

Université de Montréal

**Étude de l'implication des navettes du pyruvate découlant du
métabolisme mitochondrial du glucose dans la régulation de la sécrétion
d'insuline par les cellules β pancréatiques**

par

Claudiane Guay

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de médecine

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

Janvier 2010

© Claudiane Guay, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de l'implication des navettes du pyruvate découlant du métabolisme mitochondrial
du glucose dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques

présentée par :
Claudiane Guay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur
Marc Prentki, directeur de recherche
Christine Des Rosiers, membre du jury
Siegfried Hekimi, examinateur externe
Stéphanie Fulton, Représentante du doyen de la FES

Résumé

Le diabète est une maladie métabolique qui se caractérise par une résistance à l'insuline des tissus périphériques et par une incapacité des cellules β pancréatiques à sécréter les niveaux d'insuline appropriés afin de compenser pour cette résistance. Pour mieux comprendre les mécanismes déficients dans les cellules β des patients diabétiques, il est nécessaire de comprendre et de définir les mécanismes impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans les cellules β pancréatiques, le métabolisme du glucose conduit à la production de facteurs de couplage métabolique, comme l'ATP, nécessaires à la régulation de l'exocytose des vésicules d'insuline. Le mécanisme par lequel la production de l'ATP par le métabolisme oxydatif du glucose déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline est bien décrit dans la littérature. Cependant, il ne peut à lui seul réguler adéquatement la sécrétion d'insuline. Le malonyl-CoA et le NADPH sont deux autres facteurs de couplage métaboliques qui ont été suggérés afin de relier le métabolisme du glucose à la régulation de la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués demeurent cependant à être caractérisés.

Le but de la présente thèse était de déterminer l'implication des navettes du pyruvate, découlant du métabolisme mitochondrial du glucose, dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Dans les cellules β , les navettes du pyruvate découlent de la combinaison des processus d'anaplérose et de cataplérose et permettent la transduction des signaux métaboliques provenant du métabolisme du glucose. Dans une première étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la navette pyruvate/citrate dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, puisque cette navette conduit à la production dans le cytoplasme de deux facteurs de couplage métabolique, soit le malonyl-CoA et le NADPH. De plus, la navette pyruvate/citrate favorise le flux métabolique à travers la glycolyse en réoxydation le NADH. Une étude effectuée précédemment dans notre laboratoire avait suggéré la présence de cette navette dans les cellules β pancréatique. Afin de tester notre hypothèse, nous avons ciblé trois étapes de cette navette dans la lignée cellulaire β pancréatique INS 832/13, soit la sortie du citrate de la mitochondrie et l'activité

de l'ATP-citrate lyase (ACL) et l'enzyme malique (MEc), deux enzymes clés de la navette pyruvate/citrate. L'inhibition de chacune de ces étapes par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique ou de la technologie des ARN interférant a corrélé avec une réduction significative de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les résultats obtenus suggèrent que la navette pyruvate/citrate joue un rôle critique dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Parallèlement à notre étude, deux autres groupes de recherche ont suggéré que les navettes pyruvate/malate et pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate étaient aussi importantes pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, trois navettes découlant du métabolisme mitochondrial du glucose pourraient être impliquées dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. Le point commun de ces trois navettes est la production dans le cytoplasme du NADPH, un facteur de couplage métabolique possiblement très important pour la sécrétion d'insuline. Dans les navettes pyruvate/malate et pyruvate/citrate, le NADPH est formé par MEc, alors que l'isocitrate déshydrogénase (IDHc) est responsable de la production du NADPH dans la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate. Dans notre première étude, nous avons démontré l'importance de l'expression de ME pour la sécrétion adéquate d'insuline en réponse au glucose. Dans notre deuxième étude, nous avons testé l'implication de IDHc dans les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La diminution de l'expression de IDHc dans les INS 832/13 a stimulé la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par un mécanisme indépendant de la production de l'ATP par le métabolisme oxydatif du glucose. Ce résultat a ensuite été confirmé dans les cellules dispersées des îlots pancréatiques de rat. Nous avons aussi observé dans notre modèle que l'incorporation du glucose en acides gras était augmentée, suggérant que la diminution de l'activité de IDHc favorise la redirection du métabolisme de l'isocitrate à travers la navette pyruvate/citrate. Un mécanisme de compensation à travers la navette pyruvate/citrate pourrait ainsi expliquer la stimulation de la sécrétion d'insuline observée en réponse à la diminution de l'expression de IDHc. Les travaux effectués dans cette deuxième étude remettent en question l'implication de l'activité de IDHc, et de la

navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate, dans la transduction des signaux métaboliques reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline.

La navette pyruvate/citrate est la seule des navettes du pyruvate à conduire à la production du malonyl-CoA dans le cytoplasme des cellules β . Le malonyl-CoA régule le métabolisme des acides gras en inhibant la carnitine palmitoyl transférase 1, l'enzyme limitante dans l'oxydation des acides gras. Ainsi, l'élévation des niveaux de malonyl-CoA en réponse au glucose entraîne une redirection du métabolisme des acides gras vers les processus d'estérification puis de lipolyse. Plus précisément, les acides gras sont métabolisés à travers le cycle des triglycérides/acides gras libres (qui combinent les voies métaboliques d'estérification et de lipolyse), afin de produire des molécules lipidiques signalétiques nécessaires à la modulation de la sécrétion d'insuline. Des études effectuées précédemment dans notre laboratoire ont démontré que l'activité lipolytique de HSL (de l'anglais hormone-sensitive lipase) était importante, mais non suffisante, pour la régulation de la sécrétion d'insuline. Dans une étude complémentaire, nous nous sommes intéressés au rôle d'une autre lipase, soit ATGL (de l'anglais adipose triglyceride lipase), dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. Nous avons démontré que ATGL est exprimé dans les cellules β pancréatiques et que son activité contribue significativement à la lipolyse. Une réduction de son expression dans les cellules INS 832/13 par RNA interférant ou son absence dans les îlots pancréatiques de souris déficientes en ATGL a conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en présence ou en absence d'acides gras. Ces résultats appuient l'hypothèse que la lipolyse est une composante importante de la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette thèse suggèrent que la navette pyruvate/citrate est importante pour la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ce mécanisme impliquerait la production du NADPH et du malonyl-CoA dans le cytoplasme en fonction du métabolisme du glucose. Cependant, nos travaux remettent en question l'implication de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate dans la régulation de

la sécrétion d'insuline. Le rôle exact de IDHc dans ce processus demeure cependant à être déterminé. Finalement, nos travaux ont aussi démontré un rôle pour ATGL et la lipolyse dans les mécanismes de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline.

Mots-clés : Cellules bêta pancréatiques, Sécrétion d'insuline, Métabolisme du glucose, Anaplérose, Navettes du pyruvate, Navette pyruvate/citrate, Facteurs de couplage métaboliques, NADPH

Abstract

Diabetes is a metabolic disorder characterized by a combination of insulin resistance in peripheral tissues with an inappropriate amount of insulin secreted by the pancreatic β -cells to overcome this insulin resistance. In order to help find a cure for diabetic patients, we need to elucidate the mechanisms underlying the proper control of insulin secretion in response to glucose. In pancreatic β -cells, glucose metabolism leads to the production of metabolic coupling factors, like ATP, implicated in the regulation of insulin vesicle exocytosis. The mechanism linking ATP production by the oxidative metabolism of glucose to the triggering of insulin release that involves Ca^{2+} and metabolically sensitive K^+ channels is relatively well known. Other mechanisms are also involved in the regulation of insulin secretion in response to glucose and other nutrients, such as fatty acids and some amino acids. Malonyl-CoA and NADPH are two metabolic coupling factors that have been suggested to be implicated in the transduction of metabolic signaling coming from glucose metabolism to control the release of insulin granules. However, the mechanisms implicated remained to be defined.

The goal of the present thesis was to further our understanding of the role of the pyruvate shuttles, derived from mitochondrial glucose metabolism, in the regulation of insulin secretion. In pancreatic β -cells, pyruvate shuttles are produced by the combination of anaplerosis and cataplerosis processes and are thought to link glucose metabolism to the regulation of insulin secretion by the production metabolic coupling factors. In our first study, we wished to determine the role of the pyruvate/citrate shuttle in the regulation of glucose-induced insulin secretion. The pyruvate/citrate shuttle leads to the production in the cytoplasm of both malonyl-CoA and NADPH and also stimulates the metabolic flux through the glycolysis by re-oxidating NADH. A previous study done in the group of Dr Prentki has suggested the feasibility of the pyruvate/citrate shuttle in pancreatic β -cells. To investigate our hypothesis, we inhibited three different steps of this shuttle in INS 832/13 cells, a pancreatic β -cell line. Specifically, we repressed, using pharmacological inhibitors or RNA interference technology, the mitochondrial citrate export to the cytoplasm and the

expression of malic enzyme (MEc) and ATP-citrate lyase (ACL), two key enzymes implicated in the pyruvate/citrate shuttle. The inhibition of each of those steps resulted in a reduction of glucose-induced insulin secretion. Our results underscore the importance of the pyruvate/citrate shuttle in the pancreatic β -cell signaling and the regulation of insulin secretion in response to glucose.

Other research groups are also interested in studying the implication of pyruvate cycling processes in the regulation of insulin exocytosis. They suggested a role for the pyruvate/malate and the pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate shuttles. Therefore, three different shuttles derived from the mitochondrial glucose metabolism could be implicated in the regulation of glucose-induced insulin release. All those three shuttles can produce NADPH in the cytoplasm. In the pyruvate/malate and the pyruvate/citrate shuttles, the NADPH is formed by cytosolic malic enzyme (MEc), whereas in the pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate, NADPH is produced by cytosolic isocitrate dehydrogenase (IDHc). In our first study, we established the importance of MEc expression in the regulation of insulin secretion. In our second study, we wanted to investigate the importance of IDHc expression in glucose-induced insulin secretion. The reduction of IDHc expression in INS 832/13 cells stimulated insulin release in response to glucose by a mechanism independent of ATP production coming from glucose oxidative metabolism. This stimulation was also observed in isolated rat pancreatic cells. IDHc knockdown cells showed elevated glucose incorporation into fatty acids, suggesting that isocitrate metabolism could be redirected into the pyruvate/citrate shuttle in these cells. Taken together, these results suggest that IDHc is not essential for glucose-induced insulin secretion and that a compensatory mechanism, probably involving the pyruvate/citrate shuttle, explains the enhanced insulin secretion in IDHc knockdown cells .

The pyruvate/citrate shuttle is the only pyruvate shuttle that is linked to the production of malonyl-CoA. Malonyl-CoA is a known inhibitor of carnitine palmitoyl transferase 1, the rate-limiting step in fatty acid oxidation. Therefore, the raising level of malonyl-CoA in response to glucose redirects the metabolism of fatty acids into the

triglycerides/free fatty acids cycle which combine esterification and lipolysis processes. Previous studies done in the laboratory of Dr Prentki supported the concept that lipolysis of endogenous lipid stores is an important process for the appropriate regulation of insulin secretion. A first lipase, hormone-sensitive lipase (HSL), has been identified in pancreatic β -cells. HSL expression is important, but not sufficient, for the β -cell lipolysis activity. In a complementary study, we have investigated the role of another lipase, adipose triglyceride lipase (ATGL), in the regulation of insulin secretion in response to glucose and to fatty acids. We first demonstrated the expression and the activity of ATGL in pancreatic β -cells. Reducing ATGL expression using shRNA in INS 832/13 cells caused a reduction in insulin secretion in response to glucose and to fatty acids. Pancreatic islets from ATGL null mice also showed defect in insulin release in response to glucose and to fatty acids. The results demonstrate the importance of ATGL and intracellular lipid signaling in the regulation of insulin secretion.

In conclusion, the work presented in this thesis suggests a role for the pyruvate/citrate shuttle in the regulation of insulin secretion in response to glucose. This mechanism possibly implicates the production of NADPH and malonyl-CoA in the cytoplasm. The results also points to a re-evaluation of the role of IDHc in glucose-induced insulin secretion. The precise role of IDHc in pancreatic β -cells needs to be determined. Finally, the data have also documented a role of lipolysis and ATGL in the coupling mechanisms of insulin secretion in response to both fuel and non-fuel stimuli.

Keywords: Pancreatic beta cells, Insulin secretion, Glucose metabolism, Anaplerosis, Pyruvate cycling, Pyruvate/citrate shuttle, metabolic coupling factors, NADPH

Table des matières

Résumé de la thèse	iii
Résumé en anglais (abstract) de la thèse	vii
Table des matières	x
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements	xix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
I LE DIABÈTE	2
A. Définitions et chiffres reliés au diabète.....	2
B. Les différents types de diabète	3
C. L'étiologie du diabète de type 2.....	4
1. Les facteurs environnementaux	5
2. Les facteurs génétiques	5
D. L'homéostasie du glucose.....	8
E. La pathogenèse du diabète de type 2.....	9
II LE MÉTABOLISME DES CELLULES β PANCREATIQUES.....	10
A. Le glucose	10
1. Transport cellulaire	11
2. Métabolisme dans le cytoplasme et la mitochondrie	12
2.1 La glycolyse	12
2.2 Les navettes du NADH	15
2.3 Le cycle de Krebs.....	18
2.4 La phosphorylation oxydative.....	20
2.5 L'anaplérose.....	21
B. Les acides gras	22

1.	Transport cellulaire	23
2.	Métabolisme intracellulaire.....	23
2.1	β -oxydation	24
2.2	Estérification	27
2.3	Lipolyse.....	28
C.	Influence du métabolisme du glucose sur celui des acides gras	30
III	LA SÉCRÉTION D'INSULINE PAR LES CELLULES β PANCRÉATIQUES.....	31
A.	Les caractéristiques générales de la sécrétion d'insuline.....	32
1.	La structure des îlots de Langerhans.....	32
2.	Le profil biphasique de la sécrétion d'insuline	33
3.	Les sécrétagogues.....	35
3.1	Nutriments.....	35
3.2	Hormones	39
3.3	Neurotransmetteurs	40
B.	La voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline.....	41
C.	La voie d'amplification de la sécrétion d'insuline.....	43
D.	Les facteurs de couplage métaboliques.....	44
1.	ATP	45
2.	Malonyl-CoA	46
3.	Glutamate	49
4.	Les ROS	51
5.	NADPH.....	52
E.	L'implication du métabolisme mitochondrial du glucose.....	54
1.	L'entrée du pyruvate dans la mitochondrie.....	54
2.	L'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs	54
2.1	Via la pyruvate déshydrogénase.....	55
2.2	Via la pyruvate carboxylase	55
3.	L'export mitochondrial d'intermédiaires du cycle de Krebs	57
4.	Le cycle du pyruvate	58

4.1 Navette pyruvate/malate	58
4.2 Navette pyruvate/citrate	59
4.3 Navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate	60
IV MISE EN CONTEXTE DE LA THÈSE	61
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS	65
Article 1.....	66
Article 2.....	100
Article 3.....	131
CHAPITRE 3 : DISCUSSION.....	173
Bibliographie.....	205
Annexe 1	235

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de diagnostique de l'hyperglycémie et du diabète selon l'Organisation Mondiale de la Santé.....	2
---	---

Liste des figures

Figure 1 : Le métabolisme du glucose à travers la glycolyse	14
Figure 2 : Les navettes du NADH.....	16
Figure 3 : Le métabolisme du pyruvate à travers le cycle de Krebs	19
Figure 4 : La chaîne de transport des électrons.....	20
Figure 5 : Transport des acyl-CoA du cytoplasme à la mitochondrie.....	24
Figure 6 : La β -oxydation des acides gras.....	26
Figure 7 : L'estérification des acyl-CoA.....	27
Figure 8 : Le cycle des triglycérides / acides gras libres.....	29
Figure 9 : Les îlots de Langerhans du pancréas	32
Figure 10 : Les deux phases de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.....	34
Figure 11 : Le modèle des trois cycles de la transduction des signaux métaboliques régulant la sécrétion d'insuline en réponse aux nutriments	38
Figure 12 : La voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline	42
Figure 13 : Le rôle du malonyl-CoA dans la sécrétion d'insuline	48
Figure 14 : Les navettes du pyruvate	59
Figure 15 : L'inhibition de la nNOS stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.	236

Liste des abréviations

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ACL : ATP-citrate lyase

ADP : adénosine diphosphate

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATGL : adipose triglyceride lipase

ATP : adénosine triphosphate

$[Ca^{2+}]_i$: concentration intracellulaire des ions calciques

CACT : carnitine/acylcarnitine translocase

Canaux K_{ATP} : canaux potassiques dépendant de l'ATP

CCVD : canaux calciques voltage-dépendant

CoA : coenzyme A

CoQ : coenzyme Q

CPT-1 ou -2 : carnitine palmitoyl transférase-1 ou -2

CTÉ : chaîne de transport des électrons

DAG : diacylglycérol

DPP-4 : dipeptidyl peptidase 4

FAD : flavine adénine dinucléotide, forme oxydée

FADH₂ : flavine adénine dinucléotide, forme réduite

FABP : fatty acid binding protein

FATP : fatty acid transport protein

FeS : groupement fer/soufre

FMN : flavine mononucléotide

cGMP : guanosine monophosphate cyclique

cGlyDP : isoforme cytosolique de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase

mGlyDP : isoforme mitochondriale de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase

GIP : glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
GRP : gastrin-release peptide
GTP : guanosine triphosphate
HSL : hormone sensitive lipase
IDH : isocitrate déshydrogénase
IDHc : isoforme cytosolique de l'isocitrate déshydrogénase
IRS1 : insulin receptor substrate 1
 K_M : constante de Michaelis-Menten
 K_v : canaux potassiques dépendant du voltage
LC-CoA : acyl-CoA ayant une longue chaîne aliphatique
LPA : acide lysophosphatidique
MCD : malonyl-CoA décarboxylase
ME : enzyme malique
MEc : isoforme cytosolique de l'enzyme malique
MODY : maturity-onset diabetes of the young
 NAD^+ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
 $NADP^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NOS : nitric oxide synthase
nNOS : l'isoforme neuronal de la NOS
PA: acide phosphatidique
PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PC : pyruvate carboxylase
PDH : pyruvate déshydrogénase
Pfu : plate-forming unit
PIN : protéine inhibitrice de la nNOS
PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

RNAi : ARN interférant

ROS : reactive oxigen species

shRNA : short-hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

TG : triglycérade

VLDL : very low density lipoprotein

Vmax : vitesse maximale

ZDF : Zucker Diabetic Fatty

ZF : Zucker Fatty

ZL : Zucker Lean

*À mes parents, Louise et André, qui m'ont
toujours encouragée à poursuivre mes rêves...*

Remerciements

Cette thèse est le fruit de nombreuses années de travail. J'aimerais remercier tous ceux qui, de près comme de loin, ont contribué à sa réalisation.

Plus particulièrement, je voudrais remercier mon directeur de thèse, le Dr Marc Prentki. J'ai acquis une formation scientifique exceptionnelle sous sa direction et je lui en suis reconnaissante. Je le remercie aussi pour son support et sa confiance face aux aléas de la recherche expérimentale.

Un merci des plus sincères à Érik Joly, un associé de recherche indispensable à la réalisation de ce projet. Je le remercie de m'avoir conseillé tout au long de mon doctorat et d'avoir su aller chercher le meilleur de moi-même. Je lui exprime toute ma gratitude.

J'aimerais remercier tous les membres du labo Prentki que j'ai côtoyés durant ces années. Ce fût un plaisir de travailler à vos côtés. Je vous remercie pour vos conseils, pour votre aide, pour votre écoute et pour avoir partagé avec moi les hauts et les bas de la science! J'ai joint une équipe exceptionnelle et je remercie chacun d'entre vous d'avoir partagé votre expertise. Je voudrais exprimer un merci plus spécial à tous ceux qui m'ont aidé dans l'avancement de mon projet.

Finalement, je ne peux passer sous silence l'importance de ma famille et de mes amis. Je vous remercie d'avoir partagé ces années avec moi, mais je vous remercie surtout d'avoir assuré mon équilibre mental... et de faire partie de ma vie!

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

I LE DIABÈTE

A. Définitions et chiffres reliés au diabète

Le diabète, communément appelé diabète sucré, est une maladie du métabolisme des glucides. Les principaux symptômes sont l'hyperglycémie, la glycosurie, la polydipsie et la polyurie. Le diabète est diagnostiqué à partir des niveaux de sucre dans le sang (glycémie) à jeun et suite au test de la prise orale de 75 g de glucose (voir Tableau 1). Chez les individus sains, la glycémie se situe en dessous des 6,1 mmol/L à jeun et n'atteint pas les 7,8 mmol/L dans les deux heures suivant le test oral. Chez les personnes diabétiques, la glycémie dépasse les 7,0 mmol/L à jeun et augmente à plus de 11,1 mmol/L suivant le test oral (Stumvoll *et al.* 2005).

Tableau 1 : Critères de diagnostique de l'hyperglycémie et du diabète selon l'Organisation Mondiale de la Santé

Diagnostique	Concentration plasmatique du glucose (mmol/L)	
	à jeun	2 h suivant la prise orale
Normoglycémique	< 6,1	< 7,8
Hyperglycémie à jeun	entre 6,1 et 7,0	< 7,8
Intolérance au glucose	< 7,0	entre 7,8 et 11,1
Diabète sucré	≥ 7,0	≥ 11,1

La mesure de la glycémie permet aussi de diagnostiquer les patients à risque de développer le diabète. Une personne ayant une glycémie à jeun entre 6,1 et 7,0 mmol/L est considérée comme souffrant d'hyperglycémie alors que celle dont la glycémie se situe entre 7,8 et 11,1 mmol/L suite au test oral est diagnostiquée intolérante au glucose. Les patients

souffrant d'hyperglycémie ou d'intolérance au glucose sont considérés comme pré-diabétiques puisque 6% d'entre eux développeront le diabète chaque année s'ils ne sont pas traités (Tuomilehto *et al.* 2001).

Au Canada, le nombre de personnes souffrant du diabète a été estimé à plus de 2 millions au début des années 2000 et devrait atteindre les 3 millions d'ici 2010 (Association Canadienne du Diabète). Le diabète est aussi la cause de plus de 10% de tous les cas de décès enregistrés chaque année chez les adultes. À l'échelle internationale, au-delà de 170 millions de gens souffraient du diabète au début des années 2000, et ce chiffre devrait atteindre les 300 millions d'ici 2025. La prévalence du diabète ne cesse d'augmenter, prenant ainsi des proportions épidémiques (King *et al.* 1998; Wild *et al.* 2004). Par exemple, il a été estimé qu'un américain sur trois nés après l'an 2000 développerait le diabète au courant de sa vie (Narayan *et al.* 2003).

À ce jour, le diabète demeure une maladie incurable et les coûts associés aux traitements des patients diabétiques sont faramineux (Klonoff et Schwartz 2000). À moyen ou long terme, les patients diabétiques développent des complications reliées à des troubles macro- ou micro-vasculaires, tels la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. De plus, le diabète représente une cause majeure du développement des maladies cardiovasculaires. Les diabétiques ont de deux à quatre fois plus de risque d'être atteints de morbidité ou de mortalité cardiovasculaire que les non diabétiques (Zimmet *et al.* 2001). Globalement, les patients diabétiques ont deux fois plus de risque de mourir prématurément que les patients non diabétiques (Stolar et Chilton 2003).

B. Les différents types de diabète

La maladie du diabète est subdivisée en trois groupes : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel.

Le diabète gestationnel apparaît chez certaines femmes enceintes vers la fin du 2^e ou durant le 3^e trimestre. Seulement de 2 à 4 % des femmes développent le diabète lors de leur

grossesse et, dans près de 90 % des cas, le diabète disparaît suite à l'accouchement (Di Cianni *et al.* 2003; Ben-Haroush *et al.* 2004). Cependant, des effets à long terme ont été observés chez les mères et leur bébé. Les femmes qui ont souffert du diabète durant leur grossesse demeurent plus à risque de développer le diabète de type 2 au cours de leur vie (Buchanan et Xiang 2005). Le diabète gestationnel affecte aussi les bébés qui ont généralement un poids plus élevé à la naissance et ont plus de chance d'être atteint du diabète à leur tour (Kaaaja et Ronnema 2008).

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune lors de laquelle les cellules productrices d'insuline, les cellules β pancréatiques, sont détruites par le système immunitaire (Devendra *et al.* 2004). Les diabétiques de type 1 sont donc incapables de produire de l'insuline. Les causes exactes de l'apparition du diabète de type 1 sont encore méconnues. Cette maladie survient généralement au début de l'adolescence, mais elle peut aussi se déclarer durant l'enfance ou à l'âge adulte. Environ 5 à 10 % des personnes diabétiques sont atteints de diabète de type 1 (Association Canadienne du Diabète).

Le diabète de type 2 se caractérise par une résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline et par une incapacité des cellules β pancréatiques à sécréter des niveaux adéquats d'insuline (AmericanDiabetesAssociation 2005). Le diabète de type 2 apparaît généralement chez les adultes de plus de 40 ans. Par contre, la sédentarité et la suralimentation reliée au style de vie moderne favorisent le développement de la maladie de plus en plus jeune. Plus de 90 % des personnes diabétiques souffrent du diabète de type II (Association Canadienne du Diabète). Bien que le nombre de patients atteints du diabète de type 2 ne cesse de croître à un rythme effréné, les différents aspects physiologiques reliés au développement de cette maladie commencent seulement à être mieux compris.

C. L'étiologie du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie complexe du métabolisme du glucose dont la progression est influencée par un ensemble de facteurs environnementaux et génétiques.

1. *Les facteurs environnementaux*

Divers facteurs environnementaux sont connus pour influencer le développement du diabète de type 2, dont l'âge, le sexe, la forme physique, l'alimentation et la cigarette (Gerich 1998). Parmi eux, la suralimentation et la sédentarité, associées au style de vie moderne, sont les deux principaux facteurs environnementaux aggravant la prévalence du diabète de type 2. En effet, le déséquilibre entre l'apport calorique et les dépenses énergétiques de l'organisme conduit à la prise de poids substantielle. Collectivement, les habitudes de la vie moderne conduisent à l'augmentation dramatique du nombre de personnes souffrant d'obésité et de diverses maladies qui lui sont associé, tel que le diabète (Zimmet *et al.* 2001).

L'importance des facteurs environnementaux dans la progression de la maladie du diabète a été mise en évidence par une série d'étude visant à modifier les habitudes de la vie moderne (Tuomilehto *et al.* 2001; Knowler *et al.* 2002). Par exemple, l'amélioration de la diète alimentaire (diminution du contenu en gras et élévation de celui en fibres) combinée à l'augmentation de l'activité physique chez des patients intolérant au glucose et ayant un surplus de poids a conduit à une diminution de 36% de l'incidence du diabète (Lindstrom *et al.* 2006). Ainsi, une alimentation saine et équilibrée combinée à une activité physique régulière contribue à réduire l'apparition du diabète chez des personnes ayant une susceptibilité pour cette maladie.

2. *Les facteurs génétiques*

L'hérédité est un facteur clé qui prédispose les enfants dont les parents sont diabétiques à développer eux aussi cette pathologie au cours de leur vie (Permutt *et al.* 2005). Une étude effectuée auprès de jumeaux identiques a confirmé le rôle de la génétique dans la susceptibilité de certaines personnes à être atteintes du diabète de type 2 (Poulsen *et al.* 1999). Les études génétiques ont permis d'identifier certains gènes associés au diabète de type 2. Ces gènes sont regroupés sous deux appellations : les gènes de susceptibilité au diabète et les diabétogènes.

Comme leur nom l'indique, les gènes de susceptibilité au diabète favorisent l'apparition de la maladie. Cependant, ces gènes ne sont pas spécifiques au diabète et une mutation dans leur séquence d'ADN n'est pas suffisante pour causer la maladie. Par exemple, les gènes reliés à l'obésité sont connus pour augmenter les risques de développer le diabète, mais sont aussi reliés à d'autres désordres métaboliques comme les maladies cardiovasculaires (Gerich 1998). Ces gènes sont malgré tout considérés comme des déterminants génétiques dans l'apparition du diabète de type 2 puisqu'ils favorisent le développement de cette pathologie.

Les gènes du diabète, aussi appelés diabétoènes, réfèrent aux gènes spécifiquement reliés au diabète de type 2. Plusieurs causes génétiques conduisant à la forme monogénique du diabète (c'est-à-dire lorsqu'une mutation ou un polymorphisme dans un seul gène conduit au développement du diabète) ont été élucidées dans les dernières années (Malecki et Mlynarski 2008). Plusieurs mutations ou polymorphismes retrouvés chez certains gènes ont été regroupés sous l'appellation du diabète de la mitochondrie (pour les mutations associées au génome de la mitochondrie), du diabète néonatal permanent (pour les mutations causant l'apparition du diabète dans les 6 premiers mois de vie du nourrisson) et de MODY (de l'anglais Maturity-Onset Diabetes of the Young) (Malecki et Mlynarski 2008). Les cas les mieux définis de la forme monogénique du diabète sont les MODY (Tattersall et Fajans 1975). Les MODY se caractérisent par une transmission héréditaire autosomique dominante et par l'apparition du diabète de type 2 à un jeune âge (généralement avant 25 ans). Fait intéressant, les MODY entraînent un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques qui conduit au développement du diabète (Fajans *et al.* 2001). Le phénotype de MODY résulte de mutations à un des six gènes identifiés. Un de ses gènes code pour la glucokinase, une enzyme clé dans le métabolisme du glucose (voir Section II A.2.1) et réfère au MODY2. Les autres gènes codent pour des facteurs de transcription, soit HNF-4 α , HNF-1 α , Pdx-1, HNF-1 β et NeuroD1 et correspondent à MODY1 et MODY3 à 6, respectivement. Environ de 2 à 5% de tous les cas de diabètes sont causés par les MODY (Giuffrida et Reis 2005).

Le diabète est cependant une maladie très hétérogène et généralement polygénique. Ainsi, plusieurs diabétogènes n'entraînent pas à eux seuls l'apparition du diabète de type 2, ce qui complique leur identification. D'importantes études d'association génomique ont été effectuées ces dernières années afin d'identifier des gènes comprenant des polymorphismes ou des mutations qui pourraient être reliés spécifiquement au diabète de type 2. Plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés pour leur association à un polymorphisme prédominant chez les diabétiques de type 2 (Prokopenko *et al.* 2008) et la majorité d'entre-eux sont reliés à la fonction de la cellule β pancréatique. La calpain-10 (Horikawa *et al.* 2000), KCNJ11 (Altshuler *et al.* 2000), PPAR- γ (Gloyn *et al.* 2003), HHEX (Saxena *et al.* 2007) et TCF7L2 (Grant *et al.* 2006; Sladek *et al.* 2007) sont des exemples de gènes de susceptibilité reliés au diabète de type 2. L'importance de ces études génétiques est mise en évidence par l'identification de TCF7L2. En effet, TCF7L2 est le premier gène de susceptibilité au diabète de type 2 à avoir été identifié sans la connaissance au préalable d'un lien avec cette maladie (Grant *et al.* 2006). TCF7L2 est un facteur de transcription impliqué dans la voie signalétique de Wnt. Des études subséquentes ont permis de suggérer un rôle pour TCF7L2 dans la prolifération et la fonction sécrétoire des cellules β pancréatiques et ainsi dans la régulation de GLP-1 (de l'anglais glucagon-like peptide-1), une hormone sécrétée par les cellules L de l'intestin et connue pour son rôle bénéfique sur les cellules β pancréatiques (voir Section III A.3.2) (Jin et Liu 2008).

De son côté, la méta-analyse de trois cohortes a conduit à l'identification d'un nouveau polymorphisme situé près du gène de IRS1 (de l'anglais insulin receptor substrate 1) et qui serait associé directement au diabète de type 2 (Rung *et al.* 2009). IRS1 est une protéine impliquée dans la voie signalétique du récepteur à l'insuline. Le polymorphisme identifié conduit à une diminution de l'expression d'IRS1 dans les muscles squelettiques et a été associé à une augmentation de la résistance à l'insuline des tissus périphériques combiné à une hyperinsulinémie chez les individus porteurs (Rung *et al.* 2009). Cette étude met en évidence les risques associés au développement du diabète de type 2 chez les individus ayant des prédispositions génétiques affectant la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques.

En résumé, d'importantes études d'association génomique effectuées dans les dernières années ont permis l'identification de gènes de susceptibilité au diabète de type 2. Ces études permettent de mieux comprendre l'aspect de prédisposition génétique de la maladie. Ainsi, le diabète de type 2 apparaît chez les personnes génétiquement prédisposées qui sont exposées, à divers degrés, à des facteurs environnementaux favorisant le développement de la maladie. Il en résulte un état d'hyperglycémie chronique.

D. L'homéostasie du glucose

Le glucose est une source d'énergie essentielle. Chez les individus sains, la glycémie se situe entre 3,6 et 6,1 mmol/L à jeun. Tant l'hypoglycémie (glycémie inférieure à 3,6 mmol/L) que l'hyperglycémie (glycémie supérieure à 6,1 mmol/L) induit des complications physiologiques néfastes pour l'organisme. L'homéostasie du glucose est donc essentielle au bon fonctionnement du corps humain. Les deux principales hormones impliquées dans la régulation de la glycémie sont le glucagon et l'insuline, toutes deux sécrétées par le pancréas.

Lorsque les niveaux de glucose dans le sang sont bas, les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas sécrètent le glucagon. Le glucagon est une hormone hyperglycémisante qui favorise la production du glucose par le foie en activant la dégradation du glycogène de réserve via la glycogénolyse et/ou en induisant la synthèse du glucose via la néoglucogenèse. Ces deux mécanismes conduisent au relâchement du glucose dans le sang afin de rétablir la glycémie.

De son côté, l'insuline joue un rôle clé dans la régulation de la glycémie sanguine en agissant sur les tissus périphériques comme le foie, les tissus adipeux et les muscles squelettiques. En réponse à une augmentation de la glycémie, l'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (voir Section III). L'élévation des niveaux d'insuline dans le sang qui s'en suit favorise l'entrée du glucose dans les muscles squelettiques et dans les tissus adipeux afin d'être entreposé sous forme de glycogène et de triglycérides, respectivement. De plus, l'insuline induit l'inhibition de la production de

glucose par le foie ainsi que celle d'acides gras libres par les tissus adipeux. L'ensemble des effets de l'insuline conduit à l'abaissement des niveaux de glucose dans le sang (Guyton et Hall 2000).

E. La pathogenèse du diabète de type 2

Chez les patients diabétiques de type 2, l'homéostasie du glucose n'est plus régulée adéquatement. Un état d'hyperglycémie chronique est observé et les complications reliées à l'état diabétique apparaissent. En fait, l'équilibre entre la sécrétion d'insuline par les cellules β et l'action de l'insuline sur les tissus périphériques est rompu. Plusieurs études ont suggéré que la résistance à l'action de l'insuline au foie, aux muscles squelettiques et aux tissus adipeux précède l'augmentation de la glycémie sanguine associée au développement du diabète de type 2 (Martin *et al.* 1992).

Un nouveau courant de pensée met cependant en relief le fait que le diabète de type 2 apparaît chez les patients résistants à l'insuline seulement lorsque les cellules β pancréatiques ne sont plus physiologiquement fonctionnelles (Porte 2001; Poitout et Robertson 2002; Prentki *et al.* 2002; Leahy 2005). Cette hypothèse explique pourquoi une proportion élevée de personnes souffrant d'obésité ne développe pas le diabète puisque les cellules β compensent pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques en augmentant les niveaux d'insuline sécrétés dans le sang. Cette phase dite de « compensation » provient de l'augmentation de la masse et de la fonction physiologique des cellules β et résulte par une élévation des niveaux d'insuline sécrétée en réponse au glucose et aux autres sécrétagogues (Prentki et Nolan 2006). Le diabète apparaît lorsque les cellules β ne peuvent plus compenser pour la résistance à l'insuline. Cette étape nommée « décompensation » pourrait en partie être associée à une destruction des cellules β par apoptose (Butler *et al.* 2003) et à une perte de la capacité de la cellule β à sécréter adéquatement de l'insuline en réponse au glucose (Leahy 2005).

Ainsi, les cellules β pancréatiques jouent donc un rôle prépondérant dans l'homéostasie du glucose de par leur fonction primaire, la sécrétion de l'insuline, et sont au cœur de la pathologie du diabète.

II LE MÉTABOLISME DES CELLULES β PANCREATIQUES

La fonction primaire des cellules β pancréatiques est de sécréter de l'insuline en fonction du niveau de divers nutriments calorigéniques (tel le glucose, les acides gras et certains acides aminés) dans le sang afin de répondre aux besoins de l'organisme. Plus précisément, la sécrétion de l'insuline par les cellules β est influencée principalement par la concentration sanguine en glucose et par la disponibilité des acides gras dans la circulation (McGarry et Dobbins 1999). Afin de comprendre les différents mécanismes qui régulent la sécrétion de l'insuline en réponse aux nutriments, il est important de réviser les particularités du métabolisme du glucose et celui des acides gras dans les cellules β pancréatiques. Les détails de la sécrétion d'insuline seront abordés à la Section III.

A. Le glucose

Pour qu'un organisme demeure en santé, la glycémie sanguine se doit d'être maintenue aux environs de 5 mmol/L. Suite à la prise alimentaire, la concentration sanguine en glucose augmente. Les cellules β pancréatiques sont munies d'un « système de détection » de la concentration sanguine en glucose afin de « sentir » les changements dans la glycémie et d'adapter les niveaux d'insuline à sécréter pour assurer le maintien d'une glycémie adéquate. Ce système de détection comprend le transport facilité du glucose à travers la membrane plasmique par les transporteurs GLUT et le métabolisme ciblé du glucose à travers la glycolyse et le cycle de Krebs afin de produire de l'adénosine triphosphate (ATP) et d'autres facteurs de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline.

1. *Transport cellulaire*

Dans les cellules β pancréatiques, le transport du glucose à travers la membrane plasmique se fait via les transporteurs GLUT. Chez l'humain, la famille des transporteurs GLUT comprend 14 membres, dont 11 ont été identifiés dans le transport du glucose. Les transporteurs GLUT permettent le transport facilité des glucides de par leurs 12 hélices transmembranaires. Chaque isoforme possède une affinité pour son substrat, des caractéristiques cinétiques et un profil de régulation génique qui lui est propre. La majorité des types cellulaires expriment, en proportion variable, un nombre différent de transporteurs GLUT afin de contrôler adéquatement le transport du glucose en fonction de leur rôle biologique (Brown 2000). Par exemple, la translocation à la membrane plasmique de GLUT4 est dépendante de l'action de l'insuline. L'isoforme GLUT4 est donc exprimé dans les tissus adipeux et dans les muscles afin de contrôler l'utilisation du glucose par ces tissus selon les besoins de l'organisme (Brown 2000).

De son côté, la cellule β pancréatique se doit d'exprimer un ou des transporteurs GLUT qui lui permet de « sentir » les niveaux de glucose dans le sang afin d'ajuster adéquatement les niveaux d'insuline à sécréter. Ainsi, les cellules β pancréatiques expriment les isoformes GLUT1, GLUT2, GLUT3 et/ou GLUT10, selon les espèces. Chez les rongeurs, les cellules β pancréatiques expriment majoritairement l'isoforme GLUT2 et très faiblement celle de GLUT1 (Unger 1991; Yasuda *et al.* 1992; Guillam *et al.* 2000). Chez l'humain, GLUT1 est l'isoforme majoritairement exprimé dans les cellules β alors que les isoformes GLUT2 et GLUT3 sont moins exprimés (De Vos *et al.* 1995).

L'isoforme GLUT1, de par son expression ubiquitaire, assure l'apport basal en glucose à l'ensemble des cellules (Scheepers *et al.* 2004). Le transporteur GLUT2, bien que peu spécifique au glucose, possède la constante de Michaelis-Menten (K_M) la plus élevée pour le glucose ($K_M = 17$ mmol/L) (Johnson *et al.* 1990). La vitesse maximale (V_{max}) à laquelle GLUT2 peut transporter le glucose est donc beaucoup plus élevée que la glycémie. Cette caractéristique de GLUT2 signifie que le transport du glucose à travers la membrane plasmique ne varie pas en fonction du nombre de transporteurs à la membrane ou de leur

activité, mais seulement en fonction de la concentration sanguine en glucose. Ainsi, l'expression de GLUT2 par la cellule β permet d'obtenir une concentration intracellulaire en glucose qui est identique à celle sanguine (Valera *et al.* 1994; Guillam *et al.* 1997; Guillam *et al.* 2000). De son coté, GLUT3 possède une très haute affinité pour le glucose et il est exprimé dans les tissus nécessitant de grandes quantités de glucose comme le cerveau (Scheepers *et al.* 2004).

Finalement, l'acide ribonucléique messenger (ARNm) de l'isoforme GLUT10 a été détecté dans des tissus pancréatiques chez l'humain et la souris (Dawson *et al.* 2001; McVie-Wylie *et al.* 2001). L'analyse structurale de GLUT10 suggère un rôle dans le transport du glucose. Le gène de GLUT10 est situé sur dans une région chromosomique de susceptibilité au diabète de type 2. Cependant, aucun lien n'a été établi entre l'expression de variants géniques de GLUT10 et la susceptibilité au développement du diabète de type 2 dans différentes populations (Andersen *et al.* 2003; Bento *et al.* 2005; Mohlke *et al.* 2005; Rose *et al.* 2005; Lin *et al.* 2006).

2. Métabolisme dans le cytoplasme et la mitochondrie

Suite à son entrée dans les cellules β pancréatiques, le glucose est métabolisé à travers la glycolyse et le cycle de Krebs. Bien que la majorité des voies métaboliques impliquées soient communes à l'ensemble des types cellulaires, la cellule β comporte certaines particularités qui dirigent le métabolisme du glucose vers la production d'ATP et d'autres facteurs de couplage métabolique contrôlant la sécrétion d'insuline.

2.1 La glycolyse

Lors de la première étape de la glycolyse, le glucose est phosphorylé par une isoforme de l'hexokinase, la glucokinase, en glucose-6-phosphate afin de favoriser son métabolisme à l'intérieur de la cellule β . En effet, le glucose-6-phosphate ne peut traverser la membrane plasmique et la glucose-6-phosphatase, l'enzyme nécessaire à la reformation du glucose, n'est exprimé que dans certains tissus comme le foie et les reins (van de Werve

et al. 2000). Ainsi, chaque molécule de glucose qui entre dans la cellule β est métabolisée à travers la glycolyse.

Dans la majorité des types cellulaires, l'hexokinase est l'enzyme qui transfère le groupement phosphate de l'ATP à la molécule de glucose. L'hexokinase possède une affinité très élevée pour le glucose ($K_M < 0,1$ mmol/L), ce qui favorise la phosphorylation du glucose dès son entrée dans la cellule. Cependant, l'activité de l'hexokinase est saturée par une concentration physiologique en glucose (Depre *et al.* 1998) et est inhibée par son produit, le glucose-6-phosphate (Wilson 1995). Ces caractéristiques cinétiques de l'hexokinase ne conviennent pas à la fonction biologique des cellules β pancréatiques qui doivent « sentir » la concentration sanguine en glucose afin d'adapter les quantités d'insuline à sécréter. Dans les cellules β , le glucose est phosphorylé par la glucokinase, une isoforme particulière de l'hexokinase (Meglasson et Matschinsky 1984). La glucokinase possède une affinité beaucoup plus faible pour le glucose et elle atteint la moitié de sa vélocité maximale à la concentration physiologique de 5 mmol/L. De plus, la glucokinase n'est pas inhibée par son produit, permettant ainsi d'ajuster la vitesse de son activité catalytique à la concentration cellulaire de glucose (Meglasson *et al.* 1983). En conséquence, l'expression de la glucokinase dans les cellules β pancréatiques favorise l'augmentation du métabolisme du glucose à travers la glycolyse en réponse à une élévation de la glycémie sanguine afin d'induire la sécrétion de l'insuline (Matschinsky 2002). La phosphorylation du glucose par la glucokinase représente l'étape limitante de la glycolyse dans les cellules β pancréatiques (Liang *et al.* 1992; Wang et Iynedjian 1997). Une mutation dans le gène de la glucokinase est associée au développement d'une rare forme de diabète, nommé MODY2 (Froguel *et al.* 1993), ce qui démontre le rôle prédominant de cette enzyme et du métabolisme du glucose dans la fonction de la cellule β pancréatique.

Les réactions subséquentes de la glycolyse dans les cellules β pancréatiques sont identiques à celles des autres types cellulaires et sont schématisées à la Figure 1. Le bilan net de la glycolyse est de deux molécules de pyruvate, deux molécules de la forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et deux molécules d'ATP formées à partir

de chaque molécule de glucose métabolisée. À noter, le NADH produit par la glycolyse est transféré dans la mitochondrie par les navettes du NADH afin de produire de l'ATP (voir section suivante).

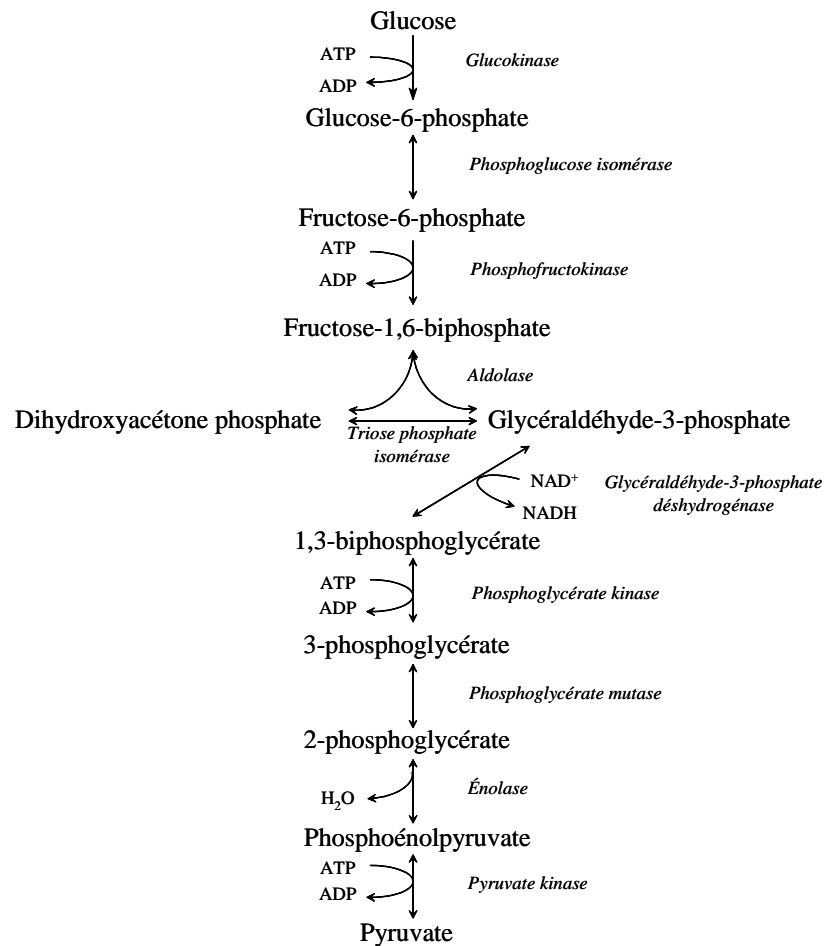


Figure 1 : Le métabolisme du glucose à travers la glycolyse

En résumé, l'expression de la glucokinase dans les cellules β pancréatiques permet de contrôler le métabolisme du glucose à travers la glycolyse afin que les niveaux d'insuline sécrétée par la cellule β soient en fonction de la glycémie sanguine. Les réactions

métaboliques subséquentes de la glycolyse ne diffèrent pas de celles des autres types cellulaires. Cependant, certaines particularités de la cellule β lui permettent de restreindre la divergence des métabolites de la glycolyse à travers d'autres voies métaboliques et ainsi de coupler la presque totalité du métabolisme cytoplasmique du glucose au cycle de Krebs afin de produire de l'ATP et d'autres facteurs de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline. Tout d'abord, le flux métabolique du glucose-6-phosphate à travers la voie des pentoses phosphates (qui conduit à la synthèse du ribose-5-phosphate employé à la biosynthèse des nucléotides) est très faible et il est même diminué en réponse à une élévation de la concentration du glucose (Schuit *et al.* 1997). En fait, moins de 4 % du glucose est métabolisé à travers la voie des pentoses phosphates lorsque la concentration du glucose dépasse les 5 mmol/L dans les cellules β pancréatiques (Hedeskov et Capito 1975; MacDonald 1993a; Schuit *et al.* 1997). En conséquence, la presque totalité du glucose est converti en pyruvate par la glycolyse.

Finalement, très peu de pyruvate provenant du métabolisme du glucose est transformé en lactate puisque l'activité de lactate déshydrogénase est très faible dans les cellules β pancréatiques. À titre d'exemple, l'activité de la lactate déshydrogénase est 120 fois plus faible dans les cellules β que dans le foie (Sekine *et al.* 1994). Ainsi, plus de 90 % du pyruvate produit par la glycolyse entre dans la mitochondrie pour y être métabolisé (Schuit *et al.* 1997). Le métabolisme du pyruvate à travers le cycle de Krebs conduit à la production de facteurs de couplage métabolique, tel que l'ATP, essentiel à la régulation de la sécrétion d'insuline (voir Section III D).

2.2 Les navettes du NADH

Le NADH produit dans le cytoplasme lors de la glycolyse doit être transféré à la mitochondrie afin d'alimenter la chaîne de transport des électrons pour la production de l'ATP (voir Section II A.2.4). Lorsque ce n'est pas le cas, l'accumulation du NADH dans le cytoplasme conduit à l'inhibition de la glycolyse. Cependant, le NADH, tout comme sa forme oxydée le NAD^+ , ne peut traverser la membrane interne de la mitochondrie. Deux

navettes sont donc présentes dans les cellules eucaryotes afin de transférer l'énergie du NADH produit dans le cytoplasme à la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie. Ces deux navettes sont la navette du glycérol-3-phosphate et la navette malate/aspartate (Voet et Voet 1995) et elles sont illustrées à la Figure 2.

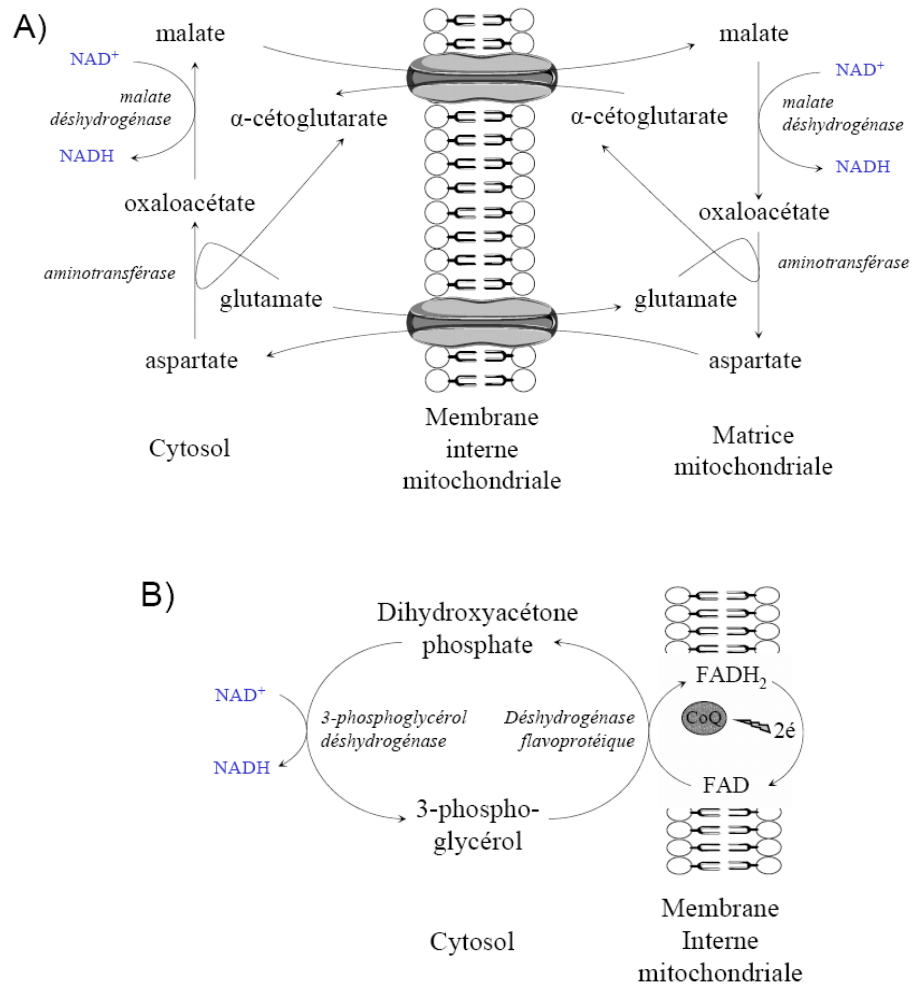


Figure 2 : Les navettes du NADH

A) La navette malate/aspartate ; B) La navette du glycérol-3-phosphate

Dans la navette du glycérol-3-phosphate, le NADH produit par la glycolyse est utilisé pour réduire la dihydroxyacétone-phosphate en glycérol-3-phosphate grâce à l'action de l'isoforme cytoplasmique de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (cGlyPD). Le

glycérol-3-phosphate entre ensuite dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie où il est réoxydé en dihydroxyacétone-phosphate. Cette réaction est catalysée par l'isoforme mitochondriale de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (mGlyPD) et conduit à la réduction d'une molécule de flavine adénine dinucléotide (FAD). Finalement, le FADH₂ fournit ses électrons à la coenzyme Q (CoQ) de la chaîne de transport des électrons et conduit donc à la production de 2 molécules d'ATP (voir Section II A.2.4). Ainsi pour chaque molécule de NADH oxydé en NAD⁺ dans le cytoplasme grâce à la navette du glycérol-3-phosphate, 2 molécules d'ATP sont produites.

