \text{ mg de matériel} &= 4,4 \text{ mg d'eau} \\ &\approx 4,4 \mu\text{L d'eau} \end{aligned}$$

Donc pour 1 mg de protéines cellulaires il y a environ 4,4 μL d'eau.

Ainsi, pour 25 nmol de metformine par mg de protéines :

$$\begin{aligned} \text{Concentration de metformine} &= 25 \times 10^{-9} \text{ mol} / 4,4 \times 10^{-6} \text{ L} \\ &= 5,7 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \\ &= 5,7 \text{ mmol/L} \end{aligned}$$

Méthode 2 :

Si 60% du poids sec d'un tissu provient des protéines (Alberts 1989), alors :

$$1 \text{ mg de protéines} = 1,7 \text{ mg de matériel sec}$$

Et si 50% du poids humide d'un tissu provient de l'eau (Prentki et coll. 1979), alors :

$$\begin{aligned} 1,7 \text{ mg de matériel sec} &= 1,7 \text{ mg d'eau} \\ &\approx 1,7 \mu\text{L d'eau} \end{aligned}$$

Donc pour 1 mg de protéines cellulaires il y a environ 1,7 μL d'eau.

Ainsi, pour 25 nmol de metformine par mg de protéines :

$$\begin{aligned} \text{Concentration de metformine} &= 25 \times 10^{-9} \text{ mol} / 1,7 \times 10^{-6} \text{ L} \\ &= 14,7 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \\ &= 14,7 \text{ mmol/L} \end{aligned}$$