De son côté, la navette malate/aspartate débute lorsque l'oxaloacétate est réduit en malate par la malate déshydrogénase. Lors de cette réaction, le NADH provenant de la glycolyse est oxydé en NAD⁺. Une fois produit, le malate est transporté dans la mitochondrie par le transporteur des acides dicarboxyliques où il est retransformé en oxaloacétate par l'isoforme mitochondriale de la malate déshydrogénase. Cette réaction conduit à la réduction du NAD⁺ en NADH. Cependant, l'oxaloacétate ne peut traverser la membrane interne de la mitochondrie. Afin de compléter la navette, l'oxaloacétate est transformé par une aminotransférase en aspartate. Ce dernier sort de la mitochondrie par son transporteur et est retransformé en oxaloacétate. Pour équilibrer les réactions biochimiques, la désamination de l'aspartate en oxaloacétate dans le cytoplasme est couplée à la transformation de l' α -cétoglutarate en glutamate. La réaction opposée est observée dans la mitochondrie. Finalement, le NADH produit dans la mitochondrie donne ses électrons au complexe I de la chaîne de transport des électrons, ce qui conduit à la production de 3 molécules d'ATP (voir Section II A.2.4). Ainsi pour chaque molécule de NADH oxydé en NAD⁺ dans le cytoplasme grâce à la navette malate/aspartate, 3 molécules d'ATP sont produites.

Ces deux navettes du NADH ont des importances différentes selon les types cellulaires. Par exemple, la navette malate/aspartate est primordiale dans le cerveau (McKenna *et al.* 2006) alors que la navette du glycérol-3-phosphate est particulièrement active dans les tissus métabolisant rapidement le glucose comme les muscles squelettiques

(MacDonald et Marshall 2000). Dans les cellules β pancréatiques, l'expression des deux navettes du NADH (MacDonald 1981; MacDonald 1982) permettent de produire de l'ATP, mais aussi d'assurer la continuité du flux métabolique à travers la glycolyse en ré-oxydant le NADH en NAD^+ . Les deux navettes du NADH sont ainsi impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Eto *et al.* 1999).

2.3 Le cycle de Krebs

Le pyruvate produit par la glycolyse entre dans la mitochondrie couplé à un proton via son transporteur (Halestrap 1975). Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate représente un substrat pour le cycle de Krebs (aussi appelé le cycle de l'acide citrique ou le cycle des acides tricarboxyliques). Dans les cellules β pancréatiques, le pyruvate entre dans le cycle de Krebs via une décarboxylation en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) ou par transformation en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (PC). La formation de l'acétyl-CoA active le métabolisme du pyruvate à travers le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP (voir ci-dessous). De son côté, l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs via la production d'oxaloacétate est appelée anaplérose et conduit à la synthèse et à l'accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs (voir section II A.2.5).

Pour être oxydé dans le cycle de Krebs, le pyruvate doit tout d'abord être transformé en acétyl-CoA par la PDH. La PDH est en fait un complexe multienzymatique qui catalyse cinq réactions. Brièvement, le pyruvate est d'abord décarboxylé avant d'être oxydé. L'acide acétique ainsi formé est ensuite combiné à la coenzyme A (CoA) afin de produire l'acétyl-CoA. Les deux dernières réactions consistent à réoxyder les éléments du complexe enzymatique afin qu'ils soient prêts à transformer une nouvelle molécule de pyruvate. La transformation du pyruvate en acétyl-CoA conduit à la formation d'une molécule de NADH et une molécule de CO_2 . Une fois formé, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs en se combinant à l'oxaloacétate afin d'être oxydé. L'ensemble des réactions métaboliques du cycle de Krebs est schématisé à la Figure 3.

Le métabolisme du pyruvate à travers le cycle de Krebs conduit à la formation de quatre molécules de NADH, une molécule de FADH₂, deux molécules de CO₂ et une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Les molécules de NADH et de FADH₂ produits par le cycle de Krebs donnent ensuite leurs électrons à la chaîne de transport des électrons afin de produire de l'ATP (voir section suivante) (Voet et Voet 1995). À noter, les atomes de CO₂ produit par le cycle de Krebs servent de mesure expérimentale pour déterminer le taux d'oxydation du glucose par les cellules β . En effet, l'incubation des cellules en présence de glucose dont les atomes de carbone sont marqués au ¹⁴C conduit à la production de CO₂ marqué au ¹⁴C. Ainsi la mesure de la quantité de ¹⁴CO₂ produit permet de déterminer les niveaux de glucose oxydé.

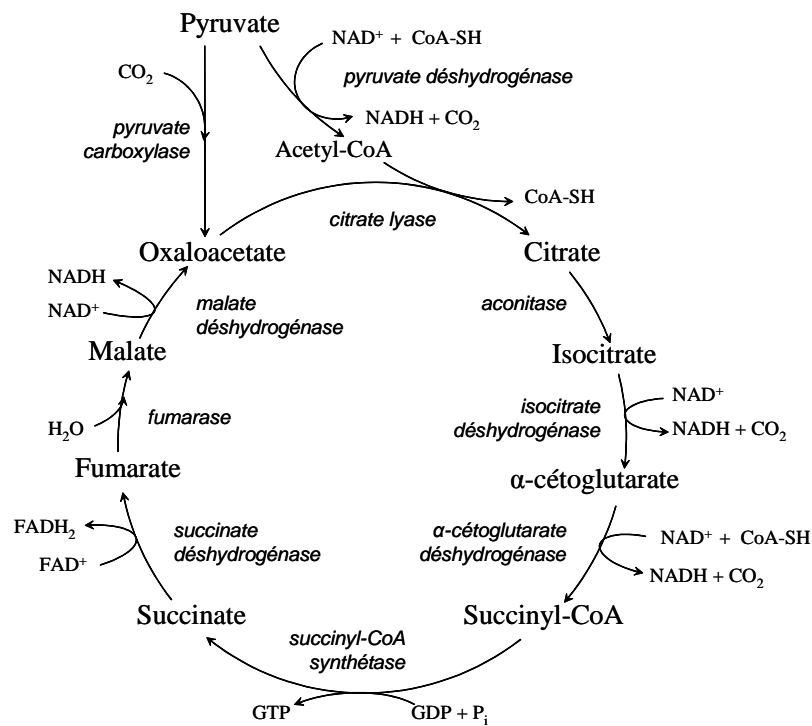


Figure 3 : Le métabolisme du pyruvate à travers le cycle de Krebs

2.4 La phosphorylation oxydative

L'énergie des molécules de NADH et de FADH₂ produites par le cycle de Krebs est utilisée par la chaîne de transport des électrons (CTÉ) pour former un gradient protonique dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. L'ATP synthétase utilise ce gradient protonique pour synthétiser l'ATP à partir d'une molécule d'ADP et d'un phosphate inorganique. Ce processus, nommé phosphorylation oxydative, est la principale source de formation de l'ATP dans la cellule. Les étapes de la phosphorylation oxydative sont illustrées à la Figure 4.

Le transfert des électrons du NADH à travers la CTÉ conduit à l'exportation à trois reprises de protons dans l'espace intermembranaire et à la formation d'une molécule d'eau dans la matrice mitochondriale (Voet et Voet 1995). Le gradient de proton ainsi créé par la CTÉ permet la synthèse de l'ATP par le complexe V. Ce complexe, aussi appelé ATP synthétase, utilise l'énergie du gradient de proton afin de catalyser la liaison d'un phosphate inorganique à une molécule d'ADP. Pour chaque molécule de NADH qui donne ses électrons à la CTÉ, trois molécules d'ATP sont formées.

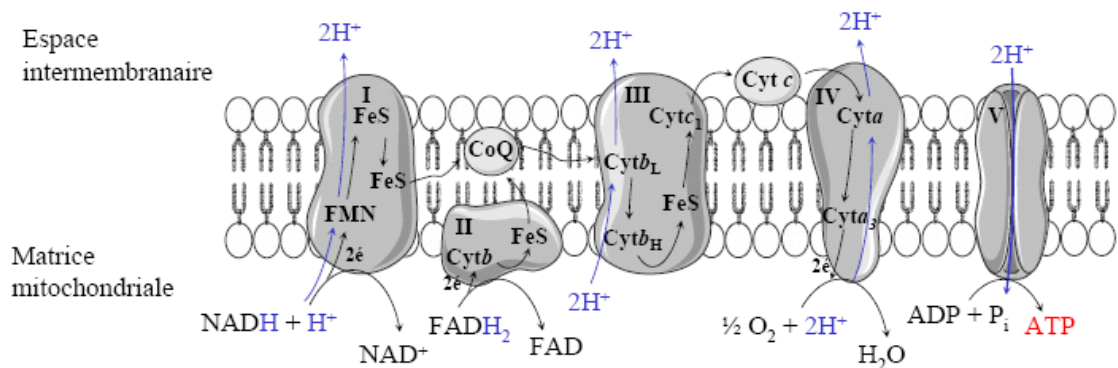


Figure 4 : La chaîne de transport des électrons

De son côté, le FADH_2 donne ses électrons au complexe II de la CTÉ. Le complexe II est formé de l'enzyme succinate déshydrogénase du cycle de Krebs ainsi que d'une molécule de FAD, du cytochrome b_{560} et de trois groupements Fe/S. Le complexe II transfère ainsi les électrons du succinate à la CoQ via la FADH_2 . Les électrons sont par la suite transportés à travers la CTÉ. L'alimentation de la CTÉ par le FADH_2 mène à l'exportation par la CoQ et le complexe IV de protons dans l'espace intermembranaire, ce qui résulte par la synthèse de deux molécules d'ATP (Voet et Voet 1995).

La phosphorylation oxydative est indispensable à la production de l'ATP pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Pour les cellules β pancréatiques, la synthèse de l'ATP fait partie intégrante du mécanisme de détection du glucose nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline (voir Section III D.1).

2.5 L'anaplérose

L'oxydation de l'acétyl-CoA en CO_2 par le cycle de Krebs est le processus central du métabolisme énergétique. Il conduit à la production des équivalents réducteurs nécessaires à la synthèse de l'ATP. Cependant, le cycle de Krebs est aussi impliqué dans les réactions de biosynthèses de la cellule. À cette fin, certains intermédiaires du cycle de Krebs sont exportés de la mitochondrie afin d'être convertis principalement en glucose, en acides gras ou en acides aminés. Ce processus nommé cataplérose doit être combiné au processus d'anaplérose afin d'assurer la continuation du cycle de Krebs. Le terme anaplérose a été utilisé pour la première fois en 1966 par le Dr Hans Kornberg et désigne l'entrée et l'accumulation dans la mitochondrie d'intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs. Les processus d'anaplérose et de cataplérose jouent un rôle essentiel dans plusieurs types cellulaires comme le foie, les reins, les muscles squelettiques et le tissu adipeux afin de réguler le métabolisme des glucides, des lipides et des acides aminés (Owen *et al.* 2002).

Dans les cellules β pancréatiques, plus de 50% du pyruvate entre dans le cycle de Krebs via la voie anaplérotique (MacDonald 1993b; Khan *et al.* 1996), c'est-à-dire en étant métabolisé par la PC afin de produire directement l'oxaloacétate (voir Figure 3).

Cependant, le processus d'anaplérose dans les cellules β n'est pas couplé à la néoglucogénèse (MacDonald *et al.* 1992) ou à la synthèse des acides gras (Brun *et al.* 1996), comme c'est le cas pour le foie et les reins ou le tissu adipeux, respectivement (Jitrapakdee *et al.* 2006). Plusieurs groupes de recherche ont ainsi suggéré que les processus d'anaplérose et de cataplérose dans les cellules β pancréatiques soient impliqués dans les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Prentki 1996) (voir Section III E.2). À noter, la PC représente la réaction anaplérotique majeure dans les cellules β . Cependant, toute réaction métabolique qui conduit à l'accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs est considérée comme anaplérotique.

En résumé, les particularités du métabolisme du glucose dans les cellules β pancréatiques permettent à celle-ci de détecter les niveaux de glucose dans le sang et ainsi d'ajuster la quantité adéquate d'insuline à sécréter. Ces particularités sont l'entrée du glucose via le transporteur GLUT2, l'expression de la glucokinase et le couplage du métabolisme du glucose à travers la glycolyse et le cycle de Krebs à la production de facteurs de couplage métabolique tel que l'ATP.

B. Les acides gras

Les acides gras sont aussi des nutriments calorigéniques très importants pour la régulation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (McGarry et Dobbins 1999). Tout comme pour le glucose, le métabolisme des acides gras dans les cellules β pancréatiques joue un rôle déterminant dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. Les particularités du métabolisme des acides gras dans les cellules β sont donc révisées dans la présente section.

Tout d'abord, les acides gras utilisés par les cellules β proviennent des réserves intracellulaires en triglycérides, mais aussi de l'apport extracellulaire par la circulation sanguine. Les acides gras présents dans le sang sont originaires de la digestion alimentaire, des réserves lipidiques des tissus adipeux ou de la synthèse des triglycérides par le foie et

circulent couplés respectivement aux chylomicrons, à l'albumine ou aux lipoprotéines VLDL (de l'anglais Very Low Density Lipoproteins).

1. *Transport cellulaire*

Les acides gras ne peuvent entrer dans les cellules que s'ils sont sous forme libre, c'est-à-dire non complexés en triglycérides ou à l'albumine. L'expression de la lipoprotéine lipase par les cellules β pancréatiques (Cruz *et al.* 2001; Pappan *et al.* 2005) permet d'hydrolyser les triglycérides circulant dans le sang en acides gras libres et ainsi d'avoir accès à cette source d'acides gras.

Les acides gras libres pénètrent ensuite dans les cellules par diffusion à travers la membrane plasmique par le phénomène de « flip-flop » (Hamilton et Kamp 1999) ou à l'aide de protéines qui facilitent leur transport. Différentes protéines effectuant le transport des acides gras à travers la membrane plasmique ont été identifiées : la translocase FAT/CD36, la protéine liant les acides gras (FABP) et la protéine transportant les acides gras (FATP). Les transporteurs FAT/CD36 et FABP sont connus pour leur rôle indispensable dans le transport des acides gras dans les cellules du cœur et des muscles squelettiques (Bonen *et al.* 2002). De plus, la FABP serait requise pour le transport des acides gras à longues chaînes (Binas *et al.* 1999). Cependant, l'importance relative de ces protéines dans le transport des acides gras à l'intérieur des cellules β pancréatiques en comparaison à la diffusion à travers la membrane plasmique demeure à être déterminée.

2. *Métabolisme intracellulaire*

Avant d'être métabolisés à l'intérieur des cellules β pancréatiques, les acides gras libres à longues chaînes doivent tout d'abord être « activés » en acyl-CoA. Cette réaction, dépendante de l'ATP, est catalysée par les acyl-CoA synthétases. Une fois formés dans le cytoplasme, les acyl-CoA sont soit transformés en triglycérides par la voie d'estérification afin d'être emmagasinés ou transportés dans la mitochondrie pour être dégradés en acétyl-CoA par la voie d'oxydation afin de produire de l'ATP.

2.1 β -oxydation

La β -oxydation des acides gras requiert trois étapes : le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie, la dégradation des acyl-CoA en acétyl-CoA et l'oxydation des acétyl-CoA en CO_2 à travers le cycle de Krebs (Voet et Voet 1995).

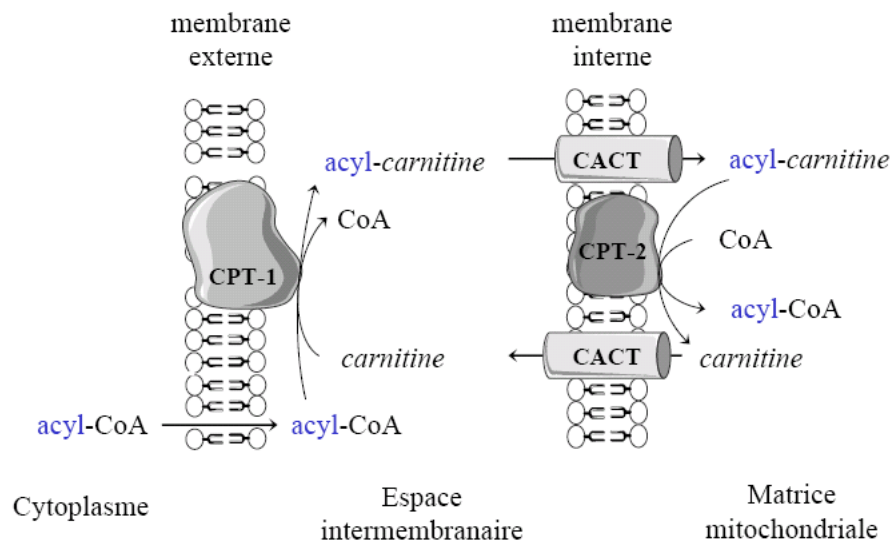


Figure 5 : Transport des acyl-CoA du cytoplasme à la mitochondrie

Bien que l'activation des acides gras en acyl-CoA ait lieu dans le cytoplasme, les acyl-CoA sont oxydés dans la mitochondrie. Cependant, les acyl-CoA à longues chaînes ne traversent pas la membrane interne de la mitochondrie. Ils doivent donc être transportés. Pour ce faire, le groupement O-acyl des acyl-CoA est transféré à un groupement carnitine. Cette réaction catalysée par la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT-1) conduit à la production d'un acyl-carnitine. L'acyl-carnitine est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale par le transporteur spécifique carnitine/acylcarnitine translocase (CACT). Une fois dans la matrice, la carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT-2) catalyse la liaison du groupement O-acyl de l'acyl-carnitine à une molécule de CoA afin de reformer l'acyl-CoA. La molécule de carnitine ainsi libérée est retournée dans l'espace intermembranaire de la

mitochondrie par la CACT afin de pouvoir transporter la prochaine molécule d'acyl-CoA. Le transport des acyl-CoA à travers les membranes de la mitochondrie est illustré à la Figure 5.

Une fois entrée dans la mitochondrie, les acyl-CoA sont dégradés en acétyl-CoA par une succession cyclique de quatre réactions enzymatiques qui sont illustrées à la Figure 6. La première réaction est catalysée par l'acétyl-CoA déshydrogénase et conduit à la formation d'une liaison double de type trans entre le carbone α et β de la chaîne aliphatique de l'acyl-CoA. Le produit de la réaction est le trans- Δ^2 -enoyl-CoA. Cette réaction enzymatique nécessite la réduction du FAD en FADH₂. Dans la deuxième réaction, une molécule de H₂O est ajoutée à la liaison double sous l'action de l'enoyl-CoA hydratase afin de former le 3-L-hydroxyacyl-CoA. Ce dernier est par la suite transformé en β -cétoacyl-CoA par la 3-L-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Cette réaction mène aussi à la réduction d'une molécule de NAD⁺ en NADH. Finalement, le β -cétoacyl-CoA est scindé en deux molécules par la β -cétoacyl-CoA thiolase, ce qui conduit à la production d'une molécule d'acétyl-CoA et à la formation de d'un acyl-CoA ayant une chaîne aliphatique plus courte de deux carbones que l'acyl-CoA de départ. Ainsi, pour chaque cycle d'oxydation d'un acyl-CoA, une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH sont formées. L'oxydation des acyl-CoA se poursuit jusqu'à ce que toute la chaîne aliphatique soit dégradée en acétyl-CoA. Lorsque la chaîne aliphatique comprend un nombre impair de carbones, le dernier cycle d'oxydation conduit à la formation d'une molécule d'acétyl-CoA et une molécule de propionyl-CoA. Ce dernier est transformé en succinyl-CoA afin qu'il puisse être métabolisé à travers le cycle de Krebs.

La dernière étape de l'oxydation des acides gras consiste à l'oxydation des molécules d'acétyl-CoA en CO₂ par le cycle de Krebs. Comme dans le cas du métabolisme du glucose, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs en se combinant à l'oxaloacétate sous l'action de la citrate synthétase (voir Section II A.2.3). L'oxydation d'une molécule d'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs conduit à la production de trois molécules de NADH, une molécule de FADH₂, deux molécules de CO₂ et une molécule de GTP. Comme pour la

mesure de l'oxydation du glucose, les atomes de CO_2 produits par le cycle de Krebs servent de mesure pour déterminer le taux d'oxydation des acides gras par les cellules β . Dans ce cas, les cellules sont incubées en présence de palmitate marqué au ^{14}C afin que le CO_2 produit par l'oxydation du palmitate soit marqué au ^{14}C . La mesure de la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ produit combinée aux intermédiaires de l'oxydation aussi marqués au ^{14}C permet de déterminer le taux d'oxydation des acides gras.

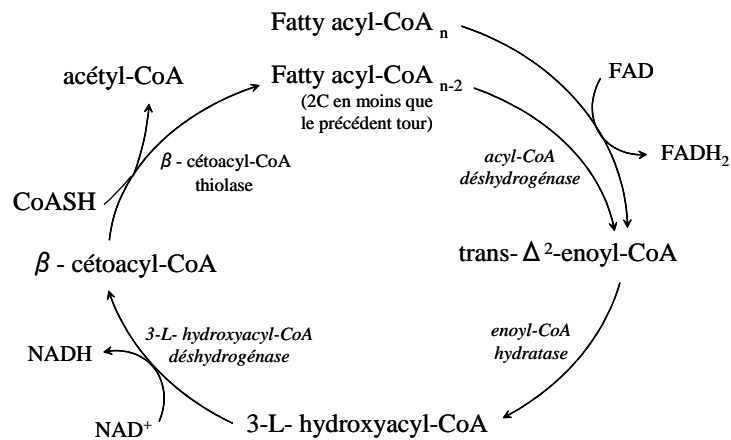


Figure 6 : La β -oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras est un processus hautement énergétique. Par exemple, l'oxydation d'une molécule de palmitate (un acide gras à 16 carbones) conduit à la production de 7 FADH_2 , 7 NADH et 8 molécules d'acétyl-CoA. Ces dernières sont ensuite métabolisées afin de former 8 GTP, 24 NADH et 8 FADH_2 . La phosphorylation oxydative des équivalents réducteurs mène à la production de 123 molécules d'ATP (voir Section II A.2.4). Puisque l'activation de la molécule de palmitate par l'acyl-CoA synthétase requiert deux molécules d'ATP, la formation net de molécules énergétiques à partir d'une molécule de palmitate est donc de 121 molécules d'ATP et de 8 molécules de GTP.

2.2 Estérification

Lorsque les nutriments abondent dans la cellule, les acides gras sont emmagasinés sous forme de triglycérides (TG). La formation des triglycérides se fait à partir d'une molécule de glycérol-3-phosphate et de trois molécules d'acyl-CoA. Le processus métabolique conduisant à la synthèse des triglycérides se nomme l'estérification et est illustré à la Figure 7. À noter, le processus d'estérification fait partie intégrante du cycle des triglycérides/acides gras libres présenté dans la section suivante et schématisé à la Figure 8.

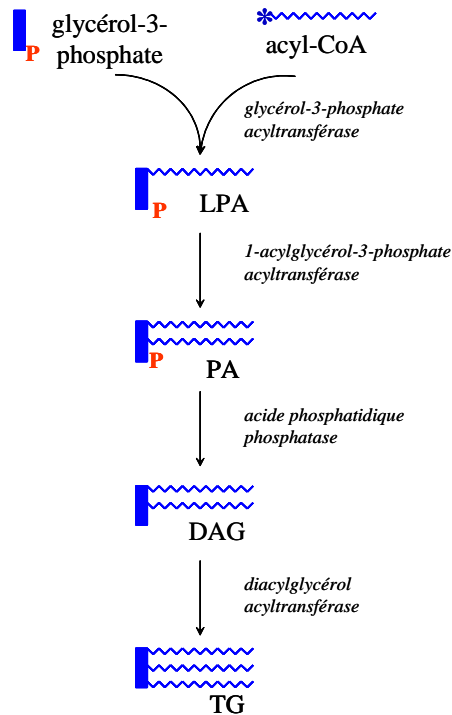


Figure 7 : L'estérification des acyl-CoA

L'étape initiale de l'estérification des acides gras est catalysée par la glycérol-3-phosphate acyltransférase. Cette enzyme catalyse la liaison de l'ester d'un acyl-CoA à la

position 1 de la molécule de glycérol-3-phosphate et conduit à la formation d'un acide lysophosphatidique (LPA). Par la suite, un deuxième ester d'acyl-CoA est ajouté à la position 2 de l'acide lysophosphatidique par deux réactions successives catalysées par la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase et l'acide phosphatidique phosphatase. Le diacylglycérol (DAG) ainsi formé est ensuite transformé en triglycéride par l'ajout d'un troisième ester d'acyl-CoA grâce à l'action de la diacylglycérol acyltransférase. À noter, certains métabolites intermédiaires, soit l'acide phosphatidique (PA) et le DAG, peuvent être transformés en phospholipides selon les besoins de la cellule (Voet et Voet 1995). Dans les cellules β pancréatiques, le processus d'estérification est étroitement relié à la sécrétion d'insuline de par la production de molécules lipidiques signalétiques, tel que le DAG (Prentki 1996; Prentki *et al.* 2002) (voir Section III A.3.1).

2.3 Lipolyse

L'oxydation et l'estérification sont les deux processus les mieux caractérisés du métabolisme des acides gras. Cependant, dans les cellules β pancréatiques, la lipolyse fait aussi partie intégrante du métabolisme des acides gras. De récentes études ont démontré que la lipase HSL (de l'anglais hormone-sensitive lipase) est importante pour la régulation du métabolisme des acides gras et qu'elle est nécessaire à la fonction sécrétoire de la cellule β pancréatique en réponse à divers nutriments (Mulder *et al.* 1999; Roduit *et al.* 2001; Peyot *et al.* 2004). Cependant, l'activité résiduelle de la lipolyse observée dans les souris déficiente en HSL suggère que d'autres lipases seraient aussi impliquées dans la régulation du métabolisme des acides gras dans les cellules β pancréatiques (Peyot *et al.* 2004). Les lipases ATGL (de l'anglais adipose triglyceride lipase), adiponutrin et GS2 qui sont exprimées dans les adipocytes représentent les meilleurs candidats (Jenkins *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2004).

La voie de la lipolyse conduit à l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et en glycérol. Les acides gras libres peuvent par la suite être réactivés en acyl-CoA afin d'être oxydés ou re-estérifiés. Puisque le processus d'estérification et celui de la lipolyse

corrèlent tous deux avec la sécrétion d'insuline, les Dr Nolan et Prentki ont suggéré la présence d'un cycle triglycérides / acides gras libres dans les cellules β pancréatiques (Nolan *et al.* 2006a). Ce cycle est schématisé à la Figure 8.

La présence d'un cycle triglycérides/acides gras libres dans les cellules β pancréatiques est pertinente car il permet de combiner la production de molécules lipidiques signalétiques par les réactions d'estérification au processus de lipolyse qui sont tous deux impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Nolan *et al.* 2006b; Nolan et Prentki 2008; Prentki et Madiraju 2008).

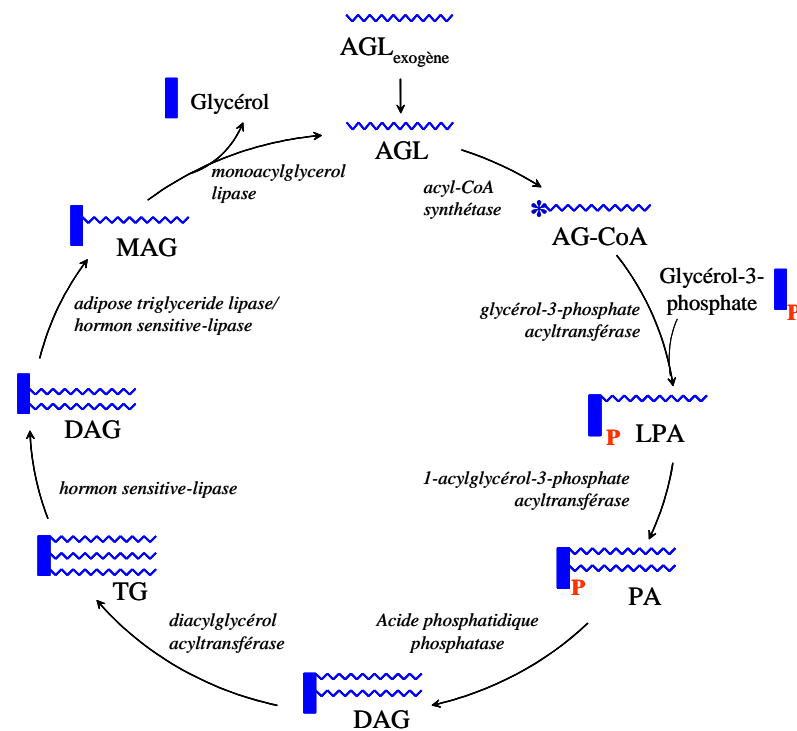


Figure 8 : Le cycle des triglycérides / acides gras libres

C. Influence du métabolisme du glucose sur celui des acides gras

La régulation du métabolisme des acides gras dans les cellules β pancréatiques est étroitement reliée à celui du glucose. En effet, l'élévation du glucose dirige le métabolisme des acides gras vers les produits d'estérification et active le cycle des triglycérides/acides gras libres (Nolan *et al.* 2006b). Plus précisément, l'augmentation de la concentration du glucose active son métabolisme à travers la glycolyse et le cycle de Krebs et conduit, via les processus d'anaplérose et de cataplérose, à l'élévation des niveaux de citrate dans le cytoplasme (Farfari *et al.* 2000). Le citrate est ensuite métabolisé en malonyl-CoA, un inhibiteur allostérique de la CPT-1 (McGarry et Brown 1997). La CPT-1 représente l'enzyme qui contrôle l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie afin d'y être oxydés (voir Section II B.2.1). Ainsi, le malonyl-CoA inhibe la β -oxydation des acyl-CoA dans la mitochondrie, ce qui résulte par la redirection des acyl-CoA vers les produits d'estérification et ainsi la production de molécules lipidiques signalétiques régulant la sécrétion d'insuline (Prentki *et al.* 1992) (voir Section III A.3.1).

L'élévation du métabolisme du glucose favoriserait aussi le flux des acides gras à travers le cycle triglycérides/acides gras libres. Premièrement, le métabolisme du glucose à travers la glycolyse conduit à la production du glycérol-3-phosphate à partir du dihydroxyacétone-phosphate, grâce à l'action de la cGlyPD. Le glycérol-3-phosphate est la molécule de départ pour la synthèse des triglycérides. Deuxièmement, l'augmentation du métabolisme du glucose, via le malonyl-CoA, favorise les produits d'estérification donc de la synthèse des triglycérides comme décrite ci-haut. Troisièmement, de récentes études ont démontré que l'élévation de la concentration en glucose active la lipolyse (Mulder *et al.* 2004; Peyot *et al.* 2004; Hu *et al.* 2005). À noter, l'élévation de la lipolyse en réponse au glucose corrèle avec une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (Winzell *et al.* 2006). L'ensemble de ces observations suggère que le métabolisme des acides gras à travers le cycle triglycérides/acides gras libres est modulé par le métabolisme du glucose (Nolan *et al.* 2006b).

Le modèle du malonyl-CoA soutient que ce dernier est un régulateur physiologique clé pour le métabolisme des acides gras dans les cellules β pancréatiques (Ruderman et Prentki 2004). Dans d'autres types cellulaires, le malonyl-CoA est connu pour être impliqué dans la régulation de processus physiologiques tel que le contrôle de l'appétit par l'hypothalamus, la régulation de l'utilisation des nutriments comme source énergétique dans les muscles squelettiques et la régulation de la cétogenèse en réponse au jeun dans le foie (Saggerson 2008). Dans les cellules β pancréatiques, le malonyl-CoA serait impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras (Corkey *et al.* 1989; Prentki *et al.* 1992). En effet, l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA issu du métabolisme du glucose conduit à une redirection du métabolisme des acides gras à travers les réactions d'estérification puis à travers le cycle des triglycérides/acides gras libres favorisant ainsi la production de molécules lipidiques régulant la sécrétion de l'insuline (Nolan *et al.* 2006b). Le malonyl-CoA est donc considéré comme un facteur de couplage métabolique issu du métabolisme du glucose et nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline (voir Section III D.2).

En résumé, le métabolisme du glucose et celui des acides gras produisent des facteurs de couplage métabolique qui permettent à la cellule β de détecter les niveaux de ces nutriments et ainsi d'ajuster adéquatement les niveaux d'insuline à sécréter.

III LA SÉCRÉTION D'INSULINE PAR LES CELLULES β PANCRÉATIQUES

L'insuline est une hormone de 51 acides aminés sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Son action sur les tissus périphériques, tels le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux, permet la régulation de la glycémie sanguine. L'insuline est emmagasinée dans des vésicules de sécrétion et leur exocytose par les cellules β est étroitement contrôlée afin d'assurer que les niveaux d'insuline sécrétée soit adaptés aux conditions nutritionnelles de l'organisme. Une altération dans un des divers mécanismes intracellulaires contrôlant la sécrétion d'insuline, tel que le métabolisme du glucose, la

production de facteurs de couplage métabolique et/ou l'exocytose des vésicules d'insuline, peut conduire au développement du diabète.

A. Les caractéristiques générales de la sécrétion d'insuline

1. La structure des îlots de Langerhans

L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Les îlots de Langerhans correspondent à la région du pancréas qui sécrète les hormones endocrines. Ces îlots, au nombre d'environ un million chez l'humain, sont des amas sphériques de cellules dispersés à travers le pancréas. Une représentation schématique des îlots de Langerhans du pancréas est présentée à la Figure 9.

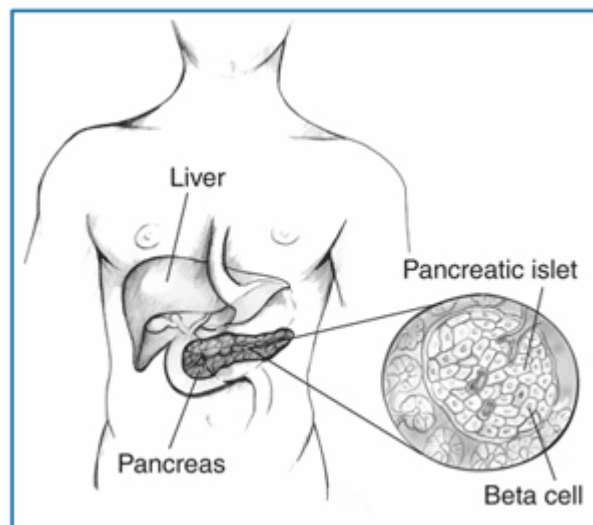


Figure 9 : Les îlots de Langerhans du pancréas

(Image provenant du site Internet : diabetes.niddk.nih.gov/dm/pubs/pancreaticislet/)

Les îlots de Langerhans constituent de 1 à 2% de la masse totale du pancréas et sont composés de 5 types cellulaires (Elayat *et al.* 1995). Les cellules α qui produisent le glucagon et les cellules β qui synthétisent l'insuline composent plus de 90 % des îlots, alors

que les cellules δ qui sécrètent la somatostatine comptent pour environ 5 %. Les cellules PP et les cellules ϵ complètent la formation des îlots et produisent, respectivement, le polypeptide pancréatique et la ghréline.

La structure des îlots de Langerhans diffère entre les espèces animales. Par exemple, chez l'humain, les cellules α , β et δ sont en étroite proximité à travers l'ensemble de l'îlot (Cabrera *et al.* 2006). Chez les rongeurs, les cellules α et δ se retrouvent à la périphérie de l'îlot tandis que le centre est occupé par les cellules β (Elayat *et al.* 1995). De plus, le ratio du nombre de cellules α sur β est plus élevé dans les îlots humains. Les diversifications dans la structure des îlots de Langerhans pourraient expliquer les différences observées dans le profil de sécrétion d'insuline selon les espèces.

2. *Le profil biphasique de la sécrétion d'insuline*

La sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques est biphasique (Curry *et al.* 1968). Une représentation schématique est illustrée à la Figure 10 (Aizawa et Komatsu 2005). En réponse à un stimulus tel que l'augmentation de la glycémie, la première phase de la sécrétion est déclenchée. Cette phase se caractérise par le relâchement d'une grande quantité d'insuline en l'espace de quelques minutes. Des études *in vitro* ont permis de caractériser le mécanisme reliant l'élévation de la concentration en glucose à la première phase de la sécrétion d'insuline. Ce mécanisme, nommé « voie de déclenchement » (voir Section III B), requiert le métabolisme du glucose dans les cellules β afin de produire de l'ATP qui induit par la suite un influx calcique intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Cette augmentation en $[Ca^{2+}]_i$ déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline pré-fusionnées à la membrane plasmique (Straub et Sharp 2002). À noter, seuls les sécrétagogues qui induisent une augmentation en $[Ca^{2+}]_i$ sont capable d'initier la sécrétion d'insuline car une concentration permissive de $[Ca^{2+}]_i$ est nécessaire pour l'exocytose des vésicules d'insuline.

Contrairement à la première phase, la deuxième phase de la sécrétion d'insuline est soutenue dans le temps et peut atteindre quelques heures. Pris dans son ensemble, la quantité d'insuline relâchée durant la deuxième phase est plus importante que durant la

première. Les mécanismes qui régulent la deuxième phase de la sécrétion d'insuline se doivent d'agir sur différents aspects du processus comme la synthèse de l'insuline, la formation et le transport des vésicules et la fusion des vésicules à la membrane plasmique (Rorsman et Renstrom 2003). Tout comme pour la première phase, la deuxième phase est régulée par le métabolisme du glucose et est en fait associée à la voie d'amplification de la sécrétion d'insuline. Cependant, le détail du (ou des) mécanisme(s) qui relie(nt) le métabolisme du glucose à la deuxième phase demeure à être caractérisé (voir Section III C).

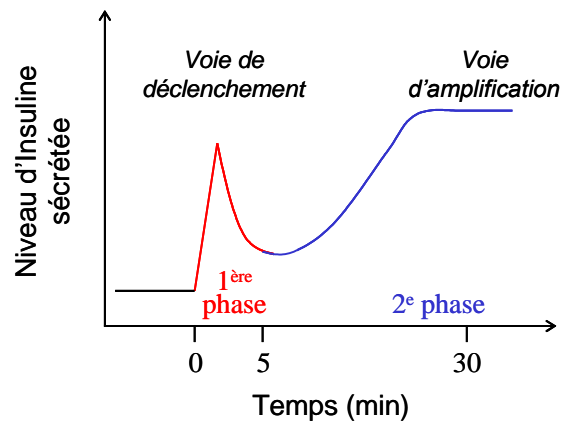


Figure 10 : Les deux phases de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose
(Adapté de Aizawa et Komatsu, *Journal of Clinical Investigation* 2005 115; 227-230)

Le profil de sécrétion de l'insuline diffère entre les espèces animales. Dans les îlots de rats et humains, les deux phases de la sécrétion d'insuline sont observées, alors que chez la souris, la deuxième phase est moins prononcée (Straub et Sharp 2002). Des distinctions sont aussi notables entre les lignées cellulaires formées à partir de cellules β pancréatiques. Par exemple, seule la première phase de la sécrétion d'insuline est présente dans les cellules INS-1 (rat), HIT-T15 (hamster) et β H9C9 (souris). Ces observations concordent avec l'absence de voie d'amplification dans ces lignées cellulaires (Straub et Sharp 2002). De leur côté, les cellules INS 832/13 (un clone des cellules INS-1) et MIN6 (souris) possèdent les deux phases de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. À noter, ces lignées

cellulaires sont utilisées en laboratoire afin d'étudier les cellules β et de réaliser certaines expériences qui sont très difficiles, voir même impossibles, à faire à partir des îlots.

3. Les sécrétagogues

Divers stimuli régulent la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. La nature de ces substances est très variée et comprend les nutriments, les hormones et les neurotransmetteurs (Hedeskov 1980).

3.1 Nutriments

Le glucose est le régulateur le plus important de la sécrétion d'insuline. Différents mécanismes reliant l'élévation du glucose à la sécrétion d'insuline ont été proposés dans la littérature. Le détail des mécanismes impliqués est présenté dans les sections suivantes.

Les acides gras n'induisent pas à eux seuls la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques. Cependant les acides gras, sous forme de diverses molécules lipidiques, sont importants pour que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose soit adéquate. De fait, la carence en acides gras diminue la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Stein *et al.* 1996) alors qu'une exposition de courte durée des cellules β aux acides gras augmente significativement celle-ci (Stein *et al.* 1997; Nolan *et al.* 2006b). L'amplification de la sécrétion d'insuline par les acides gras est proportionnelle à leur degré de saturation et dépendante de la longueur de leur chaîne aliphatique (Prentki *et al.* 1992; Stein *et al.* 1997). En effet, le métabolisme intracellulaire des acides gras à longue chaîne conduit à la production de facteurs de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline. Différentes voies métaboliques et signalétiques sont impliquées dans la régulation par les acides gras de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Tout d'abord, deux processus requièrent le métabolisme intracellulaire des acides gras : la voie du malonyl-CoA et le cycle des triglycérides/acides gras libres (voir Section II C) (Nolan *et al.* 2006b). Ces deux voies métaboliques conduisent à la production de molécules lipidiques signalétiques comme les acyl-CoA à longues chaînes (LC-CoA) et le DAG (Prentki 1996; Prentki *et al.* 2002) qui

favorisent la sécrétion d'insuline. Le processus de lipolyse serait aussi impliqué (Peyot *et al.* 2004; Nolan *et al.* 2006a). Cependant, les mécanismes reliant le métabolisme des acides gras à l'exocytose des vésicules d'insuline demeurent à être précisés.

Des études ont démontré plus récemment l'expression par les cellules β pancréatiques d'un récepteur couplé aux protéines G, le GPR40, qui est activé par les acides gras à longues chaînes. L'activation par les acides gras du récepteur GPR40 conduit à une augmentation de la concentration des ions calciques et favorisent l'exocytose des vésicules d'insuline (Briscoe *et al.* 2003; Itoh *et al.* 2003). Le rôle de GPR40 dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras a été confirmé dans un modèle de souris déficientes en GPR40 (Steneberg *et al.* 2005; Latour *et al.* 2007). La liaison des acides gras au récepteur serait responsable d'environ 50 % de l'augmentation de la sécrétion d'insuline en présence des acides gras. Bien que le mécanisme exact demeure à être caractérisé, il semble que le métabolisme du glucose et des acides gras ne soient pas impliqués (Alquier *et al.* 2009). Une voie signalétique impliquant la phospholipase C et l'inositol phosphate conduirait à l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ régulant l'exocytose des vésicules d'insuline (Fujiwara *et al.* 2005; Shapiro *et al.* 2005; Alquier *et al.* 2009). Ainsi, les acides gras augmentent la sécrétion d'insuline induite par le glucose par différents mécanismes impliquant notamment le métabolisme intracellulaire des acides gras et l'activation du récepteur GPR40.

Certains acides aminés affectent aussi la sécrétion d'insuline, soit de par leur métabolisme ou soit de par un effet direct sur l'exocytose des vésicules d'insuline. Par exemple, la leucine et la glutamine active la sécrétion d'insuline de par leur métabolisme. En effet, le métabolisme de la leucine conduit à la formation d'acétyl-CoA dans la mitochondrie qui est ensuite métabolisé à travers le cycle de Krebs. De plus, la leucine active la glutamate déshydrogénase et favorise la formation de l' α -cétoglutarate à partir de la glutamine (Sener et Malaisse 1980). L' α -cétoglutarate produit entre ensuite dans le cycle de Krebs, par voie anaplérotique, afin d'être métabolisé. Ainsi, la combinaison de la leucine et de la glutamine conduit à l'activation du métabolisme mitochondrial de par la formation

de l'acétyl-CoA combiné à l'anaplérose, résultant par une stimulation de la sécrétion d'insuline à des niveaux similaires à ceux induit par le glucose. Le mécanisme précis par lequel le métabolisme mitochondrial de la leucine et de la glutamine stimule la sécrétion de l'insuline demeure cependant à être déterminé, mais implique fort probablement la production de facteurs de couplage métabolique (Newsholme *et al.* 2007). De leur côté, l'arginine et l'alanine induisent la sécrétion d'insuline par un effet ionique. De fait, les charges positives de ces acides aminés déclenchent la dépolarisation de la membrane plasmique (Henquin et Meissner 1986; Blachier *et al.* 1989), ce qui conduit à l'exocytose des vésicules d'insuline.

L'étroite relation entre les métabolismes du glucose, des acides gras et des acides aminés a conduit les Drs Nolan et Prentki à suggérer le modèle des trois cycles, illustré à la Figure 11 (Nolan et Prentki 2008). Le modèle des trois cycles représente la détection de l'abondance des nutriments par les cellules β combinée à la transduction des signaux métaboliques nécessaires à la régulation adéquate de la sécrétion d'insuline. Plus précisément, le métabolisme du glucose induit la sécrétion d'insuline en produisant des facteurs de couplage métabolique à travers trois principaux processus : soit i) l'oxydation, ii) l'anaplérose et iii) la production du glycérol-3-phosphate utilisé par cycle des triglycérides/acides gras libres. Dans le premier cycle (i), le métabolisme du glucose à travers la glycolyse et le cycle de Krebs qui conduit à la production de l'ATP par le cycle de Krebs et possiblement d'autres facteurs de couplage métabolique comme les ROS (de l'anglais reactive oxygen species). Dans le deuxième cycle (ii), l'entrée du glucose dans le cycle de Krebs via la voie anaplérotique conduit à la production du NADPH et du malonyl-CoA par le cycle du pyruvate (voir Section III, D et E). Finalement, le métabolisme du glucose à travers la glycolyse conduit à la production, à partir du dihydroxyacétone phosphate, du glycérol-3-phosphate important pour le troisième cycle (iii), le cycle des triglycérides/acides gras libres. Ce cycle conduit à la production de molécules lipidiques signalétiques telles que le DAG aussi impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline.

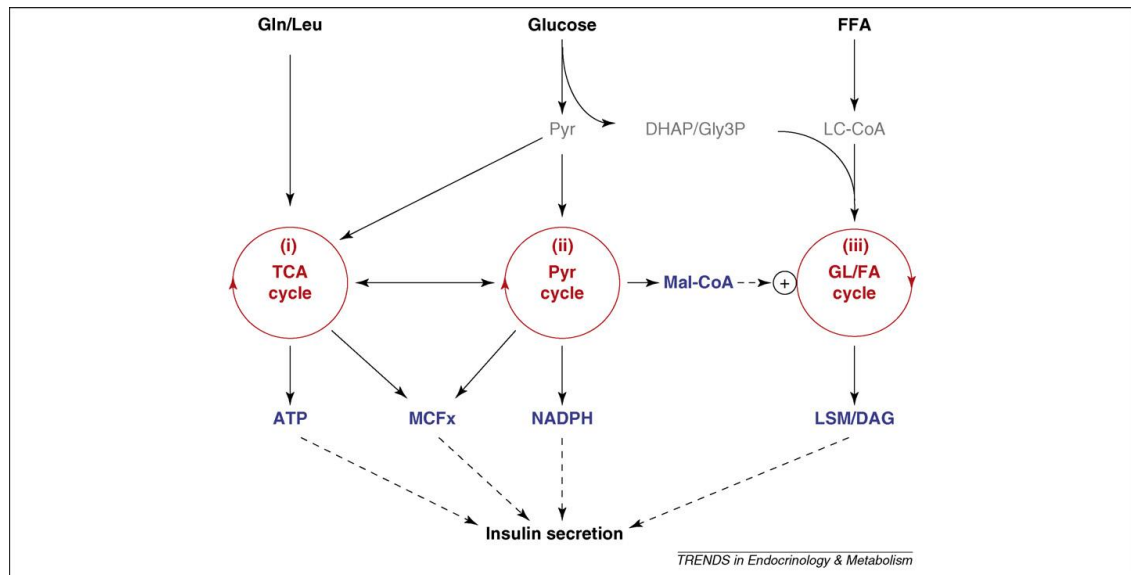


Figure 11 : Le modèle des trois cycles couplant les signaux métaboliques à la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse aux nutriments

(Provenant de Nolan et Prentki, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2008 19 ; 285-91 ; voir texte pour la discussion. Abréviations utilisés dans ce schéma: DAG, diacylglycérol ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; FFA, acides gras libres ; GL/FA cycle, cycle des triglycérides/acides gras libres; Gln, glutamine ; Gly3P, glycéril-3-phosphates ; LC-CoA, acides gras à longues chaînes couplés à la coenzyme A ; Leu, leucine ; LSM, molécules lipidiques signalétiques ; Mal-CoA, malonyl-CoA ; MCFx, facteurs de couplage métabolique à être identifiés ; Pyr, pyruvate ; TCA, cycles des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs).)

Le métabolisme des acides gras et de certains acides aminés, comme la leucine et la glutamine, se combine ensuite à celui du glucose afin de réguler précisément la sécrétion d'insuline en fonction de l'abondance de ces nutriments. Ainsi, les acides gras, suite à leur activation en acyl-CoA, activent le cycle des triglycérides/acides gras libres afin de favoriser la production de molécules lipidiques signalétiques. De leur côté, le métabolisme de la leucine et de la glutamine active le métabolisme mitochondrial en produisant de l'acétyl-CoA et de l' α -cétoglutarate (voir ci-dessus), ce qui pourrait conduire à la production de facteurs de couplage métabolique. Ainsi, les métabolismes du glucose, des acides gras et de certains acides aminés sont étroitement inter-reliés afin de réguler adéquatement la sécrétion de l'insuline.

3.2 Hormones

L'insuline sécrétée en réponse aux nutriments est modulée par l'action de différentes hormones. Les hormones relâchées par les autres types cellulaires des îlots de Langerhans régulent l'exocytose des vésicules d'insuline par les cellules β . Le glucagon favorise l'élévation des niveaux sanguins en insuline. Cependant, il n'est pas clair si les effets positifs du glucagon sur la sécrétion d'insuline sont dus à un mécanisme indirect via l'augmentation de la glycémie sanguine ou par un mécanisme direct relié à l'activation de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) suite à la liaison du glucagon à son récepteur sur les cellules β pancréatiques (Pipeleers *et al.* 1985; Kieffer *et al.* 1996). De leur côté, la somatostatine et la ghréline inhibent la sécrétion de l'insuline induite par le glucose (Strowski *et al.* 2000; Egido *et al.* 2002; Hauge-Evans *et al.* 2009).

La sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques est aussi régulée par différentes hormones relâchées par le tractus gastro-intestinal suite à la prise alimentaire. Parmi ces hormones, le GIP (de l'anglais, glucose-dependent insulintropic polypeptide) sécrété par les cellules K du duodénum et le GLP-1 sécrété par les cellules L de l'intestin amplifient la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Drucker 2006). Les mécanismes d'action du GIP et du GLP-1 sont très similaires. Ces deux hormones se lient à leur récepteur et activent la voie de l'adénylate cyclase/ cAMP/protéine kinase A (PKA). L'élévation du $[Ca^{2+}]_i$ qui s'ensuit conduit à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Une voie indépendante à PKA et impliquant Epac est aussi activée par le GLP-1 et contribue à l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Kashima *et al.* 2001). Le GLP-1 n'affecte cependant pas le métabolisme du glucose ou des acides gras. Son mode d'action est donc indépendant des mécanismes de transduction des signaux métaboliques (Peyot *et al.* 2009a). En plus d'avoir des effets bénéfiques sur la sécrétion d'insuline, le GLP-1 a aussi des effets positifs sur la biosynthèse de l'insuline et sur la prolifération des cellules β . Ces bienfaits ont conduit les compagnies pharmaceutiques à développer une nouvelle classe de médicaments basée sur l'activation du récepteur au GLP-1 ou

l'inhibition de DDP4 (la protéine qui dégrade le GLP-1) afin de traiter les patients souffrant du diabète de type 2 (Drucker 2006).

3.3 Neurotransmetteurs

Les îlots de Langerhans sont grandement innervés par les deux branches du système nerveux autonomes, le parasympathique et le sympathique. La régulation de la sécrétion d'insuline par les terminaisons parasympathiques s'effectue principalement via l'acétylcholine. Suite à sa libération, l'acétylcholine se lie au récepteur membranaire muscarinique M3 des cellules β et active la phospholipase C. La production de diacylglycérol et d'inositol triphosphate qui s'ensuit conduit à l'élévation du $[Ca^{2+}]_i$ via la voie signalétique de la protéine kinase C (PKC) (Jones et Persaud 1998). Ainsi, l'acétylcholine potentialise l'influx de calcium induit par le glucose et augmente la sécrétion d'insuline. D'autres neurotransmetteurs sont produits par les terminaisons parasympathiques et favorisent aussi la sécrétion d'insuline. Le VIP et le PACAP (de l'anglais, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) stimulent la sécrétion d'insuline de par l'augmentation du cAMP, tandis que le GRP (de l'anglais gastrin-release peptide) agit par l'activation de la voie de PKC (Gilon et Henquin 2001).

De leur côté, les neurotransmetteurs relâchés par les terminaisons sympathiques réduisent la sécrétion d'insuline. Tout d'abord, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la noradrénaline inhibe la sécrétion d'insuline (Gilon et Henquin 2001). Plus précisément, la noradrénaline active les récepteurs adrénergiques α_2 , ce qui résulte par la répression de l'activité de l'adénylate cyclase et de la diminution des niveaux de cAMP. La galanine et le neuropeptide Y ont aussi des effets inhibiteurs sur la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués demeurent cependant à être déterminés.

Parmi tous ces sécrétagogues, le glucose est le stimulus prépondérant pour réguler la sécrétion d'insuline. Les mécanismes contrôlant la sécrétion d'insuline induite par le glucose ont fait l'objet de nombreuses études depuis près d'un demi-siècle. Cependant,

plusieurs aspects de ces mécanismes demeurent à être éclaircis, précisés, déterminés ou même à être découverts.

B. La voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline

Afin de relier le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline, un premier mécanisme dit « classique » ou de « déclenchement » a tout d'abord été proposé et est à ce jour très bien accepté dans la littérature. Ce modèle suggère que l'ATP, découlant du métabolisme du glucose, induit une cascade signalétique conduisant à l'exocytose des vésicules de l'insuline (Ashcroft *et al.* 1984; Aguilar-Bryan *et al.* 1995; Straub et Sharp 2002). Plus précisément, suite à une élévation de la glycémie sanguine, le glucose entre dans les cellules β par le transporteur GLUT2 afin que la concentration en glucose soit à l'équilibre de part et d'autre de la membrane plasmique (Thorens *et al.* 1988). Le glucose est ensuite métabolisé dans le cytoplasme à travers la glycolyse puis dans la mitochondrie à travers le cycle de Krebs. L'ensemble des réactions enzymatiques découlant du métabolisme oxydatif du glucose conduit à la production de l'ATP par la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Detimary *et al.* 1996) (voir Section II A.2).

L'élévation du ratio ATP/ADP (adénosine diphosphate) cytosolique découlant du métabolisme du glucose induit la fermeture des canaux potassiques dépendant de l'ATP (canaux K_{ATP}) (Ashcroft *et al.* 1984; Cook et Hales 1984; Tarasov *et al.* 2004) puis la dépolarisation de la membrane plasmique. Lorsque la dépolarisation de la membrane atteint le seuil d'activation des canaux calciques voltage-dépendant (CCVD), les CCVD s'ouvrent afin de favoriser l'influx du calcium (Ashcroft *et al.* 1994). La concentration intracellulaire des ions calciques augmente, déclenchant ainsi l'exocytose des vésicules de l'insuline (Rorsman 1997; Lang 1999). Ce modèle décrit ainsi le mécanisme par lequel le métabolisme du glucose conduit au déclenchement de la sécrétion d'insuline. Il est illustré à la Figure 11.

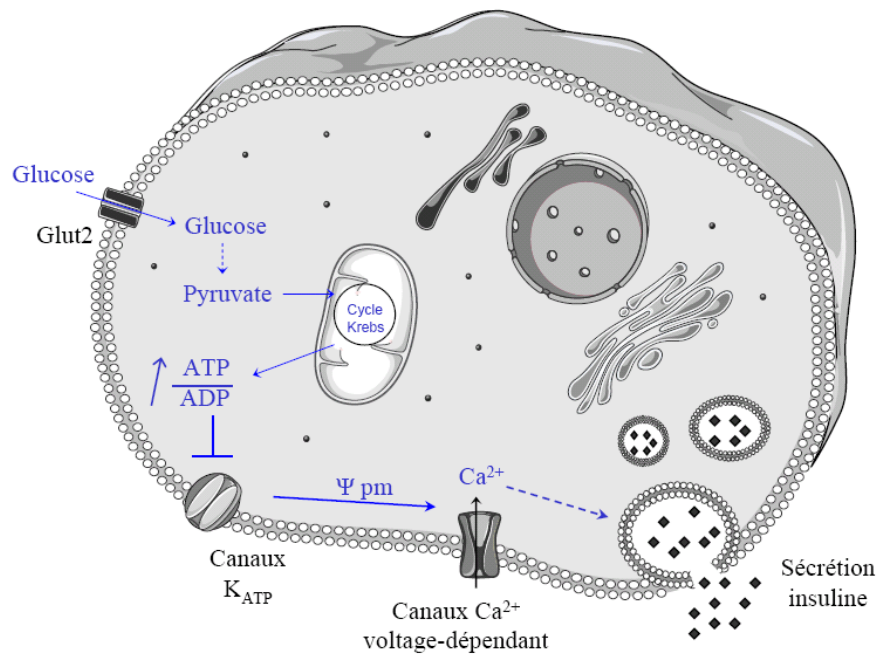


Figure 12 : La voie de déclenchement de la sécrétion d'insuline

Les étapes du mécanisme de déclenchement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose sont très bien caractérisées par l'ensemble des études effectuées sur le sujet. Le mécanisme de déclenchement ne peut cependant pas expliquer à lui seul la complexité de la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Par exemple, la sécrétion d'insuline induite par le glucose comporte deux phases (voir Section III A.2). Basé sur le mécanisme de déclenchement, un produit qui dépolarise la membrane plasmique devrait pouvoir mimer les effets du glucose sur la sécrétion d'insuline. Or, le KCl et l'arginine sont deux composés qui induisent la dépolarisation de la membrane plasmique. L'influx subséquent d'ions calciques ne fait que déclencher l'exocytose des vésicules d'insuline sans mimer la réponse soutenue de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Charles *et al.* 1982; Gembal *et al.* 1993). En fait, seule la 1^{ère} phase de la sécrétion d'insuline est observée en réponse au KCl ou à l'arginine. Des observations similaires ont été rapportées suite à l'inhibition pharmacologique des canaux K_{ATP} par les sulfonylurées, une classe de médicaments utilisés pour le traitement du diabète. Plus précisément, les sulfonylurées se

lient à la sous-unité SUR1 des canaux K_{ATP} et provoquent leur fermeture (Nagashima *et al.* 2004). La durée de la sécrétion d'insuline induite par les sulfonyles est moindre que celle observée en réponse au glucose (Basabe *et al.* 1976; Henquin 1980). Ainsi, d'autres mécanismes se doivent d'être impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

C. La voie d'amplification de la sécrétion d'insuline

Diverses observations ont conduit le Dr Henquin à suggérer l'existence d'un mécanisme découlant du métabolisme du glucose qui serait complémentaire au mécanisme de déclenchement (Henquin 1992). Tout d'abord, Henquin *et al.* ont démontré que le glucose pouvait augmenter la sécrétion d'insuline indépendamment des canaux K_{ATP} , à condition que la concentration de calcium soit permissive (Henquin *et al.* 1982). Deux études indépendantes ont ensuite confirmé que les canaux K_{ATP} n'étaient pas les seuls sites de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Gembal *et al.* 1992; Sato *et al.* 1992). Dans ces études, la sécrétion d'insuline était induite par le glucose malgré l'ouverture par le diazoxide des canaux K_{ATP} . L'utilisation des sulfonyles a permis de confirmer ces résultats. En effet, dans les conditions où les canaux K_{ATP} étaient fermés par les sulfonyles, la sécrétion d'insuline était tout de même augmentée en réponse au glucose (Basabe *et al.* 1976; Henquin 1980). Ces résultats appuient l'hypothèse que le glucose régule la sécrétion d'insuline également par un mécanisme indépendant des canaux K_{ATP} .

La combinaison du diazoxide, qui conserve les canaux K_{ATP} ouverts, et du KCl, qui assure l'influx des ions calciques, a permis de confirmer que le glucose régule la sécrétion d'insuline indépendamment des canaux K_{ATP} dans des lignées cellulaires β (Hohmeier *et al.* 2000), dans des îlots pancréatiques de rats (Aizawa *et al.* 1994; Kelley *et al.* 1994; Chan et MacPhail 1996), de souris (Henquin 2000) et humains (Straub *et al.* 1998).

Les études subséquentes ont permis d'établir le rôle du calcium dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par la voie indépendante aux canaux K_{ATP} .

Ainsi, un influx calcique intracellulaire est nécessaire pour que le KCl et/ou le glucose déclenche la sécrétion d'insuline (Henquin 2000). Une augmentation subséquente des $[Ca^{2+}]_i$ n'est cependant pas requise pour que le glucose régule l'amplitude et la durée de la sécrétion d'insuline (Sato *et al.* 1999).

En résumé, l'ensemble des études a permis de démontrer l'importance d'un mécanisme indépendant des canaux K_{ATP} dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cependant, puisque ce mécanisme n'est initié que suite à un influx de calcium, il a été nommé « mécanisme d'amplification » et il est associé à la 2^e phase de sécrétion d'insuline en réponse au glucose (MacDonald *et al.* 2005). Il est intéressant de noter que tous les nutriments qui régulent la sécrétion d'insuline de par leur métabolisme activent la voie d'amplification (Henquin 2000).

Suite à l'identification de la voie d'amplification de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, divers candidats ont été testés afin de déterminer ceux possiblement impliqués dans ce mécanisme. La régulation de la voie d'amplification est indépendante des voies signalétiques de cAMP/PKA et de phospholipase C/PKC. L'acide arachidonique, l'oxyde nitrique et le guanine monophosphate cyclique (cGMP) ne sont pas non plus impliqués comme second messager dans la voie d'amplification (Sato et Henquin 1998). Finalement, puisque le glucose n'agit pas par une liaison à un récepteur (Sato et Henquin 1998), il semble que ce soit le métabolisme du glucose qui conduit à la production de molécules signalétiques nommés facteur de couplage métabolique régulant la voie d'amplification de la sécrétion d'insuline.

D. Les facteurs de couplage métaboliques

Dans les cellules β pancréatiques, le terme « facteur de couplage métabolique » réfère à une molécule issue du métabolisme qui déclenche, potentialise ou soutient la sécrétion d'insuline. En d'autres termes, un facteur de couplage métabolique agit comme un messager intracellulaire qui relie le métabolisme à la sécrétion d'insuline. Divers groupes de recherche se sont intéressés à l'implication du métabolisme mitochondrial du glucose

dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Ils ont tenté, à travers de nombreuses études, de déterminer les facteurs de couplage métabolique jouant un rôle prédominant dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les résultats de ces recherches ont conduit à l'identification de cinq principaux facteurs de couplage métabolique : l'ATP, le malonyl-CoA, le glutamate, les ROS et le NADPH.

1. ATP

L'ATP est la seule molécule issue du métabolisme mitochondrial du glucose qui est accepté dans l'ensemble de la littérature comme un facteur de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline (MacDonald *et al.* 2005). Comme décrit précédemment, le métabolisme oxydatif du glucose à travers la glycolyse puis le cycle de Krebs conduit à la production de l'ATP (Erecinska *et al.* 1992) (voir Section II A.2). Les travaux originaux reliant la production de l'ATP par le métabolisme du glucose à la régulation de la sécrétion d'insuline ont été effectués il y a plus de 20 ans. Le mécanisme de régulation de la sécrétion d'insuline par l'ATP est maintenant bien défini et est dénommé « mécanisme classique » ou « mécanisme de déclenchement » de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (voir section III B).

La production de l'ATP en réponse à l'activation du métabolisme du glucose entraîne parallèlement une diminution des niveaux d'ADP (Detimary *et al.* 1996). À l'inverse de l'ATP, ADP favorise l'ouverture des canaux K_{ATP} -dépendant (Ashcroft et Gribble 1998). Ainsi, en réponse au métabolisme du glucose, la réduction des niveaux d'ADP est au moins aussi importante que l'augmentation de ceux de l'ATP pour la régulation des canaux K_{ATP} -dépendant. Le ratio ATP/ADP est donc un indicateur plus précis des effets du métabolisme du glucose sur les canaux K_{ATP} -dépendant et sur le mécanisme de déclenchement de la sécrétion d'insuline.

2. *Malonyl-CoA*

Le malonyl-CoA est un métabolite produit dans le cytoplasme à partir de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA carboxylase (ACC) est l'enzyme impliquée dans la conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA tandis que la malonyl-CoA décarboxylase (MCD) catalyse la dégradation du malonyl-CoA en acétyl-CoA. À cause de son effet inhibiteur sur la CPT-1, le malonyl-CoA joue un rôle déterminant dans le contrôle du métabolisme des acides gras (voir section II C).

Le rôle du malonyl-CoA à titre de facteur de couplage métabolique dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été suggéré par les Dr Corkey et Prentki (Corkey *et al.* 1989; Prentki *et al.* 1992). Ce modèle prédit que le malonyl-CoA, provenant du métabolisme mitochondrial du glucose, redirige le métabolisme des acides gras vers les produits d'estérification afin de produire des molécules lipidiques signalétiques contrôlant la sécrétion d'insuline. Ainsi, le malonyl-CoA serait impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, mais serait aussi responsable, du moins en partie, de l'effet de potentialisation des acides gras sur les niveaux d'insuline sécrétés en réponse au glucose (Nolan *et al.* 2006b).

Diverses études supportent l'hypothèse que le malonyl-CoA est un facteur de couplage métabolique liant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline. Tout d'abord, la mesure des niveaux de malonyl-CoA dans différentes lignées de cellules β pancréatiques démontre qu'ils augmentent en réponse au glucose (Corkey *et al.* 1989; Liang et Matschinsky 1991; Prentki *et al.* 1992; Roduit *et al.* 2004) et qu'ils corrèlent avec la stimulation de la sécrétion d'insuline (Farfari *et al.* 2000). Par la suite, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire a permis d'étudier l'effet de la variation des niveaux de malonyl-CoA sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans une première étude, la diminution de l'expression de ACC dans les cellules β pancréatiques INS-1 a conduit à une réduction des niveaux de malonyl-CoA, à une augmentation de l'oxydation des acides gras ainsi qu'à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Zhang et Kim 1998). Dans une deuxième étude, Roduit *et al.* (2004) ont surexprimé l'enzyme qui dégrade

le malonyl-CoA, soit la MCD, dans les cellules β pancréatiques INSr3. La surexpression de MCD a conduit à une diminution de plus de 75% des niveaux de malonyl-CoA couplée à une réduction de plus de 45% de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. À noter, la surexpression de MCD a favorisé le métabolisme des acides gras à travers l'oxydation et a diminué la formation des produits d'estérification en réponse au glucose. La surexpression de MCD dans les cellules isolées d'îlots pancréatiques de rats a aussi mené à une diminution de la sécrétion d'insuline (Roduit *et al.* 2004). Ces études suggèrent donc que les niveaux de malonyl-CoA dans les cellules β sont importants pour que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose soit adéquate.

Par la suite, le groupe du Dr Hegardt a testé l'implication du malonyl-CoA dans la régulation du métabolisme des acides gras et de la sécrétion d'insuline (Herrero *et al.* 2005). Basé sur le fait que le malonyl-CoA est un inhibiteur allostérique de la CPT-1 (McGarry *et Brown* 1997), ils ont surexprimé dans les cellules β pancréatiques une forme mutante de CPT-1 qui est insensible au malonyl-CoA. Leurs résultats démontrent que l'expression de la forme mutée de CPT-1 n'affecte pas l'augmentation des niveaux de malonyl-CoA en réponse au glucose, mais résulte par une élévation de l'oxydation des acides gras, ainsi qu'une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. L'effet de la potentialisation de la sécrétion d'insuline par les acides gras est aussi réduit dans ces conditions. Cette étude soutient donc l'hypothèse que le malonyl-CoA contrôle la sécrétion d'insuline via l'inhibition de la CPT-1 et la régulation du métabolisme des acides gras.

Le modèle du malonyl-CoA a cependant été remis en question. Deux études ont rapporté que la surexpression de MCD dans les cellules β pancréatiques n'affectait pas la sécrétion d'insuline malgré une réduction significative des niveaux de malonyl-CoA (Antinozzi *et al.* 1998; Mulder *et al.* 2001). La différence dans les résultats obtenus est due aux conditions expérimentales utilisées dans ces études, i.e. l'absence versus la présence d'acides gras dans le milieu d'incubation. En effet, le modèle du malonyl-CoA prédit que l'augmentation de la concentration en glucose conduit à une redirection du métabolisme des

acides gras vers les produits d'estérification afin de produire des molécules lipidiques signalétiques. Ainsi, la présence d'acides gras dans le milieu d'incubation des cellules β est essentielle afin de déterminer le rôle du malonyl-CoA dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Roduit *et al.* 2004).

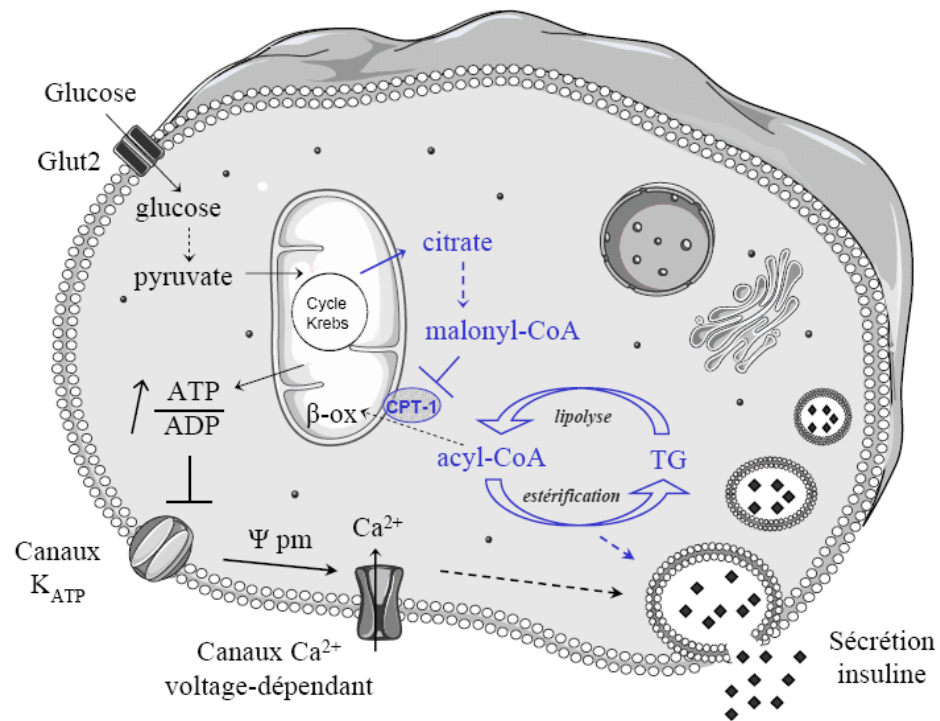


Figure 13 : Le rôle du malonyl-CoA dans la sécrétion d'insuline (voir le texte pour les détails)

Le détail du modèle malonyl-CoA/acides gras est présenté à la Figure 13. Suite à son entrée dans les cellules β pancréatiques, le glucose est métabolisé en pyruvate par la glycolyse. Le pyruvate ainsi formé est transporté dans la mitochondrie afin d'être métabolisé par le cycle de Krebs. Le pyruvate entre dans le cycle de Krebs via la PDH afin de produire de l'ATP ou via la PC afin de favoriser l'accumulation de certains intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs. Ce dernier processus, nommé anapérose, conduit à l'accumulation du citrate dans la mitochondrie puis à son exportation dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, le citrate est métabolisé successivement par

l'ATP-citrate lyase (ACL) et l'ACC afin de produire du malonyl-CoA. L'augmentation des niveaux de malonyl-CoA en réponse au glucose conduit à l'inhibition allostérique de la CPT-1 et résulte en la réduction de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie afin d'être oxydés. Le métabolisme des acides gras est ainsi redirigé vers les produits d'estérification et vers le cycle triglycérides/acides gras libres. Ce changement dans le métabolisme des acides gras en réponse à une élévation du glucose conduit à la production de diverses molécules lipidiques et favorise certains processus métaboliques qui sont impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline, comme le DAG, les LC-CoA, la lipolyse et le cycle des triglycérides/acides gras libres (Nolan *et al.* 2006b). Le détail du mécanisme reliant les molécules lipidiques signalétiques à l'exocytose des vésicules d'insuline demeure à être déterminé.

3. *Glutamate*

Le glutamate est un acide aminé non essentiel formé à partir de l' α -cétoglutarate ou de la glutamine. La synthèse du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate est catalysée soit par une aminotransférase ou par la glutamate déshydrogénase. Le glutamate est aussi produit à partir de la glutamine, l'acide aminé le plus abondant dans le sang, grâce à l'activité de la glutaminase. Le glutamate est nécessaire à la synthèse des protéines, mais il est aussi impliqué dans la régulation de divers processus cellulaires selon les besoins énergétiques et selon les spécificités fonctionnelles des tissus. Par exemple, le glutamate agit comme un neurotransmetteur dans le cerveau alors que dans les muscles squelettiques, il favorise le métabolisme oxydatif et que dans le foie, il est nécessaire à la formation de l'urée (Frigerio *et al.* 2008).

Dans les cellules β pancréatiques, le métabolisme du glutamate semble impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Les Dr Maechler et Wollheim ont suggéré que le glutamate agit comme un facteur de couplage métabolique reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline (Maechler et Wollheim 1999). Cette étude réalisée dans la lignée cellulaire INS-1E et dans des îlots pancréatiques de rat rapporte que les niveaux de

glutamate sont augmentés en réponse à une concentration stimulatrice de glucose et que l'exocytose des vésicules d'insuline est induite en réponse au glutamate lorsque la concentration des ions calciques est permissive (500 nmol/L). Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que l'augmentation du métabolisme mitochondrial du glucose dans les cellules β conduit à la formation du glutamate à partir de l' α -cétoglutarate grâce à l'action de la glutamate déshydrogénase. L'élévation des niveaux de glutamate qui s'ensuit favorise l'entrée du glutamate dans les vésicules d'insuline afin d'induire leur exocytose (Maechler et Wollheim 1999).

Les études subséquentes réalisées par ces deux groupes de recherche soutiennent cette hypothèse (Rubi *et al.* 2001; Hoy *et al.* 2002; Broca *et al.* 2003). Toutefois, les résultats obtenus par différents groupes de recherche remettent sérieusement en question l'implication du glutamate comme facteur de couplage métabolique dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Tout d'abord, plusieurs études indépendantes ont démontré que la concentration en glutamate n'est pas augmentée en réponse à une élévation du glucose (Bertrand *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002; MacDonald 2003) ou en réponse à d'autres composés qui induisent la sécrétion d'insuline de par leur métabolisme mitochondrial (MacDonald et Fahien 2000). De plus, l'exportation du glutamate de la mitochondrie n'est pas augmentée en réponse au glucose (MacDonald et Fahien 2000). Finalement, la glutamine par elle-même n'induit pas la sécrétion d'insuline malgré qu'elle augmente significativement les niveaux de glutamate (MacDonald et Fahien 2000; Bertrand *et al.* 2002; MacDonald 2003) et le flux métabolique à travers la glutamate déshydrogénase (Cline *et al.* 2004).

Ces études ont cependant permis de mettre en évidence l'importance de l'activité de la glutamate déshydrogénase dans la sécrétion d'insuline. Chez l'humain, une mutation dans le gène de la glutamate déshydrogénase, qui conduit à une activation persistante de l'enzyme, a été associée au syndrome de l'hyperinsulinémie (Stanley *et al.* 1998; Yorifuji *et al.* 1999). De plus, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la glutamate déshydrogénase conduit à la diminution de la sécrétion d'insuline (Sener et Malaisse 1980; Bryla *et al.* 1994; Maechler *et al.* 2006; Carobbio *et al.* 2009). La caractérisation d'un

modèle de souris déficiente en glutamate déshydrogénase confirme ces résultats (Carobbio *et al.* 2009). Cependant, il est important de noter que chez les souris déficientes en glutamate déshydrogénase, les niveaux d'ATP étaient réduits dans les îlots pancréatiques et que la structure organisationnelle de ceux-ci était affectée. Il est ainsi difficile de conclure si l'effet de la réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose était dû directement à l'absence de la glutamate déshydrogénase ou s'il résulte d'un effet indirect sur l'homéostasie métabolique des îlots pancréatiques.

En résumé, la régulation de l'activité de la glutamate déshydrogénase dans les cellules β pancréatiques semble importante pour la sécrétion adéquate d'insuline en réponse au glucose. L'ensemble des études suggère cependant que le glutamate n'est pas un facteur de couplage métabolique dans les cellules β pancréatiques.

4. Les ROS

La production de ROS est généralement associée au stress oxydatif et à son effet néfaste sur l'intégrité des cellules β pancréatiques (Kajimoto et Kaneto 2004; Robertson et Harmon 2006). Cependant, la production en faible concentration de ROS est importante pour la régulation de divers processus cellulaires, comme la transcription, la phosphorylation de protéines et le transport ionique (Kourie 1998; Droge 2002; Liu *et al.* 2005a; Rhee 2006). Ainsi, en faible concentration, les ROS peuvent jouer un rôle signalétique.

L'activation de la chaîne de transport des électrons par le métabolisme du glucose favorise la génération de ROS, comme l'anion superoxide ou le H_2O_2 , dans la mitochondrie (Turrens 2003). Dans les cellules β pancréatiques, les niveaux d'expression des enzymes antioxydantes sont très faibles en comparaison à d'autres tissus (Lenzen *et al.* 1996; Tiedge *et al.* 1997), ce qui favorise le rôle signalétique des ROS produits par le métabolisme du glucose. En fait, deux études indépendantes ont démontré une corrélation entre l'augmentation des niveaux de ROS en réponse au glucose et l'élévation de la sécrétion d'insuline (Pi *et al.* 2007; Leloup *et al.* 2009). Faits intéressants, cette augmentation de la

sécrétion d'insuline est mimée par des molécules qui favorisent la production de ROS, mais elle est contrée suite à l'ajout d'un antioxydant. Il semble ainsi que les ROS, en faible concentration, soit un messenger intracellulaire qui relie le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués ne sont toutefois pas connus.

5. NADPH

Le NADPH est un équivalent réducteur utilisé comme co-facteur dans plusieurs processus de biosynthèse. Contrairement au NADH, le NADPH n'est pas impliqué dans la synthèse de l'ATP.

Différentes évidences soutiennent l'hypothèse que le NADPH est un facteur de couplage métabolique reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques. Premièrement, des études ont démontré que l'augmentation du ratio NADPH/NADP⁺ en réponse à une élévation de la concentration du glucose corrèle avec la stimulation de la sécrétion d'insuline. Fait intéressant, cette corrélation est observée uniquement pour le ratio NADPH/NADP⁺ et non pour celui du NADH/NAD⁺ (Hedekov *et al.* 1987; Ivarsson *et al.* 2005). Deuxièmement, l'exocytose des vésicules d'insuline est affecté par l'inhibition ou l'augmentation du NADPH. En effet, l'administration à des rats de 6-aminonicotinamide, un composé qui forme un analogue inactif du NADPH *in vivo*, cause l'hyperglycémie et réduit la capacité des îlots pancréatiques isolés de ces rats traités à sécréter de l'insuline en réponse au glucose (Ammon et Steinke 1972). À l'opposé, l'injection de NADPH dans une cellule β de souris augmente l'exocytose des vésicules d'insuline en présence d'une concentration permissive en ions calciques (Ivarsson *et al.* 2005). Finalement, une étude menée par Watkins et Moore rapporte que le NADPH est capté par les granules d'insuline des îlots de poissons-crapauds et stimule la sécrétion d'insuline (Watkins et Moore 1977).

L'ensemble de ces études suggèrent que le NADPH, mais plus spécifiquement le ratio NADPH/NADP⁺, joue un rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Les mécanismes impliqués demeurent cependant à être déterminés. Dans la majorité des types

cellulaires, le NADPH est produit dans le cytosol via la voie des pentoses phosphates. Cependant dans les cellules β pancréatiques, moins de 4% du glucose est métabolisé à travers cette voie (Schuit *et al.* 1997), ce qui suggère que les niveaux de NADPH sont maintenus dans les cellules β par d'autres processus métaboliques. Deux enzymes liées au métabolisme mitochondrial du glucose (voir Section III E.4) produisent du NADPH dans le cytoplasme. Ces enzymes sont l'enzyme malique (ME) et l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et pourraient être importantes dans la régulation des niveaux de NADPH et donc de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Le mécanisme par lequel la production du NADPH est reliée à l'exocytose des vésicules d'insuline est aussi méconnu. Le NADPH est un régulateur négatif des canaux potassiques dépendant au voltage (K_v) (MacDonald *et al.* 2003b). Les canaux K_v sont impliqués dans la repolarisation de la membrane plasmique suite à une dépolarisation induite par le glucose (MacDonald et Wheeler 2003). Leur inhibition en réponse à une augmentation du ratio NADPH/NADP⁺ favorise le prolongement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le NADPH est aussi un co-facteur utilisé dans plusieurs processus de biosynthèse. La production du NADPH dans le cytoplasme peut aussi conduire à l'activation d'une enzyme impliquée dans la sécrétion d'insuline. Parmi les enzymes cibles potentielles, l'isoforme neuronal de la NOS (de l'anglais, nitric oxide synthase), la nNOS, et la glutarédoxine sont deux candidates intéressantes puisqu'elles sont exprimées au niveau des vésicules de sécrétion et que leur activité est connue pour réguler la sécrétion de l'insuline (Lajoix *et al.* 2001; Ivarsson *et al.* 2005; Reinbothe *et al.* 2009).

Parmi tous les facteurs de couplage métabolique suggérés dans la littérature pour réguler la sécrétion d'insuline, seul l'ATP est accepté par l'ensemble des études. De leur côté, le malonyl-CoA et le NADPH sont les deux facteurs de couplage métabolique candidats les plus probants à relier le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline. Certains aspects des mécanismes impliqués demeurent toutefois à être identifiés. Les études réalisées au cours de la dernière décennie ont cependant permis de mettre en évidence

l'importance du métabolisme mitochondrial du glucose dans la génération de facteurs de couplage métabolique, tel que l'ATP, le malonyl-CoA et le NADPH.

E. L'implication du métabolisme mitochondrial du glucose

1. L'entrée du pyruvate dans la mitochondrie

Le pyruvate, produit par la glycolyse, entre dans les mitochondries par son transporteur. L'inhibition du transport du pyruvate par le α -cyano-4-hydroxycinnamate conduit à une diminution de l'oxydation du pyruvate dans la mitochondrie et corrèle avec une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Best et Tomlinson 1988; Skelly *et al.* 2001). Ainsi, l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie pour y être métabolisé est nécessaire à la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

2. L'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs

Suite à son transport dans la mitochondrie, le pyruvate est décarboxylé en acétyl-CoA par la PDH afin d'être métabolisé dans le cycle de Krebs et ainsi produire de l'ATP (voir Section II A.2.3). Dans les cellules β pancréatiques, près de 50 % du pyruvate entre cependant dans le cycle de Krebs par la voie anaplérotique (MacDonald 1993a; Khan *et al.* 1996), c'est-à-dire en étant métabolisé en oxaloacétate par la PC. Dû à l'absence de la néoglucogénèse (MacDonald *et al.* 1992) et au faible taux de synthèse des acides gras (Brun *et al.* 1996) dans ces cellules β , plusieurs groupes de recherche ont suggéré que le processus d'anaplérose est impliqué dans les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (MacDonald *et al.* 2005). Ainsi, le métabolisme du pyruvate à travers la PDH conduit à la production d'ATP, nécessaire au mécanisme de déclenchement de la sécrétion d'insuline, alors que le métabolisme du pyruvate par la PC conduit au processus d'anaplérose, qui serait impliqué dans la voie d'amplification de la sécrétion d'insuline (Prentki *et al.* 1997). Différentes études ont donc été réalisées afin d'établir l'importance relative des enzymes PDH et PC dans les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

2.1 Via la pyruvate déshydrogénase

La PDH est un complexe multienzymatique. Son activité est régulée par l'inhibition allostérique qu'exercent ses produits et par son statut de phosphorylation. Ainsi, la PDH kinase phosphoryle la PDH afin de l'inactiver et la PDH phosphatase hydrolyse le lien phosphate afin de réactiver la PDH. Puisque l'oxydation du pyruvate à travers la PDH et le cycle de Krebs conduit à la production d'ATP et que l'ATP est un facteur de couplage métabolique important dans la sécrétion d'insuline (voir Section III D), le groupe du Dr Rutter a émis l'hypothèse que la PDH aurait un rôle important à jouer dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ils ont cependant observé que la modulation de l'activité de la PDH, par la surexpression de la PDH kinase ou de la PDH phosphatase, était sans effet sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'augmentation de l'activité de la PDH induite par le dichloroacétate n'a pas non plus affecté la sécrétion d'insuline (Nicholls *et al.* 2002). Une étude indépendante a aussi confirmé que l'inhibition de la PDH par la surexpression de la PDH kinase n'affectait pas la sécrétion d'insuline (Xu *et al.* 2008a). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité de la PDH n'est pas limitante pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il est cependant important de rappeler que le flux métabolique à travers la PDH, bien que non limitant pour la régulation de la sécrétion d'insuline, est important pour la production de l'ATP et l'homéostasie métabolique des cellules.

2.2 Via la pyruvate carboxylase

La PC est une enzyme anaplérotique importante dans plusieurs processus cellulaires (Jitrapakdee *et al.* 2006). Dans les cellules β pancréatiques, la PC semble impliquée dans la régulation de la voie d'amplification de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'utilisation d'un inhibiteur de la PC, l'acide phénylacétique (Bahl *et al.* 1997), a permis d'observer une diminution significative de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les îlots de Langerhans ainsi que dans différentes lignées cellulaires β pancréatiques (Farfari *et al.* 2000; Liu *et al.* 2002; Lu *et al.* 2002; Attali *et al.* 2006; Fransson *et al.* 2006). Ces résultats ont récemment été confirmés par deux études qui ont employé les ARN

interférant (RNAi) afin de diminuer l'expression de la PC. De fait, la diminution de l'expression et de l'activité de la PC par des ARN interférant spécifiques a conduit à la réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Hasan *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008a). À l'opposé, la surexpression de la PC a conduit à une augmentation de la sécrétion d'insuline (Xu *et al.* 2008a). De toute la littérature, une seule étude n'a pas observé d'effet de la diminution de l'expression de la PC sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Jensen *et al.* 2006). L'utilisation de RNAi a permis de réduire de 35 à 50 % les niveaux protéiques de la PC, mais n'a diminué que de 20 % son flux métabolique. Les auteurs de cette étude concluent que la diminution de l'expression de la PC a été compensée par une augmentation de son activité afin de préserver le flux anaplerotique et la régulation adéquate de la sécrétion d'insuline par les cellules β . Ainsi, l'ensemble des études suggère que la PC joue un rôle déterminant dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Les résultats obtenus *in vivo* soutiennent aussi l'hypothèse que l'activité de la PC est plus importante dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose que celle de la PDH. Chez le modèle des rats Zucker Fatty, les cellules β pancréatiques compensent pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques en amplifiant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette élévation de la sécrétion d'insuline corrèle avec une augmentation de l'activité de la PC, alors que celle de la PDH est diminuée de 30% (Liu *et al.* 2002). Fait intéressant, l'inhibition de l'activité de la PC par l'acide phénylacétique dans les îlots de ces rats Zucker Fatty conduit à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Liu *et al.* 2002). De plus, la diminution de la sécrétion d'insuline observée dans deux modèles de rats diabétiques de type 2, les Zucker Diabetic Fatty et les Goto Kakizaki, corrèle avec une réduction de l'activité de la PC dans les îlots pancréatiques (MacDonald *et al.* 1996a; MacDonald *et al.* 1996b). Il est cependant à noter que l'activité de la PDH est aussi diminuée dans les rats diabétiques Goto Kakizaki (Zhou *et al.* 1995). Une diminution de l'activité de la PC a aussi été observée chez des patients diabétiques de type 2 (MacDonald *et al.* 2009). L'ensemble des études confirme que la PC joue un rôle déterminant dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, les

résultats obtenus dans les modèles *in vivo* de rats suggèrent que l'anaplérose, à travers la PC, est un des mécanismes impliqués dans la compensation de la sécrétion d'insuline pour la résistance à l'action de l'insuline dans les tissus périphériques. Ce mécanisme pourrait être altéré chez les diabétiques.

Finalement, le groupe du Dr Cline a utilisé la technologie de la résonance magnétique nucléaire afin de déterminer l'importance de la PDH et de la PC dans la sécrétion d'insuline. L'incubation des cellules β INS 832/13 à différentes concentrations de glucose marqué au carbone 13 a permis d'établir une corrélation significative entre le flux métabolique à travers la PC et la sécrétion d'insuline. Cependant, la corrélation est encore plus élevée lorsque les flux métaboliques à travers la PC et la PDH sont combinés, ce qui suggère que la sécrétion d'insuline est augmentée lorsque l'oxydation du glucose est couplée à l'anaplérose (Cline *et al.* 2004).

3. *L'export mitochondrial d'intermédiaires du cycle de Krebs*

Le processus d'anaplérose conduit à la synthèse et à l'accumulation de différents intermédiaires du cycle de Krebs qui doivent par la suite sortir de la mitochondrie afin de ne pas perturber le métabolisme oxydatif mitochondrial (Owen *et al.* 2002). L'export mitochondrial de différents intermédiaires du cycle de Krebs, comme le malate (MacDonald 1995) et le citrate (Farfari *et al.* 2000), a été observé en réponse au glucose dans les cellules β pancréatiques. D'autres métabolites, comme l'isocitrate et l' α -cétoglutarate, peuvent aussi sortir de la mitochondrie bien qu'ils ne semblent pas s'accumuler dans le cytoplasme (MacDonald *et al.* 2005).

Afin de sortir de la mitochondrie, les métabolites du cycle de Krebs utilisent différents transporteurs : le transporteur des acides tricarboxyliques, le transporteur des acides dicarboxyliques ou le transporteur du 2-oxo-glutarate (Palmieri 2004). Les rôles du transporteur des acides dicarboxyliques et celui du transporteur du 2-oxo-glutarate dans la régulation de la sécrétion d'insuline n'ont pas été encore rapportés dans la littérature. Cependant, l'inhibition par le 1,2,3-benzènetricarboxylate du transporteur des acides

tricarboxyliques ou la diminution de son expression par ARN interférant dans les cellules β pancréatiques a conduit à la diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Joseph *et al.* 2006). Ainsi, la sortie de certains intermédiaires du cycle de Krebs, comme le citrate, semble jouer un rôle déterminant dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

4. Le cycle du pyruvate

L'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs par la voie anaplérotique et la sortie de certains intermédiaires de la mitochondrie sont deux évènements impliqués dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ces observations ont mené à la proposition que des navettes découlant du métabolisme du pyruvate soient opérationnelles dans les cellules β pancréatiques afin de coupler le métabolisme mitochondrial du glucose à la régulation de la sécrétion d'insuline. En fait, ces navettes, regroupées sous l'appellation du « cycle du pyruvate », permettraient de produire dans le cytoplasme des facteurs de couplage métabolique régulant l'exocytose des vésicules d'insuline (MacDonald 1995; Prentki *et al.* 1997). De plus, l'utilisation de la technologie de la résonance magnétique a permis d'observer une corrélation entre l'augmentation du cycle du pyruvate et une élévation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Lu *et al.* 2002). Trois navettes du pyruvate ont été identifiées dans les cellules β pancréatiques : la navette pyruvate/malate, la navette pyruvate/citrate et la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate. Elles sont schématisées à la Figure 13.

4.1 Navette pyruvate/malate

Le Dr MacDonald (1995) a été le premier à suggérer la possibilité d'une navette pyruvate/malate dans les cellules β pancréatiques. Cette navette débute lorsque le pyruvate, découlant du métabolisme du glucose, est métabolisé par la PC en oxaloacétate puis en malate par la malate déshydrogénase. Le malate est ensuite exporté de la mitochondrie par le transporteur des acides dicarboxyliques. Une fois dans le cytoplasme, le malate reforme le pyruvate sous l'action de ME. Cette dernière réaction est couplée à la production du

NADPH, un facteur de couplage métabolique possiblement impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline (voir Section III D.5). L'implication de l'isoforme cytoplasmique de ME dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a par la suite été confirmée et corrélée au ratio $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Guay *et al.* 2007; Pongratz *et al.* 2007; Ronnebaum *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008b; Heart *et al.* 2009).

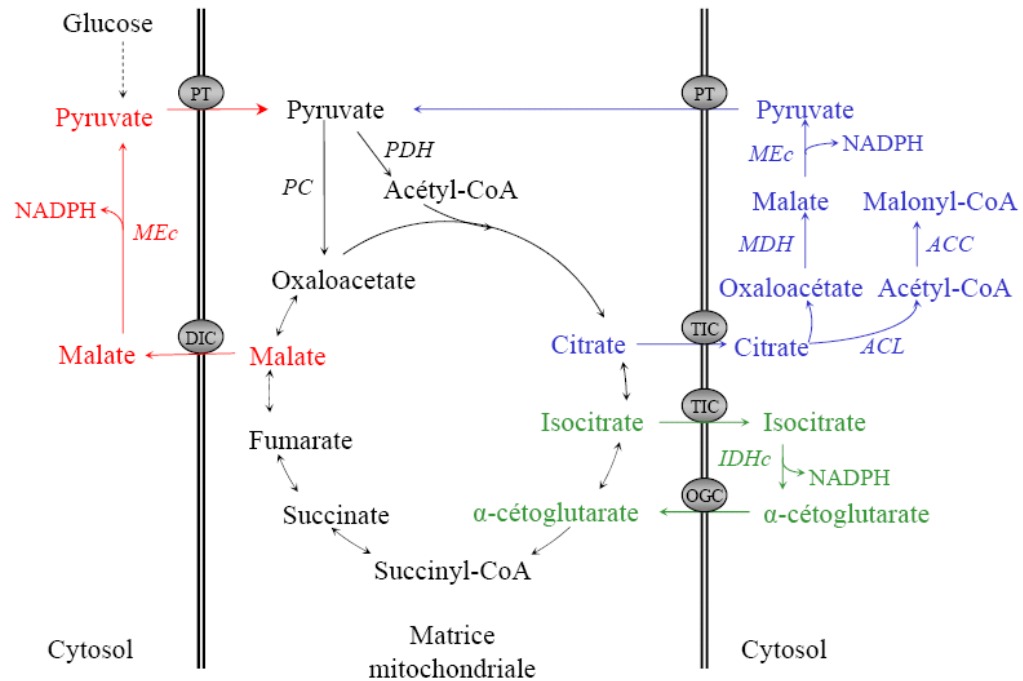


Figure 14 : Les navettes du pyruvate

La navette pyruvate/malate en rouge, la navette pyruvate/citrate en bleu et la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate en vert. Voir texte pour les détails.

4.2 Navette pyruvate/citrate

Une deuxième navette découlant du métabolisme mitochondrial du glucose a été suggérée par l'équipe du Dr Prentki : la navette pyruvate/citrate (Farfari *et al.* 2000). Suite à l'entrée du pyruvate par la PC dans le cycle de Krebs, l'oxaloacétate se lie à l'acétyl-CoA sous l'action de la citrate synthétase afin de former le citrate. Ce dernier sort ensuite de la

mitochondrie par le transporteur des acides tricarboxyliques. Une fois dans le cytoplasme, le citrate est clivé par l'ATP-citrate lyase (ACL) afin de reformer l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA. Alors que l'acétyl-CoA est transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase, l'oxaloacétate est métabolisé de son côté en malate par la malate déshydrogénase. Finalement, le malate reforme le pyruvate par l'action de l'enzyme malique, ce qui conduit à la production du NADPH. Ainsi, la navette pyruvate/citrate produit dans le cytoplasme deux facteurs de couplage métabolique, le malonyl-CoA et le NADPH, fort probablement impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline (voir Section III D). Une première étude a mené à la suggestion de la faisabilité de la navette pyruvate/citrate dans les cellules β pancréatiques (Farfari *et al.* 2000). L'importance de la navette pyruvate/citrate dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a fait l'objet de la présente thèse et est analysée dans la section Discussion.

4.3 Navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate

Plus récemment, l'équipe du Dr Newgard a suggéré qu'une troisième navette est impliquée dans la régulation de la sécrétion d'insuline, la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate. Dans cette étude, la diminution de l'expression de l'isoforme cytoplasmique de l'isocitrate déshydrogénase corrèle avec une réduction du cycle du pyruvate et de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Ronnebaum *et al.* 2006). Le détail des réactions enzymatiques de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate demeure à être déterminé (Jensen *et al.* 2008). Le modèle suggère que le pyruvate entre dans le cycle de Krebs via la PC et qu'il est métabolisé à travers le cycle de Krebs pour former l'isocitrate. L'isocitrate sort de la mitochondrie par le transporteur des acides tricarboxyliques. Une fois dans le cytoplasme, l'isocitrate est transformé en α -cétoglutarate par l'action de l>IDH. Cette réaction enzymatique conduit à la production du NADPH dans le cytoplasme. L' α -cétoglutarate retourne ensuite dans la mitochondrie via son transporteur où il est métabolisé à travers le cycle de Krebs. Tout comme pour la navette pyruvate/malate, le malate formé dans le cycle de Krebs peut sortir de la mitochondrie afin de former dans le cytoplasme le pyruvate et le NADPH par l'action de l'enzyme malique. La navette pyruvate/isocitrate/ α -

cétoglutarate conduit donc à la production de deux molécules de NADPH dans le cytoplasme. Le NADPH a été suggéré comme facteur de couplage métabolique liant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline.

Ces trois navettes du pyruvate permettent de relier le métabolisme mitochondrial du glucose à l'exocytose des vésicules d'insuline en produisant dans le cytoplasme des facteurs de couplage métabolique. Cependant l'importance relative de chacune de ces navettes demeure à être démontrée. L'implication de ces navettes dans la régulation de la sécrétion d'insuline a fait l'objet de la présente thèse et est discutée plus en profondeur dans la section Discussion.

IV MISE EN CONTEXTE DE LA THÈSE

La fonction primaire des cellules β pancréatiques est de sécréter de l'insuline en réponse à divers nutriments, mais principalement en réponse au glucose. Le mécanisme par lequel le glucose déclenche l'exocytose des vésicules d'insuline a été décrit dans la littérature et implique la production de l'ATP, un facteur de couplage métabolique, par le métabolisme oxydatif du glucose. D'autres mécanismes découlant du métabolisme du glucose sont cependant nécessaires à la régulation adéquate de la sécrétion d'insuline.

Avant de débiter ma thèse, une étude suggérant la présence de la navette pyruvate/citrate dans les cellules β pancréatiques a été publiée par notre laboratoire (Farfari *et al.* 2000). L'intérêt pour la navette pyruvate/citrate était que différentes composantes de cette navette pouvaient être impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Tout d'abord, la navette pyruvate/citrate produit dans le cytoplasme le malonyl-CoA et le NADPH, deux facteurs de couplage métaboliques fort probablement impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline. De plus, le métabolisme du citrate à travers cette navette soutient le flux métabolique rapide de la glycolyse par la réoxydation du NADH en NAD^+ . Finalement, la reformation dans le cytoplasme du pyruvate à partir du citrate permet au pyruvate de rentrer à nouveau dans la mitochondrie afin de soutenir le flux métabolique mitochondrial aussi longtemps que les cellules β sont exposées à des

concentrations stimulantes de glucose. Basé sur ces prémisses, nous avons émis l'hypothèse que la navette pyruvate/citrate est un mécanisme important pour relier le métabolisme du glucose à la régulation de la sécrétion d'insuline.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons inhibé trois étapes de la navette pyruvate/citrate, soit la sortie du citrate de la mitochondrie et l'activité enzymatique des enzymes ACL et MEc, en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques et/ou des ARN interférant (RNAi). À cette époque, la commercialisation de la technologie des RNAi en était à ses débuts. Les résultats obtenus démontrent que les activités des enzymes ACL et MEc sont impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, des inhibiteurs pharmacologiques ont montré que la sortie des acides di- et tricarboxyliques, comme le citrate, est nécessaire à la sécrétion adéquate de l'insuline en réponse au glucose. Pris dans leur ensemble, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent un rôle pour la navette pyruvate/citrate dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Parallèlement à notre étude, d'autres groupes de recherche se sont aussi intéressés au rôle des navettes du pyruvate découlant du métabolisme mitochondrial du glucose dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Trois navettes du pyruvate ont été suggérées dans la littérature : la navette pyruvate/malate, la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate et la navette pyruvate/citrate. La navette pyruvate/citrate est la seule des trois navettes à produire du malonyl-CoA et à ré-oxyder le NADH dans le cytoplasme. La caractéristique commune à ces trois navettes est la production du NADPH. Or, la corrélation entre l'augmentation du glucose, l'élévation du ratio NADPH/NADP⁺ et la stimulation de la sécrétion d'insuline a été rapportée à cette même période par différents groupes, faisant ainsi du NADPH un facteur de couplage métabolique de choix pour relier le métabolisme du glucose à la sécrétion de l'insuline.

Dans les cellules β pancréatiques, très peu de glucose est métabolisé à travers la voie des pentoses phosphates. Ainsi, les enzymes MEc et IDHc semblent être les principales sources de NADPH dans le cytoplasme. Dans notre première étude, nous avons

démontré que la réduction de l'expression de MEc réduisait la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. D'autres groupes ont aussi observé ce résultat (Pongratz *et al.* 2007; Ronnebaum *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008b; Heart *et al.* 2009). Cependant, une seule étude effectuée par le groupe du Dr Newgard s'est intéressée au rôle de IDHc dans la régulation de la sécrétion d'insuline. La diminution de l'expression de IDHc par RNAi dans les cellules INS 832/13 et les îlots pancréatiques de rats a altéré la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans notre deuxième étude, nous voulions donc confirmer le rôle de IDHc dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose puis examiner les conséquences sur la sécrétion d'insuline d'une double diminution de l'expression de MEc et IDHc, les deux enzymes produisant le NADPH dans le cytoplasme des cellules β . Pour ce faire, nous avons réprimé l'expression de IDHc en transfectant les cellules INS 832/13 avec des RNAi dirigés spécifiquement contre cette enzyme. Nous avons aussi planifié de diminuer simultanément l'expression des deux enzymes MEc et IDHc afin de vérifier si cette double réduction avait un effet plus prononcé sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose que la réduction de l'expression d'une seule de ces enzymes.

Contrairement à l'étude de Ronnebaum *et al.* (2006), la diminution de l'expression et de l'activité de IDHc a stimulé la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par un mécanisme indépendant des canaux K_{ATP} . Ce résultat a été confirmé dans les cellules dispersées d'îlots pancréatiques de rat. De plus, la réduction de l'activité de IDHc a favorisé l'incorporation du glucose en acides gras suggérant que le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate a été favorisé dans ces conditions. Ainsi, les résultats obtenus dans notre deuxième étude remettent en question le rôle de IDHc et de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate dans les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Il est cependant possible que IDHc soit impliquée dans la régulation de l'état d'oxydoréduction des cellules β pancréatiques ou dans la sécrétion d'insuline induite par d'autres stimuli, tels que la combinaison de la leucine et de la glutamine.

Dans une étude complémentaire, nous nous sommes intéressés au rôle de ATGL dans l'activité lipolytique des cellules β pancréatiques et dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. De fait, le malonyl-CoA, produit par la navette pyruvate/citrate, est un inhibiteur physiologique de la CPT-1, l'enzyme limitante pour l'oxydation des acides gras à longues chaînes. En réponse au glucose, les niveaux de malonyl-CoA sont augmentés, ce qui inhibe l'entrée des acides gras dans la mitochondrie afin d'être oxydés et redirige leur métabolisme vers les réactions d'estérification. De plus, l'augmentation de la concentration en glucose favorise la lipolyse, à travers les enzymes HSL et ATGL, des TG et du DAG en acides gras libres et en glycérol dans les cellules β pancréatiques. Ainsi, l'activation du métabolisme du glucose entraîne une augmentation du métabolisme des acides gras à travers le cycle triglycéride/acides gras libre afin de produire des molécules lipidiques signalétiques, tel que le DAG, importantes pour la régulation de la sécrétion d'insuline. Des études effectuées préalablement dans notre laboratoire avaient démontré que l'enzyme HSL était importante, mais non suffisante, pour l'activité lipolytique dans les cellules β pancréatiques. Afin de poursuivre cette étude, nous avons analysé le rôle de ATGL dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Nous avons tout d'abord vérifié l'expression de ATGL dans les cellules β pancréatiques et confirmé l'implication de son activité enzymatique dans le processus de lipolyse des acides gras neutres. Par la suite, la diminution de son expression dans les cellules INS 832/13 par un RNAi a altéré la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. Le rôle de ATGL dans la lipolyse des acides gras et dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été confirmé dans les îlots pancréatiques de souris déficientes en ATGL. Ainsi, cette étude appuie l'hypothèse que la lipolyse à travers ATGL est un processus nécessaire pour la sécrétion adéquate de l'insuline en réponse au glucose ainsi qu'aux acides gras.

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

Article 1

A ROLE FOR ATP-CITRATE LYASE, MALIC ENZYME AND PYRUVATE/CITRATE CYCLING IN GLUCOSE-INDUCED INSULIN SECRETION

Claudiane Guay, S.R. Murthy Madiraju, Alexandre Aumais, Érik Joly and Marc Prentki

Molecular Nutrition Unit and the Montreal Diabetes Research Center, the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Departments of Nutrition and biochemistry of the University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

Running title: Pyruvate/citrate shuttle and insulin secretion

Published in : Journal of Biological Chemistry 2007 282(49):35657-65.

Address for correspondence:

Marc Prentki
MDRC- CR-CHUM, Technopole Angus (Room 401)
2901, Rachel Street
Montreal, QC, Canada, H1W 4A4,
Phone : 514-890-8000 ext. 23642
Fax : 514-412-7648

Contribution des co-auteurs :

S.R. Madiraju a collaboré à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

A. Aumais a effectué une partie des expériences reliées à l'effet de l'inhibition de la sortie du citrate de la mitochondrie sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

É. Joly a collaboré à l'élaboration de ce projet, à la mise au point de certaines techniques utilisées dans cette étude, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Abstract

In pancreatic β -cells, metabolic coupling factors generated during glucose metabolism and pyruvate cycling, through anaplerosis/cataplerosis processes, contribute to the regulation of insulin secretion. Pyruvate/citrate cycling across the mitochondrial membrane leads to the production of malonyl-CoA and NADPH, two candidate coupling factors. In order to examine the implication of pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion (GIIS), different steps of the cycle were inhibited in INS 832/13 cells by pharmacological inhibitors and/or RNAi technology: mitochondrial citrate export, ATP-citrate lyase (ACL) and cytosolic malic enzyme (ME1). The inhibitors of the di- and tri-carboxylate carriers, n-butylmalonate and 1,2,3-benzenetricarboxylate, respectively, reduced GIIS indicating the importance of trans-mitochondrial transport of tri- and dicarboxylates in the action of glucose. To directly test the role of ACL and ME1 in GIIS, shRNA were used to selectively decrease ACL or ME1 expression in transfected INS 832/13 cells. shRNA-ACL reduced ACL protein levels by 67% and this was accompanied by a reduction in GIIS. The amplification/ K_{ATP} -independent pathway of GIIS was affected by RNAi knockdown of ACL. The ACL inhibitor radicicol also curtailed GIIS. shRNA-ME1 reduced ME1 activity by 62% and decreased GIIS. RNAi-suppression of either ACL or ME1 did not affect glucose oxidation. However, since ACL is required for malonyl-CoA formation, inhibition of ACL expression by shRNA-ACL decreased glucose incorporation into palmitate and increased fatty acid oxidation in INS 832/13 cells. Taken together, the results underscore the importance of pyruvate/citrate cycling in pancreatic β -cell metabolic signaling and the regulation of GIIS.

Introduction

Pancreatic β -cells secrete insulin in response to an elevated blood glucose level. Although the molecular aspects of glucose-stimulated insulin secretion are not completely understood, it is clear that an increase in cytosolic ATP to ADP ratio plays a critical role in this process via the closure of ATP-dependant potassium (K_{ATP}) channels, leading to the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels (1-3). The resulting Ca^{2+} influx stimulates insulin vesicles exocytosis (4). In recent years, in addition to K_{ATP}/Ca^{2+} signaling, metabolic coupling factors (MCFs) derived from anaplerosis (e.g., malonyl-CoA (11,12), succinate (5) and glutamate (6)), NADPH (7,8), H_2O_2 (9), lipolysis of endogeneous lipid stores (10,11), and lipid signaling molecules, in particular free fatty acids (FFA) themselves, fatty acyl-CoAs (FA-CoA) and diacylglycerol (12-18), have been proposed to be critical players in fuel-stimulated insulin secretion by β -cells. However, the precise mechanisms underlying the amplification (formely called K_{ATP} -independent) pathways of fuel-induced insulin secretion, and the targets of the various candidate MCFs, are poorly understood.

Anaplerosis, the replenishment of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with intermediates, is essential for its optimal operation in different cell types and is involved in the regulation of glucose and lipid metabolisms (review in (19)). The anaplerotic enzyme pyruvate carboxylase (PC) is highly expressed in pancreatic β -cells (7,20) and in rat clonal INS-1 cells (21). Nearly 50% of the glucose carbon entering the mitochondria is utilized by PC and converted to oxalacetate (OAA) in rat islet tissue (22,23). Considering the absence of gluconeogenesis (24) and the relatively low rate of lipid synthesis (21) in the β -cells, the high PC activity suggests an alternate purpose for anaplerosis in the β -cell. We and others have investigated the importance of anaplerosis in glucose-induced insulin secretion (GIIS) (20,25-27) and have shown that following accelerated anaplerosis in glucose stimulated β -cells, different TCA cycle intermediates, such as citrate and malate (20,27), are exported from the mitochondria to the cytosol (cataplerosis) where they could play a signaling role in GIIS.

Three different mitochondrial metabolite shuttles/cycling processes linking anaplerosis/cataplerosis with GIIS have been described (reviewed in (28)). These are: 1) the pyruvate/malate shuttle (7), 2) pyruvate/citrate cycling (27), and 3) the pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate shuttle (29). A common feature of these shuttles is the formation of NADPH, a candidate MCF (7,8). However, among these shuttles, only pyruvate/citrate cycling leads, in addition, to the production of malonyl-CoA, another candidate MCF (14) and is associated with the reoxidation of cytosolic NAD, possibly favoring fast glycolytic flux (23). As part of this cycling process, citrate derived from anaplerotic input into the TCA cycle is exported from mitochondria to the cytosol, where it is cleaved by ATP-citrate lyase (ACL) to acetyl-CoA and OAA. Acetyl-CoA is then carboxylated to malonyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase, whereas OAA is reduced by malate dehydrogenase to malate. A cytosolic isoform of malic enzyme (ME1) converts malate into pyruvate, simultaneously yielding NADPH. Finally, pyruvate thus formed, re-enters mitochondria to complete the pyruvate/citrate cycling process (see also Fig. 6). In a previous study (27), we have shown that the dose dependence of GIIS correlated closely with the cellular concentrations of citrate, malate, and malonyl-CoA in INS 1 β -cells. Additional evidence supporting a role for pyruvate/citrate cycling in GIIS are the following. The PC inhibitor phenylacetate curtailed fuel induced insulin secretion (23). Lu *et al.* (25) have shown that pyruvate cycling activity correlates with the extent of GIIS. Furthermore, as very little glucose is metabolized through the pentose-phosphate pathway in the β -cells (20), ME1 activity is thought to be the major source of NADPH in the β -cell, at least in human and rat islets, but perhaps not in mouse islets which might contain very low level of the enzyme (30). Finally, recent studies have shown that inhibition of citrate export lowers GIIS (31) and that a decrease in ME1 expression alters glucose- and amino acid-induced insulin secretion (32).

In the present study, we continued our investigation of the role of pyruvate/citrate cycling in the regulation of GIIS using two complementary approaches in INS 832/13 cells. We sought to directly test the hypothesis that this particular pyruvate cycling process is

important for GIIS. Firstly, pharmacological inhibitors were used to block citrate export out of the mitochondria and to inhibit ATP-citrate lyase (ACL). Secondly, shRNA were designed to specifically decrease the expression levels of ACL and ME1. The results show that a reduction in mitochondrial citrate export, ACL inhibition, or a reduction in ACL and ME1 expression, all lead to a decrease in GIIS. Altogether the data provide direct support for a role of pyruvate/citrate cycling in GIIS.

Experimental procedure

Cell culture – INS 832/13 cells (33) (passages 51-64) were grown in monolayer cultures in RPMI 1640 complete medium at 11.1 mmol/L glucose supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L sodium pyruvate and 50 μ mol/L β -mercaptoethanol at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air). For transfection experiments, cells were seeded in 75-cm² flasks at 4x10⁶ cells two days prior to transfection and were at 60-70% confluency at the time of the transfection. For pharmaceutical inhibitor experiments, cells were seeded in 12-well plate at a density of 2x10⁵ cells per well.

short-hairpin RNA mediated gene suppression – shRNAs directed against rat cytosolic NADP⁺-dependant malic enzyme (ME1, GenBank™ accession number NM_012600) or rat ATP-citrate lyase (ACL, GenBank™ accession number NM_016987) were designed according to Ambion® (Austin, TX, USA) siRNA design guidelines. Briefly, shRNA sequence included, from 5' to 3', BamH1 restriction site (in **bold**), the 19-nucleotide sense gene-targeting sequence (underlined), loop sequence (in *italic*), the 19-nucleotide anti-sense gene-targeting sequence (underlined), TTT TTT ending transcription sequence and HindIII restriction site (in **bold**). For each targeted-gene, 4 different shRNAs were designed and tested for their potency to decrease the targeted-gene expression. The most efficient one was chosen for subsequent experiments and its sequence is listed here. The sense sequence for shRNA-ME1 (beginning at nucleotide 387 of ME1 sequence) is 5'-**GAT CCG GGC ATA TTG CTT CAG TTC *TTC AAG AGA GAA CTG AAG CAA TAT GCC CTT TTT TGG AAA* -3'** and for shRNA-ACL (beginning at nucleotide 560 of ACL sequence) is 5'- **GAT CCG ACA TTA AGA GAC ACC TGT *TTC AAG AGA ACA GGT GTC TCT TAA TGT CTT TTT TGG AAA* -3'**. The sense sequence with no known target for appropriate scrambled control were 5'- **GAT CCC AGT GCT GGT ACT TGT ACT *TTC AAG AGA AGT ACA AGT ACC AGC ACT GTT TTT TGG AAA* -3'** and 5'- **GAT CCC TGA GAA TCT AAC GTA AGC *TTC AAG AGA GCT TAC GTT AGA TTC TCA GTT TTT TGG AAA* -3'** for Scr-ME1 and Scr-ACL, respectively. All oligonucleotides were synthesized and purified by polyacrylamide gel

electrophoresis by IDT (Coralville, IA, USA). After annealing, the double-stranded oligonucleotides were ligated by self-formed restriction sites for BamH1 and HindIII in pSilencer 2.0 vector (Ambion). shRNAs expression was under U6 promotor control. The pSilencer 2.0 empty-vector (referred as Mock in the text) was also used as a control in most of the experiments.

Cell transfection – shRNA-pSilencer constructs were introduced into INS 832/13 cells using program T-27 and solution V of Amaxa Nucleofactor (Amaxa Inc., Gaithersburg, MD, USA) at a concentration of 5 µg of DNA for 6×10^6 cells. After transfection, INS 832/13 cells were seeded in 12-well plates at 0.3×10^6 cells (shRNA-ME1 or ScrME1) or at 0.6×10^6 cells (shRNA-ACL or ScrACL) for insulin secretion assays, protein content, and immunoblot analysis, in 60-mm tissue culture plates at 1.2×10^6 cells for malic enzyme activity, and in 25-cm² flasks at 1.5×10^6 cells (shRNA-ME1 or ScrME1) or at 3.2×10^6 cells (shRNA-ACL or ScrACL) for glucose and fatty acid oxidation, and glucose incorporation into fatty acids assays. Experiments for shRNA-ACL transfected cells or appropriate controls were performed 48 h post-transfection and experiments for shRNA-ME1 transfected cells or appropriate controls, 96 h post-transfection.

Real-time quantitative PCR analysis – Cells were extracted using the Rneasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with Rnase-Free Dnase (Qiagen) from 12-well plates. RNA was reversed transcribed to cDNA using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and hexamers as described previously (34). Forward and reverse sequence primers (IDT) were designed specifically for ME1 or ACL and normalized to cyclophilin. Primer sequences were: ME1 F: 5'-CCG CAT CTC AAC AAG GAC TTG-3', and R: 5'-CCA TCA GTC ACC ACA ATA GCC-3'. ACL F: 5'-TGC TTA GCC AGA GCT TGG TAG-3', and R: 5'-TGA ATA GGC CGG AGA TGA AGC-3'. Cyclophilin F: 5'-CTT GCT GCA GAC ATG GTC AAC-3', and R: 5'-GCC ATT ATG GCG TGT GAA GTC-3'. Real-time quantitative PCR were performed on Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) using LC Faststart DNA Masterplus SYBR Green reagent (Roche, Laval,

QC, Canada). Results were analyzed using the Rotor-Gene software version 6.0.19 provided by Corbett Research.

Cytosolic NADP⁺-dependant malic enzyme 1 activity – Malic enzyme activity was assayed in fresh cytosolic cell extracts. Briefly, 96 h post-transfection, shRNA-ME1, ScrME1, or Mock transfected cells were placed on ice, washed with cold PBS, extracted by scraping in ice-cold PBS/EGTA buffer containing protease inhibitors (1 µg/ml of leupeptin and pepstatin, 1 mmol/L PMSF, and 1.5 µg/ml of aprotinin and referred as protease inhibitor mix in the text). Cell suspension was centrifuged at 1000 x *g* for 2 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 500 µl in a ice-cold homogenization buffer containing 20 mmol/L HEPES pH 7.4, 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EGTA, and protease inhibitor mix and homogenized using a 1 ml Potter-Elvehjem homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1000 x *g* for 2 min at 4°C to discard nucleus and then at 12 000 x *g* for 30 min at 4°C to discard mitochondria. The post-mitochondrial supernatant content was concentrated using a Microcon® YM-30 (Millipore, Billerica, MA, USA). Final volume of the concentrate was adjusted to 100 µl with ice-cold homogenization buffer (see above) and 40 µl was used for malic enzyme assay. The assay system in 96-well plates contained 70 mmol/L of triethanolamine-HCl buffer pH 7.4, 5 mmol/L MnCl₂, 0.3 mmol/L NADP⁺, 3 mmol/L of L-malate. Reactions were started adding cytosolic extracts, immediately followed by shaking, and absorbance at 340 nm was read every 30 s for up to 10 min using Fluostar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). For each set of experiments, background control was run without L-malate as substrate. Enzyme activity was determined by subtracting the activity of the background control to each sample. The resulting slopes of absorbance versus time were normalized to protein content using a BCA protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Immunoblot analysis – shRNA-ACL, ScrACL, or Mock transfected cells were collected at 24, 48, 72 and 96 h post-transfection. Cells were rinsed with cold PBS, trypsinized, and centrifuged at 300 x *g* for 5 min at 4°C. Cell pellets were washed once with cold PBS and

resuspended in 20 mmol/L Tris-HCl lysis buffer containing 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS, and supplemented with protease inhibitor mix, incubated on ice for 45 min, and centrifuged 10 000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant containing total cell extract was collected and protein content was determined using a BCA protein assay kit (Pierce). Aliquots of 20 µg of total cell extract were resolved on a 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Whatman, Hahnstrabe, Dassel, Germany). Membranes were incubated with anti-ACL antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 1 h at room temperature, followed by secondary antibody treatment with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (BioRad, Hercules, CA, USA). As a loading control, membranes were incubated with anti-tubulin antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA). Semi-quantitative analysis of immunoblot density was performed using the Genesnap software from the G-Box (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada).

Insulin secretion and insulin content measurement – shRNA-transfected cells were pre-incubated during 2 h in RPMI complete medium at 1 mmol/L glucose and then were equilibrated for 1 h in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mmol/L HEPES (KRBH; pH 7.4), 0.5% defatted BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 1 mmol/L glucose. Cells were then incubated for 45 minutes in KRBH containing 0.5% BSA and 1, 5 or 10 mmol/L glucose, in the presence or absence of 0.3 mmol/L palmitate, or 35 mmol/L KCl, and/or 20 µmol/L diazoxide. Stock solution of diazoxide was prepared in DMSO and final DMSO concentration in KRBH was 0.5%. In experiments using inhibitors, INS 832/13 cells were incubated as described above in the presence or absence of 0.5 mmol/L n-butylnalonate (BM) (Sigma) or 1,2,3-benzenetricarboxylate (BTC) (Sigma), or 50 µM radicicol (Sigma). Stock solution of radicicol was prepared in DMSO and final DMSO concentration in KRBH was 0.2%. At the end of incubation, media were preserved for insulin determination. Total insulin content of the cells was measured after acid-ethanol (0.2 mmol/L HCl in 75% ethanol) extraction. Insulin levels were measured by

radioimmunoassay using a human insulin standard (Linco Research, St. Charles, MO). Insulin levels were normalized to total insulin content and to protein content.

Glucose and fatty acid oxidation and glucose incorporation into fatty acids – Glucose oxidation to CO₂, fatty acid (FA) oxidation to CO₂ and acid-soluble products (ASP; essentially ketone bodies (35)) and glucose incorporation into FA were measured in transfected cells pre-incubated as described for insulin secretion assay. For glucose oxidation experiments, cells were incubated for 45 min in KRBH containing 0.5% BSA and, 1 mmol/L glucose and 0.1 μCi/ml of [U-¹⁴C]glucose (Amersham, Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada), or, 10 mmol/L glucose and 0.2 μCi/ml of [U-¹⁴C]glucose. At the beginning of the incubation, the 25-cm² flasks were sealed with a stopper supporting a 3-cm length of PVC tubing (internal diameter 4.7 mm) containing a piece of Whatman GF/B paper (half of a 25-mm-diameter circle) soaked in 5% KOH. At the end of incubation period, 0.2 ml of perchloric acid (40% v/v) was injected into each flask via a needle through the cap in order to acidify the medium and to liberate the CO₂. After overnight isotopic equilibration at room temperature, papers were removed and the trapped ¹⁴CO₂ was measured by liquid scintillation counting after overnight equilibration in scintillation fluid. For fatty acid oxidation experiments, cells were incubated for 45 min in KRBH containing 0.5% BSA, 1, 5 or 10 mmol/L glucose in the presence of 1 mmol/L of carnitine plus 0.2 mmol/L of palmitate, and 0.1 μCi/ml of [1-¹⁴C]palmitate (PerkinElmer). Oxidation to CO₂ and ASPs were performed as previously described (17). For glucose incorporation into FA experiments, cells were incubated for 2 h in KRBH containing 0.5% BSA, 1, 5 or 10 mmol/L glucose and 3 μCi/ml [U-¹⁴C]glucose (Amersham) in the presence of 1 mmol/L oleate. At the end of the incubation period, media were removed, cells were washed once with PBS and 1 ml of PBS + 0.53 mmol/L EDTA were added to the plated cells. Cells were collected with gentle pipeting, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, dissolved in 3 ml of CHCl₃: methanol:HCl (200:100:1 v/v), and placed at -20°C until the extraction. To perform the lipid extraction, 750 μl of H₂O was added and, after vigorous vortexing, the phases were separated by centrifugation at 1 000 x g for 10 min at 4°C. The organic lipid

layer was extracted and evaporated under a stream of N₂ to dryness. In order to separate ¹⁴C-FA and ¹⁴C-glycerol formed from ¹⁴C-glucose, esterification products were hydrolyzed during 1 h at 37°C in 100 µl of 0.1 mmol/L of Tris buffer pH 7.0 containing 0.5% of Triton X-100, 1% of acetonitrile, >30 U of both lipase and phospholipase C (Sigma) enzymes. At the end of incubation, 3 ml of chloroform:methanol:HCl (200:100:1 v/v) was added to the hydrolysis buffer. Lipids were re-extracted as described above and redissolved in 50 µl of chloroform and spotted onto a silica gel 60 TLC plate (Whatman, Florham Park, NJ). Extracted lipids were separated by thin-layer chromatography using silica gel 60 plates in a solvent system containing petroleum ether:ethyl ether:acetic acid (70:30:1). Radioactive signal present on the TLC plate was transferred to a storage phosphor screen (Amersham) and visualized after scanning of the screen on the Typhoon (Amersham). Semi-quantitative analysis of ¹⁴C-FA (including FA from esterification products and very low level of NEFA) was performed, using ¹⁴C-palmitate standard as a reference, with ImageQuant TL software (Amersham) and quantification of ¹⁴C-glucose incorporated into FA was performed using ¹⁴C-glucose standard curve.

Statistical analysis – Data are expressed as means ± SEM. Statistical significance was calculated with two-tailed unpaired Student's t-test. A *p* value of < 0.05 was considered significant (*) whereas a *p* value of < 0.01 was considered very significant (**). Statistical analysis were performed using InStat program (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

Inhibition of mitochondrial citrate export alters GIIS.

We have previously reported that an elevation in glucose concentration causes a rise in citrate in both mitochondrial and cytosolic compartments in the β -cell (27), suggesting that during glucose stimulation citrate formed by the TCA cycle is exported from the mitochondria into the cytosol. Both the di- and tri-carboxylate carriers are essential for effective export of citrate (36,37). To investigate the implication of pyruvate/citrate cycling in GIIS, we first decreased mitochondrial citrate export using n-butylmalonate (BM) and 1,2,3-benzenetricarboxylate (BTC), inhibitors of the di- and the tri-carboxylate carriers, respectively. As shown in Fig. 1, incubation of INS 832/13 cells with 0.5 mM BM or BTA decreased insulin secretion at high glucose (10 mM). BTA also reduced insulin secretion at intermediate glucose (5 mM) whereas BM had no effect. KCl-stimulated insulin secretion was not affected by BM or BTA, and the cellular insulin content was unaltered by these treatments (data not shown). These results suggest that export of citrate from mitochondria is needed for GIIS.

Inhibition of ATP-citrate lyase by radicicol decreases GIIS.

The next step in the pyruvate/citrate cycling process involves cytosolic citrate cleavage by ACL to acetyl-CoA and OAA. In order to further examine the role of pyruvate/citrate cycling in the regulation of GIIS, we decided to study the importance of ACL by using specific inhibitors of this enzyme. Hydroxycitrate (38-40) and radicicol (38) have been used as ACL inhibitors and their effects on GIIS have been investigated. However, contradictory results have been published using hydroxycitrate in rat islets (38-40). As hydroxycitrate decreases the pH of KRBH buffer and is known to actively bind Ca^{2+} , we did not test this inhibitor. Radicicol, a non-competitive inhibitor of ACL (41), was used instead to determine the effect of ACL inhibition on GIIS in INS 832/13 cells. In accordance with a previous study carried out in purified normal rat β -cells (38), 50 μM radicicol decreased insulin secretion by approximately 50% at 5 and 10 mM glucose, but

had no effect on KCl-stimulated insulin release compared to control (Fig. 2). In all experiments, basal insulin secretion at 1 mM glucose and the total cellular insulin content were not affected by radicicol (data not shown). Radicicol also appeared to decrease GIIS in the presence of 0.3 mM palmitate, though the effect was less prominent and did not reach statistical significance (Fig. 2).

shRNA against ACL decreases its expression and inhibits GIIS.

The RNAi technology was used as a complementary, non-pharmacological, approach. Four shRNA constructs specifically directed against ACL (shRNA-ACL #1 to #4) were tested for their efficiency to decrease ACL expression, as compared to a scrambled control shRNA. All four shRNA-ACL constructs reduced ACL mRNA level in INS 832/13 cells from 35 to 75%, 48 h post-transfection (data not shown). The most efficient, shRNA-ACL #3, was used in subsequent experiments and is referred to shRNA-ACL. We next determined the time-dependent efficiency of shRNA-ACL at 14, 24, 36, 48, 72 and 96 h post-transfection. shRNA-ACL decreased ACL mRNA level as early as 14 h ($50 \pm 0.5\%$ reduction vs $t = 0$) with a maximal effect between 36 and 48 h post-transfection ($74 \pm 2\%$ and $75 \pm 1.5\%$ vs $t = 0$, respectively). At the protein level, ACL expression was reduced by 30% at 24 h and by 75% at 96 h, as compared to ScrACL. Since suppression of ACL expression for a long period of time could affect cell growth (42,43), we decided to perform the experiments at 48 h post-transfection.

Insulin secretion was assayed in INS 832/13 cells transfected with shRNA-ACL, the scrambled control (ScrACL), or the empty-vector (Mock). At 10 mM glucose, but not 5 mM, the insulin secretion in ScrACL treated cells was slightly but significantly lower ($p < 0.05$), as compared to empty-vector-transfected cells (Mock). Perhaps the insert with shRNA-ScrACL very slightly perturbed the insulin release machinery, although there was no difference at 10 mM glucose plus palmitate or 5 mM glucose plus or minus palmitate. In addition, we verified that the shRNA-ScrACL did not affect basal and KCl-induced insulin secretion as well as glucose oxidation, fatty acid oxidation and ACL expression.

Knockdown of ACL protein expression by 67% with shRNA-ACL (Fig. 3A) significantly inhibited GIIS at both intermediate (5 mM, 43% vs ScrACL) and elevated (10 mM, 25% vs ScrACL) glucose concentrations (Fig. 3B), without affecting the secretory effect of KCl. Basal insulin release at 1 mM glucose (Fig 3B) and the cellular insulin content (6.0 ± 0.3 and 6.0 ± 0.4 ng insulin/ μ g protein for ScrACL and shRNA-ACL, respectively; $n = 4$), were not affected by the reduction in ACL expression. In the presence of 0.3 mM palmitate, ACL knockdown in INS 832/13 cells led to a 27% decrease in GIIS at 5 mM glucose, whereas at 10 mM glucose the reduction in GIIS was not statistically significant (Fig. 3B). The fact that reduced insulin secretion by either radicicol or ACL knockdown was less prominent when the experiments were performed in the presence of exogenous fatty acids fits with the concept that pyruvate/citrate cycling is linked to the production of lipid signaling molecules, e.g. malonyl-CoA and FA-CoA.

In order to further understand the role of ACL in the regulation of GIIS, we investigated the effect of ACL knockdown on the amplification/ K_{ATP} -independent pathway. The combination of diazoxide (an activator of the K_{ATP} channel) with a stimulatory concentration of elevated KCl allows the assessment of GIIS at high cytosolic Ca^{2+} by a pathway independent of K_{ATP} channel closure (44). As shown in Fig 3C, insulin secretion at 5 and 10 mM glucose in presence of diazoxide and KCl was decreased by 20% and 37%, respectively as compared to ScrACL control, indicating that ACL activity is implicated in metabolic signaling by glucose, and is needed for the optimal operation of the K_{ATP} -independent pathway(s) of GIIS.

ACL downregulation affects fatty acid metabolism but not glucose oxidation.

Acetyl-CoA produced from citrate cleavage by ACL is converted to malonyl-CoA, a candidate MCF. Prentki *et al.* (14) have suggested that malonyl-CoA by inhibiting carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT-1), decreases fatty acid (FA) oxidation and diverts FA-CoA into esterification products, leading to a potentiation effect of FA on GIIS. In order to test if the decrease in GIIS observed using shRNA-ACL could be linked to an

alteration in FA metabolism, FA oxidation was measured using ^{14}C -palmitate. In both empty-vector (Mock) and ScrACL transfected INS 832/13 cells, increasing glucose concentration in the incubation media led to a dose-dependent decrease in FA oxidation (Fig. 4A). This decrease in FA oxidation in response to rising glucose was also observed in shRNA-ACL transfected cells, but at a lesser extent. As shown in Fig. 4A, FA oxidation in shRNA-ACL transfected cells was increased at intermediate (5 mM) and elevated (10 mM) glucose concentration compared to the ScrACL or Mock controls.

We also investigated if an inhibition of ACL expression affects FA synthesis and elongation, a process that requires malonyl-CoA and NADPH (two candidate MCF), by measuring ^{14}C -glucose incorporation into FA. Knockdown of ACL expression by shRNA-ACL reduced glucose incorporation into FA at both 5 and 10 mM glucose (Fig. 4B). Glucose oxidation measured in cells transfected with shRNA-ACL did not differ from control conditions (Mock and ScrACL) at either basal (1 mM) or elevated (10 mM) glucose (Fig. 4C). Collectively these results suggest that knockdown of ACL expression by shRNA-ACL did not affect glucose oxidation but did alter FA metabolism, possibly via a reduction in malonyl-CoA and/or NADPH levels.

shRNA-ME1 decreases ME1 expression and inhibits GIIS.

Finally in order to ascertain whether cytosolic ME (ME1), which catalyzes the last enzymatic step in the pyruvate/citrate cycling process, contributes to the regulation of GIIS, we knocked-down ME1 by shRNA in INS 832/13 cells. We designed and tested four different shRNA specifically directed against ME1 (shRNA-ME1 #1 to #4). Compared to a scrambled control (ScrME), shRNA #1 to #4 decreased ME1 expression at the mRNA level by 40 to 60%, 24 h post-transfection (data not shown). The most efficient, shRNA-ME1 #3 was chosen for subsequent experiments and is mentioned as shRNA-ME1. Determination of the time-dependant efficiency of shRNA-ME1 showed that shRNA-ME1 decreased ME1 expression at the mRNA level after 24 h (42% vs $t = 0$) with a maximal effect between 36 and 48 h post-transfection (81%). However, ME1 activity was decreased only by less than

50% at 48 and 72 h post-transfection. We therefore performed the experiments 96 h post-transfection, when ME1 activity was reduced by more than 60% (Fig. 5A). No sign of toxicity (assayed by trypan blue, data not shown) was observed in INS 832/13 cells transfected with shRNA-ME1, ScrME or empty-vector (Mock).

Knockdown of ME1 activity decreased insulin secretion at intermediate (5 mM) and elevated (10 mM) glucose by more than 30% compared to ScrME, without any effect on KCl-stimulated insulin release (Fig. 5B). Basal insulin release at 1 mM glucose (Fig 5B) and the cellular insulin content were not affected by the reduction in ME1 expression (3.9 ± 0.3 ng insulin/ μ g protein and 4.0 ± 0.4 ng insulin/ μ g protein for ScrME and shRNA-ME1, respectively; n=3). Oxidative metabolism of glucose was not affected by shRNA-ME1 (Fig. 5C).

Discussion

In a previous study, we showed that a pyruvate/citrate shuttle is operational in INS-1 β -cells and provided correlative biochemical evidence suggesting that anaplerosis/cataplerosis is implicated in fuel-induced insulin secretion (27). The current study aimed at directly testing these hypotheses using pharmacological and molecular approaches. As detailed below through the examination of each step in the cycle, the current results, together with our previous work (20,21,27), provide strong evidence supporting the view that pyruvate/citrate cycling is implicated in the amplification/ K_{ATP} -independent pathway of glucose signaling for insulin secretion.

The first step of this cycling process involves the carboxylation of pyruvate by pyruvate carboxylase (PC) (Fig. 6). We previously showed that inhibiting this enzyme with phenylacetate curtailed GIIS and that the dose dependence of the drug inhibitory effect on insulin secretion correlated with reductions in cellular citrate (23). In addition, glucose stimulation of the β -cell was associated with a rise in both mitochondrial (corresponding to the result of the second reaction in the cycle catalyzed by citrate synthase) and cytosolic citrate (23). The implication in glucose signaling of the export of citrate from the mitochondria to the cytosol (cataplerotic output), the third step of pyruvate/citrate cycling, has been studied by Joseph et al. (31). These authors recently reported that either pharmacological inhibition of the tricarboxylate carrier (TIC) using 1,2,3-benzenetricarboxylate (BTC) or TIC knockdown using specific siRNA, both resulted in a reduction of GIIS in INS 832/13 cells and rat islets. However, even though TIC conducts citrate export from the mitochondria (37), the dicarboxylate carrier (DIC) supplies malate for the exchange transport of citrate through TIC (36,45). In the current study, the inhibition of either TIC (with BTC) or DIC (with BM) resulted in a decrease in GIIS. These results suggest that both di- and tri-carboxylate carriers are important for glucose signaling.

Once in the cytosol, citrate is cleaved by ACL to oxaloacetate and acetyl-CoA, which can be converted to malonyl-CoA. In the present study, radicicol, a pharmacological

inhibitor of ACL, decreased GIIS in INS 832/13 cells, similar to earlier results in dispersed rat pancreatic β -cells (38), suggesting that inhibition of ACL activity is important for GIIS. The involvement of ACL in GIIS was further confirmed using the RNAi approach. Knockdown of ACL expression by shRNA-ACL reduced GIIS and affected the K_{ATP} -independent pathway of GIIS. Since ACL activity provides substrate for the formation of malonyl-CoA, an inhibitor of CPT-1 and FA oxidation, we verified that knockdown of ACL led to a rise in FA oxidation. As glucose-derived cytosolic malonyl-CoA, and NADPH generated by the cycle are utilized for FA synthesis, we also verified the prediction that ACL knockdown does lead to a reduction in ^{14}C -glucose incorporation into FA. The penultimate step in pyruvate/citrate cycling involves the conversion of malate (derived from the reduction of oxaloacetate by malate dehydrogenase) into pyruvate by the cytosolic isoform of ME (ME1). Knockdown of ME1 decreased GIIS without affecting glucose oxidation. These results implicate ME1 in glucose-induced insulin secretion in INS 832/13 cells. Similar results were described previously by Pongratz *et al.* (32). Finally, the last step in the cycle involves the mitochondrial pyruvate transporter, and others showed that inhibiting this carrier with α -cyano-4-hydroxycinnamate curtailed GIIS in the rat pancreatic islets (46). Collectively, the above results provide very strong support for the concept that pyruvate/citrate cycling plays an important role in GIIS.

Three different pyruvate cycling processes (pyruvate/malate, pyruvate/citrate and pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate) have been proposed to be active in the β -cell, possibly linking mitochondrial metabolism to insulin secretion. It should be underscored that none of these pyruvate cycling processes are exclusive and that they might be redundant or vary in activity depending on species or the nutritional state. A common feature of these metabolite shuttles is the production of NADPH. Ivarsson *et al.* (8) have shown that elevation in glucose concentration correlates with a rise in NADPH to $NADP^+$ ratio and β -cell capacitance, a measurement for insulin granule exocytosis. This supported earlier suggestions of Hedekov *et al.* (47) that the cytosolic NADPH to $NADP^+$ ratio, rather than the NADH to NAD^+ ratio, establishes a link between glucose metabolism and insulin

secretion. In pancreatic β -cells, most of the cytosolic NADPH is produced by ME1 and/or cytosolic isocitrate dehydrogenase, but little by glucose-6 phosphate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway, as relatively low amount of glucose is metabolized through this pathway (20). Whether NADPH acts directly or indirectly on insulin exocytosis remains to be determined. NADP(H) could act on insulin release by binding to the Kv β -subunits of the voltage-dependent K⁺ channels (48), or perhaps by binding to the nucleotide inhibitory site of the KATP channel (49). Different NADPH using enzymes have been reported to regulate insulin secretion (for review see (28)), including thioredoxin and glutaredoxin (8) and the neuronal isoform of nitric oxide synthase (nNOS) (50,51), which are additional candidates for the possible role of NADPH in the regulation of insulin release.

Among the three pyruvate shuttles linking glucose metabolism to insulin secretion, only pyruvate/citrate cycling contributes to malonyl-CoA formation and the reoxidation of cytosolic NAD. These two features render this cycling process particularly attractive with respect to the two others since both features favour high glycolytic flux. Thus, the NAD regeneration allows flux through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, whereas high malonyl-CoA, by inhibiting fatty acid oxidation, should allow full glucose usage and also prevents a possible inhibition of pyruvate dehydrogenase by fatty acid oxidation and the establishment of Randle cycle.

The hypothesis presented here that pyruvate/citrate cycling is important for GIIS is attractive, not only because this cycling process is linked to the production of NADPH, NAD⁺ and malonyl-CoA in the cytoplasm, but also because enhanced pyruvate/citrate cycling might be related to mitochondrial ATP production (Fig 6). Thus, during the operation of the pyruvate/citrate shuttle, malate is co-transported by both the TIC and DIC carriers with a net influx of inorganic phosphate. The later is a substrate for ATP synthase, and ATP is released in the cytoplasm through adenine nucleotide translocase. Thus, in response to an elevation in glucose concentration, activation of mitochondrial metabolism

and of pyruvate cycling through the pyruvate/citrate shuttle should favour the net synthesis of ATP, malonyl-CoA and NADPH, three key candidate MCFs for the regulation of insulin secretion, as well as cytosolic NAD⁺, important for the positive regulation of the glycolytic flux. Moreover, Fransson *et al* (52) have recently provided evidence that PC, and thus anaplerosis, is important for the rise of ATP to ADP ratio in response to glucose.

In conclusion, the results support the hypothesis that pyruvate/citrate cycling plays a critical role in the regulation of insulin secretion in response to glucose. Since pyruvate cycling, possibly via a rise in PC and ME1 expression, is increased in rodent models of β -cell compensation for insulin resistance (26,53) in which insulin secretion is enhanced, it will also be of interest to determine whether pyruvate/citrate cycling plays a role in β -cell compensation and failure in the etiology of type 2 diabetes.

Acknowledgements - This work was supported by a grant from the Canadian Institut of Health Research (to M.P.). C. Guay was supported by graduate studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec and Programmes de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal.

Abbreviations – glucose-induced insulin secretion (GIIS); ATP-dependent potassium channels (K_{ATP} channels); metabolic coupling factor (MCF); free fatty acid (FFA); fatty-acyl-CoA (FA-CoA); tricarboxylic acid (TCA); pyruvate carboxylase (PC); oxaloacetate (OAA); ATP-citrate lyase (ACL); cytosolic isoform of malic enzyme (ME1); fatty acid (FA); n-butylmalonate (BM); 1,2,3-benzenetricarboxylate (BTC); tricarboxylate carrier (TIC); dicarboxylate carrier (DIC)

References

1. Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., and Ashcroft, S. J. (1984) *Nature* **312**, 446-448
2. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P. t., Boyd, A. E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. (1995) *Science* **268**, 423-426
3. Straub, S. G., and Sharp, G. W. (2002) *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463
4. Ashcroft, F. M. (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**, 671-675
5. Fahien, L. A., and MacDonald, M. J. (2002) *Diabetes* **51**, 2669-2676
6. Maechler, P., and Wollheim, C. B. (1999) *Nature* **402**, 685-689
7. MacDonald, M. J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 20051-20058
8. Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., in 't Veld, P., Renstrom, E., and Schuit, F. C. (2005) *Diabetes* **54**, 2132-2142
9. Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E., and Collins, S. (2007) *Diabetes* **56**, 1783-1791
10. Roduit, R., Masiello, P., Wang, S. P., Li, H., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2001) *Diabetes* **50**, 1970-1975
11. Peyot, M. L., Nolan, C. J., Soni, K., Joly, E., Lussier, R., Corkey, B. E., Wang, S. P., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2004) *Diabetes* **53**, 1733-1742
12. Prentki, M., and Nolan, C. J. (2006) *J Clin Invest* **116**, 1802-1812
13. Prentki, M., and Matschinsky, F. M. (1987) *Physiol Rev* **67**, 1185-1248
14. Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M. C., Regazzi, R., Deeney, J. T., and Corkey, B. E. (1992) *J Biol Chem* **267**, 5802-5810
15. Corkey, B. E., Glennon, M. C., Chen, K. S., Deeney, J. T., Matschinsky, F. M., and Prentki, M. (1989) *J Biol Chem* **264**, 21608-21612
16. Nolan, C. J., Madiraju, M. S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M. L., and Prentki, M. (2006) *Diabetes* **55** Suppl 2, S16-23
17. 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., and Prentki, M. (2004) *Diabetes* **53**, 1007-1019
18. Herrero, L., Rubi, B., Sebastian, D., Serra, D., Asins, G., Maechler, P., Prentki, M., and Hegardt, F. G. (2005) *Diabetes* **54**, 462-471
19. Owen, O. E., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. (2002) *J Biol Chem* **277**, 30409-30412
20. Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18572-18579
21. Brun, T., Roche, E., Assimacopoulos-Jeannet, F., Corkey, B. E., Kim, K. H., and Prentki, M. (1996) *Diabetes* **45**, 190-198
22. Khan, A., Ling, Z. C., and Landau, B. R. (1996) *J Biol Chem* **271**, 2539-2542
23. MacDonald, M. J. (1993) *Metabolism* **42**, 1229-1231
24. MacDonald, M. J., McKenzie, D. I., Walker, T. M., and Kaysen, J. H. (1992) *Horm Metab Res* **24**, 158-160
25. Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S. C., Jensen, M. V., Kamzolova, S., Newgard, C. B., and Sherry, A. D. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2708-2713

26. Liu, Y. Q., Jetton, T. L., and Leahy, J. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 39163-39168
27. Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., and Prentki, M. (2000) *Diabetes* **49**, 718-726
28. MacDonald, M. J., Fahien, L. A., Brown, L. J., Hasan, N. M., Buss, J. D., and Kendrick, M. A. (2005) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1-15
29. Ronnebaum, S. M., Ilkayeva, O., Burgess, S. C., Joseph, J. W., Lu, D., Stevens, R. D., Becker, T. C., Sherry, A. D., Newgard, C. B., and Jensen, M. V. (2006) *J Biol Chem* **281**, 30593-30602
30. MacDonald, M. J. (2002) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**, E302-310
31. Joseph, J. W., Jensen, M. V., Ilkayeva, O., Palmieri, F., Alarcon, C., Rhodes, C. J., and Newgard, C. B. (2006) *J Biol Chem* **281**, 35624-35632
32. Pongratz, R. L., Kibbey, R. G., Shulman, G. I., and Cline, G. W. (2007) *J Biol Chem* **282**, 200-207
33. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C. B. (2000) *Diabetes* **49**, 424-430
34. Rduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C. B., Assimacopoulos-Jeannet, F., and Prentki, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 35799-35806
35. Fulgencio, J. P., Kohl, C., Girard, J., and Pegorier, J. P. (1996) *Diabetes* **45**, 1556-1562
36. Mizuarai, S., Miki, S., Araki, H., Takahashi, K., and Kotani, H. (2005) *J Biol Chem* **280**, 32434-32441
37. Azzi, A., Glerum, M., Koller, R., Mertens, W., and Spycher, S. (1993) *J Bioenerg Biomembr* **25**, 515-524
38. Flamez, D., Berger, V., Kruhoffer, M., Orntoft, T., Pipeleers, D., and Schuit, F. C. (2002) *Diabetes* **51**, 2018-2024
39. Chen, S., Ogawa, A., Ohneda, M., Unger, R. H., Foster, D. W., and McGarry, J. D. (1994) *Diabetes* **43**, 878-883
40. Sener, A., and Malaisse, W. J. (1991) *Biochimie* **73**, 1287-1290
41. Ki, S. W., Ishigami, K., Kitahara, T., Kasahara, K., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (2000) *J Biol Chem* **275**, 39231-39236
42. Bauer, D. E., Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Andreadis, C., and Thompson, C. B. (2005) *Oncogene* **24**, 6314-6322
43. Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D. E., Andreadis, C., Shaw, A. N., Dhanak, D., Hingorani, S. R., Tuveson, D. A., and Thompson, C. B. (2005) *Cancer Cell* **8**, 311-321
44. Henquin, J. C. (2000) *Diabetes* **49**, 1751-1760
45. Bisaccia, F., De Palma, A., Dierks, T., Kramer, R., and Palmieri, F. (1993) *Biochim Biophys Acta* **1142**, 139-145
46. Best, L., and Tomlinson, S. (1988) *Biochem Pharmacol* **37**, 2019-2022
47. Hedekov, C. J., Capito, K., and Thams, P. (1987) *Biochem J* **241**, 161-167
48. MacDonald, P. E., and Wheeler, M. B. (2003) *Diabetologia* **46**, 1046-1062
49. Dabrowski, M., Trapp, S., and Ashcroft, F. M. (2003) *J Physiol* **550**, 357-363
50. Lajoix, A. D., Reggio, H., Chardes, T., Peraldi-Roux, S., Tribillac, F., Roye, M., Dietz, S., Broca, C., Manteghetti, M., Ribes, G., Wollheim, C. B., and Gross, R. (2001) *Diabetes* **50**, 1311-1323
51. Salehi, A., Carlberg, M., Henningson, R., and Lundquist, I. (1996) *Am J Physiol* **270**, C1634-1641

52. Fransson, U., Rosengren, A. H., Schuit, F. C., Renstrom, E., and Mulder, H. (2006) *Diabetologia* **49**, 1578-1586
53. Liu, Y. Q., Moibi, J. A., and Leahy, J. L. (2004) *J Biol Chem* **279**, 7470-7475

Figure Legends

FIGURE 1. Pharmacological inhibition of mitochondrial citrate export decreases glucose-induced insulin secretion. Insulin release was measured in INS 832/13 cells, incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) or 1 mM glucose plus 35 mM KCl in the absence (Control) or the presence of 0.5 mM n-butylmalonate (BM) and 1,2,3-benzenetricarboxylate (BTC). Insulin levels were normalized by protein content and expressed as fold increase over 1 mM G under the same incubation condition. Data represent means \pm SEM of 4 independent experiments each done in quadruplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs control under the same glucose concentration.

FIGURE 2. Inhibition of ACL activity by radicicol decreases glucose-induced insulin secretion. Insulin release was measured in INS 832/13 cells, incubated at 1, 5 or 10 mM glucose or 1 mM glucose plus 35 mM KCl in the absence (Control) or the presence of 50 μ M radicicol \pm 0.3 mM palmitate. Insulin levels were normalized by protein content and expressed as fold increase over 1 mM G under the same incubation condition. Data represent means \pm SEM of 3 to 4 independent experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs control under the same glucose concentration.

FIGURE 3. Knock-down of ACL expression reduces glucose-induced insulin secretion. INS 832/13 cells were transfected with ScrACL, shRNA-ACL or empty-vector (Mock) by electroporation and cells were cultured for 48 h prior to the experiment. A) Immunoblot analysis of ACL expression. Data represent the mean \pm SEM of 11 (Mock) or 14 (ScrACL and shRNA-ACL3) independent experiments. B) Glucose-induced insulin secretion. Insulin release was measured in transfected cells, incubated at 1, 5 or 10 mM glucose or 1 mM glucose plus 35 mM KCl \pm 0.3 mM palmitate. Insulin levels were normalized by protein content and results are expressed as fold increase over 1 mM G under the same transfection condition. C) Assessment of the amplification/ K_{ATP} -independent pathway of glucose-induced insulin secretion. Insulin secretion was measured in transfected cells incubated at 1, 5 or 10 mM glucose \pm 150 μ M diazoxide plus 35 mM KCl (Dz + KCl). Insulin levels

were normalized by protein content. Data represent the mean \pm SEM of 3 to 4 independent experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs ScrACL under the same condition.

FIGURE 4. Reduction in ACL expression alters fatty acid metabolism without affecting oxidative glucose metabolism. ScrACL, shRNA-ACL or empty-vector (Mock) were introduced into INS 832/13 cells by electroporation and cells were cultured for 48 h prior to the experiment. For all experiments, transfected cells were incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) and the results were normalized by protein content. A) Fatty acid oxidation was measured using [1-¹⁴C]palmitate. B) Glucose incorporation into free fatty acids was monitored using [U-¹⁴C]glucose. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments done in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs ScrACL under the same incubation condition. C) Glucose oxidation was assayed using [U-¹⁴C]glucose. Data represent means \pm SEM of 2 independent experiments done in triplicate.

FIGURE 5. Knock-down of ME1 expression decreases glucose-induced insulin secretion without affecting glucose oxidation. ScrME, shRNA-ME1 or empty-vector (Mock) were introduced into INS 832/13 cells by electroporation and cells were cultured for 96 h prior the experiment. A) Enzymatic determination of ME1 activity. B) Glucose-induced insulin secretion. Insulin release was measured in transfected cells, incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) or 1 mM G plus 35 mM KCl. Insulin levels were normalized by protein content and results are expressed as fold increase over 1 mM G for the same transfection condition. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments done in quadruplicate. ** $p < 0.01$ vs ScrME under the same incubation condition. C) Glucose oxidation was measured using [U-¹⁴C]glucose. Cells were incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G). Data represent means \pm SEM of 2 independent experiments done in triplicate.

FIGURE 6. Model illustrating the implication of pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. Half of the pyruvate-derived from glucose metabolism enters in

the TCA cycle via its carboxylation by PC, producing oxaloacetate. This anaplerotic process leads to the formation and accumulation of citrate within the mitochondria. At increasing levels, mitochondrial citrate is exported into the cytoplasm by TIC in exchange with malate. Once in the cytosol, citrate is cleaved by ACL, producing acetyl-CoA and oxaloacetate. Acetyl-CoA is then converted to malonyl-CoA by ACC whereas oxaloacetate is reduced by MDH to malate accompanied by the oxidation of NADH into NAD⁺. Malate is converted back into pyruvate by malic enzyme, leading to the production of NADPH. Pyruvate re-enters the mitochondria via the pyruvate transporter. DIC transports malate, entering into mitochondrial matrix via TIC, back into cytosol. The pyruvate/citrate cycling represented by bold arrows together with glucose-derived pyruvate leads to the net synthesis of malonyl-CoA, NAD⁺, NADPH and indirectly ATP (dash circles), the latter being favored by the reoxidation of cytosolic NAD allowing high glycolytic flux, and mitochondrial import of Pi via DIC. See text for discussion. Abbreviations: AAC, acetyl-CoA carboxylase; AAT, ATP-ADP translocase; ACL, ATP-citrate lyase; AS, ATP synthase; DIC, dicarboxylate carrier; MDH, malate dehydrogenase; ME1, cytosolic isoform of malic enzyme; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; PT, pyruvate transporter; TIC, tricarboxylate carrier.

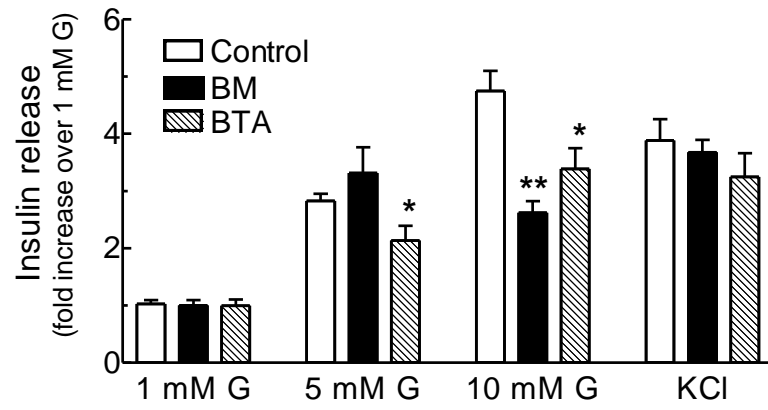


Figure 1 Guay *et al.* JBC 2007

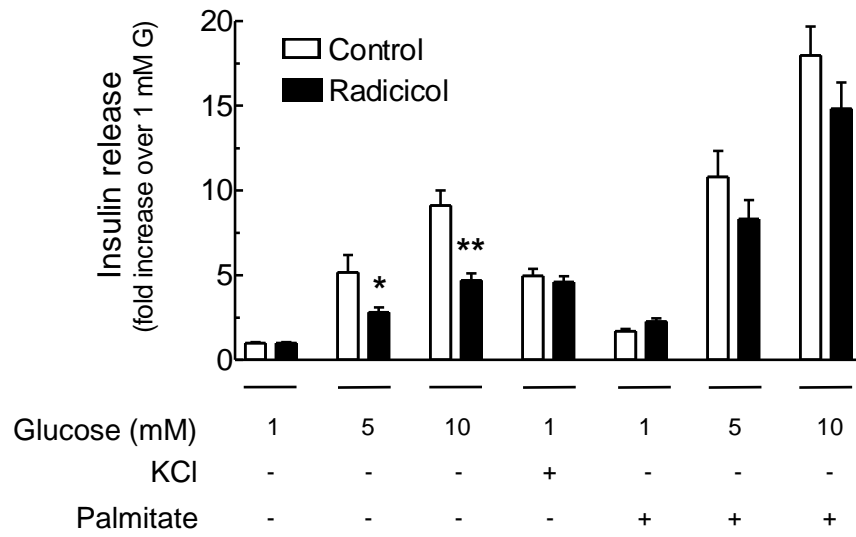


Figure 2 Guay *et al.* JBC 2007

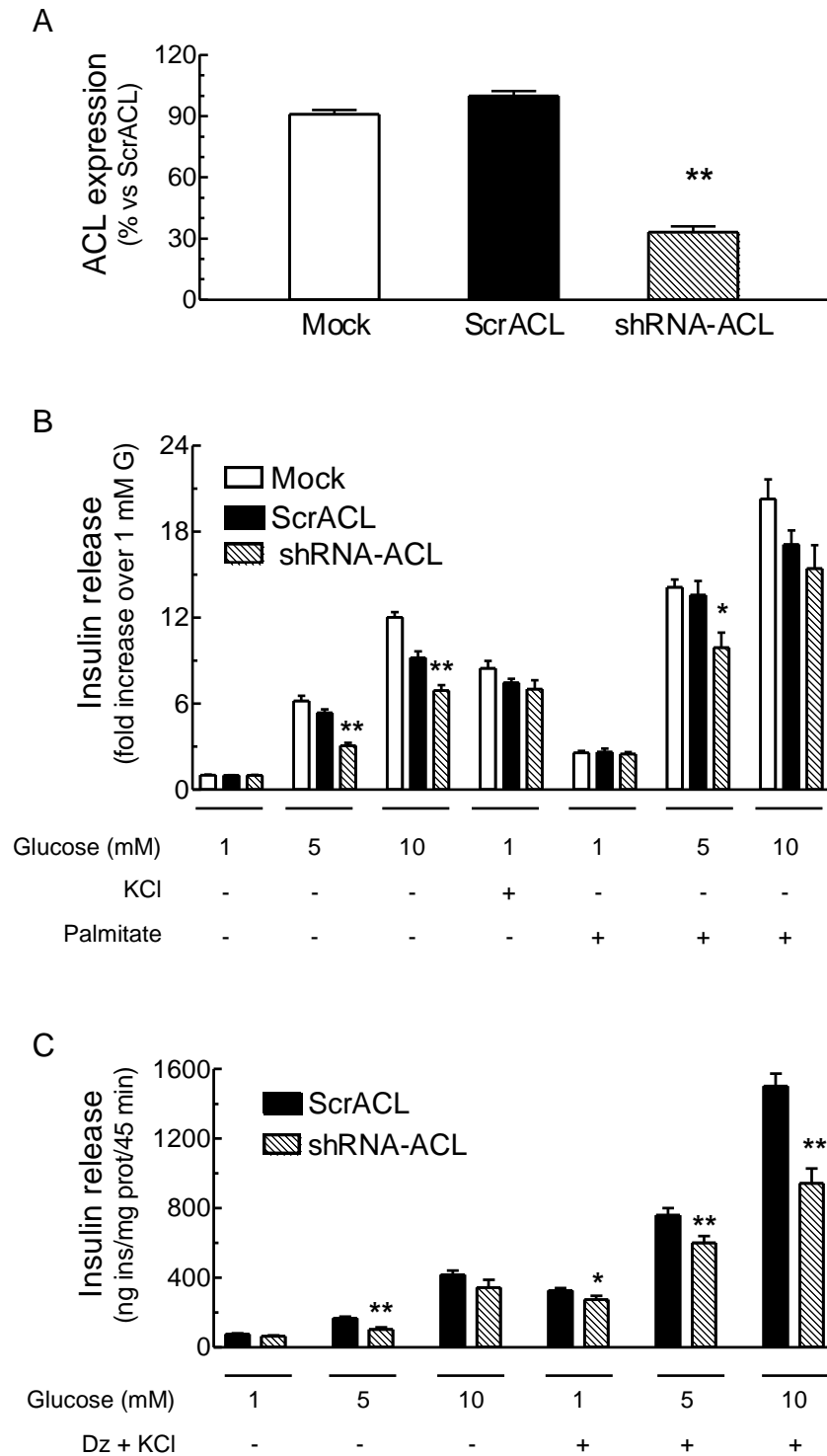


Figure 3 Guay *et al.* JBC 2007

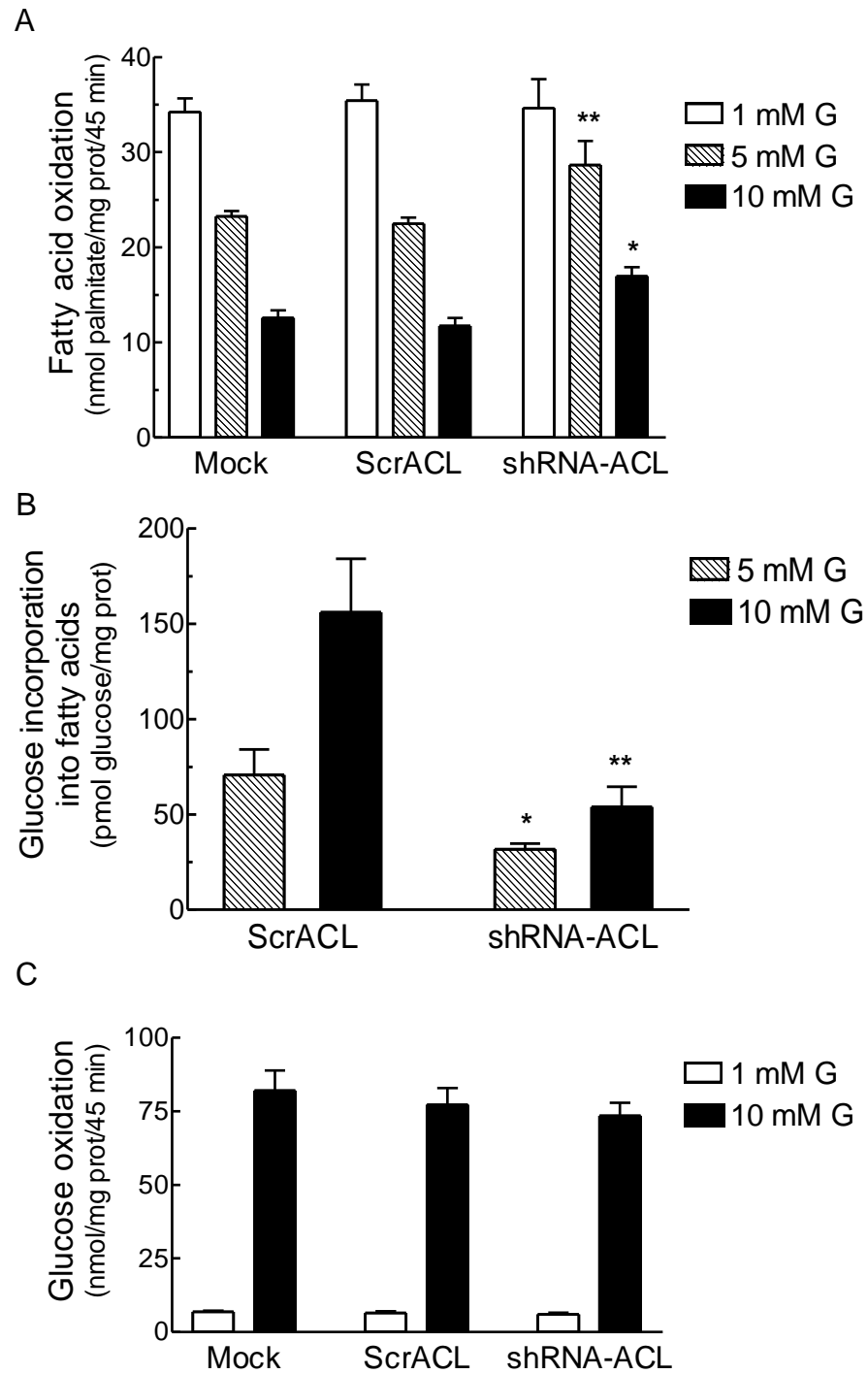


Figure 4 Guay *et al.* JBC 2007

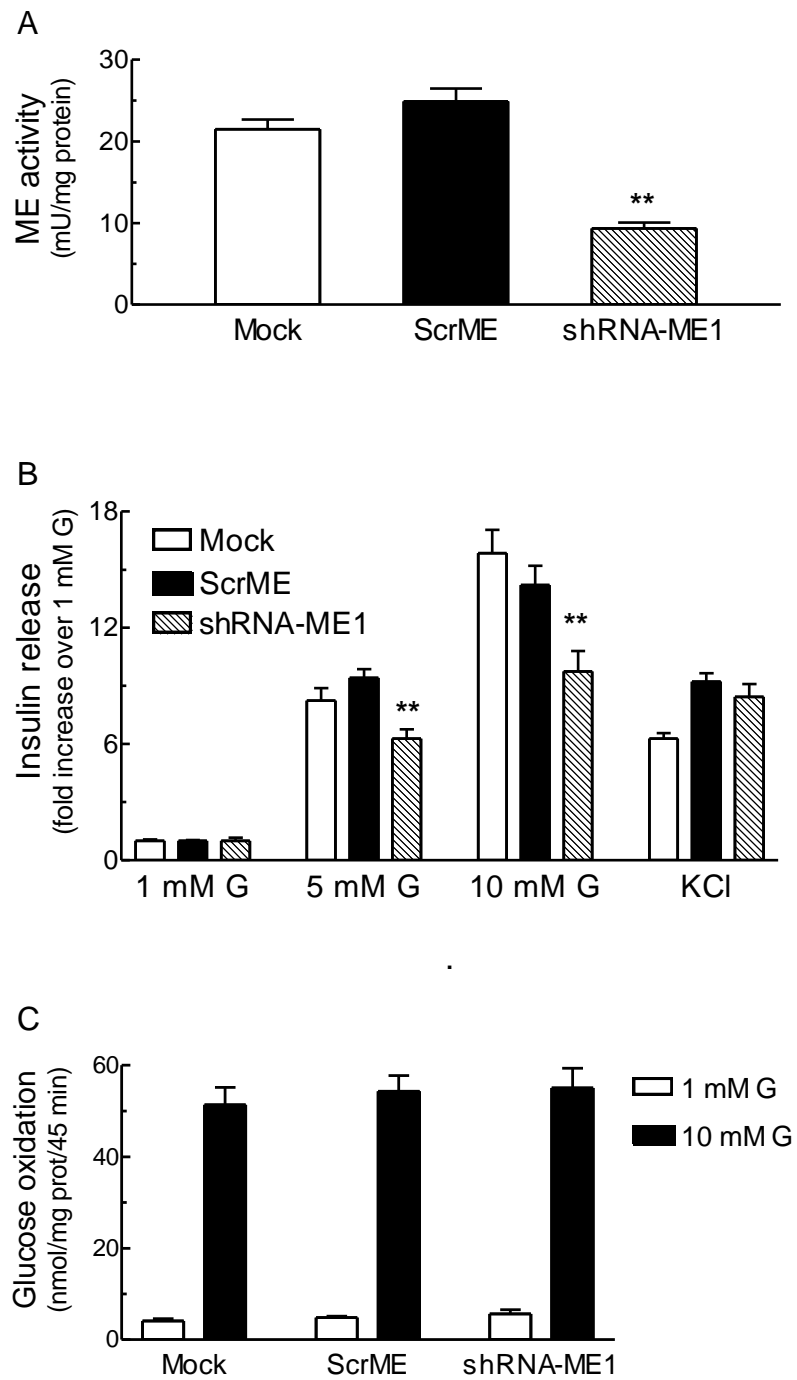


Figure 5 Guay *et al.* JBC 2007

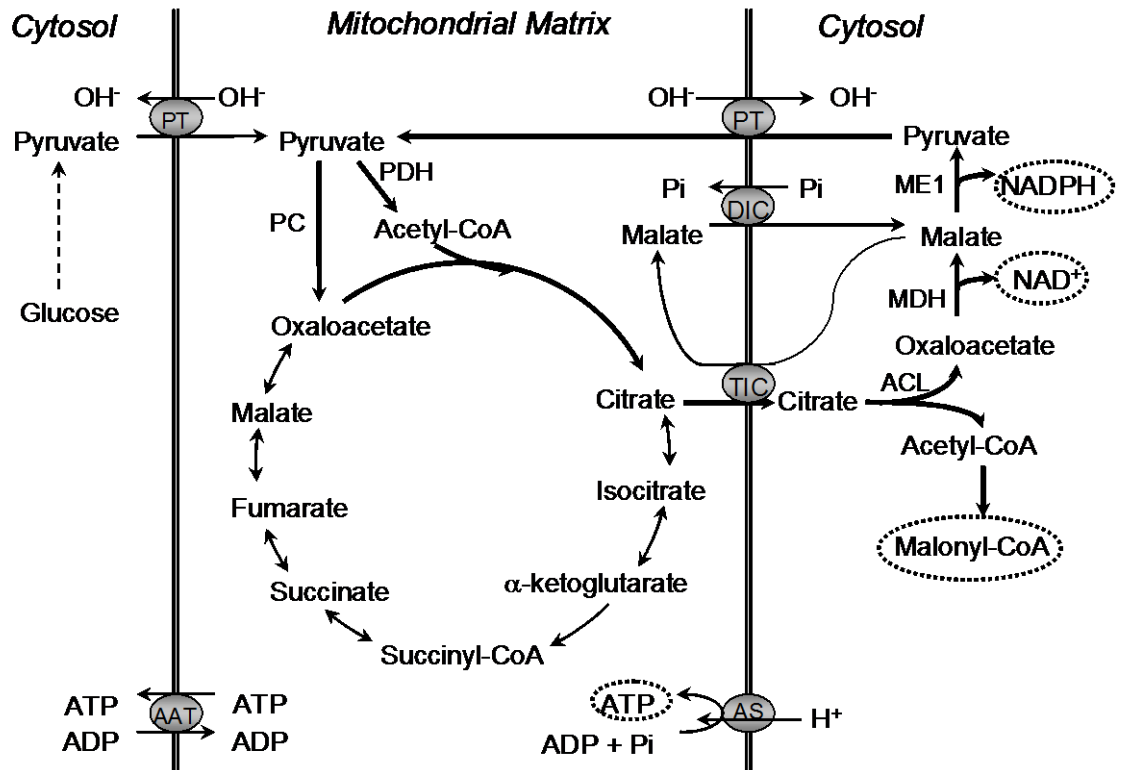


Figure 6 Guay *et al.* 2007

Article 2**A RE-EVALUATION OF THE ROLE OF CYTOSOLIC ISOCITRATE
DEHYDROGENASE IN β -CELL GLUCOSE SIGNALING
FOR INSULIN SECRETION**

Claudiane Guay, Émilie Pepin, Annie Barbeau, S.R. Murthy Madiraju, Érik Joly
and Marc Prentki

Molecular Nutrition Unit and the Montreal Diabetes Research Center, the Centre de
Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Departments of
Nutrition and biochemistry of the University of Montreal, Montreal, QC, Canada.

Running title: Isocitrate dehydrogenase and insulin secretion

To be submitted to: Journal of Biological Chemistry

Address for correspondence:

Marc Prentki
MDRC- CR-CHUM, Technopole Angus (Room 401)
2901, Rachel Street
Montreal, QC, Canada, H1W 4A4,
Phone : 514-890-8000 ext. 23642
Fax : 514-412-7648

Contribution des co-auteurs :

É. Pepin a réalisé les expériences de sécrétion de hGH dans les cellules isolées d'îlots pancréatiques de rat.

A. Barbeau a réalisé les expériences mesurant les effets de la transfection et de l'infection sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

S.R. Madiraju a collaboré à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

É. Joly a collaboré à l'élaboration de ce projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Abstract

In pancreatic β -cells, glucose metabolism-derived metabolic coupling factors (MCF) play an important role in the regulation of insulin secretion. Recent studies have suggested that NADPH may act as an MCF since NADPH concentration correlates with glucose-induced insulin secretion (GIIS). In the β -cell, cytosolic NADPH level is thought to be controlled primarily by the cytosolic isoforms of malic enzyme (MEc) and isocitrate dehydrogenase (IDHc). Previously, we have shown that MEc expression is important for GIIS through the pyruvate/citrate shuttle. IDHc is implicated in the pyruvate/isocitrate/ α -KG shuttle and is also thought to be implicated in the regulation of GIIS. To investigate the role of IDHc in GIIS, we transfected INS 832/13 cells with siRNA against IDHc (siIDH). siIDH#1 and siIDH#2 reduced IDHc mRNA expression by more than 50% and 70%, respectively, with a corresponding decrease of IDHc activity by 15% and 30%. Interestingly, RNAi knockdown of IDHc expression led to a 58% and 46% increase in insulin secretion at 5 mM and 10 mM glucose, respectively. This effect on GIIS was mediated via the K_{ATP} -independent/amplification pathway. Basal and KCl-induced secretion were not affected by IDHc knockdown. This upregulation of insulin secretion in response to glucose in IDHc knockdown cells was confirmed in dispersed rat islet cells transfected with siIDH#2. Glucose and fatty acid oxidations in β -cells with IDHc knockdown were only slightly decreased at 10 mM and 5 mM glucose, respectively. IDHc knockdown cells showed elevated glucose incorporation into fatty acids, suggesting that isocitrate metabolism could be redirected into the pyruvate/citrate shuttle in these cells. However, malonyl-CoA levels were not altered in IDHc-knockdown cells. Taken together, these results suggest that IDHc is not limiting for GIIS as previously thought, and that a compensatory mechanism, probably the pyruvate/citrate shuttle, replenishes the needed MCFs (like NADPH and malonyl-CoA) in pancreatic β -cells.

Introduction

Pancreatic β -cells secrete insulin in response to glucose and other stimuli in order to regulate blood glucose concentration and fuel homeostasis. However, the mechanisms involved in the regulation of insulin secretion in response to glucose and other fuel stimuli remain to be ascertained. A triggering pathway links insulin vesicle exocytosis to glucose oxidation via an elevation in cytosolic ATP, closure of the K_{ATP} channels, depolarisation of the plasma membrane and the opening of voltage-gated Ca^{2+} channels (1-3). The resulting Ca^{2+} influx stimulates exocytosis (4). However, K_{ATP}/Ca^{2+} -independent amplification pathways are also involved in the control of GIIS (5). Metabolic coupling factors (MCF) derived from glucose metabolism (e.g. ATP, malonyl-CoA (6,7), short-chain acyl-CoAs (8), glutamate (9), mitochondrial GTP (10), reactive oxygen species (11,12) and NADPH (13,14)) have been proposed to be critical players in GIIS (see review in (15)). However, the precise mechanisms underlying the action of these candidates MCF implicated in the amplification pathways of GIIS are poorly understood.

Mitochondrial metabolism is an important component of GIIS (16). Nearly 50% of the pyruvate derived from glycolysis in the β -cell enters the Krebs' cycle via conversion to oxaloacetate via by pyruvate carboxylase (PC) (17,18). This anaplerotic process leads to the net synthesis and accumulation of Krebs' cycle intermediates and is coupled to the export (cataplerosis) of metabolites, such as malate and citrate (19,20), into the cytosol where their metabolism leads to the production of signalling molecules for insulin secretion. We and others have studied the role of anaplerosis in GIIS (19-22) and documented the significance of three pyruvate cycling processes in the regulation of GIIS: the pyruvate/malate (13,23,24), pyruvate/citrate (20,25) and pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate shuttles (26).

While only the pyruvate/citrate shuttle leads to the formation of malonyl-CoA for lipid signalling and the production of cytosolic NAD^+ for fast glycolytic flux, (20,25), all three shuttles produce NADPH in the cytosol (13,25,26). In the pyruvate/malate and pyruvate/citrate shuttles, NADPH is produced by cytosolic malic enzyme (MEc), whereas, cytosolic isocitrate dehydrogenase (IDHc) is responsible for NADPH production by the

pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate shuttle. Since the pentose-phosphate pathway is not quantitatively significant in the β -cell (19), MEc and IDHc activities are thought to be the major source of cytosolic NADPH. Interestingly, the dose dependence of GIIS correlates with the cellular NADPH/NADP⁺ ratio (14,24,26,27). Moreover, intracellular addition of NADPH directly stimulated exocytosis of insulin granules (14). Thus, the emerging evidence indicates that NADPH produced in the β -cell cytoplasm by MEc and/or IDHc, is an important MCF in the regulation of GIIS, possibly via the NADPH acceptor protein glutaredoxin-1 (28).

In previous studies, we and others have shown that reduction of MEc expression in INS 832/13, MIN6 cells and in mouse islets impaired GIIS and correlated with a concomitant decrease in NADPH level (23-25,29). In rat islets, siRNA knockdown of MEc did not affect GIIS; however, the NADPH/NADP⁺ ratio was not measured in this study (29). Knockdown of IDHc expression using an siRNA approach with adenoviral constructs altered GIIS in INS 832/13 cells and rat islets and also attenuated the glucose induced increment of NADPH/NADP⁺ ratio (26). However, the total cellular NADP(H) content was also affected in this study and controls of the interference of adenoviruses per se with β -cell metabolism were not reported. Therefore, the implication of IDHc in the regulation of GIIS needs to be confirmed.

In the present study, we reinvestigated the importance of IDHc in the regulation of GIIS. Surprisingly, we found that decreased IDHc expression in INS 832/13 cells using a non-viral-based delivery approach with siRNAs resulted in enhanced GIIS via the K_{ATP}-independent/amplification pathway. Glucose and fatty acid (FA) oxidations were barely affected by siRNA knockdown of IDHc but glucose incorporation into total lipids was increased. Collectively, our results suggest that, unlike proposed previously, IDHc is not a key enzyme implicated in pancreatic β -cell glucose signaling for insulin secretion.

Experimental Procedures

Cell culture – Rat insulinoma INS 832/13 cells (30) (passages 51-64) were grown in monolayer and cultured in RPMI 1640 medium at 11.1 mmol/L glucose supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum, 10 mmol/L HEPES, 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L sodium pyruvate and 50 μ mol/L β -mercaptoethanol (referred as complete RPMI) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air).

Islet isolation - Wistar rats (200–250 g) were obtained from Charles River (St. Constant, QC, Canada). All procedures were approved by the institutional committee for the protection of animals at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Hamilton, ON, Canada) and killed by exsanguinations. Pancreatic islets were isolated by collagenase digestion of the pancreas (31). After digestion and washing, islets were separated from digested exocrine tissue by histopaque gradient, after which they were hand-picked. Isolated islets were incubated overnight in complete RPMI at 11 mM glucose containing 100 μ g/mL of streptomycin and 100 IU/mL of penicillin without β -mercaptoethanol at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air).

siRNA mediated gene suppression – siRNAs directed against rat cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH1 isoform, GenBank™ accession number NM_031510) were purchased from Ambion® (Applied Biosystems, Streetsville, ON, Canada). siRNA duplexes were targeted to 21-pb regions of the IDHc cDNA sequence beginning at nucleotides 73, 97 and 282 and are referred as siIDH#1, siIDH#2 and siIDH#3 respectively in the text. The combination of two different siRNA with no known target provided by Ambion as negative control was used as the siRNA Scrambled. The Silencer Negative Control#A and #B sequences were 5'-UAA CGA CGC GAC GAC GUA Att-3' and 5'-UCG UAA GUA AGC GCA ACC Ctt-3', respectively and referred as ScrAB. The purity of each siRNA strand was measured by analytical HPLC and guaranteed by Ambion.

Cell transfection – Cells were seeded in 75-cm² flasks at 4x10⁶ cells two days prior to transfection and were at 60-70% confluence at the time of transfection. Small interfering RNA (siRNA) duplexes were introduced into INS 832/13 cells using Nucleofector technology (Amaxa Inc., Walkersville, MD, USA) (25). To preserve a ratio of 5 µg of DNA for 6x10⁶ cells, 4.4 µg of plasmid BlueScript were combined to 0.6 µg of siRNA. Therefore, a condition of plasmid BlueScript transfected alone (referred as pBS in the text) was included in our experiments as control. After transfection, INS 832/13 cells were seeded in 12-well plates at 0.6x10⁶ cells for insulin secretion assays, protein content, and mRNA analysis, in 6-well plates at 1.6x10⁶ cells for glucose incorporation into total lipids assay, in 60-mm tissue culture plates at 2.5x10⁶ cells for IDHc activity, in 25-cm² flasks at 3.2x10⁶ cells for glucose and fatty acid oxidation measurements, and in 100-mm tissue culture at 5x10⁶ cells for malonyl-CoA and metabolite determinations. Experiments were performed 48 h post-transfection.

Cell infection – Cells were treated as described below in order to reproduce as closely as possible the method used by Dr C. Newgard and coll. for INS 832/13 cells (26,29,32-34). Cells were seeded in 12-well plates at 2x10⁵ cells/well and cultured for 36 h before infection. Cells were infected with adenoviruses expressing the bacterial β-galactosidase under the beta-actin promoter (Ad-LacZ) (35) or expressing GFP under the CMV-5 promoter (Ad-GFP) (kindly provided by Dr Yves Langelier (36)) at viral dose of 10 or 60 plaque-forming units (pfu)/cell (referred as 10 or 60 multiplicity of infection (MOI) in the text, respectively) for 16 h in 0.5 mL of complete RPMI. They were then washed and further cultured for 48 h in 1 mL of the same media prior to GIIS experiments. The adenoviruses were amplified using the packaging cell line BMA200-8, and purified by CsCl ultracentrifugation. CsCl was removed by dialysis in 20 mM Tris pH 8.0, 25 mM NaCl and 2.5% glycerol, and viral aliquots were stored at –80 °C for single use. Stock titer was carefully assessed using the plaque-assay method with the permissive 293A cell line.

Real-time quantitative PCR analysis – Cells were extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) with Rnase-Free Dnase (Qiagen) from 12-well plates. RNA was reversed transcribed to cDNA using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and hexamers as described previously (37). Forward and reverse sequence primers (IDT) were designed specifically for IDHc and normalized to cyclophilin and to 18S. Primer sequences were: IDHc F: 5'-CTG GAT CTG CAT AGC TAT GAC-3', and R: 5'-CCT CAA CCC TCT TCT CAT CG-3'. Cyclophilin F: 5'-CTT GCT GCA GAC ATG GTC AAC-3', and R: 5'-GCC ATT ATG GCG TGT GAA GTC-3'. 18S F: 5'-CTG AGA AAC GGC TAC CAC ATC-3', and R: 5'-GGC CTC GAA AGA GTC CTG TAT-3'. Real-time quantitative PCR were performed on Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) using LC Faststart DNA Masterplus SYBR Green reagent (Roche, Laval, QC, Canada). Results were analyzed using the Rotor-Gene software version 6.0.19 provided by Corbett Research.

Cytosolic NADP⁺-dependant isocitrate dehydrogenase 1 activity – Isocitrate dehydrogenase activity was assayed in fresh cytosolic cell extracts. Briefly, 48 h post-transfection, transfected cells were placed on ice, washed with cold PBS, extracted by scraping in ice-cold PBS/EGTA buffer containing protease inhibitors (1 µg/ml of leupeptin and pepstatin, 1 mmol/L PMSF, and 1.5 µg/ml of aprotinin; referred as protease inhibitor mix). Cell suspension was centrifuged at 1000 x g for 2 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 500 µl of a ice-cold homogenization buffer containing 20 mmol/L HEPES (pH 7.4), 0.25 mol/L sucrose, 1 mmol/L EGTA, and protease inhibitor mix, and homogenized by hand using a 1 ml Potter-Elvehjem homogenizer with 25 gentle passes. Homogenates were centrifuged at 1,000 x g for 2 min at 4°C to discard nuclei and then at 12,000 x g for 30 min at 4°C to discard mitochondria. The post-mitochondrial supernatant content was concentrated using a Microcon® YM-30 (Millipore, Billerica, MA). Final volume of the concentrate was adjusted to 100 µl with ice-cold homogenization buffer (see above), and 40 µl was used for IDH activity. The assay system in 96-well plates contained 100 mmol/L of Tris buffer pH 8.0, 7 % glycerol, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L NADP⁺ and

3 mmol/L of isocitrate. Reactions were started adding cytosolic extracts, immediately followed by shaking, and absorbance at 340 nm was read every 15 s for up to 10 min using Fluostar Optima (BMG Labtechnologies, Offenburg, Germany). For each set of experiments, background control was run without isocitrate as substrate. Enzyme activity was determined by subtracting the activity of the background control of each sample. The resulting slopes of absorbance versus time were normalized to protein content using a BCA protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Insulin secretion and contents – siRNA-transfected cells were pre-incubated during 2 h in RPMI complete medium at 1 mmol/L glucose and then were equilibrated for 1 h in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mmol/L HEPES (KRBH; pH 7.4), 0.5% defatted BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and 1 mmol/L glucose. Cells were then incubated for 45 minutes in KRBH containing 0.5% BSA and 1, 5 or 10 mmol/L glucose, in the presence or absence of 35 mmol/L KCl, and/or 20 μ mol/L diazoxide. Stock solution of diazoxide was prepared in DMSO and final DMSO concentration in KRBH was 0.5%. At the end of incubation, media were collected for insulin determination. Total insulin content of the cells was measured after acid-ethanol (0.2 mmol/L HCl in 75% ethanol) extraction. Insulin levels were measured by radioimmunoassay using a human insulin standard (Linco Research, St. Charles, MO). Insulin levels were normalized to total insulin content or protein content.

Glucose and fatty acid metabolism – Glucose oxidation to CO₂, FA oxidation to CO₂ and acid-soluble products (ASP; essentially ketone bodies (38)) and glucose incorporation into FA were measured in transfected INS 832/13 cells pre-incubated as described for insulin secretion assay. For glucose oxidation experiments, cells were incubated for 45 min in KRBH containing 0.5% BSA and, 1 mmol/L glucose with 0.1 μ Ci/ml of [U-¹⁴C]glucose (Amersham, Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada), or 10 mmol/L glucose and 0.2 μ Ci/ml of [U-¹⁴C]glucose. The experiments were performed as previously described (25). For fatty acid oxidation experiments, cells were incubated for 45 min in KRBH containing

0.5% BSA, 1, 5 or 10 mmol/L glucose in the presence of 1 mmol/L carnitine plus 0.2 mmol/L palmitate, and 0.1 $\mu\text{Ci/ml}$ of $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ palmitate (PerkinElmer). Beta-oxidation to CO_2 and ASP was performed as previously described (39). For glucose incorporation into FA, cells were incubated for 2 h in KRBH containing 0.5% BSA, 1, 5 or 10 mmol/L glucose and 3 $\mu\text{Ci/ml}$ $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucose (Amersham) in the presence of 1 mmol/L oleate. At the end of the incubation period, media were removed, cells were washed once with PBS and 1 ml of PBS + 0.53 mmol/L EDTA were added to the plated cells. Cells were collected with gentle pipeting, centrifuged at 500 x g for 10 min at 4°C, dissolved in 3 ml of CHCl_3 :methanol:HCl (200:100:1 v/v), and placed at -20°C until the extraction. Lipid extractions and semi-quantitative analysis of ^{14}C -FA were performed as previously described (25).

Malonyl-CoA measurements – Malonyl-CoA levels were measured in transfected INS 832/13 cells pre-incubated and incubated as described for insulin secretion assay. After the incubation, media were discarded and malonyl-CoA was extracted using 10% trichloroacetic acid (40). Cell extracts were centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4 °C to precipitate proteins. The supernatant was collected and washed with successive ether extractions to neutralize the extract pH. Samples were lyophilized and stored at -80 °C. Malonyl-CoA levels were determined based on a radioactive method using $[\text{U-}^3\text{H}]$ acetyl-CoA and fatty acid synthase (41).

Rat islets dispersion and transfection – After an overnight recovery, isolated rat islets were washed with PBS and islet cells were dispersed by incubation in a solution of PBS:Trypsin (1:1) for 5 min at 37 °C with gentle shaking by pipeting. Dispersed cells (1.4×10^6 cells per condition) were transfected using Nucleofactor technology (Amaxa) with 800 nmol/L of siRNA and 5 μg of the human growth hormone (hGH) (Open Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Huntsville, AL, USA) used as a reporter of insulin secretion in transfected cells (42,43). After transfection, dispersed islet cells were seeded in 24-well plates at 1.2×10^5 cells. Experiments were performed 48 h post-transfection.

Insulin secretion on transfected dispersed islet cells – siRNA-transfected dispersed rat islet cells were pre-incubated for 2 h in RPMI complete medium without β -mercaptoethanol at 2 mM glucose and then equilibrated for 1 h in KRBH containing 0.5% BSA and 2 mM glucose. Cells were then incubated for 1 h in KRBH containing 0.5% BSA and 2, 8 or 16 mmol/L glucose, and at 2 mmol/L glucose with 35 mmol/L KCl. At the end of the incubation period, media were collected for hGH and insulin determinations. Total hGH and insulin content of the cells were measured after acid-ethanol (0.2 mmol/L HCl in 75% ethanol) extraction. Cells were also harvested with urea lysis buffer (6 mol/L urea, 2 % SDS, 62,5 mmol/L Tris-HCl) for total protein content determination. Total hGH content and hGH release were measured by a colorimetric enzyme immunoassay (Roche). Insulin release and total insulin content were measured by radioimmunoassay (Linco Research). Insulin and hGH levels were normalized to total insulin content or total hGH content, respectively, and to protein content.

Statistical analysis –Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated with the Student's *t* test or, for multiple comparisons, one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post test as indicated. A *p* value of < 0.05 was considered significant. Statistical analyses were performed using InStat program (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

The Impact of the siRNA Delivery Methods on GIIS

The RNA interference (RNAi) technology has been used to investigate the role of anaplerosis and pyruvate cycling processes in GIIS (23-26,29,32-34,44,45). Normal β -cells and INS 832/13 β -cells are particularly difficult to transfect and therefore earlier studies generally used adenoviral vectors to deliver RNAi or cDNA into normal rodent islet cells as well as INS1 and INS 832/13 cells. Under our experimental conditions, we observed that the transfection efficiency of INS 832/13 cells using the efficient Nucleofactor technology (Amaxa©) is approximately 85% based on GFP expression. In order to choose the optimal technology to study β -cell metabolic fuel sensing we compared two RNAi delivery methods in terms of basal and GSIS under control conditions: Nucleofactor transfection and adenoviral infection. INS 832/13 cells transfected with a control siRNA (ScrAB) showed similar basal and GSIS than mock cell transfected with pBS or untransfected cells (Fig. 1A).

For viral infection studies we tried to reproduce as close as possible experimental conditions used in several β -cell metabolism studies (26,29,32-34), in particular an IDHc knockdown study where INS 832/13 cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 60 viral particles per cell for 16 h (26). Ad-GFP and Ad-LacZ treatment of INS 832/13 cells at 60 MOI, with rigorously tittered viral stocks (see methods) showed significant toxicity in three separate experiments. Cell death was apparent 24 h post-infection and almost all INS 832/13 cells showed trypan blue staining 48 h post-infection (not shown). Cells infected with 10 MOI of Ad-LacZ or Ad-GFP showed a 2.5-5 fold increased basal insulin release and markedly altered insulin secretion in response to 5 mM and 10 mM glucose (Fig. 1B). Expression of the data as the amount of insulin released over basal value (1 mM glucose) indicated a 2-5 fold reduction in GSIS at 5 or 10 mM glucose in adenovirus-treated cells as compared to untransduced cells (Fig 1 B, lower left panel). However the Ad-LacZ or Ad-GFP infected cells at 10 MOI showed preserved KCl-induced insulin secretion (Fig. 1B, lower left panel) and unchanged total insulin content. Thus, viral

infection of INS 832/13 cells induces significant cell toxicity in INS cells, with massive death at 60 MOI and markedly defective GISIS but not cell death at 10 MOI. Therefore, in subsequent work we refrained using viral transduction and carried out experiments in siRNA transfected cells.

RNAi-knockdown of IDHc Expression Increases GISIS

The role of IDHc in the regulation of GISIS was studied using three siRNA directed against IDHc (siIDH#1-3) to knockdown this enzyme in INS 832/13 cells. In comparison with a combination of two scrambled control siRNA with no known targets (ScrAB), siIDH#1 and #2 effectively decreased IDHc mRNA expression, whereas siIDH#3 had little effect (not shown). IDH#1 and IDH#2 were therefore used in subsequent experiments. Forty hours post-transfection, siIDH#1 and siIDH#2 reduced IDHc mRNA level by about 50% and 70% (Fig. 2A) and significantly decreased IDHc activity by 15% and 30%, respectively (Fig. 2B). This reduction in enzymatic activity is likely underestimated due to contaminating mitochondrial IDH due to some mitochondrial damage and leakiness during cell homogenization and fractionation. Surprisingly and in contrast to a previous report using adenoviral constructs (26), RNAi knockdown of IDHc did not reduce but stimulated GISIS at 5 and 10 mM glucose, without affecting basal or KCl-induced insulin secretion (Fig. 2C). The cellular insulin content was unchanged under all conditions (8.1 ± 0.8 ; 9.8 ± 1.6 and 9.0 ± 0.9 ng insulin/mg protein for ScrAB, siIDH#1 and siIDH#2, respectively).

We next investigated the involvement of the K_{ATP} -independent/amplification pathway of GISIS using the combination of diazoxide (an activator of the K_{ATP} channel) with a stimulatory concentration of KCl (which allows permissive cytosolic Ca^{2+} level) (46). As shown in Fig. 2D, insulin secretion at 5 and 10 mM glucose in the presence of KCl without or with diazoxide was markedly increased in the siIDH#2 condition as compared to the ScrAB control. The results indicate that knockdown of IDHc enhances the K_{ATP} -independent/amplification pathway of GISIS.

Downregulation of IDHc Expression Affects Fatty Acid Metabolism in INS 832/13 cells

The effect of reducing IDHc expression on glucose and FA metabolism was investigated due to the importance of fuel metabolism and redox processes in GIIS. IDHc knockdown barely affected glucose oxidation rate at all tested glucose concentrations. A slight reduction of glucose oxidation at 10 mM was observed with siIDH#2 that cannot explain its action to enhance secretion (Fig. 3).

As IDHc plays a role in the generation of cytosolic NADPH, a candidate MCF that is involved in *de novo* FA synthesis, and because pyruvate cycling processes are linked to FA partitioning (47) we measured the incorporation of glucose into total FA (using [U-¹⁴C]glucose) and FA oxidation (using [1-¹⁴C]palmitate). Fig. 4A shows that IDHc knockdown by siIDH#1 or siIDH#2 increased glucose incorporation into FA at 10 mM glucose. A similar increase was observed at 5 mM glucose concentration in siIDH#1 transfected cells. FA oxidation at 5 mM glucose was slightly but significantly decreased by siIDH#1 and siIDH#2, but not 1 or 10 mM glucose. Malonyl-CoA levels dose-dependently increased in response to glucose, but knockdown of IDHc expression using siRNA#2 did not alter its level (Fig. 4C).

Islet cells studies

Finally, we examined if reducing IDHc expression in primary β -cells affects GIIS. Since transfection of whole islets or dispersed islet cells is not efficient enough to test this directly, we employed human growth hormone (hGH) as a reporter for insulin release (42,43). As shown in Fig. 5, dispersed rat islet cells transfected with hGH and control ScrAB efficiently secreted hGH in response to fuel (5 and 10 mM glucose) and non-fuel (KCl) stimuli. The hGH release in response to glucose was increased in dispersed rat islet cells co-transfected with siIDH#2. Basal and KCl-induced hGH release were not affected by the IDHc siRNA.

Discussion

Using the siRNA technology in transfected cells, we observed that reduced IDHc expression results in stimulation of GIIS without affecting basal secretion, KCl-induced insulin release, the total cellular insulin content or glucose oxidation. This contrasts with a previous study showing that IDHc knockdown using an adenoviral approach reduces GIIS, a finding supporting the view for a role of a pyruvate/isocitrate/ α -KG shuttle in β -cell metabolic signaling (26). Since in this and the previous study, the level of siRNA-induced IDHc knockdown, the experimental conditions and the cellular models (INS 832/13 cells and rat islets) were quite similar (26), these opposite results are difficult to reconcile. How can this dichotomy be explained? The present study indicates that adenoviral constructs show some cell toxicity and may not be an optimal tool to study metabolic fuel sensing in the β -cell. This is of general interest to the β -cell field since many groups, including us, have used this method. This is not to demise all the β -cell adenoviral work published so far but we wish to emphasize that performing appropriate controls of toxicity, metabolism and insulin secretion are mandatory in β -cell transfection or transduction studies.

The Nucleofactor transfection method, instead of adenoviral infection, was chosen in this study because it was without any apparent toxicity or unspecific effects on insulin secretion. This transfection technique per se did not affect basal, glucose and KCl-induced secretion or the cellular insulin content, as indicated by comparison of the pBS and untransfected cells controls. In marked contrast, INS 832/13 cells infected at a MOI of 10 pfu/cell, a concentration 6 times lower than that used in the previous β -cell IDHc study (26), with two different control vectors (Ad-LacZ or Ad-GFP) showed severe defects in insulin secretion. In comparison to control cells the infected cells showed high basal secretion, and GIIS was approximately reduced by 3 fold. Insulin content and KCl-induced insulin release at 10 MOI, however, were not altered by adenoviral infection, suggesting that the decrease in GIIS observed in infected cells is caused by an alteration of the mechanisms linking glucose metabolism to insulin vesicles exocytosis. It should be mentioned that in the previous adenoviral IDHc study (26) untransduced cell controls were

not reported and INS 832/13 cells with IDHc knockdown showed an approximately 20 % decreased in total cellular NADP(H) content, suggesting some toxicity of the Ad-IDHc construct or of reducing expression of this enzyme in infected cells. It should be mentioned that other studies reported side effects of adenoviral infection on pancreatic β -cells. Adenoviral infection of MIN6 or INS 832/13 cells at a MOI of 100 with an empty vector or a vector coding for β -galactosidase caused increased in caspase3 activity, a marker of cell apoptosis (48). Also, adenoviral infection of rat, pig and human pancreatic islets with a vector coding for GFP or Luciferase led to Akt1 activation and an increase in islet cell proliferation compared to non-infected islets (49). Thus, we wish to put a note of caution on the use of the adenoviral approach in β -cell studies, particularly as it related to metabolic signalling.

Herein, the increase in GIIS in IDHc-knockdown cells involved the K_{ATP} -independent/amplification pathway. To gain insight into the mechanism(s) implicated in the stimulation of GIIS upon IDHc knockdown, we analyzed FA metabolism and signaling. We hypothesized that reduction of citrate-derived carbons through IDHc might favour/redirect cataplerotic metabolic flux via the pyruvate/citrate pathway (see Fig.6) that we proposed to be important for GIIS. Thus, this pathway allows simultaneous production of two MCFs (NADPH and malonyl-CoA) and NAD^+ reoxidation for fast glycolytic flux (20,25). In accordance with this hypothesis, siIDHc knockdown resulted in enhanced incorporation of glucose into total FA. There was a slight but significant decrease in FA oxidation only at intermediate glucose concentration in siIDHc treated cells, but the total cellular malonyl-CoA remained unaltered. Malonyl-CoA controls β -oxidation via its interaction with carnitine palmitoyl transferase 1. We speculate that cells readjusted malonyl-CoA concentration and fat oxidation to their need, even though flux through the pyruvate/citrate may be increased. Thus, the data are consistent with a compensation mechanism in which down regulation of IDHc enhances the pyruvate/citrate shuttle and the production of lipogenesis-derived lipid signaling molecules. We are currently performing metabolite analysis to test this possibility.

It has been reported using different models (INS 832/13 cells, Min6 cells and mouse islets) that inhibition of MEc expression in pancreatic β -cells reduces GIIS (23-25,29). In one rat islet study using the adenovirus approach this was not observed, yet the same group showed that MEc knockdown in INS 832/13 cells reduced GIIS (29). Thus, the balance of the published work favour the view that metabolic flux and NADPH production via MEc is implicated in glucose signalling in both tumoral and normal β -cells. Herein, the inhibition of IDHc expression in INS 832/13 cells and rat islets stimulated insulin release. The opposite effect of MEc and IDHc knockdown on GIIS suggests that NADPH produced by MEc and IDHc may have different fates and roles in the pancreatic β -cell. Some support for this hypothesis can be found in the literature. Many studies in liver and adipose tissues have established the role of MEc in *de novo* lipogenesis (Review in (50)). Thus, the increase in glucose incorporation into FA in INS 832/13 cells transfected with siIDHc is consistent with a possible role for MEc, through NADPH production, in the regulation of insulin secretion via lipogenesis and the production of lipid signaling molecules. These would include free fatty acids and some complex lipids, in particular diacylglycerol, involved in glycerolipid/FA cycling (51). With respect to IDH enzymes, both mitochondrial and cytoplasmic isoforms of NADP-dependent IDH have been implicated in the control of the cellular redox state (52,53). Decreasing IDHc expression in three different cell lines (HeLa, HL-60 and NIH 3T3) led to a greater susceptibility to oxidative stress and apoptosis (54-56). Interestingly, genome wide transcriptomic identified IDH1 (IDHc) mutations associated with patients with aggressive glioblastoma (57). Perhaps, IDHc might play a role in the control of β -cell growth and its redox state rather than metabolic signaling.

The present results challenge the concept that IDHc is part of a pyruvate cycling process critical for the regulation of GIIS. The role of pyruvate cycling in the β -cell is thought to be linked to the production of MCFs in the cytoplasm for the regulation of insulin vesicle exocytosis, in a complementary fashion with the Krebs cycle and electron transport chain for ATP production. In both the pyruvate/malate and pyruvate/citrate shuttles, malate and citrate metabolism in the cytoplasm lead to the reformation of pyruvate which can re-enter the mitochondrion to allow the anaplerotic/cataplerotic and oxidative

metabolic fluxes to be sustained as long as β -cells are exposed to stimulating glucose concentration (13,25). In contrast, the pyruvate/isocitrate/ α -ketoglutarate pathway does not lead to the production of pyruvate in the cytosol, unless in association with subsequent malate export from the mitochondria and pyruvate formation via MEc. In fact, this pathway is not well defined and the fate of α -ketoglutarate produced by IDHc is uncertain (58). It has been suggested that α -ketoglutarate could directly stimulate insulin vesicle exocytosis (60), but this view is not supported by the current data. Hence, β -cell IDHc may be implicated in extra-mitochondrial pathways linked to cell growth or redox control that require cytosolic NADPH but we do not favour the view that it is implicated in a pyruvate cycling process linked to glucose signaling for insulin secretion.

In conclusion, the current study points to a re-evaluation of the role of IDHc in the production of MCF for insulin secretion. The data, however, are consistent with a role of pyruvate/citrate cycling in GIIS. In addition, the results put a serious note of caution on the use of the adenoviral approach for the study of β -cell metabolic signalling. Additional work is required to define the roles of IDHc in the pancreatic β -cell.

Acknowledgements - We thank Mélanie Guévremont for technical help. This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (to M.P.). M.P. is a recipient of the Canadian Chair in Diabetes and Metabolism. C. Guay was supported by a graduate studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec and from Programmes de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal. É. Pepin was supported by a graduate studentship from Programmes de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal and from Diabète Québec. A. Barbeau was supported by a graduate studentship from Diabète Québec.

Abbreviations – metabolic coupling factor (MCF); glucose-induced insulin secretion (GIIS); cytosolic isoform of malic enzyme (MEc); cytosolic isoform of isocitrate dehydrogenase (IDHc); ATP-dependent potassium channels (K_{ATP} channels); pyruvate carboxylase (PC); fatty acid (FA); small interfering RNA (siRNA); plasmid BlueScript (pBS); human growth hormone (hGH); plaque-forming units (pfu); multiplicity of infection (MOI); RNA interference (RNAi); carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT-1).

References

1. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P. t., Boyd, A. E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. (1995) *Science* **268**, 423-426
2. Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., and Ashcroft, S. J. (1984) *Nature* **312**, 446-448
3. Straub, S. G., and Sharp, G. W. (2002) *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463
4. Ashcroft, F. M. (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**, 671-675
5. Henquin, J. C. (1992) *Endocrinology* **131**, 127-131
6. Corkey, B. E., Glennon, M. C., Chen, K. S., Deeney, J. T., Matschinsky, F. M., and Prentki, M. (1989) *J Biol Chem* **264**, 21608-21612
7. Prentki, M., Vischer, S., Glennon, M. C., Regazzi, R., Deeney, J. T., and Corkey, B. E. (1992) *J Biol Chem* **267**, 5802-5810
8. Fahien, L. A., and MacDonald, M. J. (2002) *Diabetes* **51**, 2669-2676
9. Maechler, P., and Wollheim, C. B. (1999) *Nature* **402**, 685-689
10. Kibbey, R. G., Pongratz, R. L., Romanelli, A. J., Wollheim, C. B., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (2007) *Cell Metab* **5**, 253-264
11. Pi, J., Bai, Y., Zhang, Q., Wong, V., Floering, L. M., Daniel, K., Reece, J. M., Deeney, J. T., Andersen, M. E., Corkey, B. E., and Collins, S. (2007) *Diabetes* **56**, 1783-1791
12. Leloup, C., Tourrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A. L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2009) *Diabetes* **58**, 673-681
13. MacDonald, M. J. (1995) *J Biol Chem* **270**, 20051-20058
14. Ivarsson, R., Quintens, R., Dejonghe, S., Tsukamoto, K., in 't Veld, P., Renstrom, E., and Schuit, F. C. (2005) *Diabetes* **54**, 2132-2142
15. MacDonald, M. J., Fahien, L. A., Brown, L. J., Hasan, N. M., Buss, J. D., and Kendrick, M. A. (2005) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E1-15
16. Maechler, P., Kennedy, E. D., Pozzan, T., and Wollheim, C. B. (1997) *Embo J* **16**, 3833-3841
17. Khan, A., Ling, Z. C., and Landau, B. R. (1996) *J Biol Chem* **271**, 2539-2542
18. MacDonald, M. J. (1993) *Metabolism* **42**, 1229-1231
19. Schuit, F., De Vos, A., Farfari, S., Moens, K., Pipeleers, D., Brun, T., and Prentki, M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18572-18579
20. Farfari, S., Schulz, V., Corkey, B., and Prentki, M. (2000) *Diabetes* **49**, 718-726
21. Liu, Y. Q., Jetton, T. L., and Leahy, J. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 39163-39168
22. Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S. C., Jensen, M. V., Kamzolova, S., Newgard, C. B., and Sherry, A. D. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2708-2713
23. Pongratz, R. L., Kibbey, R. G., Shulman, G. I., and Cline, G. W. (2007) *J Biol Chem* **282**, 200-207
24. Xu, J., Han, J., Long, Y. S., Lock, J., Weir, G. C., Epstein, P. N., and Liu, Y. Q. (2008) *Diabetologia* **51**, 2281-2289
25. Guay, C., Madiraju, S. R., Aumais, A., Joly, E., and Prentki, M. (2007) *J Biol Chem* **282**, 35657-35665

26. Ronnebaum, S. M., Ilkayeva, O., Burgess, S. C., Joseph, J. W., Lu, D., Stevens, R. D., Becker, T. C., Sherry, A. D., Newgard, C. B., and Jensen, M. V. (2006) *J Biol Chem* **281**, 30593-30602
27. Hedekov, C. J., Capito, K., and Thams, P. (1987) *Biochem J* **241**, 161-167
28. Reinbothe, T. M., Ivarsson, R., Li, D. Q., Niazi, O., Jing, X., Zhang, E., Stenson, L., Bryborn, U., and Renstrom, E. (2009) *Mol Endocrinol* **23**, 893-900
29. Ronnebaum, S. M., Jensen, M. V., Hohmeier, H. E., Burgess, S. C., Zhou, Y. P., Qian, S., MacNeil, D., Howard, A., Thornberry, N., Ilkayeva, O., Lu, D., Sherry, A. D., and Newgard, C. B. (2008) *J Biol Chem* **283**, 28909-28917
30. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C. B. (2000) *Diabetes* **49**, 424-430
31. Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C. J., and Monaco, A. P. (1987) *Transplantation* **43**, 725-730
32. Joseph, J. W., Jensen, M. V., Ilkayeva, O., Palmieri, F., Alarcon, C., Rhodes, C. J., and Newgard, C. B. (2006) *J Biol Chem* **281**, 35624-35632
33. Joseph, J. W., Odegaard, M. L., Ronnebaum, S. M., Burgess, S. C., Muehlbauer, J., Sherry, A. D., and Newgard, C. B. (2007) *J Biol Chem* **282**, 31592-31600
34. Jensen, M. V., Joseph, J. W., Ilkayeva, O., Burgess, S., Lu, D., Ronnebaum, S. M., Odegaard, M., Becker, T. C., Sherry, A. D., and Newgard, C. B. (2006) *J Biol Chem* **281**, 22342-22351
35. Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G., and Nicolas, J. F. (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 6795-6799
36. Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., Belanger, F., and Langelier, Y. (1998) *J Virol* **72**, 2289-2296
37. Roduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C. B., Assimacopoulos-Jeannet, F., and Prentki, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 35799-35806
38. Fulgencio, J. P., Kohl, C., Girard, J., and Pegorier, J. P. (1996) *Diabetes* **45**, 1556-1562
39. 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., and Prentki, M. (2004) *Diabetes* **53**, 1007-1019
40. Roche, E., Farfari, S., Witters, L. A., Assimacopoulos-Jeannet, F., Thumelin, S., Brun, T., Corkey, B. E., Saha, A. K., and Prentki, M. (1998) *Diabetes* **47**, 1086-1094
41. McGarry, J. D., and Foster, D. W. (1976) *J Lipid Res* **17**, 277-281
42. Iezzi, M., Regazzi, R., and Wollheim, C. B. (2000) *FEBS Lett* **474**, 66-70
43. Lilja, L., Johansson, J. U., Gromada, J., Mandic, S. A., Fried, G., Berggren, P. O., and Bark, C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 29534-29541
44. MacDonald, M. J., Smith, A. D., 3rd, Hasan, N. M., Sabat, G., and Fahien, L. A. (2007) *J Biol Chem* **282**, 30596-30606
45. Hasan, N. M., Longacre, M. J., Stoker, S. W., Boonsaen, T., Jitrapakdee, S., Kendrick, M. A., Wallace, J. C., and MacDonald, M. J. (2008) *J Biol Chem* **283**, 28048-28059
46. Henquin, J. C. (2000) *Diabetes* **49**, 1751-1760
47. Nolan, C. J., and Prentki, M. (2008) *Trends Endocrinol Metab* **19**, 285-291
48. Li, D., Yin, X., Zmuda, E. J., Wolford, C. C., Dong, X., White, M. F., and Hai, T. (2008) *Diabetes* **57**, 635-644

49. Icyuz, M., Bryant, S. M., Fortinberry, H. K., Molakandov, K., Siegal, G. P., Contreras, J. L., and Wu, H. (2009) *Transplantation* **87**, 821-824
50. Hillgartner, F. B., Salati, L. M., and Goodridge, A. G. (1995) *Physiol Rev* **75**, 47-76
51. Nolan, C. J., Madiraju, M. S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M. L., and Prentki, M. (2006) *Diabetes* **55** Suppl 2, S16-23
52. Lee, S. M., Koh, H. J., Park, D. C., Song, B. J., Huh, T. L., and Park, J. W. (2002) *Free Radic Biol Med* **32**, 1185-1196
53. Jo, S. H., Son, M. K., Koh, H. J., Lee, S. M., Song, I. H., Kim, Y. O., Lee, Y. S., Jeong, K. S., Kim, W. B., Park, J. W., Song, B. J., and Huh, T. L. (2001) *J Biol Chem* **276**, 16168-16176
54. Lee, S. M., Park, S. Y., Shin, S. W., Kil, I. S., Yang, E. S., and Park, J. W. (2009) *Free Radic Res* **43**, 165-173
55. Kim, S. Y., Lee, S. M., Tak, J. K., Choi, K. S., Kwon, T. K., and Park, J. W. (2007) *Mol Cell Biochem* **302**, 27-34
56. Kim, S. Y., and Park, J. W. (2003) *Free Radic Res* **37**, 309-316
57. Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., and Bigner, D. D. (2009) *N Engl J Med* **360**, 765-773
58. Jensen, M. V., Joseph, J. W., Ronnebaum, S. M., Burgess, S. C., Sherry, A. D., and Newgard, C. B. (2008) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, E1287-1297
59. Owen, O. E., Kalhan, S. C., and Hanson, R. W. (2002) *J Biol Chem* **277**, 30409-30412
60. Rabaglia, M. E., Gray-Keller, M. P., Frey, B. L., Shortreed, M. R., Smith, L. M., and Attie, A. D. (2005) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E218-224

Figure Legends

FIGURE 1 Effect of the RNA interference delivery method on GIIS in INS 832/13 cells. A, Glucose-induced insulin secretion is not affected by Nucleofactor transfection. INS 832/13 cells were not transfected (No T) or transfected with an empty vector (pBS) or a combination of two siRNA controls (ScrAB) using Nucleofactor electroporation. Cells were cultured for 48 h prior to the experiment. B, Adenoviral infection per se alters glucose-induced insulin secretion. INS 832/13 cells were not infected (No inf) or infected with one control adenovirus containing LacZ or GFP (Ad-LacZ or Ad-GFP) at 10 MOI for 16 h. After the end of the infection period, cells were cultured for 48 h prior to the experiment. Insulin release was measured in cells incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) or 1 mM glucose plus 35 mM KCl (KCl). Insulin levels were normalized by protein content. Data represent the mean \pm SEM of two to three independent experiments performed in quadruplicate.

FIGURE 2 Knockdown of IDHc expression enhances glucose-induced insulin secretion. INS 832/13 cells were transfected with ScrAB, siIDHc#1 or siIDHc#2. A, IDHc mRNA expression level normalized with cyclophilin mRNA and presented as percentage vs the ScrAB condition. Mean \pm SEM of 16 (ScrAB and si-IDHc#2) or 13 (si-IDHc#1) independent experiments. B, Enzymatic activity of IDHc normalized by protein content. C, Glucose-induced insulin secretion. Insulin release was measured in transfected cells incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) or 1 mM glucose plus 35 mM KCl (KCl). Insulin levels were normalized by protein content. D, Assessment of the amplification pathway of glucose-induced insulin secretion. Insulin secretion was measured in transfected cells incubated at 1, 5 or 10 mM glucose \pm 150 μ M diazoxide plus 35 mM KCl (Dz + KCl). Insulin levels were normalized by protein content. Data represent the mean \pm SEM of three to four independent experiments performed in quadruplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs ScrAB under the same condition, by one-way Anova, Dunnett's post test.

FIGURE 3 Reduction in IDHc expression does not affect oxidative glucose metabolism.

Transfected cells were incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) and the results were normalized by protein content. Data represent the mean \pm SEM of two independent experiments performed in triplicate.

FIGURE 4 Reduction in IDHc expression alters fatty acid metabolism.

Transfected cells were incubated at 1, 5 or 10 mM glucose (G) and the results were normalized by protein content. A) Glucose incorporation into free fatty acids was monitored using [U-¹⁴C]glucose. B) Fatty acid oxidation was measured using [1-¹⁴C]palmitate. C) Malonyl-CoA levels were determined using [U-³H]acetyl-CoA and FAS assay. Data represent means \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, vs ScrAB under the same incubation condition, by one-way Anova, Dunnett's post test.

FIGURE 5 Knockdown of IDHc expression in dispersed rat islet cells increases glucose-induced hormone release.

ScrAB and siIDH#2 were co-transfected with hGH plasmid in dispersed rat islet cells. Cells were cultured for 48 h prior to the experiment. hGH release was measured in cells incubated at 2, 8 or 16 mM glucose (G) or 2 mM glucose plus KCl (KCl). hGH levels were normalized by protein or hGH content and expressed as fold increase over the 2 mM glucose condition. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ vs ScrAB under the same incubation condition by paired two-tailed Student *t* test.

FIGURE 6 Model illustrating the redirection of isocitrate metabolism through the pyruvate/citrate shuttle.

Half of the pyruvate-derived from glucose metabolism enters in the TCA cycle via its carboxylation by PC, producing oxaloacetate. This anaplerotic process leads to the formation and accumulation of citrate and isocitrate within the mitochondria. At increasing levels, mitochondrial citrate and isocitrate are exported into the cytoplasm. Once in the cytosol, citrate is metabolized through the pyruvate/citrate shuttle. Under normal condition, isocitrate can be metabolized by IDHc to form α -ketoglutarate

with concomitant production of NADPH. α -Ketoglutarate can re-enters into the mitochondria to be metabolized by the Krebs cycle. In response to a reduction of IDHc activity, isocitrate metabolism could be redirected, via aconitase isomerisation, into citrate production and through the pyruvate/citrate shuttle. More precisely, citrate is cleaved by ACL, producing acetyl-CoA and oxaloacetate. Acetyl-CoA is then converted to malonyl-CoA by ACC whereas oxaloacetate is reduced by MDH to malate accompanied by the oxidation of NADH into NAD⁺. Malate is converted back into pyruvate by MEc, leading to the production of NADPH. Pyruvate re-enters the mitochondria via the pyruvate transporter. Indeed, the redirection of isocitrate metabolism through the pyruvate/citrate shuttle could explain the increase in GIIS observed in response to a reduction of IDHc expression and activity. See text for discussion. Abbreviations: AAC, acetyl-CoA carboxylase; ACL, ATP-citrate lyase; CPT-1, carnitine palmitoyl transferase-1; IDHc, cytosolic isoform of isocitrate dehydrogenase; MDH, malate dehydrogenase; MEc, cytosolic isoform of malic enzyme; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase.

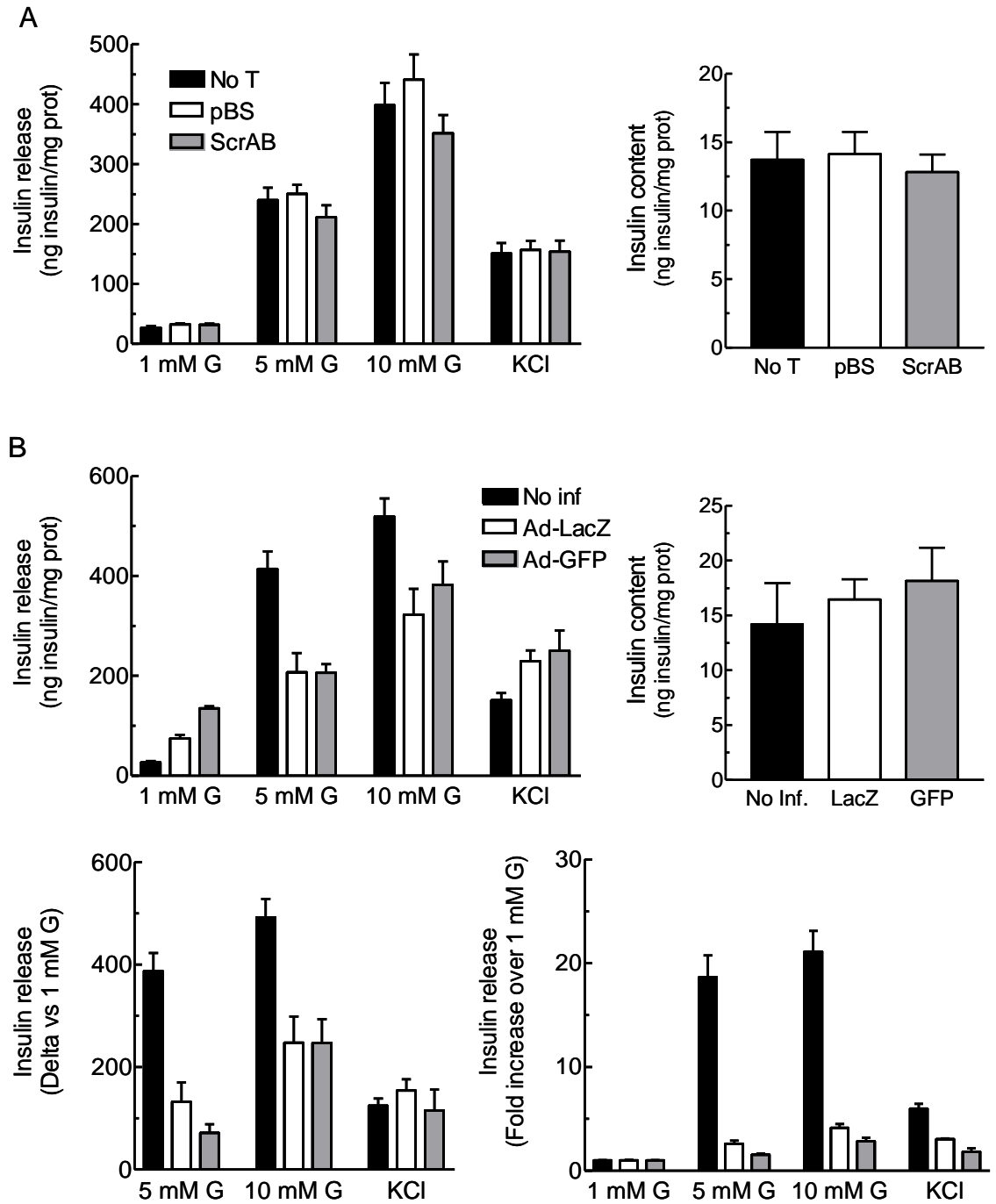


Figure 1 Guay *et al.*

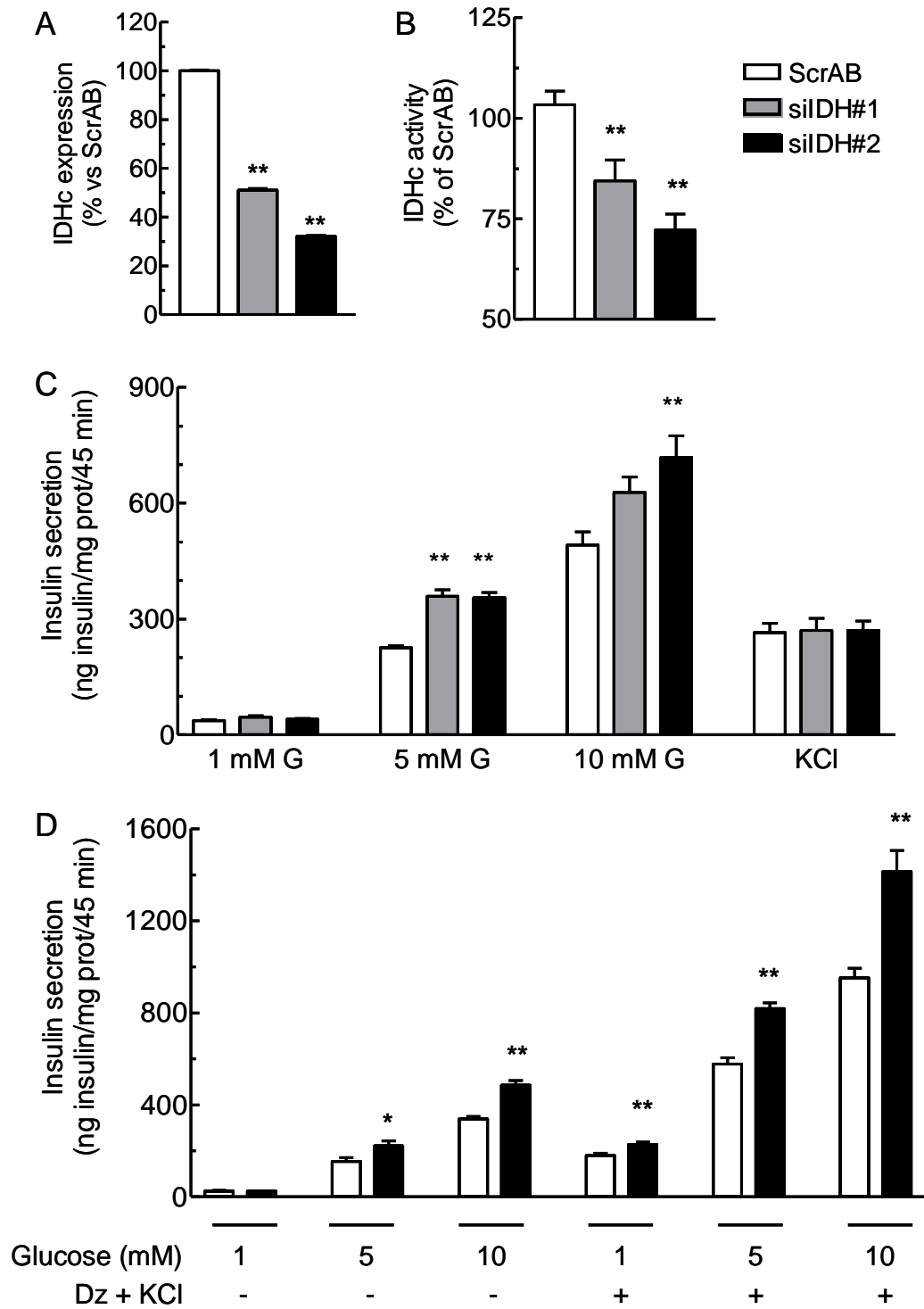


Figure 2 Guay *et al.*

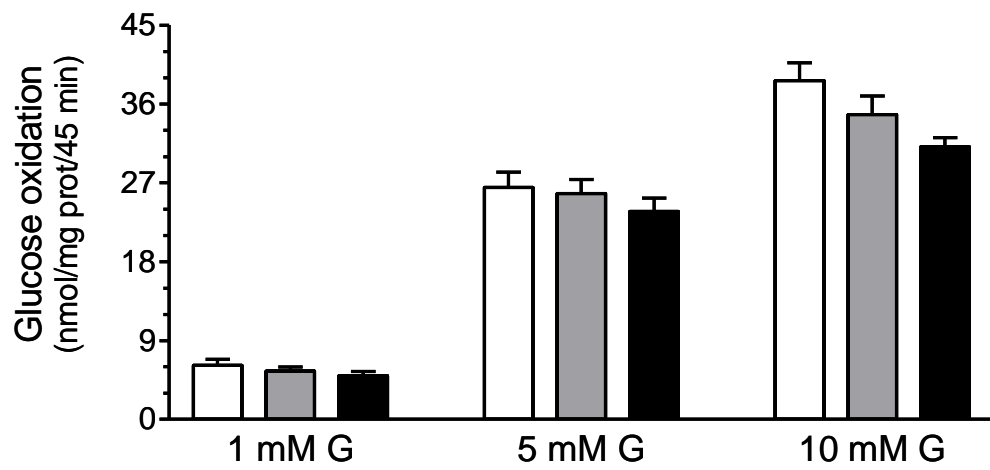


Figure 3 Guay *et al.*

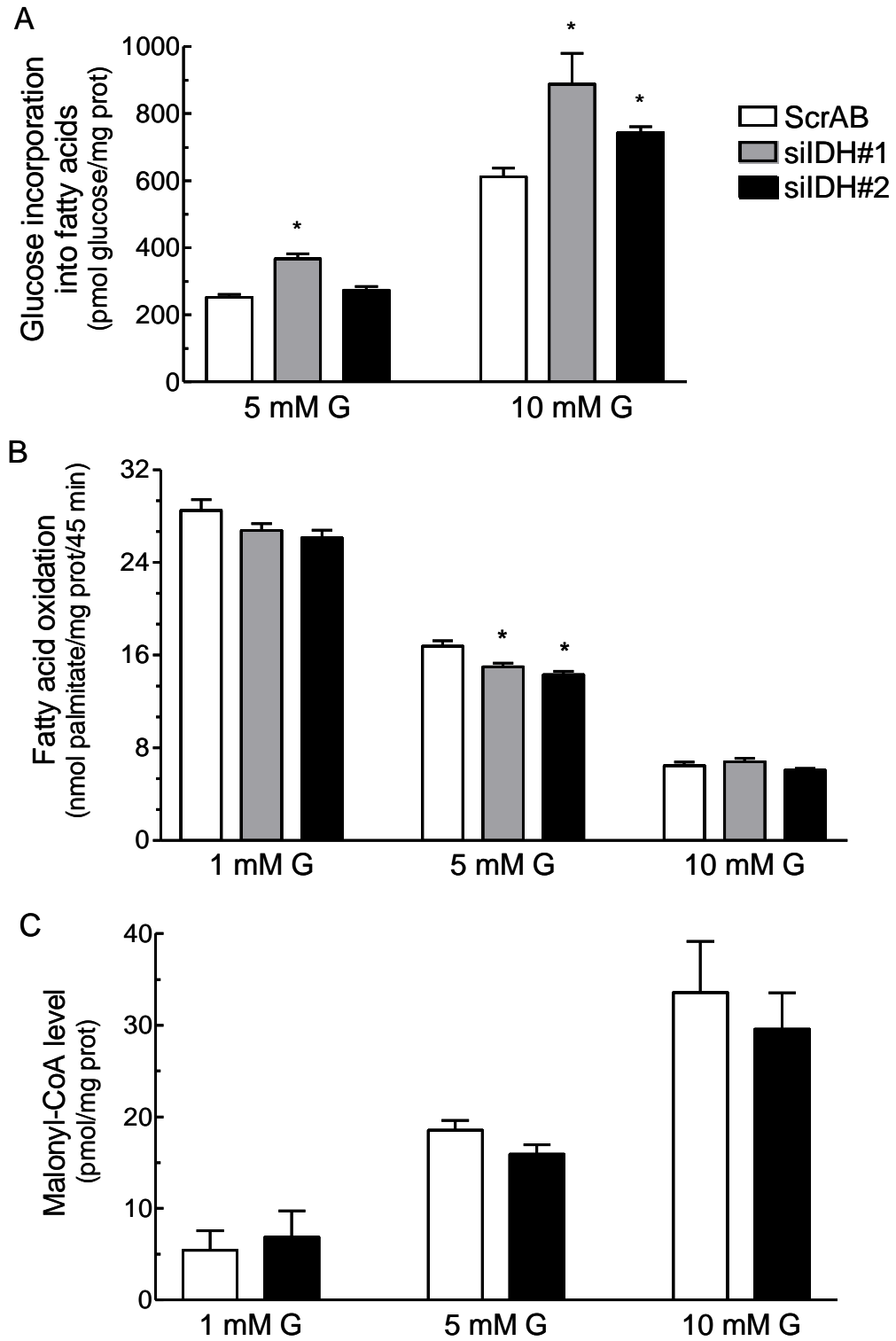


Figure 4 Guay *et al.*

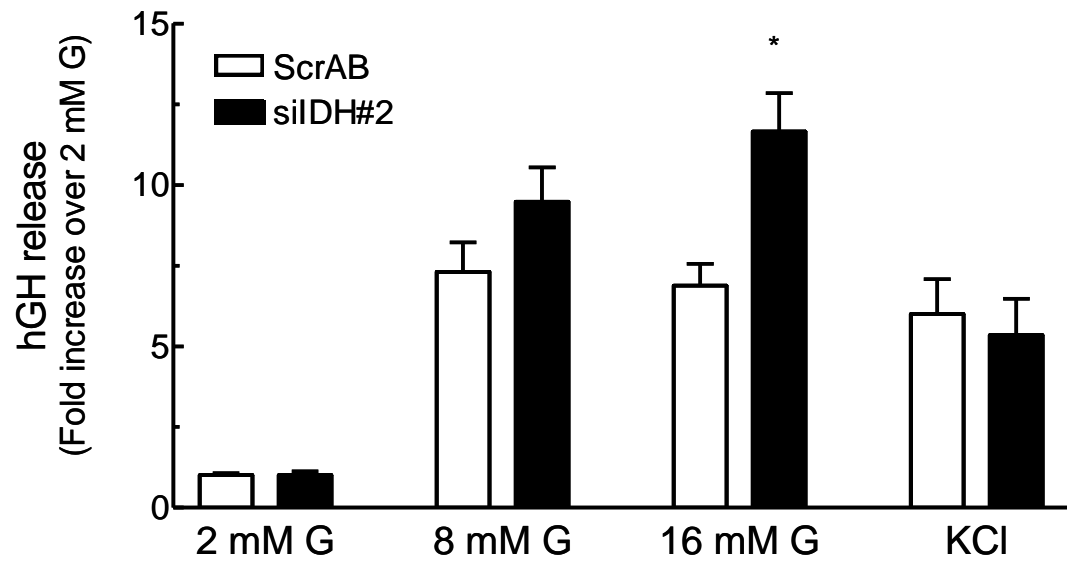


Figure 5 Guay *et al.*

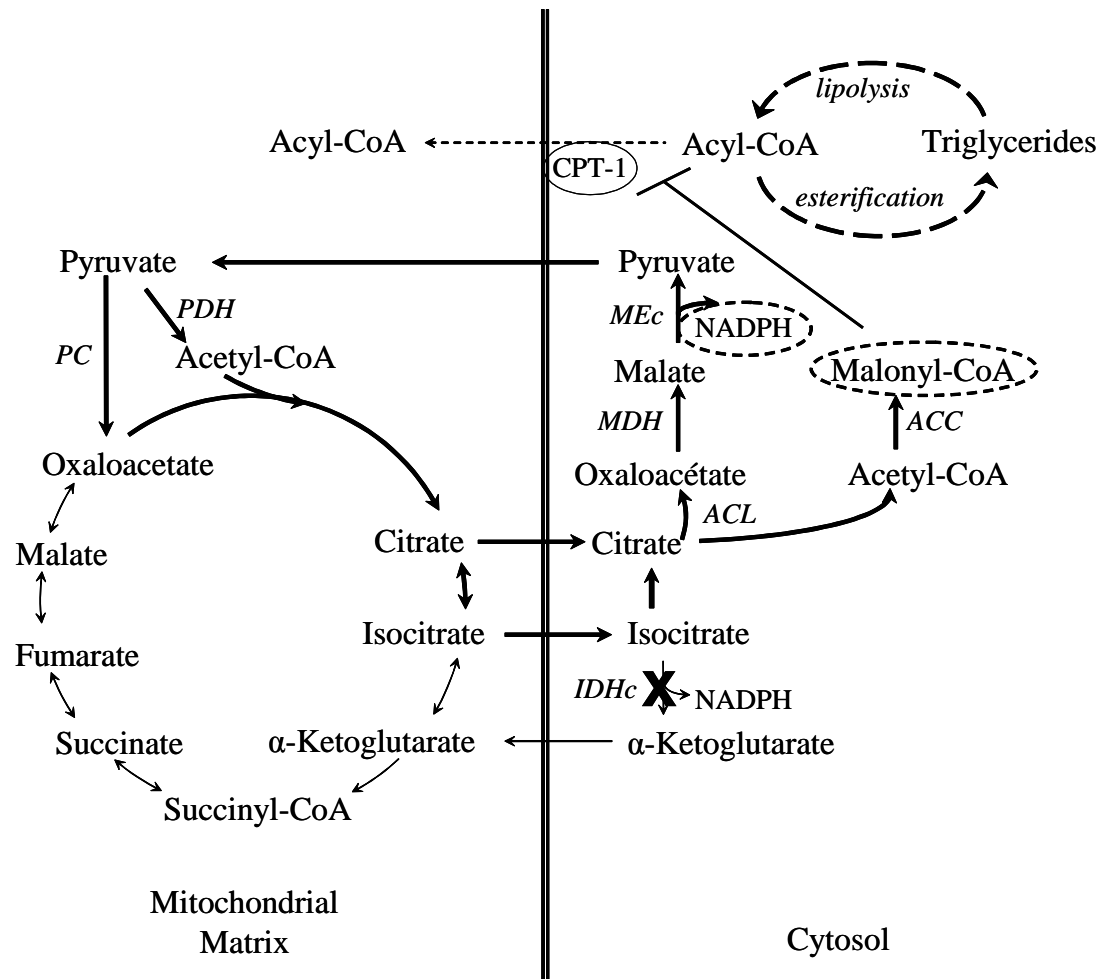


Figure 6 Guay *et al.*

Article 3

ADIPOSE TRIGLYCERIDE LIPASE IS IMPLICATED IN FUEL AND NON-FUEL STIMULATED INSULIN SECRETION

Marie-Line Peyot¹, Claudiane Guay¹, Martin G. Latour¹, Julien Lamontagne¹, Roxane Lussier¹, Marco Pineda¹, Neil B. Ruderman⁴, Guenter Haemmerle⁵, Rudolf Zechner⁵, Érik Joly¹, S. R. Murthy Madiraju¹, Vincent Poitout^{1,2,3} and Marc Prentki^{1,2}

¹Molecular Nutrition Unit and the Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM; Departments of ²Nutrition and ³Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec H1W 4A4, Canada; ⁴Departments 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,02118, USA; ⁵Inst. of Molecular Biosciences, Karl-Franzens-University, Graz 8010, Austria

Running title: ATGL and insulin secretion

Published in : Journal of Biological Chemistry 2009 284(25):16848-59.

Address for correspondance:

Marc Prentki
MDRC- CR-CHUM, Technopole Angus (Room 401)
2901, Rachel Street
Montreal, QC, Canada, H1W 4A4,
Phone : 514-890-8000 ext. 23642
Fax : 514-412-7648

Contribution des co-auteurs :

M.-L. Peyot a effectué la majeure partie du travail présenté dans cet article. Elle a élaboré ce projet, planifié et réalisé les expériences et rédigé le manuscrit.

M. G. Latour a participé aux expériences effectuées *in vivo*.

J. Lamontagne et M. Pineda ont aidé à l'isolation des îlots des souris.

R. Lussier a géré la colonie de souris et elle a fourni l'aide technique nécessaire au Dr Peyot pour effectuer les expériences en laboratoire.

G. Haemmerle et R. Zechner ont fourni les souris déficientes en ATGL.

Les expertises des Dr Ruderman et Poitout ont été d'une aide précieuse.

É. Joly et M. Madiraju ont collaboré à l'élaboration de ce projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Abstract

Reduced lipolysis in hormone-sensitive lipase (HSL)-deficient mice is associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), suggesting that endogenous β -cell lipid stores provide signalling molecules for insulin release. Measurements of lipolysis and triglyceride (TG) lipase activity in islets from HSL^{-/-} mice indicated the presence of other TG lipase(s) in the β -cell. Using RT-QPCR, adipose triglyceride lipase (ATGL) was found to be the most abundant TG lipase in rat islets and INS832/13 cells. To assess its role in insulin secretion, ATGL expression was decreased in INS832/13 cells (ATGL-KD) by small hairpin RNA. ATGL-KD increased the esterification of free fatty acid (FFA) into TG. ATGL-KD cells showed decreased glucose- or Gln + Leu-induced insulin release, as well as reduced response to KCl or palmitate at high, but not low, glucose. The KATP/amplification pathway of GSIS was considerably reduced in ATGL-KD cells. ATGL^{-/-} mice were hypoinsulinemic, hypoglycemic, and showed decreased plasma TG and FFAs. A hyperglycemic clamp revealed increased insulin sensitivity and decreased GSIS and arginine induced insulin secretion in ATGL^{-/-} mice. Accordingly, isolated islets from ATGL^{-/-} mice showed reduced insulin secretion in response to glucose, glucose + palmitate and KCl. Islet TG content and FFA esterification into TG were increased by 2 fold in ATGL^{-/-} islets, but glucose usage and oxidation were unaltered. The results demonstrate the importance of ATGL and intracellular lipid signalling for fuel and non-fuel induced insulin secretion.

Introduction

Free fatty acids (FFA) and other lipid molecules are important for proper glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) by β -cells. Thus, deprivation of fatty acids (FA) in vivo (1) diminishes GSIS whereas a short-term exposure to FFA enhances it (1-3). In contrast, a sustained provision of FA, particularly in the presence of high glucose in vitro, is detrimental to β -cells in that it reduces insulin gene expression (4) and secretion (5), and induces β -cell apoptosis (6). The FA supply to the β -cells can be from exogenous sources, such as plasma FFAs and lipoproteins, or endogenous sources such as intracellular triglyceride (TG) stores. Studies from our laboratory (7-10) and others (11,12) support the concept that the hydrolysis of endogenous TG plays an important role in fuel-induced insulin secretion since TG depletion with leptin (13) or inhibition of TG lipolysis by lipase inhibitors such as 3,5-dimethylpyrazole (7) or orlistat (11,12) markedly curtail GSIS in rat islets. Furthermore, mice with β -cell specific knockout of hormone-sensitive lipase (HSL), which hydrolyzes both TG and diacylglycerol (DAG), show defective first phase GSIS in vivo and in vitro (14).

Lipolysis is an integral part of an essential metabolic pathway, the TG/FFA cycle, in which FFA esterification onto a glycerol backbone leading to the synthesis of TG is followed by its hydrolysis with the release of the FFA that can then be re-esterified. Intracellular TG/FFA cycling is known to occur in adipose tissue of rats and humans (15,16) and also in liver and skeletal muscle (17). It is generally described as a “futile cycle” as it leads to the net hydrolysis of ATP with the generation of heat (18). However, several studies have shown that this cycle has important functions in the cell. For instance, in brown adipose tissue, it contributes to overall thermogenesis (17,19). In islets from the normoglycemic, hyperinsulinemic, obese Zucker fatty rat, increased GSIS is associated with increased glucose-stimulated lipolysis and FA esterification, indicating enhanced TG/FFA cycling (10). Stimulation of lipolysis by glucose has also been observed in isolated islets from normal rats (12) and HSL^{-/-} mice (8) indicating the presence of glucose-responsive TG/FFA cycling in pancreatic β -cells.

The identity of the key lipases involved in the TG/FFA cycle in pancreatic islets is uncertain. HSL is expressed in islets (20), is up-regulated by long-term treatment with elevated glucose (21), and it is associated with insulin secretory granules (22). In addition, our earlier results suggested that elevated HSL expression correlates with augmented TG/FFA cycling in islets of Zucker fatty rats (10). However, it appears that other lipases may contribute to lipolysis and the regulation of GSIS in islet tissue. Thus, results from studies using HSL^{-/-} mice showed unaltered GSIS (8,23), except in fasted male mice (8,9) in which lipolysis was decreased but not abolished. Furthermore, HSL^{-/-} mice show residual TG lipase activity (8) indicating the presence of other TG lipases.

Recently, adipocyte triglyceride lipase (ATGL; also known as Desnutrin, TTS-2, iPLA2- α and PNPLA2) (24-26) was found to account for most, if not all the residual lipolysis in HSL^{-/-} mice (26,27). Two homologues of ATGL, Adiponutrin and GS2, have been described in adipocytes (24). All three enzymes contain a patatin-like domain with broad lipid acyl-hydrolase activity. However, it is not known if adiponutrin and GS2 are actually TG hydrolases. An additional lipase, TG hydrolase or carboxylesterase-3, has been identified in rat adipose tissue (28,29). While the hydrolysis of TG is catalyzed by all these lipases, HSL can hydrolyze both TG and DAG, the latter being a better substrate (30).

In the present study, we observed that besides HSL, ATGL (31), adiponutrin and GS2 are expressed in rat islets and β -INS832/13 cells, with ATGL being the most abundant. We then focused on the role of ATGL in fuel-stimulated insulin secretion in two models: INS832/13 β -cells in which ATGL expression was reduced by RNAi-knockdown (ATGL-KD), and ATGL^{-/-} mice.

Experimental procedures

Cell culture – Rat insulinoma INS832/13 cells (32) (passages 54-63) were cultured at 11.1 mM glucose in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (w/v) FBS, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate and 50 μ M β -mercaptoethanol (complete RPMI) at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂, 95% air). Cells were seeded at 4×10^6 cells two days before transfection to reach a 60-70% confluence at the day of transfection.

Animals – 10-week-old overnight fasted male ATGL^{-/-} mice (33) backcrossed to the C57BL/6 strain for more than 9 generations were used. Control mice used in this study were C57BL/6 wild-type littermates. The mice are not from the /6J background and therefore do not harbor a mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene (34). Wistar rats (200–250 g) were obtained from Charles River (St. Constant, Quebec, Canada). Mice and rats were housed under control temperature (23°C) and light conditions (12-h light/dark cycle) with free access to water and standard diet (11% fat by energy). Serum insulin, glucose, non-esterified FFA and TG were measured in overnight fasted pentobarbital-anaesthetized mice (8). The measurement of whole body fat and lean mass were done in fed mice by quantitative magnetic resonance (EchoMRI, Echo Medical Systems). All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of animals at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Islet isolation and culture – Fed or overnight fasted male Wistar rats and male ATGL^{-/-} mice and their wild type controls were anesthetised with sodium pentobarbital (Somnotol, MTC Pharmaceuticals, Hamilton, ON, Canada) and killed by exsanguination. Pancreatic rat or mice islets were isolated by collagenase digestion of the pancreas according to the method of Gotoh *et al.* (35). After digestion and washing, islets were separated from digested exocrine tissue by histopaque gradient, after which rat islets were hand-picked for immediate extraction of RNA or protein preparation for Western blotting. Mouse islets were handpicked and kept before experiments for 2h in culture in complete RPMI

containing 2.8 mM glucose without β -mercaptoethanol at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (8).

Short-hairpin RNA mediated ATGL gene suppression – Short-hairpin (sh) RNA mediated gene suppression was performed as previously described (36). In brief, five 19-nucleotide shRNA against rat ATGL (GenBank™ accession number NM_001108509) with a 9-nucleotide loop were synthesized, annealed and ligated to the PmeI and XbaI sites of pDLDU6 (37). Efficiency of the various shRNA constructs on ATGL mRNA levels was verified in INS832/13 cells and the most efficient shRNA was chosen for subsequent experiments. The sense target sequence of shRNA-ATGL chosen is 5'-AAA GAC CAT CCG TGG TTG TCT-3' (beginning at nucleotide 371 of ATGL sequence). The sense sequence with no known rat gene homology for scrambled control shRNA is 5'-CTG AGC ATT CAT TGG TCG C-3' (ScrATGL). The pDLDU6 empty-vector (referred to as Mock) was also used as control.

Cell transfection – shRNA-pDLDU6 constructs were introduced into INS832/13 cells by nucleofection (36) at a concentration of 5 μ g of DNA for 6.9×10^6 cells. After transfection, cells were seeded in: 12-wells plates with 3×10^5 cells for mRNA preparation and insulin secretion assays; 6-wells plates with 6×10^5 cells for immunoblot analysis, TG hydrolase activity, TG content, fatty acid (FA) esterification and lipolysis measurements; 48-wells plates with 6×10^4 cells for mitochondrial membrane potential determinations; 96-wells plates with 2×10^4 cells for the assessment of ATP content; and in 25-cm² flasks with 1.5×10^6 cells for glucose oxidation determination. Experiments with shRNA-ATGL were performed 96 h post transfection.

Real-time quantitative PCR analysis – Total RNA was extracted from rat adipocytes using the Rneasy lipid tissue mini kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and from rat and mouse islets and cells using the Rneasy Mini kit (Qiagen) with Rnase-free Dnase (Qiagen). RNA (3 μ g) was reverse transcribed to cDNA using MMLV reverse transcriptase (Invitrogen,

Burlington, ON, Canada) and hexamers as described previously (38). The primers (IDT, Coralville, IA, USA) used are listed in supplementary table 1. Gene expression was determined by the standard curve method and normalized to the expression of cyclophilin or β -actin. Real-time PCR analysis was performed using the Rotor-Gene R3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) and the LCR Faststart DNA masterplus SYBR Green reagent (Roche, Laval, QC, Canada). The number of mRNA molecules of the different lipases per μ g of total RNA was evaluated employing a corresponding standard curve. For the determination of the effect of glucose on ATGL mRNA expression, INS832/13 cells at 70-80% confluence were employed after washing twice with PBS and culturing in complete RPMI at 3, 11 or 16 mM glucose for 24 h.

Triglyceride lipase activity – Transfected cells were washed twice in PBS and centrifuged for 5 min at 200 x g. Cell homogenates were then prepared in 0.2 ml of homogenization buffer (0.25 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7.0), 20 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml antipain, and 1 μ g/ml pepstatin A). Triglyceride lipase (TGL) activity assay was performed on the cell homogenates as previously described (8).

Western blotting analysis – Transfected cells collected by trypsinization and isolated rat islets were washed three times with PBS. Total protein extracts from islets and cells were obtained as previously described (36). Inguinal fat pads were surgically removed from fed rats, pulverized under liquid nitrogen and extracted with the use of ice-cold lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.2, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS, and protease inhibitors) for 30 min at 4°C. Insoluble material was removed by centrifugation at 10,000 x g at 4°C for 10 min. The supernatant was collected and the protein assayed with a BSA protein assay kit (Pierce). Protein extracts from cells, islets and fat (15 μ g/lane) were separated on 10% SDS-PAGE and electroblotted to nitrocellulose membrane (Whatman, Hanstrabe, Dassel, Germany). Membranes were blocked with 5% (w/v) non fat dry skimmed milk in Tris-buffered saline pH 7.5 with 0.1% (v/v) Tween (TBS-T) for 30 min at 37°C and incubated with rabbit anti-ATGL antibody

(1/200 dilution in TBS-T, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA) overnight at 4°C. Blots were washed with TBS-T, blocked 15 min at 37°C with TBS-T/5% milk and exposed to horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/10,000 dilution in TBS-T, BioRad, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature. Membranes were washed again and developed by enhanced chemiluminescence using a standard kit (SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate, Pierce). Band intensity was measured by densitometry and analysed using image analysis Genesnap software from the G-Box (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada). For the normalization of ATGL protein levels, membranes were incubated with anti-actin antibody (1/500 dilution in TBS-T).

Triglyceride content – TG content was measured in transfected cells and mice islets as described (9).

Insulin secretion and insulin content measurements – Transfected cells (96 h post transfection) were washed with PBS and cultured for 2h in complete RPMI at 1 mM glucose. They were then pre-incubated for 40 min at 37°C in 1 ml Krebs-Ringer bicarbonate (KRBH) buffer containing 10 mM HEPES, 1 mM glucose and 0.5% defatted BSA, after which they were incubated for 45 min in KRBH/0.5% defatted BSA (d-BSA) plus different test agents as indicated in figure legends. At the end of the incubation, media were kept for insulin measurement by radioimmunoassay using a human insulin standard (Linco research, St. Charles, MO, USA). Total insulin content was measured following acid-ethanol (0.2 mM HCl in 75% ethanol) extraction of cells and protein cellular content was determined by using a BCA protein assay kit.

For insulin secretion in islets, freshly isolated islets that were cultured as described above in RPMI for only 2 h for recovery from isolation, were distributed in 12-well plates (10 islets/well) and pre-incubated for 45 min at 37°C in KRBH/0.5% d-BSA and 2.8 mM glucose. They were then incubated for 1h in KRBH/0.5% d-BSA and 2.8, 8.3 or 16.7 mM glucose, in the presence or absence of 0.4 mM palmitate, or 35 mM KCl. Insulin in the

media at the end of the incubation and islets insulin contents were quantified as indicated above.

Intraperitoneal glucose tolerance test – Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) were performed in conscious mice in the morning after a 16-h fast. A 15% glucose solution (1.5 g glucose/kg body weight) was administered intraperitoneally. Tail blood samples (~70 µl) were collected into heparinised tubes at 0, 15, 30, 60, and 120 min for measurement of glycemia and insulinemia.

Hyperglycemic clamp – One-step hyperglycaemic clamps (HGC) were performed on conscious mice. A 20% dextrose solution (Baxter Healthcare Corporation) was infused through the jugular vein to clamp plasma glucose at ~300 mg/dl for 60 min. Glucose infusion rate of the exogenous glucose infusion was adjusted based on instantaneous glycaemia assessments using a handheld glucometer (Roche Accu-Check, Roche, Indianapolis, IN). At time 60 min of the clamp, an arginine bolus injection was performed (iv; 1mmol/kg; Sandoz Canada Inc.) to assess the maximal insulin response. Blood samples were collected from the tail vessels, rapidly spun to separate erythrocytes and kept frozen until insulin determination by ELISA (Insulin mouse ultrasensitive EIA, ALPCO Diagnostics, Salem, NH, USA) at times 0, 5, 15, 30, 60, 61, and 70 min.

Glucose oxidation in INS cells – Transfected INS832/13 cells, cultured and pre-incubated as described under insulin secretion experiments, were incubated for 2h in 2 ml KRBH/0.5% d-BSA with 1 mM glucose plus 0.1 µCi/ml of [U-¹⁴C]-glucose (290 mCi/mmol, Amersham) or 10 mM glucose plus 0.2 µCi/ml of [U-¹⁴C]-glucose. At the beginning of the incubation, 25 cm²-flasks were sealed with a stopper containing a piece of Whatman GF/B paper soaked in 5% KOH. At the end of the incubation, perchloric acid was injected into each flask and the liberated CO₂ was trapped into Whatman paper. The trapped ¹⁴CO₂ was measured by liquid scintillation counting.

Islets glucose metabolism – Groups of 20 freshly isolated islets, cultured and preincubated as described for insulin secretion, were incubated at 37°C for 2h in KRBH/0.25% d-BSA containing 0.5 µCi D-[5-³H]-glucose (16 Ci/mmol) and 1 µCi/ml D-[U-¹⁴C]-glucose (250 mCi/mmol), 2.8 or 16.7 mM glucose. Incubation was stopped by the addition of citrate-NaOH buffer (400 mM, pH 4.9) containing antimycin-A (10 µM), rotenone (10 µM) and potassium cyanide (5 mM) as previously described (39). Glucose oxidation was measured by the generation of potassium hydroxide-trapped ¹⁴CO₂ after 60 min incubation at RT. Glucose utilization was determined by measuring the amount of ³H₂O.

Fatty acid esterification and oxidation – For fatty acid esterification determination in INS832/13 cells, transfected cells cultured and preincubated as for insulin secretion experiment, were incubated for 45 min in 2 ml KRBH containing 0.1 µCi/ml [¹⁴C]-palmitate (57.5 mCi/mmol, Amersham), 0.2 mM palmitate/0.5% defatted BSA, 1 mM carnitine and 1 or 10 mM glucose. For FA esterification and oxidation in mice islets, batches of 50 freshly isolated islets cultured as for insulin secretion experiments, were preincubated for 45 min in 1 ml KRBH containing 0.1 mM (FA oxidation) or 0.2 mM palmitate/0.25% BSA (FA esterification) and 2.8 mM glucose. They were then incubated for 2h in 0.5 ml KRBH/0.25% BSA, 0.1 mM (oxidation) or 0.2 mM palmitate (esterification), 1 mM carnitine, 2 µCi/ml [9,10(n)-³H]-palmitate (51 Ci/mmol, Amersham), and 2.8 or 16.7 mM glucose. At the end of the incubation, cells or islets were collected for FA esterification determination, washed in cold PBS and resuspended in 3 ml Folch reagent (40). Total lipids were extracted and separated by thin layer chromatography using a solvent for neutral lipids (petroleum ether/ether/acetic acid; 70:30:1) to measure the incorporation of labelled palmitate into complex lipids as previously described (10). For FA oxidation, after 2h, incubation media was transferred into Eppendorf tubes for separation of ³H₂O from labelled fatty acids as previously described (41).

Lipolysis measurement – Transfected INS832/13 cells cultured and pre-incubated as for insulin secretion experiments, were incubated for 2h in 1 ml KRBH/0.5% defatted BSA and

1 or 10 mM glucose. Batches of 60 freshly isolated islets, cultured as for insulin secretion experiments, were incubated 3h in 0.2 ml KRBH/0.07% BSA at 2.8 or 16.7 mM glucose. At the end of the incubation, media were kept to measure glycerol release as an index of lipolysis. An enzymatic luminescence detection method, based on the reduction of NAD^+ to NADH in a series of enzymatic reactions (8) was used to measure glycerol in the medium.

ATP content and mitochondrial membrane potential – Transfected INS832/13 cells cultured as described for insulin secretion experiment, were preincubated for 1h in KRBH/0.07% dBSA at 1 mM glucose after which they were incubated for 10 min in KRBH/0.07% dBSA at 1 or 10 mM glucose. At the end of the incubation, ATP was extracted from the cells and assayed using an ATP bioluminescence assay (ATPlite kit, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions.

For mitochondrial membrane potential determination, transfected cells were loaded with rhodamine 123 (Rh123, Invitrogen) for 20 min. They were then washed and incubated in KRBH/0.07% at 1 mM glucose for 30 min, after which they were washed and incubated in the same solution for 10 min. At the end of the incubation, basal fluorescence (Rh123 excited at 485 nm and the emitted fluorescence monitored at 530 nm) was measured on a FLUOstar microplate reader (BMG labtech, Offenburg, Germany). Then, 1 or 10 mM glucose with or without 0.3 mM fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone (FCCP), a mitochondrial membrane uncoupler, were added, and 10 min later Rh123 fluorescence was recorded.

Statistical analysis – All results are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated with the Student's *t* test or, for multiple comparisons, one-way or two-ways analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc testing as indicated. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

Results

ATGL is expressed in rat islets and INS832/13 cells and regulated by fasting

We first determined the level of expression of TG lipases that have recently been characterized, including ATGL, adiponutrin, and GS2 (24), in white adipose tissue of inguinal fat pads (WAT), rat islets and INS832/13 cells. As shown in Fig 1A, ATGL and HSL are the most highly expressed TG lipases in WAT. Adiponutrin is detectable in WAT from fed rats, but is almost absent in WAT from fasted rats. GS2 mRNA was not detected. ATGL mRNA was up-regulated in WAT of overnight fasted rats, as previously described (25). In rat islets, ATGL and HSL mRNA were the most abundantly expressed lipases, and their levels were significantly increased by fasting. Adiponutrin and GS2 mRNA were present at low levels (Fig 1B). The mRNA for carboxylesterase 3 (also named TG hydrolase), another TG lipase identified in WAT and possibly involved in basal lipolysis in adipocytes (29), was not detected in either rat islets or INS832/13 cells (not shown). ATGL was the main TG lipase in INS832/13 cells cultured in complete RPMI at 11.1 mM glucose (Fig 1C). Since HSL expression is up-regulated by long-term exposure to high glucose (21), the effect of glucose on ATGL expression was evaluated by RT-QPCR in INS832/13 cells incubated for 24h at different glucose concentrations. No significant effect of glucose on ATGL mRNA levels was observed, although it tended to decrease with increasing glucose concentrations (Fig 1D). Possibly, reduced expression of ATGL may become significant with longer incubation times at high glucose. The presence of ATGL protein in rat WAT, rat islets and INS832/13 cells was established by Western blot analysis (Fig 1E).

ATGL knockdown decreases TG lipase activity and induces accumulation of intracellular TG

As ATGL appears to be the most expressed TG lipase in β -cells, we assessed the effect of silencing it in INS832/13 cells using shRNA (shATGL). Transfection efficiency was approximately 85%, as evaluated with a green fluorescence protein (GFP) reporter plasmid (not shown). ATGL mRNA expression was reduced by 65% 24h post shATGL-

transfection and by 75% from 37-96h (Fig 2A). For subsequent experiments, the effects of shATGL were studied 96h post transfection. At this time, there was a 40% decrease in cellular ATGL protein (Fig 2B) and a 30% reduction in total TGL activity (Fig 2C). It should be noted that ATGL is not the only TG lipase expressed in INS832/13 cells and that other lipases including HSL contribute to the measured TG lipase activity. We verified that the decrease in ATGL expression did not lead to a compensatory increase in HSL expression (not shown).

ATGL is responsible for the initial step of TG catabolism (26). It is anticipated that reduced ATGL expression should reduce TG/FFA cycling and cause accumulation of cellular TG. In keeping with this prediction, ATGL-KD in INS832/13 cells resulted in a 3-fold increase in TG content (Fig 3A). To measure the effect of ATGL-KD on FA esterification, transfected cells were labelled for 45 min with ¹⁴C-palmitate. Palmitate esterification into TG was enhanced about two fold at both 1 and 10 mM glucose in ATGL-KD cells (Fig 3B). In contrast, no changes in palmitate incorporation into DAG (Fig 3C) or phospholipids (Fig 3D) or in cellular non-esterified palmitate (NEFA) was observed (not shown). A modest reduction in esterification of FA to cholesterol esters in ATGL-KD cells cultured at 10 mM glucose was noted (not shown).

The effect of modulating ATGL expression on lipolysis was evaluated by measuring glycerol release. There was no change in the release of glycerol expressed per mg protein in shATGL cells (Fig 3E). In ATGL-KD cells, the TG content was increased 3 fold and if lipolysis is expressed per unit of TG, it was reduced in shATGL cells (Fig 3F). Overall the data indicate that TG metabolism of INS832/13 cells is affected upon reduced expression of ATGL.

Knockdown of ATGL expression does not affect glucose and energy metabolism

Various parameters of glucose and energy metabolism were determined to assess the potential toxicity of the constructs or of reducing ATGL expression. ATGL-KD had no effect on glucose oxidation at low or high glucose concentrations in INS832/13 cells (Fig 4A). A very modest reduction in ATP content was observed at both low and high glucose in ATGL-KD cells; however, there was no difference in the fractional increase in ATP content from 1 to 10 mM glucose between scrATGL and shRNA-ATGL cells (Fig 4B). Insulin granules contain a large amount of ATP (42). Since ATGL-KD causes a modest reduction in the insulin content of INS832/13 cells (see below), the slight reduction in ATP content is possibly due to a reduced number of secretory granules. Mitochondrial membrane potential was measured in INS832/13 cells using rhodamine 123, a fluorescent lipophilic cation. In ScrATGL and ShATGL transfected cells, 10 mM glucose caused mitochondrial membrane potential hyper-polarization to the same extent, indicated by a fall in the intensity of Rh123 fluorescence, and membrane potential at basal glucose was similar (Fig 4C). These results indicate that ATGL-KD does not affect glucose and energy metabolism in INS832/13 cells.

A reduction in ATGL expression lowers fuel-induced insulin secretion

The effect of ATGL-KD on insulin secretion was measured in cells in response to glucose, amino-acids (leucine plus glutamine), GLP-1, and palmitate. ScrATGL-transfected cells had the same response to different secretagogues as mock-transfected cells (not shown for Fig 5A; see Fig 5B). Basal insulin release at 1 mM glucose was the same for scrATGL and shATGL cells. The response to KCl, GLP-1 and palmitate at low glucose were not affected by ATGL-KD (Fig 5A and B). In contrast, reduced ATGL expression decreased the effect of amino acids on insulin release by 60% and GSIS both in the absence and presence of palmitate by 50-55% (Fig 5A). Total insulin content was decreased by 35% in ShATGL transfected cells (4.13 ± 0.15 and 2.73 ± 0.11 ng insulin/ μ g protein for ScrATGL and ShATGL, respectively, n=7).

To ascertain whether the reduction of GSIS in ATGL-KD cells involves KATP-independent/amplification mechanism(s) (43,44), cells were incubated in the presence of 35

mM KCl \pm diazoxide, a K_{ATP} channel opener. ShATGL treatment of INS832/13 cells barely affected KCl-induced insulin secretion at low (1mM) glucose (Fig 5 A and B). However, in the presence of elevated KCl with or without diazoxide, GSIS was markedly curtailed in shATGL cells as compared to mock- or scrATGL-transfected cells (Fig 5B). Thus, the activity of the "amplification" arm of GSIS, as evaluated by the difference in insulin secretion between 1 and 10 mM glucose in cells incubated with high KCl without or with diazoxide (45), was reduced by 60-75% in shATGL-treated cells (Fig 5C). These results indicate that the defect of GSIS in ATGL-KD cells is largely due to altered K_{ATP}-independent/amplification of insulin secretion.

ATGL^{-/-} mice are hypoinsulinemic and hypoglycaemic and show decreased plasma TG and FFA levels

To confirm the importance of ATGL in the regulation of insulin secretion, ATGL^{-/-} mice were used. Body weight and blood chemistry of ATGL^{-/-} mice following an overnight fast are shown in Table 1. Fasted ATGL^{-/-} mice were slightly heavier than ATGL^{+/+} mice. Circulating insulin levels were reduced by 70% in ATGL^{-/-} mice, consistent with the 40% reduction in serum insulin reported in fed ATGL^{-/-} mice on a mixed genetic background (50% C57BL/6 and 50% 129/Ola) (33). As expected, plasma TG and FFA were reduced (about 40 %), and glucose levels were significantly (25%) decreased in ATGL^{-/-} mice. Whole body fat mass was increased by 2-fold in ATGL^{-/-} mice, as reported before in mice on a mixed genetic background (33).

Reduced first phase GSIS in vivo in insulino-sensitive glucose-normotolerant ATGL^{-/-} mice

Hyperglycaemic clamps (HGC) were performed in 10-wk-old overnight fasted conscious male mice to investigate the consequence of ATGL deficiency on insulin secretion *in vivo*. Conscious ATGL^{-/-} mice had lower basal glycaemia (105 \pm 4 vs 145 \pm 7 mg/dl) (Fig 6A) and insulinemia (51.7 \pm 7.7 vs 123.3 \pm 13.6 pmol/L) (Fig 6B) than ATGL^{+/+} mice. During the clamp, the glucose infusion rate was adjusted to maintain blood

glucose at ~ 300 mg/dl (Fig. 6A). Insulin secretion in response to hyperglycemia was reduced in ATGL^{-/-} mice (Fig 6B). Calculation of the area under the curve (AUC) for the first 15 min of the clamp, subtracting basal insulinemia, indicated that first phase GSIS was reduced by 72% in ATGL^{-/-} mice (Fig 6D). However, the AUC for the second phase GSIS (15-60 min of the clamp) of ATGL^{-/-} mice was not significantly different from that of ATGL^{+/+} mice (Fig 6E). Consistent with reduced first phase GSIS, insulin secretion in response to an arginine bolus was reduced by 50% in ATGL^{-/-} mice (Fig 6C). The M/I index of insulin sensitivity (46) was increased in ATGL^{-/-} mice (2.42 ± 0.21 vs 1.47 ± 0.13 $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ glucose infusion per pmol/L insulin) indicating that ATGL^{-/-} mice are more sensitive to insulin than WT mice (Fig 6F). In ATGL^{-/-} mice, glucose tolerance was unchanged in comparison to ATGL^{+/+} mice (Fig 6G). Normal glucose tolerance in ATGL^{-/-} mice was maintained despite lower plasma insulin levels (Fig. 6H). These data confirm that ATGL^{-/-} mice show improved insulin sensitivity in association with reduced insulin secretion, allowing unchanged glucose tolerance.

Impaired insulin secretion in isolated islets from ATGL^{-/-} mice

Insulin release was measured in isolated islets from overnight-fasted ATGL^{+/+} and ATGL^{-/-} male mice. In ATGL^{+/+} mice, glucose increased insulin secretion by 3 and 7 fold at 8.3 and 16.7 mM glucose, respectively, in comparison to the value at 2.8 mM glucose (Fig 7A). Exogenous palmitate induced a robust enhancement of insulin secretion in control islets at all glucose concentrations, and this enhancement was curtailed in ATGL^{-/-} islets. Fig 7A shows that GSIS either in the absence or presence of palmitate was dramatically reduced in islets deficient in ATGL, even when the data are expressed per total islet insulin content. Insulin secretion in response to a depolarizing concentration of KCl was also reduced by 50% in ATGL^{-/-} islets. At low glucose, palmitate causes a 2-3 fold increase in insulin release in ATGL^{+/+} islets and this secretory response remained unaltered in ATGL^{-/-} islets (Fig 7A). Altogether the data indicate that ATGL^{-/-} islets show a marked reduction in insulin secretion in response to all classes of tested stimuli (glucose, palmitate in the presence of elevated glucose and KCl).

Total insulin content was reduced by 50% in ATGL^{-/-} islets (Fig 7C), largely due to the fact that ATGL^{-/-} islets were smaller, as indicated by their protein content that was reduced by approximately 35% (Fig 7B). However, islet insulin content corrected for protein content per islet was similar in both islet groups (Fig 7D).

Metabolic correlates in ATGL^{-/-} islets

As observed in shATGL-KD cells, the deletion of ATGL led to a 2.6 fold increase in the islet TG content of ATGL^{-/-} mice (Fig 8A). Similar to shATGL-KD cells, lack of ATGL did not alter islet lipolysis when expressed per mg protein (Fig 8B). However, when normalized for TG content, lipolysis was reduced by 50% in ATGL^{-/-} islets (Fig. 8C). There was no change in HSL transcript expression in islets from ATGL^{-/-} mice (data not shown). Islets from ATGL^{-/-} mice showed a 55% significant increase in FA esterification into TG at 16.7 mM glucose compared to ATGL^{+/+} islets (Fig 8D). In contrast, FA esterification into DAG (Fig 8E) and PL (Fig 8F) were not significantly different in islets from both genotypes.

FA oxidation (Fig 8G), glucose utilization (Fig 8H) and glucose oxidation (Fig 8I) were similar at low and high glucose in isolated islets from ATGL^{-/-} and ATGL^{+/+} mice, indicating that ATGL-deficiency does not induce metabolic toxicity of islet tissue.

Discussion

The results show that ATGL is expressed in rat islets and INS832/13 cells, and that this key lipolytic enzyme plays a role in the regulation of fuel-induced insulin secretion, mainly via the K_{ATP} /amplification arm of nutrient induced insulin release. Thus, both ATGL-KD in INS cells or its deletion in mice resulted in defective GSIS and the same changes in lipid metabolism. The reduction in both GSIS and KCl-induced secretion were more prominent in isolated ATGL^{-/-} islets mice than in INS cells, likely due to the fact that ATGL still remained expressed at appreciable levels in shATGL-treated cells.

Insulin release in response to glucose, and to palmitate or KCl at high glucose, were curtailed in ATGL-KD cells and ATGL^{-/-} islets; insulin release *in vivo* promoted by glucose or arginine at high glucose were reduced. This is consistent with the view that intracellular lipid signalling is important in the secretory response of all classes of stimuli (3). Thus, increased expression of malonyl-CoA decarboxylase (47) in INS cells, or reduced lipolysis *in vivo* using nicotinic acid (48), impaired the secretory effects of both fuel and non-fuel stimuli. However, the exocytotic process *per se* was not altered by reduced ATGL expression because the rise in insulin release promoted by palmitate, GLP-1 and KCl at low glucose remained largely unchanged. As discussed before (3,47,49), we believe that the lipid amplification arm of glucose signalling that provide active molecules such as DAG synergize with other “classical” pathways e.g. Ca^{2+} and cAMP.

The decrease in circulating insulin levels in ATGL^{-/-} mice can be explain in part by the increase in insulin sensitivity observed during the hyperglycaemic clamp and as reported before in ATGL^{-/-} mice on a mixed genetic background (33). Indeed, ATGL^{-/-} mice need to secrete less insulin than ATGL^{+/+} mice to keep normal glycemia. However, the data obtained in isolated islets clearly demonstrate that ATGL^{-/-} mice have a marked reduced fuel and non-fuel insulin secretion. Consequently, the decrease in first phase GSIS and in insulin secretion in response to arginine *in vivo* during the HGC and the very low level of insulin release in ATGL^{-/-} mice after a glucose challenge during an IPGTT are

related at least in part to a β -cell defect in insulin secretion independently of insulin action whose change is relatively modest in comparison to the alterations in insulin secretion.

The lack of ATGL in ATGL^{-/-} mice or depletion of this enzyme in INS cells resulted in a 2.5-3 fold increase in TG content and it might be argued that this might cause cell toxicity. We believe that such "lipotoxicity" can be discounted for the following reasons: glucose oxidation and the mitochondrial membrane potential remained unchanged in ATGL-KD cells; glucose usage, glucose oxidation and FA oxidation were unaltered in ATGL^{-/-} islets; basal insulin release and insulin secretion at low glucose in response to palmitate were unchanged; esterification of palmitate into DAG and PL remained constant as did total glycerol release; insulin content per mg islet protein was unchanged; finally the rise in TG in ATGL-KD cells or ATGL^{-/-} islets were relatively modest and TG accumulation in the β -cell has emerged as a protective mechanism against tissue lipotoxicity (50) rather than a cellular "offense" as previously thought (13).

The decreased circulating TG and FFA availability during fasting might contribute to defective GSIS in isolated islets from ATGL^{-/-} mice. Thus, as discussed above, lowering of circulating FFA in fasted rats was shown to impair insulin secretion in response to all secretagogues both *in vivo* and *ex vivo*, an effect that was restored upon provision of exogenous FFA (48). However, the provision of exogenous FFA to "fasted" ATGL^{-/-} islets did not restore GSIS. This favours the view, in accordance with data obtained in ATGL-KD cells, that lipolysis of endogenous lipid stores via ATGL plays an important role in GSIS. The results contrasts with our previous data obtained in isolated islets from fasted male HSL^{-/-} mice, which also have lowered plasma lipid levels, and in which the defect in GSIS was reversed by FFA supplementation (8). This suggests a more essential role of lipolysis via ATGL than HSL in GSIS as well as in response to other stimuli.

Glucose stimulated lipolysis in INS832/13 cells, whereas, a modest not significant trend to be higher was observed in mouse islets. Reported data in the literature indicates that glucose-stimulated glycerol release is largest in β -cell lines (51), intermediate in rat

islets (10,12,52) and modest in mouse islets (8,23,51,53). An excellent correlation between lipolysis and GIIS (51) was observed in INS-1 cells and mice islets. A finding that support the concept that lipolysis is important for GIIS. Fex *et al* (23) reported no effect of glucose on lipolysis in mouse islets, whereas we observed in overnight fasted male wild type and HSL^{-/-} mice a 40% and 100% increase in glucose-induced lipolysis, respectively (8). For assay sensitivity reason, lipolysis *in vitro* is measured over 2-3 h in KRBH medium (a rather long time for an incubation of a tissue in an incomplete medium without serum), whereas insulin secretion is determined over 45-60 min. A time course of lipolysis following glucose stimulation of rodent islet *in vitro* needs to be performed following sensitive assay development. Thus, enhanced lipolysis in response to glucose may be more prominent at early times following glucose stimulation. Alternatively and as discussed below, it is possible that only a specific fuel-sensitive TG pool is involved in the production of lipid signalling molecules for insulin secretion.

Surprisingly there was no change in the release of glycerol expressed per mg protein in ATGL-KD cells and ATGL^{-/-} islets, despite the fact that ATGL knockdown or its absence caused TG accumulation. This observation is consistent with the finding that the esterification of palmitate into DAG and the incorporation of labeled palmitate into NEFA were unchanged. A possible explanation for these observations is that shATGL cells or ATGL^{-/-} islets readjusted their total levels of DAG and FFA as well as their esterification of FFA into DAG because these are well defended currencies that influence many biological processes. A first possibility is because cells display glycerolipid cycling processes (54) such that de novo synthesized sn1,2-DAG does not necessarily have to be esterified to TG before being hydrolyzed, but can directly be hydrolyzed by HSL to MAG. In other words the β -cell may adapt to TG accumulation by redirecting newly formed DAG via a short cycle to MAG, thus bypassing TG formation. Another possibility is that increased TG lipolysis via other TG lipases compensated reduced flux via ATGL. Glycerol release results from the activity of ATGL, HSL, MAG lipase, acyltransferases in the TG synthesis pathways, DAG kinase, phosphatidate phosphohydrolase, glycerol kinase, and additional

enzymes. Possibly, cells readjusted glycerol release by modulating flux of one or several of the mentioned enzymes. It should be pointed out that similar observation has been reported in myotubes where ATGL-KD resulted in enhanced incorporation of labeled palmitate into TG with no difference in DAG and in NEFA (55).

How is it possible that ATGL may be important for insulin secretion if total glycerol release, an index of lipolysis, remained unaffected in ATGL-KD β -cells and ATGL^{-/-} islets? We wish to propose the existence of fuel-insensitive and sensitive TG pools in the β -cell, the latter linked to stimulus secretion coupling and regulation by ATGL. Recent work from our laboratory support this view (C. Nolan and M.P., unpublished). We speculate that the local production of lipid signalling molecules by ATGL and/or enzymes of glycerolipid/fatty acid cycling are important for the exocytotic release of insulin in response to various stimuli. In this context, HSL has been shown to associate with insulin secretory granules in the β -cell (22) and it will be of interest to assess the β -cell subcellular localization of ATGL.

Recently, Fex *et al* (14) reported that β -cell specific HSL^{-/-} mice had a reduced first phase GSIS and a diminution in insulin release in response to an arginine challenge, as we observed in ATGL^{-/-} mice. They provided evidence that an altered exocytosis rate in the β -cell of HSL^{-/-} mice that is not related to calcium influx is responsible for this defect in insulin secretion (14). Thus, the emerging evidence indicates that TG lipolysis via both ATGL and HSL play key role in the regulation of exocytosis and GSIS.

The nature of the "locally" produced lipid signalling molecule(s) provided by ATGL(s) and/or associated enzymes of TG/FFA cycling needs to be defined. The most likely candidates are DAG, FFA and long chain fatty acyl-CoA (FACoA). FACoA (56) and FFA (57) have been shown to promote exocytosis in permeabilized β -cells and might be used as substrates by enzymes that acylate exocytotic proteins, such as the synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) (58) and synaptogamin (59), to enhance their association

with the plasma membrane. Furthermore, phorbol esters, commonly used as stable and potent DAG mimics, via PKC activation, cause SNAP-25 phosphorylation and stimulation of insulin exocytosis (60). DAG, can also act on vesicle exocytosis via its binding to the C1 domain of the synaptic vesicle priming protein Munc-13 (61) and we reported that GSIS is defective in Munc13-1 deficient islets (62).

The cellular insulin content was reduced in islets of ATGL^{-/-} mice and in shATGL-transfected INS cells. Recent studies have revealed a tight coupling between insulin secretion and biosynthesis. Islet cell autoantigen 512 (ICA512), an intrinsic tyrosine phosphatase-like protein of the insulin secretory granule membrane (63), is cleaved (64) following granule fusion to the plasma membrane. The resulting cleaved cytosolic fragment of this protein (ICA512-CCF) translocates to the nucleus where it prolongs the activity of STATs and thus insulin gene transcription and granule biogenesis (65). Possibly, decreased exocytosis of insulin due to reduced ATGL expression in the β -cell, leads to an adaptive reduced insulin biosynthesis and storage.

The role of lipolysis in human islets is not known but we have observed both ATGL and HSL expression in human islets (data not shown). The possible importance of ATGL in human β -cell function and insulin secretion is supported by the identification of ATGL gene polymorphisms associated with type 2 diabetes (66). Furthermore, ATGL mutations leading to a truncated ATGL protein are responsible for a neutral lipid storage disease with myopathy (NLSDM) which is characterized by systemic TG accumulation (67,68).

Recently, a novel mutation in the ATGL gene leading to a lack of the C-terminal region of the ATGL protein was identified in a NLSDM patient (69). Interestingly, this patient showed a decreased insulin secretory capacity with age. Whether ATGL participates in lipolysis and insulin secretion in human islets remains to be examined.

In conclusion, the results support the concept that β -cell lipolysis via ATGL is important for the provision of lipid-signalling molecules necessary for insulin secretion in

response to fuel and non fuel stimuli. Additional work is needed to conclusively identify these lipid signalling molecules, to understand how ATGL is regulated in the β -cell, and to determine whether this enzyme directly produce coupling factors (DAG and FFA) for insulin secretion, or indirectly via glycerolipid/FFA cycling or other metabolic pathway(s) of lipid metabolism.

Acknowledgements - We thank Grace Ferguson and Mélanie Ethier for valuable technical help. This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association, the Canadian Institute of Health Research (to MP) and the US National Institutes of Health (to NR, VP and MP). MP is the recipient of a Canadian Chair in Diabetes and Metabolism. VP is the recipient of a Canadian Chair in Diabetes and Pancreatic Beta-cell Function. CG was supported by graduate studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec and Programme de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal. JL is supported by graduate studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

Abbreviations – ADPN, adiponutrin; ATGL, adipose triglyceride lipase; BSA, bovine serum albumin; CE, cholesterol ester; DAG, diacylglycerol; FA, fatty acid; FFA, free fatty acid; FACoA, long chain fatty acyl-CoA; GSIS, glucose-stimulated insulin secretion; HSL, hormone-sensitive lipase; KD, knockdown; KRBH, Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing HEPES; LD, lipid droplet; MAG, monoacylglycerol; NEFA, non-esterified fatty acid; shRNA, small hairpin RNA; PBS, phosphate-buffered saline; PL, phospholipid; TG, triglyceride; TGL, triglyceride lipase; WAT, white adipose tissue; WT, wild type.

References

1. Stein, D. T., Esser, V., Stevenson, B. E., Lane, K. E., Whiteside, J. H., Daniels, M. B., Chen, S., and McGarry, J. D. (1996) *J Clin Invest* **97**, 2728-2735
2. Stein, D. T., Stevenson, B. E., Chester, M. W., Basit, M., Daniels, M. B., Turley, S. D., and McGarry, J. D. (1997) *J Clin Invest* **100**, 398-403
3. Nolan, C. J., Madiraju, M. S., Delghingaro-Augusto, V., Peyot, M. L., and Prentki, M. (2006) *Diabetes* **55** Suppl 2, S16-23
4. Poitout, V., Hagman, D., Stein, R., Artner, I., Robertson, R. P., and Harmon, J. S. (2006) *J Nutr* **136**, 873-876
5. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., and Roduit, R. (2002) *Diabetes* **51** Suppl 3, S405-413
6. El-Assaad, W., Buteau, J., Peyot, M. L., Nolan, C., Roduit, R., Hardy, S., Joly, E., Dbaibo, G., Rosenberg, L., and Prentki, M. (2003) *Endocrinology* **144**, 4154-4163
7. Masiello, P., Novelli, M., Bombara, M., Fierabracci, V., Vittorini, S., Prentki, M., and Bergamini, E. (2002) *Metabolism* **51**, 110-114
8. Peyot, M. L., Nolan, C. J., Soni, K., Joly, E., Lussier, R., Corkey, B. E., Wang, S. P., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2004) *Diabetes* **53**, 1733-1742
9. Roduit, R., Masiello, P., Wang, S. P., Li, H., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2001) *Diabetes* **50**, 1970-1975
10. Nolan, C. J., Leahy, J. L., Delghingaro-Augusto, V., Moibi, J., Soni, K., Peyot, M. L., Fortier, M., Guay, C., Lamontagne, J., Barbeau, A., Przybytkowski, E., Joly, E., Masiello, P., Wang, S., Mitchell, G. A., and Prentki, M. (2006) *Diabetologia* **49**, 2120-2130
11. Yaney, G. C., Civelek, V. N., Richard, A. M., Dillon, J. S., Deeney, J. T., Hamilton, J. A., Korchak, H. M., Tornheim, K., Corkey, B. E., and Boyd, A. E., 3rd. (2001) *Diabetes* **50**, 56-62
12. Mulder, H., Yang, S., Winzell, M. S., Holm, C., and Ahren, B. (2004) *Diabetes* **53**, 122-128
13. Koyama, K., Chen, G., Wang, M. Y., Lee, Y., Shimabukuro, M., Newgard, C. B., and Unger, R. H. (1997) *Diabetes* **46**, 1276-1280
14. Fex, M., Haemmerle, G., Wierup, N., Dekker-Nitert, M., Rehn, M., Ristow, M., Zechner, R., Sundler, F., Holm, C., Eliasson, L., and Mulder, H. (2009) *Diabetologia* **52**, 271-280
15. Jensen, M. D., Ekberg, K., and Landau, B. R. (2001) *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E789-793
16. Vaughan, M. (1962) *J Biol Chem* **237**, 3354-3358
17. Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., and Hanson, R. W. (2003) *J Biol Chem* **278**, 30413-30416
18. Newsholme, E. A., and Crabtree, B. (1976) *Biochem Soc Symp*, 61-109
19. Hahn, P., and Novak, M. (1975) *J Lipid Res* **16**, 79-91
20. Mulder, H., Holst, L. S., Svensson, H., Degerman, E., Sundler, F., Ahren, B., Rorsman, P., and Holm, C. (1999) *Diabetes* **48**, 228-232

21. Winzell, M. S., Svensson, H., Arner, P., Ahren, B., and Holm, C. (2001) *Diabetes* **50**, 2225-2230
22. Lindvall, H., Nevsten, P., Strom, K., Wallenberg, R., Sundler, F., Langin, D., Winzell, M. S., and Holm, C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 3828-3836
23. Fex, M., Olofsson, C. S., Fransson, U., Bacos, K., Lindvall, H., Sorhede-Winzell, M., Rorsman, P., Holm, C., and Mulder, H. (2004) *Endocrinology* **145**, 3746-3753
24. Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B., and Gross, R. W. (2004) *J Biol Chem* **279**, 48968-48975
25. Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H., and Sul, H. S. (2004) *J Biol Chem* **279**, 47066-47075
26. Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004) *Science* **306**, 1383-1386
27. Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006) *J Biol Chem* **281**, 40236-40241
28. Soni, K. G., Lehner, R., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Semache, M., Gao, W., Ashman, K., Pshezhetsky, A. V., and Mitchell, G. A. (2004) *J Biol Chem* **279**, 40683-40689
29. Wei, E., Gao, W., and Lehner, R. (2007) *J Biol Chem* **282**, 8027-8035
30. Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002) *J Biol Chem* **277**, 4806-4815
31. Fex, M., Lucas, S., Winsell, M. S., Ahrén, B., Holm, C., and Mulder, H. (2006) *Diabetes* **55** Suppl 2, S24-31
32. Hohmeier, H. E., Mulder, H., Chen, G., Henkel-Rieger, R., Prentki, M., and Newgard, C. B. (2000) *Diabetes* **49**, 424-430
33. Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., Kratky, D., Wagner, E. F., Klingenspor, M., Hoefler, G., and Zechner, R. (2006) *Science* **312**, 734-737
34. Freeman, H. C., Hugill, A., Dear, N. T., Ashcroft, F. M., and Cox, R. D. (2006) *Diabetes* **55**, 2153-2156
35. Gotoh, M., Maki, T., Satomi, S., Porter, J., Bonner-Weir, S., O'Hara, C. J., and Monaco, A. P. (1987) *Transplantation* **43**, 725-730
36. Guay, C., Madiraju, S. R., Aumais, A., Joly, E., and Prentki, M. (2007) *J Biol Chem* **282**, 35657-35665
37. Brun, T., Duhamel, D. L., Hu He, K. H., Wollheim, C. B., and Gauthier, B. R. (2007) *Oncogene* **26**, 4261-4271
38. Roduit, R., Morin, J., Masse, F., Segall, L., Roche, E., Newgard, C. B., Assimacopoulos-Jeannet, F., and Prentki, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 35799-35806
39. Massa, M. L., Borelli, M. I., Del Zotto, H., and Gagliardino, J. J. (2001) *J Endocrinol* **171**, 551-556
40. Segall, L., Lameloise, N., Assimacopoulos-Jeannet, F., Roche, E., Corkey, P., Thumelin, S., Corkey, B. E., and Prentki, M. (1999) *Am J Physiol* **277**, E521-528
41. Saddik, M., and Lopaschuk, G. D. (1991) *J Biol Chem* **266**, 8162-8170
42. Hutton, J. C., and Peshavaria, M. (1983) *Biochem J* **210**, 235-242

43. Henquin, J. C. (2000) *Diabetes* **49**, 1751-1760
44. Straub, S. G., and Sharp, G. W. (2002) *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463
45. Straub, S. G., James, R. F., Dunne, M. J., and Sharp, G. W. (1998) *Diabetes* **47**, 758-763
46. DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., and Andres, R. (1979) *Am J Physiol* **237**, E214-223
47. 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., and Prentki, M. (2004) *Diabetes* **53**, 1007-1019
48. Dobbins, R. L., Chester, M. W., Stevenson, B. E., Daniels, M. B., Stein, D. T., and McGarry, J. D. (1998) *J Clin Invest* **101**, 2370-2376
49. Nolan, C. J., and Prentki, M. (2008) *Trends Endocrinol Metab* **19**, 285-291
50. Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., and Pipeleers, D. G. (2001) *Diabetes* **50**, 1771-1777
51. Winzell, M. S., Strom, K., Holm, C., and Ahren, B. (2006) *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **16** Suppl 1, S11-16
52. Delghingaro-Augusto, V., Nolan, C. J., Gupta, D., Jetton, T. L., Latour, M. G., Peshavaria, M., Madiraju, S. R., Joly, E., Peyot, M. L., Prentki, M., and Leahy, J. (2009) *Diabetologia* **52**, 1122-1132
53. Sorhede Winzell, M., and Ahren, B. (2004) *Horm Metab Res* **36**, 795-803
54. Prentki, M., and Madiraju, S. R. (2008) *Endocr Rev* **29**, 647-676
55. Watt, M. J., van Denderen, B. J., Castelli, L. A., Bruce, C. R., Hoy, A. J., Kraegen, E. W., Macaulay, L., and Kemp, B. E. (2008) *Mol Endocrinol* **22**, 1200-1212
56. Deeney, J. T., Gromada, J., Hoy, M., Olsen, H. L., Rhodes, C. J., Prentki, M., Berggren, P. O., and Corkey, B. E. (2000) *J Biol Chem* **275**, 9363-9368
57. Olofsson, C. S., Salehi, A., Holm, C., and Rorsman, P. (2004) *J Physiol* **557**, 935-948
58. Gonzalo, S., and Linder, M. E. (1998) *Mol Biol Cell* **9**, 585-597
59. Chapman, E. R., Blasi, J., An, S., Brose, N., Johnston, P. A., Sudhof, T. C., and Jahn, R. (1996) *Biochem Biophys Res Commun* **225**, 326-332
60. Shu, Y., Liu, X., Yang, Y., Takahashi, M., and Gillis, K. D. (2008) *J Neurosci* **28**, 21-30
61. Rhee, J. S., Betz, A., Pyott, S., Reim, K., Varoqueaux, F., Augustin, I., Hesse, D., Sudhof, T. C., Takahashi, M., Rosenmund, C., and Brose, N. (2002) *Cell* **108**, 121-133
62. Kwan, E. P., Xie, L., Sheu, L., Nolan, C. J., Prentki, M., Betz, A., Brose, N., and Gaisano, H. Y. (2006) *Diabetes* **55**, 1421-1429
63. Solimena, M., Dirx, R., Jr., Hermel, J. M., Pleasic-Williams, S., Shapiro, J. A., Caron, L., and Rabin, D. U. (1996) *Embo J* **15**, 2102-2114
64. Trajkovski, M., Mziaut, H., Altkruger, A., Ouwendijk, J., Knoch, K. P., Muller, S., and Solimena, M. (2004) *J Cell Biol* **167**, 1063-1074
65. Mziaut, H., Trajkovski, M., Kersting, S., Ehninger, A., Altkruger, A., Lemaitre, R. P., Schmidt, D., Saeger, H. D., Lee, M. S., Drechsel, D. N., Muller, S., and Solimena, M. (2006) *Nat Cell Biol* **8**, 435-445
66. Schoenborn, V., Heid, I. M., Vollmert, C., Lingenhel, A., Adams, T. D., Hopkins, P. N., Illig, T., Zimmermann, R., Zechner, R., Hunt, S. C., and Kronenberg, F. (2006) *Diabetes* **55**, 1270-1275

67. Akiyama, M., Sakai, K., Ogawa, M., McMillan, J. R., Sawamura, D., and Shimizu, H. (2007) *Muscle Nerve* **36**, 856-859
68. Fischer, J., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2007) *Med Sci (Paris)* **23**, 575-578
69. Kobayashi, K., Inoguchi, T., Maeda, Y., Nakashima, N., Kuwano, A., Eto, E., Ueno, N., Sasaki, S., Sawada, F., Fujii, M., Matoba, Y., Sumiyoshi, S., Kawate, H., and Takayanagi, R. (2008) *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 2877-2884

Table 1

Plasma insulin, glucose, FFA, TG levels and body weight in 10-week-old overnight fasted male ATGL^{+/+} and ATGL^{-/-} mice. #, body weight (BW), body fat and lean mass in 9-week-old fed male mice. Means \pm SE. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. ATGL^{+/+} by unpaired, two-tailed Student's *t* test.

	ATGL ^{+/+}	ATGL ^{-/-}
Insulin (pmol/L)	111 \pm 18 (n=35)	31 \pm 7*** (n=31)
Glucose (mg/dL)	167 \pm 5 (n=40)	128 \pm 7*** (n=36)
FFA (mmol/L)	0.32 \pm 0.03 (n=23)	0.20 \pm 0.01*** (n=22)
TG (mmol/L)	0.46 \pm 0.02 (n=24)	0.28 \pm 0.03 *** (n=20)
BW (g)	23.6 \pm 0.3 (n=85)	24.6 \pm 0.3* (n=66)
BW (g)#	26.0 \pm 0.7 (n=10)	27.3 \pm 0.8 (n=7)
Body fat (g)#	2.5 \pm 0.3 (n=10)	4.9 \pm 0.2 *** (n=7)
Lean Mass#	20.5 \pm 0.9 (n=10)	19.4 \pm 0.7 (n=7)

Figure legends

FIGURE 1. ATGL expression relatively to other triglyceride lipases in adipose tissue, islets and INS832/13 cells, and its regulation by the dietary state. ATGL adiponutrin (ADPN), GS2 and HSL mRNA levels were determined by real-time RT-PCR in adipose tissue (A) and islets (B) from overnight fasted and fed rats, and in INS832/13 cells cultured in complete RPMI at 11.1 mM glucose (C). The effect of glucose on ATGL expression was studied in INS832/13 exposed for 24 h at 3, 11 or 16 mM glucose (G) in complete RPMI and normalized to cyclophilin (D). Immunoblot analysis of ATGL (E) in rat inguinal fat pad (two different rats, lanes 1-2), rat islets (two different rats, lanes 3-4) and INS832/13 cells (two different passages, lanes 5-6). The data are expressed as means \pm SEM of 4 rats (A & B) or 4 different passages for INS832/13 cells (C & D). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 *vs.* nutritional state, by unpaired two-tailed Student's *t* test.

FIGURE 2. shATGL treatment of INS832/13 cells reduces the expression of ATGL mRNA and protein and decreases TG lipase activity. INS832/13 cells were electroporated in the presence of empty vector (Mock), scrATGL (Scr) or shATGL. Non-transfected cells (NT) served as additional control. (A), time course of the effect of shATGL on ATGL mRNA expression in INS832/13 cultured in complete RPMI at 11.1 mM glucose. (B), ATGL protein expression was determined by Western blot analysis using actin as a control. (C), triglyceride lipase activity of cytosolic extracts of INS832/13 cells using radiolabeled triolein as a substrate. Means \pm SE of 3 experiments performed in duplicate. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 *vs.* time 13h after transfection (A) or *vs.* scrambled ATGL (B & C), by unpaired two-tailed Student's *t* test.

FIGURE 3. Knockdown of ATGL expression in INS832/13 cells increases FA esterification into TG and causes TG deposition. Cellular TG content was measured 96h post-transfection with scrATGL, shATGL or under mock or non transfected conditions (A). Means \pm SE of 15 different wells in 4 separate experiments. (B-D), cells were incubated for 45 min in KRBH containing [1-¹⁴C] palmitate at 1 and 10 mM glucose. Panels (B-D) show

palmitate esterification into (B) TG, (C) DAG and (D) PL. Means \pm SE of 3 independent experiments done in triplicate. Glycerol release is shown in panels E-F, expressed per protein content (E) or per TG content (F). Data represent means \pm SE of 5 independent experiments performed in duplicate or triplicate. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. scrambled ATGL for the same glucose concentration, one way-ANOVA, Bonferroni post-hoc test.

FIGURE 4. Decreased ATGL expression in INS832/13 cells does not affect glucose and mitochondrial metabolism. Non-transfected cells (NT) or INS832/13 cells electropored in the presence of either controls (mock and ScrATGL) or shATGL plasmids were cultured for 96 h prior to experiments. (A) Glucose oxidation was measured in cells incubated for 2h in KRBH at 1 or 10 mM glucose with [U-¹⁴C] glucose. Means \pm SE of 9 separate determinations in 3 independent experiments. (B) Total ATP content was determined in cells incubated for 10 min in KRBH at 1 or 10 mM glucose. Means \pm SE of 18 separate determinations in 3 independent experiments. (C) Mitochondrial membrane potential was monitored as rhodamine 123 fluorescence. After dye loading, basal fluorescence was determined in cells cultured at 1 mM glucose, and then fluorescence was recorded for 10 min at 10 mM glucose. Means \pm SE of 12 separate determinations in two independent experiments. * p <0.05 vs. scrambled ATGL for the same glucose concentration and ### p <0.001 vs. 1 mM glucose for the same group; one way-ANOVA, Bonferroni post-hoc test.

FIGURE 5. ATGL knockdown in INS832/13 cells reduces fuel-induced insulin secretion. (A) Insulin release was measured in mock, scrATGL and shATGL cells incubated as indicated for 45 min at 1 or 10 mM glucose with 0.5% BSA in the presence or absence of 0.25 mM palmitate, 10 nM GLP-1, 35 mM KCl or 5 mM glutamine plus 5 mM leucine. The effect of ATGL knockdown on the K_{ATP} independent/amplification pathway(s) of insulin secretion (B) was determined in cells incubated at 1 or 10 mM glucose in the presence or absence of 35 mM KCl with or without 0.25 mM diazoxide (Dz). Panel (C)

shows the differences in insulin release between 1 and 10 mM glucose from data shown in panel B. Means \pm SE of 9-15 separate determinations from 3 to 5 independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. scrambled ATGL for the same incubation condition; one way-ANOVA, Bonferroni post-hoc test.

FIGURE 6. ATGL^{-/-} mice are insulino-sensitive, glucose-normotolerant and have a defect in glucose and arginine stimulated-insulin secretion *in vivo*. A hyperglycaemic clamp was performed in overnight fasted male wild type (ATGL^{+/+}) and ATGL KO (ATGL^{-/-}) mice. (A) Glucose levels during the clamp. (B) Insulin levels during the clamp and (C) in response to an arginine (Arg) bolus (1 mmol/kg). (D) First phase insulin secretion in response to elevated glucose (Gluc) expressed as area under the curve (AUC) from 0 to 15 min. (E) Second phase insulin secretion (AUC) from 15 to 45 min. (F) M/I index of insulin sensitivity calculated by dividing the glucose infusion rate during the last 30 min of the clamp by circulating insulin levels during the same period. M/I index expressed as $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ glucose infusion per pmol/L insulin. Glycemia (G) and insulinemia (H) during an IPGTT in overnight fasted male ATGL^{+/+} and ATGL^{-/-} mice. Mean \pm SE of 9 and 5 animals per group for HGC and IPGTT, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. ATGL^{+/+} for the same time; two way-ANOVA, Bonferroni post-hoc test for panels A-C and G-H, and unpaired two-tailed Student's *t* test for panels D-F.

FIGURE 7. Isolated islets from ATGL^{-/-} mice show reduced insulin release in response to glucose, palmitate and KCl. (A), insulin secretion in islets isolated from overnight fasted male ATGL^{-/-} or ATGL^{+/+} mice incubated for 1 h in KRBH with 0.5% BSA at 2.8, 8.3 or 16.7 mM glucose in the presence or absence of 0.4 mM palmitate and at 2.8 mM glucose plus 35 mM KCl. Insulin release was normalized for the total islet insulin content shown in panel (C). (B) Protein content per islet and (D) insulin content corrected by the protein content per islet. Means \pm SE of 15-20 separate determinations from islets of 5 ATGL^{-/-} and 10 ATGL^{+/+} mice in 5 separate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. ATGL^{+/+} for the same incubation condition; unpaired two-tailed Student's *t* test.

FIGURE 8. Metabolic correlates of islets from ATGL^{+/+} and ATGL^{-/-} mice. (A) TG content in islets isolated from overnight fasted male mice. Means \pm SE of 13-14 separate determinations from islets of 8 ATGL^{-/-} and 11 ATGL^{+/+} mice. Glycerol release, an index of lipolysis, expressed per protein (B) or TG content (C). Means \pm SE of 18-20 separate determinations from islets of 9 ATGL^{-/-} and 15 ATGL^{+/+} mice in 4 separate experiments. Islets were incubated in KRBH at 2.8 or 16.7 mM with [9,10(n)-³H]-palmitate to assess FA esterification into TG (D), DAG (E) and PL (F), and FA oxidation (G). Means \pm SE of 12-14 separate determinations from islets of 4 ATGL^{-/-} and 4 ATGL^{+/+} mice in 3 different experiments for FA oxidation, and means \pm SE of 19-20 separate determinations from islets of 10 ATGL^{-/-} and 16 ATGL^{+/+} mice in 5 different experiments for FA esterification. Glucose utilization (H) and oxidation (I) were measured in islets incubated in KRBH at 2.8 or 16.7 mM glucose with D-[U-¹⁴C]-glucose and D-[5-³H]-glucose. Means \pm SE of 27-31 separate determinations from islets of 6 ATGL^{-/-} and 6 ATGL^{+/+} mice in 3 different experiments. **p<0.01, ***p<0.001 vs. ATGL^{+/+} for the same incubation condition; unpaired two-tailed Student's *t* test.

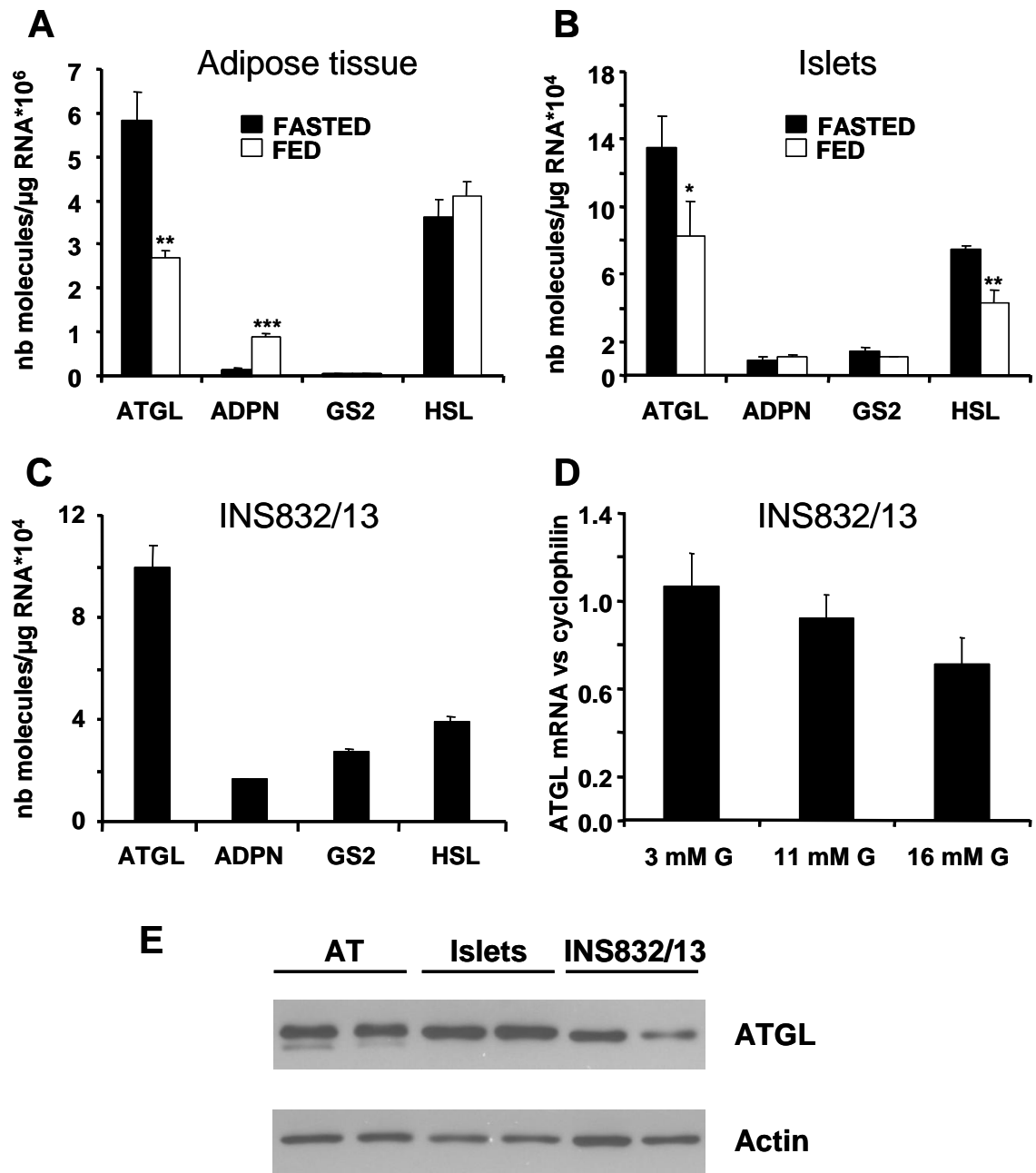


Figure 1 Peyot *et al.* JBC 2009

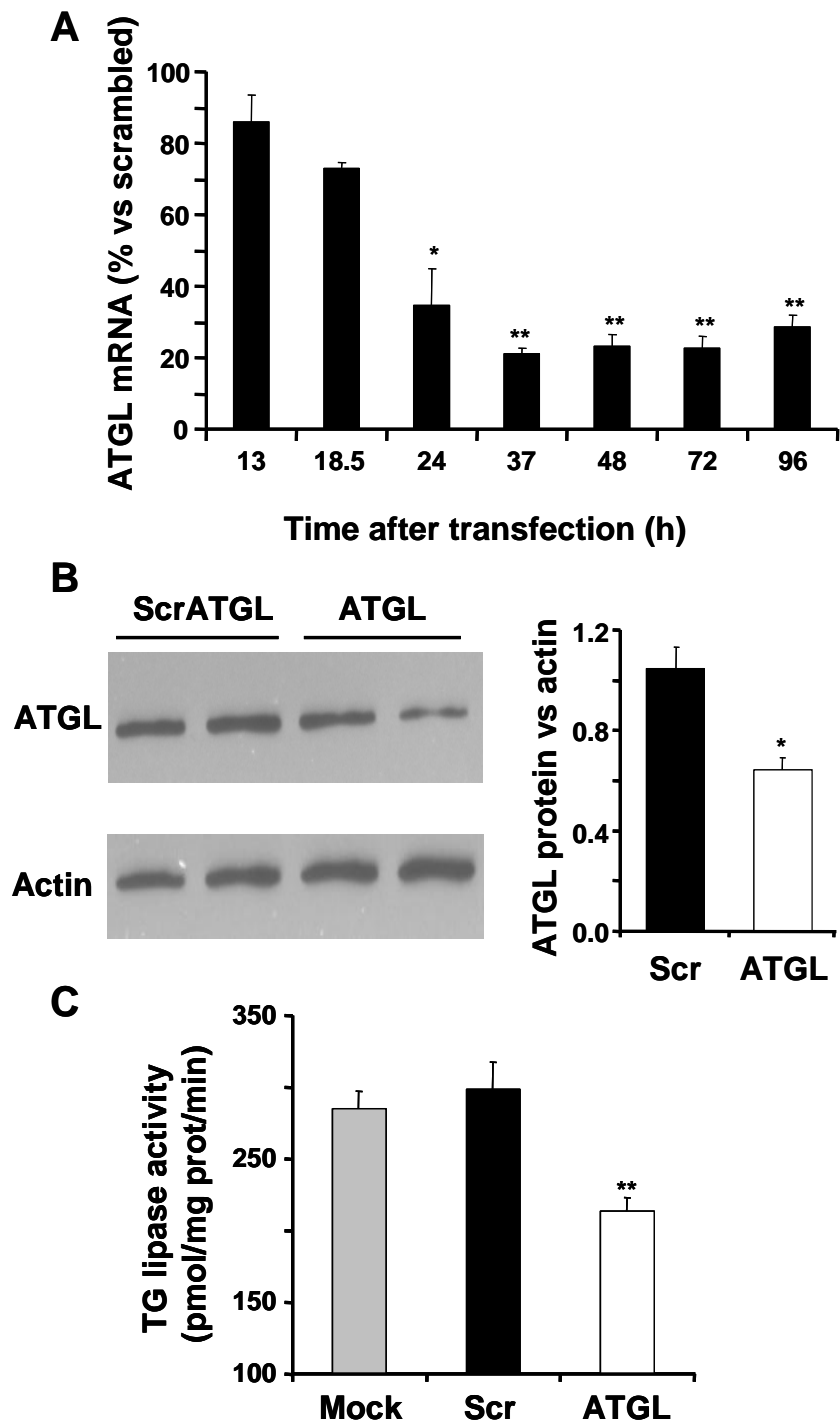


Figure 2 Peyot *et al.* JBC 2009

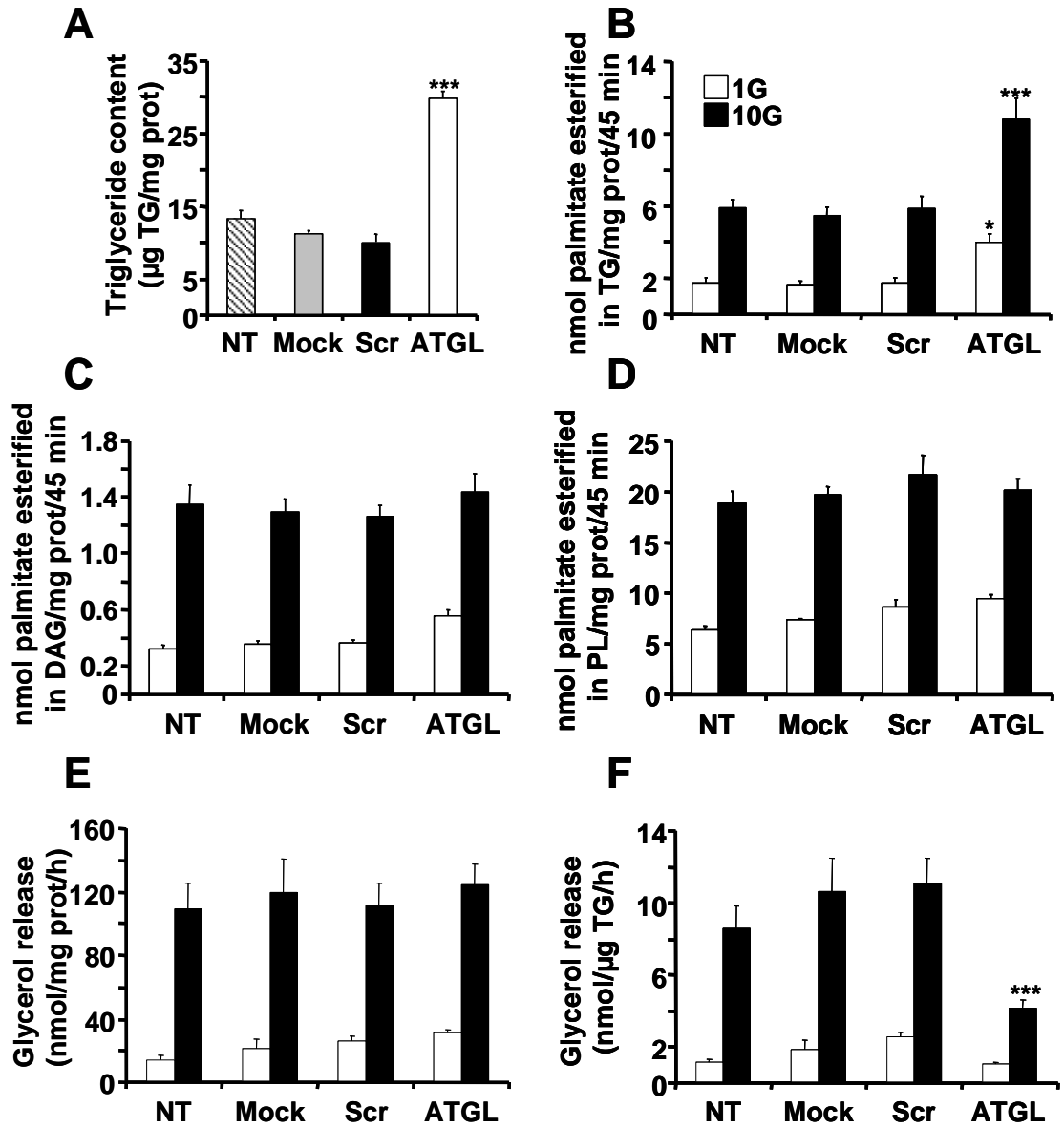


Figure 3 Peyot *et al.* JBC 2009

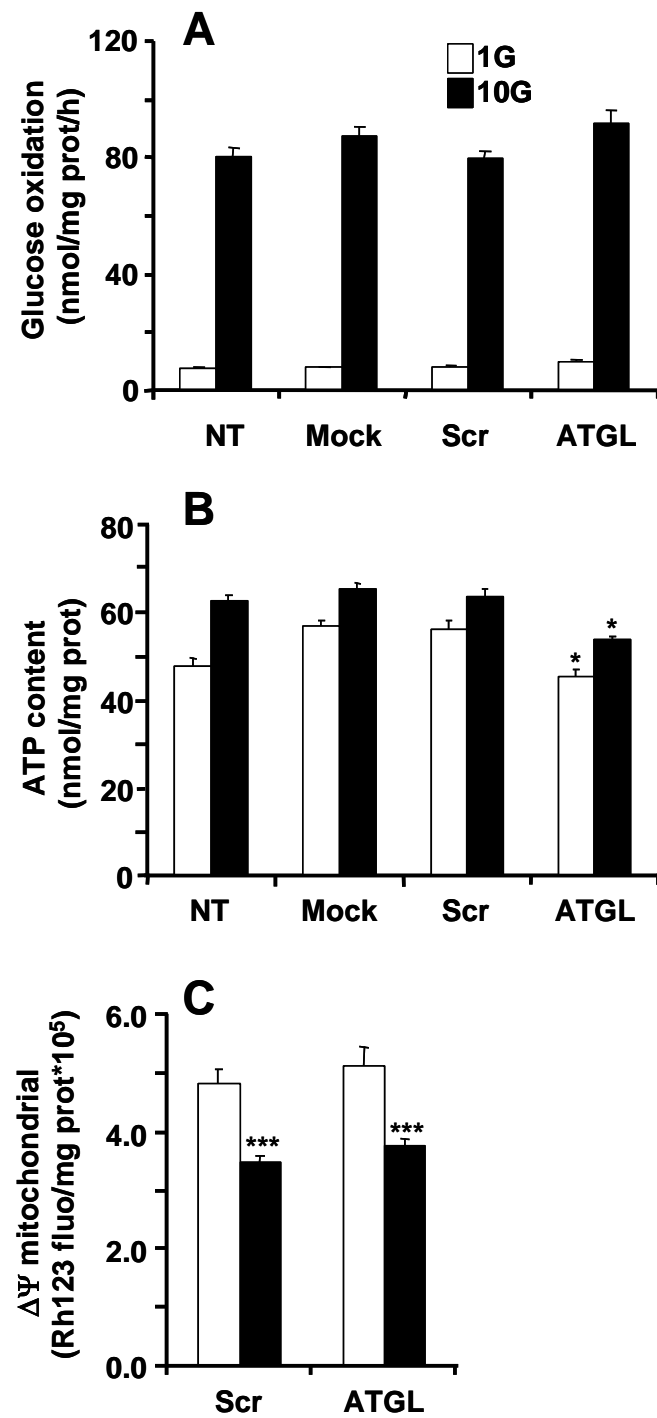


Figure 4 Peyot *et al.* JBC 2009

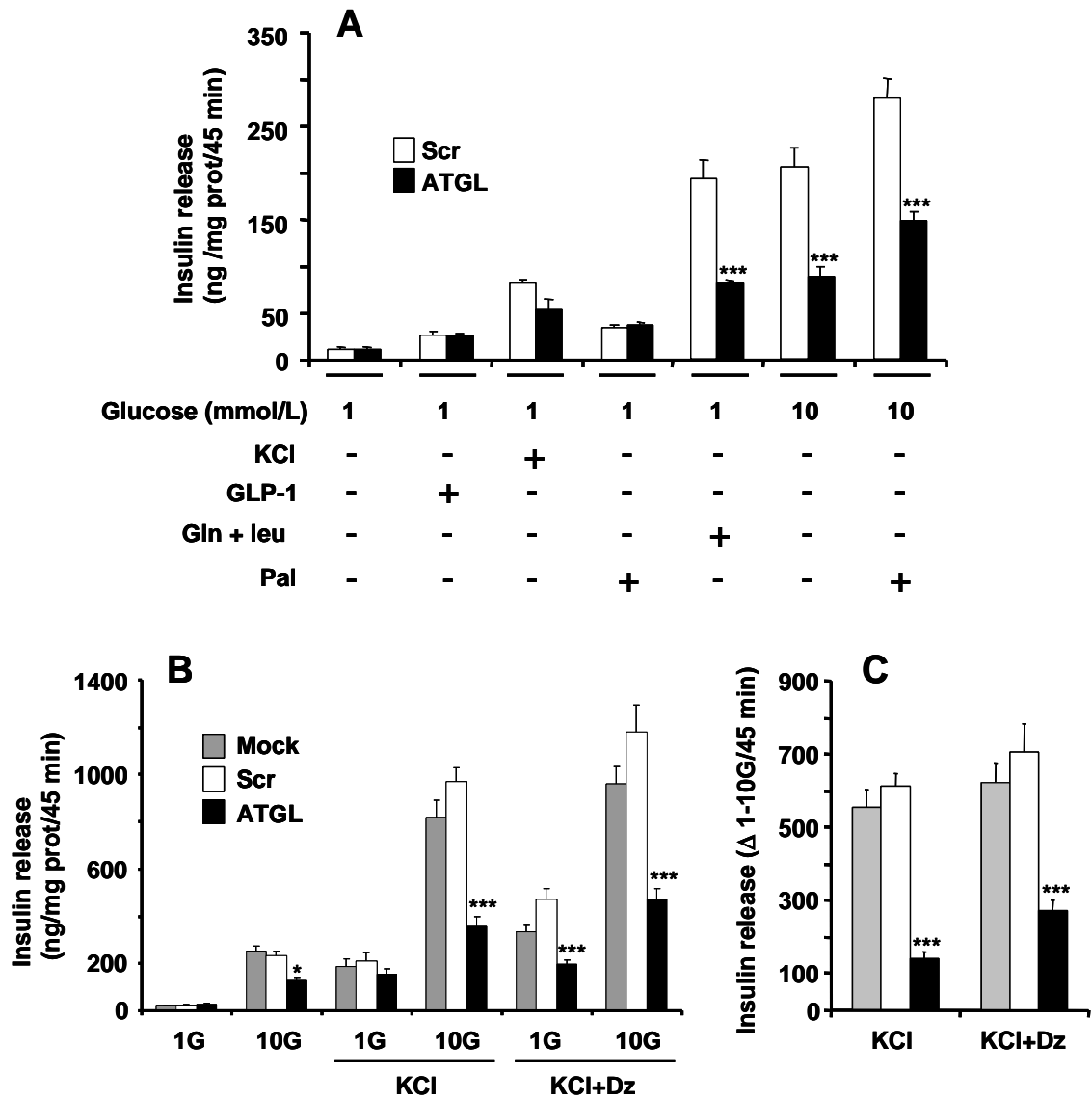


Figure 5 Peyot *et al.* JBC 2009

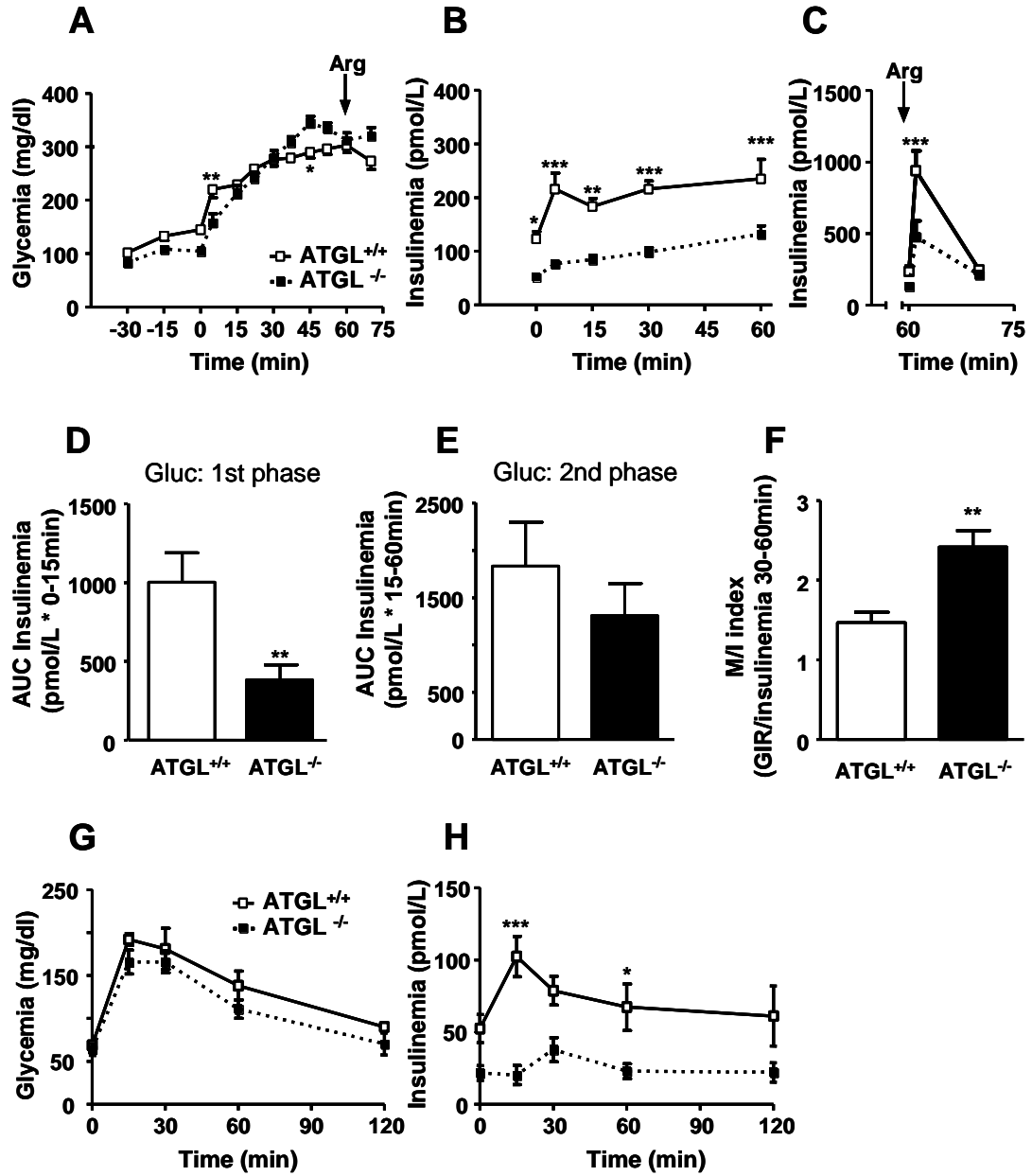


Figure 6 Peyot *et al.* JBC 2009

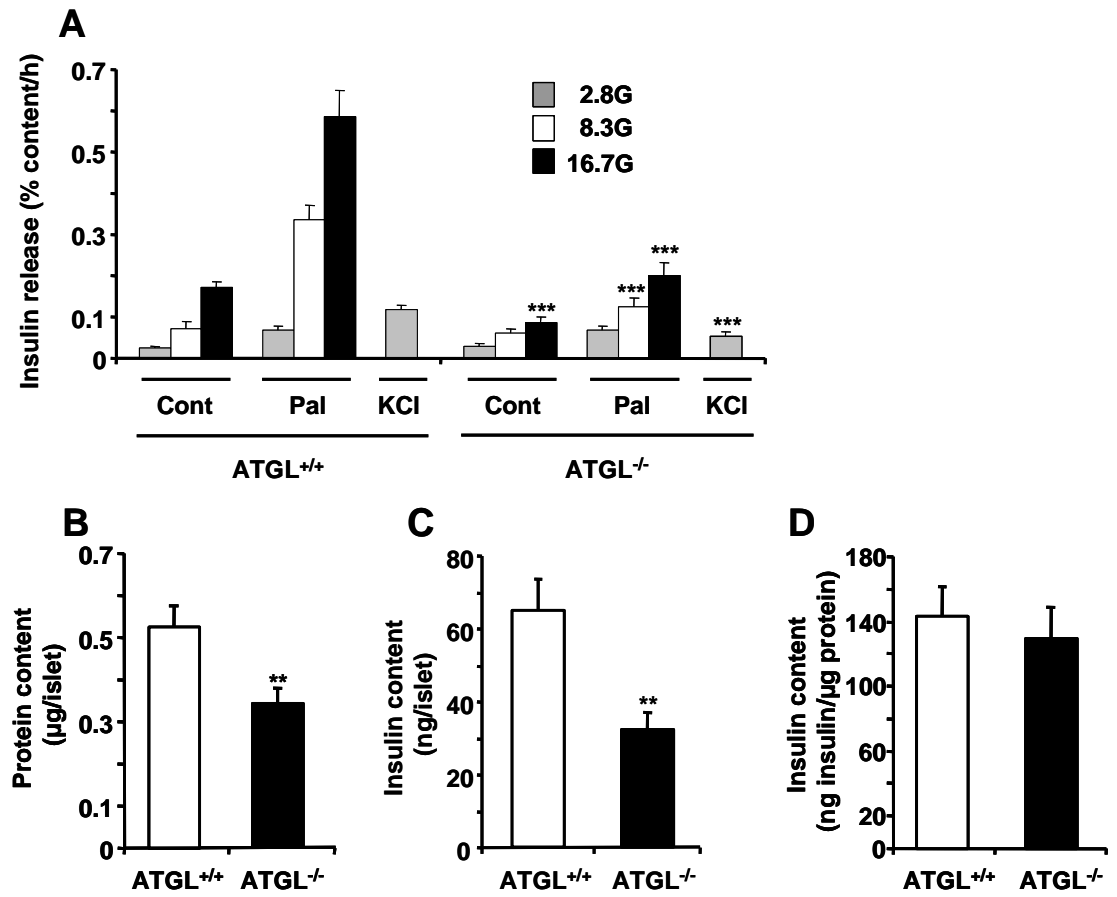


Figure 7 Peyot *et al.* JBC 2009

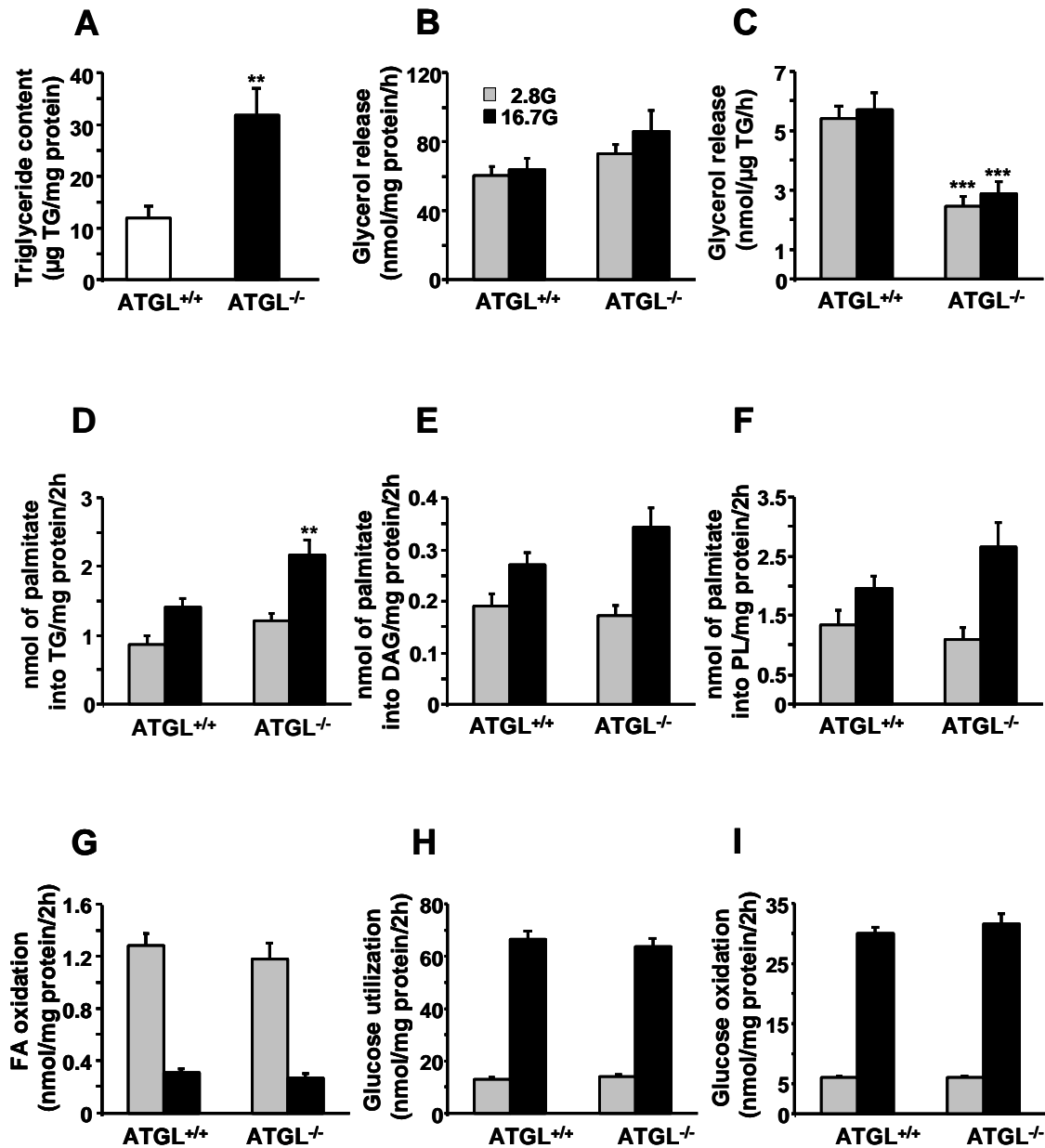


Figure 8 Peyot *et al.* JBC 2009

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

Retour sur les articles et intégration des résultats dans la littérature

La sécrétion de l'insuline en réponse au glucose par les cellules β pancréatiques est étroitement régulée afin de répondre au besoin de l'organisme. Un premier mécanisme, nommé voie de déclenchement, a été décrit dans la littérature afin de relier la production d'un facteur de couplage métabolique, l'ATP, par le métabolisme oxydatif du glucose à l'exocytose des vésicules d'insuline (Ashcroft *et al.* 1984; Aguilar-Bryan *et al.* 1995; Straub et Sharp 2002). Cependant, d'autres facteurs de couplage métabolique issus du métabolisme mitochondrial du glucose, tel que le malonyl-CoA (Prentki *et al.* 1992) et le NADPH (Ivarsson *et al.* 2005), ont été proposés comme régulateur de la sécrétion d'insuline. Les mécanismes reliant le métabolisme du glucose à la production de facteurs de couplage métabolique et à l'exocytose des vésicules d'insuline demeurent toutefois à être déterminés. L'objectif de la présente thèse de doctorat était de déterminer l'implication des navettes du pyruvate, découlant du métabolisme mitochondrial du glucose, dans la production de facteurs de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline.

Dans une première étude, nous nous sommes intéressés à l'importance de la navette pyruvate/citrate dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Guay *et al.* 2007). Cette hypothèse provenait d'une étude effectuée précédemment dans notre laboratoire (Farfari *et al.* 2000) suggérant la présence d'une navette pyruvate/citrate dans les cellules β pancréatiques. De plus, les prémisses conduisant à cette idée étaient bien fondées dans la littérature : une corrélation entre le cycle du pyruvate et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose avait été observée (Lu *et al.* 2002), le rôle du malonyl-CoA dans la régulation de la sécrétion d'insuline était connu (Prentki *et al.* 1992) et une corrélation entre le ratio NADPH/NADP⁺ et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose suggérait que le NADPH soit un facteur de couplage métabolique (Ivarsson *et al.* 2005).

La difficulté relative de ce projet résidait dans la disponibilité des outils pharmacologiques et de biologie moléculaire. En effet, peu d'inhibiteurs spécifiques aux enzymes reliées à l'anaplérose sont disponibles commercialement. L'hydroxy-citrate et le

radicol inhibent spécifiquement ACL. Cependant, l'hydroxy-citrate affecte le pH des solutions d'incubation conduisant ainsi à un effet non-spécifique sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Joseph *et al.* 2007). Nous avons donc décidé d'utiliser le radicol, un inhibiteur de ACL connu pour diminuer la sécrétion d'insuline en réponse au glucose dans les îlots pancréatiques de rat (Flamez *et al.* 2002). Aucun inhibiteur n'est cependant disponible pour diminuer spécifiquement l'activité enzymatique de l'isoforme cytosolique de la ME ou de l'IDH.

Afin de tester notre hypothèse, nous avons aussi utilisé un outil de la biologie moléculaire, les ARN interférant (RNAi). Au début de mon doctorat, la technologie des RNAi venait d'être commercialisée. Aucune étude n'avait cependant utilisé cette technologie dans notre modèle, les cellules INS 832/13. De plus, aucune compagnie n'offrait de RNAi validés contre nos enzymes cibles. J'ai donc, avec l'aide du Dr Joly, implanté cette technique dans notre laboratoire. Heureusement, cette période a coïncidé avec la mise en marché du Nucléofactor par la compagnie Amaxa. Cette nouvelle technique de transfection, basée sur le principe d'électroporation, permettait désormais de transférer les cellules INS 832/13 avec une efficacité de 85 à 90 %, comparativement à moins de 40% pour la méthode classique de la Lipofectamine. Nous avons pu ainsi combiner la technologie des RNAi avec celle du Nucleofactor afin de diminuer l'expression de nos enzymes d'intérêt.

Une fois les outils de biologie moléculaire au point, nous avons testé l'importance de la navette pyruvate/citrate dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'incubation des cellules INS 832/13 en présence d'inhibiteurs des transporteurs des acides di- ou tri-carboxyliques ou de ACL a conduit à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, la réduction de l'expression de ACL ou de la MEc par shRNA a corrélé avec une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, l'inhibition de trois étapes de la navette pyruvate/citrate, soit la sortie du citrate de la mitochondrie et l'activité des enzymes ACL et MEc, ont conduit à la réduction significative de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Les résultats obtenus dans

cette étude suggèrent que la navette pyruvate/citrate, de par la production du NADPH et du malonyl-CoA, est nécessaire à la régulation adéquate de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Durant cette période, d'autres groupes de recherche se sont aussi intéressés aux navettes du pyruvate découlant du métabolisme mitochondrial du glucose dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Deux études ont remis en question nos résultats démontrant l'importance de ACL dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Joseph *et al.* 2007; Macdonald *et al.* 2007). Dans une première étude, la diminution de l'expression et de l'activité de ACL par RNAi dans les cellules INS 832/13 et dans les îlots pancréatiques de rat n'a pas conduit à une diminution des niveaux d'insuline sécrétés en réponse au glucose (Joseph *et al.* 2007). Cependant, la mesure de la sécrétion d'insuline n'a été effectuée qu'à une concentration élevée en glucose alors que la diminution de la sécrétion d'insuline observée dans notre étude suite à l'inhibition de l'expression de ACL était principalement à une concentration intermédiaire de glucose. Cette différence est importante puisque en réponse à une concentration élevée en glucose, la sécrétion d'insuline est maximale et elle est régulée par différents mécanismes. L'inhibition d'une navette du pyruvate peut alors être compensée par d'autres voies métaboliques. L'utilisation d'une concentration intermédiaire en glucose, qui est stimulante mais non maximale, est donc plus adéquate afin de déterminer si une voie est impliquée dans la régulation de la sécrétion d'insuline. De plus, les résultats de l'étude de Joseph *et al.* (2007) n'ont pas été confirmés par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique comme le radicicol. Finalement, la condition contrôle non-infectée n'a pas été effectuée, empêchant ainsi de vérifier si l'infection des cellules INS 832/13 avec un adénovirus a affecté les mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Dans une deuxième étude, des clones stables de cellules INS 832/13 déficientes en ACL ont été sélectionnées. L'auteur de cette étude stipule que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'était pas affectée dans les clones déficients en ACL comparativement aux cellules contrôles, sans toutefois montrer les résultats (Macdonald *et al.* 2007). De plus,

l'utilisation de ce modèle est inappropriée pour l'étude du rôle de ACL dans la régulation de la sécrétion d'insuline. ACL est une enzyme importante pour la lipogenèse et la suppression de son expression affecte la croissance cellulaire (Bauer *et al.* 2005; Hatzivassiliou *et al.* 2005). Nous avons aussi observé que la réduction de l'expression de ACL dans les cellules INS 832/13 conduisait à une élévation de la mort cellulaire plus de 72 h après la transfection des cellules avec un shRNA dirigé contre ACL. Ainsi, la sélection d'un clone stable déficient en ACL est biaisée puisque le clone choisi a dû inévitablement s'adapter afin de survivre. Cette hypothèse a été confirmée dans une étude subséquente de ce groupe (Macdonald *et al.* 2008). Dans cette étude, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est pas affectée dans les cellules INS 832/13 déficientes en ACL puisque la sortie de l'acétoacétate de la mitochondrie compense pour la réduction du métabolisme du citrate. De plus, la sécrétion d'insuline en réponse à la combinaison de la leucine et de la glutamine, deux sécrétagogues qui activent le métabolisme mitochondrial, était diminuée significativement dans ce modèle. Ainsi, ACL semble jouer un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline et l'inhibition de son expression peut conduire à un mécanisme de compensation afin de préserver la fonctionnalité de la cellule β .

Le rôle de l'isoforme cytosolique de ME dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été confirmé dans les cellules INS 832/13 et MIN6 et dans les îlots de souris (Pongratz *et al.* 2007; Ronnebaum *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008b; Heart *et al.* 2009). De plus, une corrélation a été observée entre l'expression de MEc, le ratio de NADPH/ NADP⁺ et la sécrétion d'insuline. À noter, la diminution de l'expression de MEc dans les îlots de rat n'a pas affecté la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Ronnebaum *et al.* 2008). Cependant, l'absence de la mesure des niveaux de NADPH dans ces conditions empêche la remise en question de la corrélation entre l'expression de MEc, le ratio NADPH/NADP⁺ et la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. L'ensemble de ces études suggèrent que MEc est une composante importante des navettes pyruvate/malate et pyruvate/citrate impliquées dans la production du NADPH cytosolique nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Afin de poursuivre notre étude sur l'implication des navettes du pyruvate découlant du métabolisme mitochondrial du glucose dans la régulation de la sécrétion d'insuline, nous nous sommes intéressés au rôle de l'isoforme cytosolique de IDH dans ce processus. L'IDHc est l'enzyme clé de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate puisqu'elle conduit à la production du NADPH dans le cytoplasme des cellules β pancréatiques. À noter, dans les cellules β pancréatiques, le NADPH cytosolique est produit principalement par la MEc et l'IDHc puisque très peu de glucose est métabolisé à travers la voie des pentoses phosphates (Schuit *et al.* 1997). Puisque nous avons démontré l'implication de la MEc dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans notre première étude, nous voulions dans un deuxième temps déterminer si l'expression et l'activité de IDHc était aussi critique pour la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Dans notre deuxième étude, la réduction de l'expression et de l'activité de IDHc par deux différents siRNA (siIDHc) dans les cellules INS 832/13 a conduit à une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose par la voie d'amplification sans affecter les niveaux basaux de sécrétion, le contenu en insuline, la sécrétion d'insuline en réponse au KCl ni le métabolisme du glucose. Cette stimulation de la sécrétion d'insuline suite à une réduction de l'expression de IDHc a été confirmée dans les cellules dispersées d'îlots pancréatiques de rat. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous avons étudiés le métabolisme des acides gras dans notre modèle. Plus précisément, nous avons émis l'hypothèse que la diminution de l'activité de IDHc conduisait à une redirection du métabolisme de l'isocitrate à travers la navette pyruvate/citrate, dont l'importance pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose avait été démontrée dans notre première étude. En accordance avec cette hypothèse, la réduction de l'expression de IDHc a conduit à une augmentation de l'incorporation du glucose en acides gras. Ce processus reflète la synthèse des acides gras à partir du malonyl-CoA provenant du métabolisme du citrate et utilise le NADPH comme co-facteur. De plus, l'oxydation des acides gras à glucose intermédiaire était diminuée dans les cellules INS 832/13 transfectées avec un siIDHc. Les niveaux totaux du malonyl-CoA n'étaient cependant pas affectés dans ces conditions possiblement parce que les cellules réajustent leur niveau de malonyl-CoA selon leurs besoins, même si

le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate est augmenté. À noter, le malonyl-CoA régule la β -oxydation des acides gras en inhibant la CPT-1 (voir Introduction Section II B.2.1). Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus dans cette étude suggère que la diminution de l'activité de IDHc redirige le métabolisme de l'isocitrate à travers la navette pyruvate/citrate, entraînant ainsi une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette hypothèse demeure toutefois à être validée par l'analyse des flux métaboliques en réponse à une diminution de l'expression de IDHc. Finalement, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que IDHc possède une activité réverse qui transforme l' α -cétoglutarate en isocitrate (Des Rosiers *et al.* 1994; Comte *et al.* 2002). Si tel est le cas, IDHc pourrait être impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse à d'autres stimuli qui influencent aussi la sécrétion d'insuline en activant le métabolisme mitochondrial, tels que la combinaison de la glutamine et de la leucine. Bien que le rôle exact de IDHc demeure à être défini, nos travaux remettent cependant en question l'importance de IDHc et de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Nos travaux vont à l'encontre d'une étude précédente suggérant que la diminution de l'IDHc à l'aide d'un siRNA délivrés par adénovirus conduise à une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Ronnebaum *et al.* 2006). Pourtant, le modèle utilisé était le même, soit les cellules INS 832/13 et les îlots pancréatiques de rat, et la réduction de l'expression et de l'activité de IDHc était similaire dans ces deux études. L'obtention de résultats opposés est donc difficile à réconcilier. En fait, une différence majeure entre ces deux études est la technique utilisée afin d'introduire les siRNA dans les cellules β . Nous avons utilisé la technologie d'Amara afin de transfecter les cellules puisqu'elle n'a aucun effet détectable sur le contenu en insuline ni aucun effet non-spécifique sur la sécrétion d'insuline. À l'opposé, l'infection des cellules INS 832/13 à une dose infectieuse de 10 pfu (de l'anglais plaque-forming units) par cellule avec deux vecteurs contrôles différents a conduit par une altération sévère de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Le contenu en insuline n'était cependant pas affecté par l'infection des cellules INS 832/13, suggérant que la diminution de la sécrétion d'insuline en réponse

au glucose est due à une altération des mécanismes reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion de l'insuline. Pourtant, la dose infectieuse testée était 6 fois inférieure à celle utilisée par l'étude de Ronnebaum *et al.* (2006). À noter, l'infection des cellules INS 832/13 à une dose infectieuse de 60 pfu par cellule a conduit à une sévère toxicité cellulaire. À la lumière des effets non-spécifiques des adénovirus sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, nous avons préféré utiliser la technologie de transfection dans notre étude.

Dans la littérature, les isoformes NADP-dépendant mitochondrial et cytosolique de IDH sont connus pour leur rôle dans le contrôle de l'état d'oxydoréduction des cellules (Jo *et al.* 2001; Lee *et al.* 2002). De plus, la diminution de l'expression de IDHc a accru la susceptibilité de trois lignées cellulaires HeLa, HL-60 et NIH 3T3 au stress oxydatif et à l'apoptose (Kim et Park 2003; Kim *et al.* 2007; Lee *et al.* 2009). Il est ainsi possible que l'expression de IDHc dans les cellules β pancréatiques soit importante pour réguler l'état d'oxydoréduction plutôt que d'être impliqué dans la transduction des signaux métaboliques conduisant à la régulation de la sécrétion d'insuline.

Finalement, dans une étude complémentaire, nous nous sommes intéressés à l'importance de la lipolyse par ATGL dans la régulation de la sécrétion d'insuline (Peyot *et al.* 2009b). De fait, la navette pyruvate/citrate conduit à la production du malonyl-CoA dans le cytoplasme des cellules β pancréatiques. Le malonyl-CoA joue un rôle clé dans le contrôle du métabolisme des acides gras et conduit à la modulation de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose ainsi qu'aux acides gras (voir Introduction section III D.2) (Nolan *et al.* 2006b). Des études précédentes suggéraient que la lipolyse est un des mécanismes impliqués dans la modulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras (Mulder *et al.* 1999; Roduit *et al.* 2001; Peyot *et al.* 2004). Les résultats obtenus démontrent que ATGL est exprimé dans les cellules β pancréatiques et que son activité contribue significativement à la lipolyse. Une réduction de son expression dans les cellules INS 832/13 par RNAi ou son absence dans les îlots pancréatiques de souris déficientes en ATGL a conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au

glucose et au KCl en présence ou en absence d'acides gras. Ces résultats appuient l'hypothèse que la lipolyse est une composante importante de la régulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques.

En résumé, les résultats obtenus durant la présente thèse suggèrent que la navette pyruvate/citrate, découlant du métabolisme du glucose, est importante dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, la navette pyruvate/citrate permettrait de produire des facteurs de couplage métabolique, soit le malonyl-CoA et le NADPH, dans le cytosol afin de contrôler adéquatement la sécrétion d'insuline en fonction de la disponibilité du glucose. Nous avons aussi démontré que ATGL est une lipase exprimée dans les cellules β pancréatiques et que son activité est nécessaire au contrôle adéquat de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. Cependant, l'activité de IDHc, qui produit du NADPH cytosolique, ne semble pas impliquée dans la transduction des signaux métaboliques reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline. Nos travaux remettent aussi en question l'importance d'une navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate dans le couplage du métabolisme du glucose à la production de facteurs de couplage métabolique et à la régulation de la sécrétion d'insuline. Le rôle exact de IDHc dans la cellule β pancréatique demeure toutefois à être déterminé.

Les principales limitations de nos études

Afin de tester nos hypothèses, nous avons effectué nos travaux majoritairement dans la lignée cellulaire INS 832/13. Les cellules INS 832/13 sont connues pour sécréter adéquatement de l'insuline en réponse au glucose, au KCl, aux acides gras ainsi qu'à divers autres sécrétagogues (Hohmeier *et al.* 2000). Cette lignée cellulaire représente donc un choix judicieux pour étudier les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le principal désavantage de ce modèle est qu'il ne reflète pas nécessairement la physiologie *in vivo*. Nous avons donc confirmé l'effet de la diminution de IDHc sur la stimulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules isolées

d'îlots pancréatiques de rat. De plus, nous avons confirmé l'importance de ATGL dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans un modèle de souris déficiente en ATGL. Finalement, l'implication de l'activité de MEc dans la régulation de la sécrétion d'insuline a été confirmée par d'autres groupes et dans d'autres modèles, soit dans la lignée cellulaire MIN6 et dans les îlots de souris (Pongratz *et al.* 2007; Ronnebaum *et al.* 2008; Xu *et al.* 2008b; Heart *et al.* 2009). L'utilisation d'une lignée cellulaire nous a par contre permis d'obtenir un taux de transfection efficace et d'avoir le matériel biologique nécessaire à la réalisation des études du métabolisme du glucose et des acides gras. La majeure partie de nos travaux effectués dans les cellules INS 832/13 n'aurait pu être effectuée dans les îlots pancréatiques ou dans des modèles animaux *in vivo*. De plus, il est important de se rappeler que les îlots constituent une population cellulaire hétérogène comprenant environ 60 à 70 % de cellules β . Bien qu'imparfait, les lignées cellulaires représentent donc un modèle utile qui nous a permis d'avancer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras.

Une autre faiblesse de notre modèle est l'aspect « statique » de nos observations. Notre étude visait à déterminer les mécanismes reliant le métabolisme du glucose, le cycle du pyruvate et la sécrétion de l'insuline. Ces mécanismes impliquent donc l'analyse des flux métaboliques à travers les différentes voies découlant du métabolisme mitochondrial du glucose. Or, nous avons mesuré différents paramètres après un temps précis d'incubation, ce qui reflète l'effet global de notre traitement sur les différents aspects physiologiques des cellules β . Nous ne pouvions cependant pas déterminer directement quelle voie métabolique était réellement activée. Idéalement, nous aurions dû mesurer l'effet de l'inhibition des différentes étapes de la navette pyruvate/citrate ou de l'expression de IDHc sur les flux métaboliques découlant du métabolisme mitochondrial du glucose. L'expertise technique nécessaire à la réalisation de ce type d'étude n'est malheureusement pas au point dans notre laboratoire. Cette avenue est cependant suggérée comme perspective à ce projet.

Rôle de l'anaplérose et de la navette pyruvate/citrate dans les mécanismes de compensation des cellules β pancréatiques à la résistance à l'insuline par les tissus périphériques.

Dans notre premier article, nous avons suggéré que le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate était nécessaire à la régulation adéquate de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en condition physiologique homéostatique. Afin de poursuivre dans cette voie, il serait intéressant d'étudier l'implication du cycle du pyruvate, et plus précisément de la navette pyruvate/citrate, dans les mécanismes de compensation et/ou de décompensation des cellules β conduisant au développement du diabète. En fait, basées sur les données de la littérature (voir ci-dessous), nous pourrions émettre l'hypothèse que la navette pyruvate/citrate serait impliquée dans l'élévation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose observée chez les cellules β lorsqu'elles compensent pour la résistance à l'action de l'insuline des tissus périphériques et que ce mécanisme serait perdu lors de la phase de décompensation qui conduit au développement du diabète.

Durant la phase de compensation, les cellules β pancréatiques sécrètent des niveaux plus élevés d'insuline en réponse au glucose et à d'autres nutriments afin de compenser pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques. Le groupe du Dr Leahy s'est intéressé aux mécanismes découlant du métabolisme du glucose qui sont impliqués dans la phase de compensation des cellules β . Dans une première étude (Liu *et al.* 2002), ils ont comparé les îlots pancréatiques de rats Zucker Fatty (ZF) à ceux des rats contrôles Zucker Lean (ZL). Les rats ZF sont obèses, hyperlipidémiques et résistants à l'insuline. Cependant, ils sont normoglycémiques car leurs cellules β sécrètent trois fois plus d'insuline en réponse au glucose que celles des rats ZL. Fait intéressant, cet accroissement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose corrèle avec une élévation du métabolisme du glucose et une augmentation de l'activité enzymatique de la PC, alors que celle de la PDH est diminuée. De plus, l'inhibition de la PC par l'acide phénylacétique conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, suggérant un rôle important de l'anaplérose par la PC dans l'hypersécrétion des cellules β des rats ZF. Outre la PC,

d'autres composantes de la navette pyruvate/citrate sont augmentées en réponse au glucose dans les îlots de rats ZF, comme l'activité enzymatique de la malate déshydrogénase et celle de l'enzyme malique et les niveaux intracellulaires du citrate, de l'oxaloacétate, du malate et du pyruvate. L'activité enzymatique de ACL n'a malheureusement pas été mesurée dans ce modèle. Ainsi, la navette pyruvate/citrate représente une voie métabolique intéressante qui permettrait de relier l'augmentation du métabolisme du glucose à l'hypersécrétion d'insuline observée chez les rats ZF.

La corrélation entre l'augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et l'élévation des composantes de la navette pyruvate/citrate a été confirmée dans une deuxième étude (Liu *et al.* 2004). Cette fois, l'incubation d'îlots pancréatiques de rats à haut glucose pour 48 h a mené à une élévation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de plus de trois fois. Cette amplification de la sécrétion d'insuline corrèle avec une élévation de l'activité de l'enzyme malique ainsi que l'augmentation de la sortie du malate de la mitochondrie. Cependant, les activités enzymatiques de la PC et de la malate déshydrogénase n'étaient pas changées dans ce modèle.

Une troisième étude suggère que l'anaplérose soit aussi impliquée dans la phase proliférative des cellules β associée à l'adaptation des îlots pancréatiques à la résistance des tissus périphériques (Liu *et al.* 2005b). Ils ont cette fois utilisé le modèle de la pancréatectomie chez les rats Sprague-Dawley. Dans ce modèle, les rats sont normoglycémiques et normoinsulinémiques malgré que 60% du pancréas ait été enlevé. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est amplifiée en comparaison au groupe contrôle et corrèle avec une stimulation du métabolisme du glucose (Liu *et al.* 2000). Ils ont aussi observé que l'augmentation de la prolifération des cellules β chez les rats pancréatectomisés corrélait avec une élévation du flux métabolique à travers la PC (Liu *et al.* 2005b). Dans les îlots pancréatiques isolés de ces rats, les concentrations intracellulaires du citrate, de l'oxaloacétate, du malate et du pyruvate sont aussi accrues, suggérant que le cycle du pyruvate et la navette pyruvate/citrate pourrait être impliqués dans les mécanismes de compensation des cellules β .

Certains patients résistants à l'insuline ne développent pas le diabète puisque leurs cellules β pancréatiques continuent de compenser tout au cours de leur vie pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques. Cependant, chez d'autres individus, il arrive un moment où les cellules β ne sont plus capables de compenser et les premiers symptômes du diabète apparaissent (Prentki et Nolan 2006). Les mécanismes reliées à la perte de la capacité des cellules β pancréatiques à compenser sont peu connus mais impliquent une augmentation de l'apoptose et une diminution de la capacité sécrétoire des cellules β pancréatiques (Butler *et al.* 2003; Leahy 2005). Parmi les études effectuées sur le sujet, certaines données suggèrent que le flux métabolique à travers le cycle du pyruvate ainsi qu'à travers la navette pyruvate/citrate serait altéré. Dans une étude réalisée *in vitro*, les cellules INS 832/13 ont été exposées à des niveaux élevés d'acides gras pour 72 h (Boucher *et al.* 2004). Ces conditions d'incubation ont conduit à une stimulation de la sécrétion d'insuline à bas glucose, mais à une perte d'environ 50 % de la capacité de la cellule β à sécréter l'insuline en réponse au glucose. La mesure du flux métabolique à travers le cycle du pyruvate dans ces conditions a permis d'observer une corrélation entre la diminution de la sécrétion d'insuline et la perte de l'élévation du cycle du pyruvate en réponse au glucose. Fait intéressant, l'augmentation de la sécrétion d'insuline à bas glucose dans les cellules incubées en présence d'acides gras corrélait aussi avec une élévation du cycle du pyruvate. Finalement, l'ajout du diméthyl-malate, un précurseur du cycle de Krebs, aux cellules affectées par les acides gras a restauré partiellement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cette restauration de la sécrétion d'insuline a aussi été observée avec les îlots de rats diabétiques ZDF (Boucher *et al.* 2004). Ainsi, cette étude suggère que le défaut sécrétoire induit par une exposition prolongée aux acides gras est dû, au moins partiellement, à une réduction du flux métabolique à travers le cycle du pyruvate.

Le métabolisme du glucose semble aussi être impliqué dans les mécanismes de compensation chez des modèles d'animaux. Dans un modèle de pancréatectomie partielle de 60 %, les rats ZL demeurent normoglycémique et leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose n'est pas affectée. Un des mécanismes impliqués pourrait être l'augmentation du métabolisme du glucose (Delghingaro-Augusto *et al.* 2009). De leur côté, les rats ZF

pancréatectomisés à 60 % sont hyperglycémiques, hyperlipidémiques et ont un défaut dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, le métabolisme du glucose n'est pas augmenté comme c'est le cas pour les ZL. Les rats ZF sont un modèle de compensation à la résistance à l'insuline et leur métabolisme du glucose est déjà stimulé en comparaison aux rats ZL (Liu *et al.* 2002). La pancréatectomie partielle de 60 % des ZF conduit à une perte des mécanismes de compensation résultant par l'apparition progressive de l'hyperglycémie (Delghingaro-Augusto *et al.* 2009). Un de ces mécanismes pourrait impliquer le métabolisme du glucose de par le flux métabolique à travers l'anaplérose et la navette pyruvate/citrate puisque l'expression de la PC est réduite de près de 40 % dans ce modèle. Cependant, une étude plus approfondie du modèle ZF pancréatectomisé à 60 % est requise afin d'obtenir les données nécessaires à la validation de cette hypothèse.

Finalement, une étude publiée récemment s'est intéressée aux niveaux d'expression chez les patients diabétiques de type 2 de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme mitochondrial du glucose (MacDonald *et al.* 2009). Ainsi, l'analyse d'îlots pancréatiques de patient diabétiques a démontré une diminution de l'activité enzymatique de la PC et de ACL en comparaison à des donneurs non-diabétiques, alors que celle de ME n'était pas affectée et celle de IDH était augmentée de près de 2 fois, sans toutefois être statistiquement significatif. Pris dans leur ensemble, ces données suggèrent que le flux métabolique à travers la PC et ACL est affecté dans les cellules β des patients diabétiques. Cependant, un nombre plus important de donneurs ainsi qu'une étude plus approfondie du métabolisme du glucose et de la sécrétion d'insuline est nécessaire chez ces sujets afin de pouvoir soutenir l'hypothèse que le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate est altéré chez les patients diabétiques.

Pris dans leur ensemble, les données publiées dans la littérature suggèrent que le flux métabolique à travers le cycle du pyruvate, et fort probablement à travers la navette pyruvate/citrate, est augmenté dans la phase de compensation des cellules β pancréatiques pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques. Ce mécanisme semble altéré dans la phase de décompensation menant à l'apparition du diabète. Il en convient que plusieurs

études devront être effectuées dans divers modèles *in vivo* afin de pouvoir valider cette hypothèse. Par exemple, il serait important de déterminer le rôle des composantes de la navette pyruvate/citrate dans les mécanismes d'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose et de vérifier si l'expression et l'activité des enzymes PC, ACL, ME et IDH sont perturbées chez les patients résistants à l'insuline ou diabétiques.

Intégration des mécanismes pouvant relier la navette pyruvate/citrate, la production du NADPH et l'exocytose des vésicules d'insuline.

Lors de la présente thèse, nous nous sommes intéressés à l'identification des mécanismes découlant du métabolisme mitochondrial du glucose et conduisant à la génération des facteurs de couplage métabolique, nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline, dans le cytosol des cellules β pancréatiques. Nos travaux ont démontré que la navette pyruvate/citrate était un élément important de ce processus. De plus, la navette pyruvate/citrate est la seule navette du pyruvate à produire dans le cytoplasme deux facteurs de couplage métabolique, soit le NADPH et le malonyl-CoA. Alors que le mécanisme impliquant le malonyl-CoA soit, en majeure partie, bien décrit dans la littérature (voir Introduction Section III D.2), celui reliant le NADPH à l'exocytose des vésicules d'insuline demeurent à être déterminé.

Le NADPH est un co-facteur utilisé dans plusieurs processus de biosynthèse. Ainsi, la production du NADPH dans le cytosol serait liée à l'exocytose des vésicules d'insuline soit par une interaction directe du NADPH avec un des constituants du mécanisme d'exocytose des vésicules d'insuline et/ou par un lien indirect passant par l'activité d'une enzyme qui utilise le NADPH comme co-facteur. Parmi celles-ci, l'isoforme neuronal de la NOS (de l'anglais, nitric oxide synthase), la nNOS, et la glutarédoxine sont deux candidates intéressantes puisque leur activité est connue pour réguler la sécrétion de l'insuline.

La nNOS catalyse la transformation de l'arginine en citrulline. Cette réaction nécessite le transfert d'un électron provenant du NADPH au domaine réducteur de la nNOS et conduit à la production par le domaine oxydatif d'une faible quantité d'oxyde nitrique (NO) en plus de la citrulline (Zhou et Zhu 2009). NO, en faible concentration, est connu pour jouer un rôle important dans la régulation de divers processus biologiques tel que la vasodilatation et la sécrétion de neurotransmetteurs (Palmer *et al.* 1987; Kano *et al.* 1998). De plus, l'analyse phénotypique des souris déficientes en nNOS suggère que cette enzyme soit aussi impliquée dans l'homéostasie du glucose et plus particulièrement dans la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline (Shankar *et al.* 2000).

Dans les cellules β pancréatiques, la nNOS se localise principalement au niveau des granules de sécrétion. Une faible proportion de la nNOS a aussi été détectée dans les mitochondries et le noyau (Lajoix *et al.* 2001). Diverses études ont suggéré que l'activité de la nNOS est impliquée dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Akeson *et al.* 1999; Beffy *et al.* 2001; Lajoix *et al.* 2001; Lajoix *et al.* 2004; Gunawardana *et al.* 2006). De plus, PIN, la protéine inhibitrice endogène de nNOS, est exprimée dans les cellules β et son expression module la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, possiblement en interagissant avec un constituant de la machinerie d'exocytose des vésicules de sécrétion (Lajoix *et al.* 2006).

Le mécanisme par lequel l'activité de nNOS, et/ou la production de NO, affectent la sécrétion d'insuline demeure à être défini. Les résultats présentés dans les études décrites précédemment suggèrent cependant que l'activité de la nNOS régule négativement la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Nous avons aussi observé dans une étude pilote que l'incubation des cellules INS 832/13 en présence de différents inhibiteurs de la nNOS, soit le L-NAME, le 7-nitroindazole et le miconazole, induit une stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (voir Annexe 1). Cependant, la nNOS est une enzyme complexe, autant au point de vue de sa structure que de son activité. La nNOS fonctionne sous forme de dimère et elle est constituée de deux domaines distincts. Le domaine C-terminal de l'enzyme contient les sites de liaison du NADPH et des flavines FAD et FMN.

Le domaine N-terminal contient l'hème et les sites de liaison de l'arginine et du co-facteur tétrahydrobioptérine (BH₄) (Zhou et Zhu 2009). Ainsi, la nNOS renferme un domaine C-réductase qui accepte l'électron du NADPH et le transporte jusqu'à l'hème du domaine N-oxydase afin catalyser la transformation de l'arginine en citrulline. Cette capacité à transporter les électrons confère à la nNOS une activité cytochrome C réductase, en plus des activités arginase et NO synthétase (Klatt *et al.* 1992). Fait intéressant, l'activité cytochrome C réductase de la nNOS est stimulée lorsque son domaine catalytique est inhibée (Lajoix *et al.* 2001). Ces observations suggèrent que les inhibiteurs de la nNOS diminuent d'un côté la production de NO, mais de l'autre favorise le transfert des électrons du domaine réductase de la nNOS au cytochrome C. Ainsi, il est possible qu'un mécanisme, impliquant le transfert par le biais de la nNOS des électrons du NADPH à une protéine réceptrice située dans les vésicules de sécrétion, existe dans les cellules β pancréatiques afin de réguler la sécrétion d'insuline. Les études effectuées ne permettent pas pour le moment de connaître le mécanisme exact par lequel la nNOS régule la sécrétion d'insuline. Ce mécanisme résulte fort probablement d'un équilibre entre les activités arginase, NO synthétase et cytochrome C réductase de la nNOS.

Les groupes de Renström et Schuit se sont intéressés aux mécanismes reliant le NADPH à l'exocytose des vésicules d'insuline. Dans une première étude, ils ont confirmé la corrélation entre l'augmentation de la concentration en glucose, l'élévation du ratio NADPH/NADP⁺ et la stimulation de la sécrétion d'insuline (Ivarsson *et al.* 2005). Ils ont aussi identifié la thiorédoxine et la glutarédoxine comme cibles potentielles du NADPH et comme modulateur de la sécrétion d'insuline. La thiorédoxine et la glutarédoxine sont deux enzymes impliquées dans le contrôle de l'état d'oxydoréduction, communément appelé l'état redox, des cellules (Holmgren 1985). Leur activité requiert le transfert des électrons du NADPH afin de réduire les ponts disulfures des protéines cibles. Dans une deuxième étude (Reinbothe *et al.* 2009), la diminution de l'expression de la glutarédoxine par siRNA dans les cellules INS 832/13 et les îlots pancréatiques de rat a conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De plus, la surexpression de la glutarédoxine a stimulé l'exocytose des vésicules d'insuline. À l'opposé, la modulation des niveaux

d'expression de la thiorédoxine n'a pas affecté la sécrétion d'insuline en réponse au glucose suggérant que la glutarédoxine est l'enzyme clé reliant le métabolisme du glucose à la sécrétion d'insuline. Cette hypothèse a été confirmée par une approche complémentaire. En effet, la diminution de l'expression de la glutarédoxine a inhibé la stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse à une micro-injection de NADPH. Ces deux études suggèrent donc que le métabolisme du glucose dans les cellules β pancréatiques conduit à l'élévation des niveaux de NADPH. La stimulation de l'exocytose des vésicules d'insuline qui s'ensuit serait régulée par l'activité de la glutarédoxine.

Finalement, il est aussi possible que le NADPH agisse plus directement sur les mécanismes d'exocytose des vésicules d'insuline. Dans le mécanisme de déclenchement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, la liaison de l'ATP aux canaux K_{ATP} -dépendant induit la dépolarisation de la membrane plasmique (Tarasov *et al.* 2004) conduisant ainsi à l'exocytose des vésicules d'insuline. La repolarisation de la membrane plasmique qui s'ensuit est régulée par l'activité des canaux potassiques dépendant au voltage (canaux K_v) (MacDonald et Wheeler 2003). Les canaux K_v sont composés de deux types de sous-unités. Les sous-unités α forment un pore dans la membrane et les sous-unités β régulent l'activité des canaux K_v . Faits intéressants, les sous-unités β renferment des motifs oxydoréductase permettant la liaison du NADPH (Gulbis *et al.* 1999; Chouinard *et al.* 2000). Une corrélation a été observée entre le taux d'inactivation des canaux K_v et le ratio $NADPH/NADP^+$ (MacDonald *et al.* 2003b). Ces études suggèrent donc que l'augmentation du ratio $NADPH/NADP^+$ en réponse au glucose favorise l'inactivation des canaux K_v conduisant ainsi au prolongement de la phase de repolarisation de la membrane plasmique et de ce fait, à l'augmentation de la sécrétion d'insuline.

En résumé, la nNOS, la glutarédoxine et les canaux K_v représentent trois mécanismes par lesquels le NADPH pourrait agir afin de stimuler l'exocytose des vésicules d'insuline en réponse à une élévation du métabolisme du glucose à travers la navette pyruvate/citrate.

Implication de la navette pyruvate/citrate dans la régulation du métabolisme cellulaire de la cellule β pancréatique.

Les travaux présentés dans cette thèse suggèrent que la navette pyruvate/citrate fait partie intégrante des mécanismes de régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Cependant, la navette pyruvate/citrate pourrait aussi être impliquée dans la régulation de différents processus cellulaires, comme par exemple la communication inter-mitochondriale et/ou la synchronisation du métabolisme du glucose.

Afin de simplifier la compréhension de notre modèle, nous avons représenté la navette pyruvate/citrate à l'intérieur d'une seule mitochondrie (voir Figure 6, de Article 1). Or, la sortie du citrate d'une mitochondrie conduit à la production du pyruvate dans le cytoplasme. Il est logique de penser que cette molécule de pyruvate puisse entrer dans une autre mitochondrie afin d'être métabolisée. En effet, les mitochondries sont organisées dans les cellules β pancréatiques sous la forme d'un réseau. Cette organisation est nécessaire à la stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Bindokas *et al.* 2003; Noske *et al.* 2008; Park *et al.* 2008). Ainsi, le cycle de la sortie du citrate d'une mitochondrie, de la production du pyruvate dans le cytoplasme et de l'entrée du pyruvate dans une autre mitochondrie permettrait la communication entre celles-ci afin de diffuser le signal provenant du métabolisme du glucose et devant conduire à une élévation de la sécrétion d'insuline. Bien que cette idée soit hypothétique, la navette pyruvate /citrate pourrait servir de lien entre les mitochondries et favoriser l'activation et la coordination de leur métabolisme.

La navette pyruvate/citrate pourrait aussi être impliquée dans la synchronisation du métabolisme du glucose à l'intérieur de la cellule β et entre les cellules β pancréatiques. Dans les cellules β pancréatiques, le phénomène d'oscillation a été observé pour différentes composantes du mécanisme de déclenchement de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, notamment la glycolyse, le ratio ATP/ADP, l'activité électrique de la membrane plasmique et les niveaux intracellulaire en Ca^{2+} (Corkey *et al.* 1988; Nilsson *et al.* 1996; Deeney *et al.* 2001; Gilon *et al.* 2002). Ces oscillations corrèlent avec la nature pulsatrice

de la sécrétion d'insuline. Bien que le rôle exact de ce modèle d'oscillation demeure à être déterminé, l'oscillation des niveaux d'insuline dans le sang serait bénéfique pour son mécanisme d'action sur les tissus périphériques (Bertram *et al.* 2007). Or, l'oscillation des niveaux de citrate a aussi été observée dans les cellules β pancréatiques en réponse à une augmentation de la concentration en glucose (MacDonald *et al.* 2003a). De plus, le patron d'oscillation du citrate coïncidait avec celui du NAD(P) et est légèrement décalé avec celui de l'ATP suggérant que ces phénomènes sont interreliés. Finalement, le citrate est un inhibiteur important de la phosphofructokinase, l'enzyme responsable de l'oscillation de la glycolyse (Yaney *et al.* 1995; Tornheim 1997). Ces données de la littérature suggèrent donc que le citrate serait impliqué dans la synchronisation du métabolisme du glucose par la glycolyse et à celui du pyruvate dans le cycle de Krebs. La navette pyruvate/citrate serait donc impliquée dans la synchronisation cellulaire du métabolisme du glucose. Enfin, la sortie du citrate des cellules β en réponse au glucose a été observée dans les cellules INS1 (Farfari *et al.* 2000). L'extrapolation de ces résultats laisse présager que le citrate pourrait aussi permettre la synchronisation des cellules β à l'intérieur d'un même îlot ou même entre différents îlots pancréatiques afin de réguler adéquatement la sécrétion d'insuline en réponse à une augmentation de la glycémie.

Extrapolation des résultats : Est-ce que la navette pyruvate/citrate pourrait être impliquée dans la régulation de divers processus biologiques dans différents tissus?

L'anaplérose est un processus métabolique présent dans de nombreux types cellulaires afin de réguler certaines réactions de biosynthèse comme la gluconéogenèse dans le foie, la lipogenèse dans le tissu adipeux et la synthèse du glutamate, un neurotransmetteur, dans les neurones. Bien que le rôle de la pyruvate carboxylase ait été étudié dans plusieurs processus anaplérotiques (voir la revue de (Jitrapakdee *et al.* 2006)), le phénomène du cycle du pyruvate n'a fait l'objet que de très peu d'attention. Certaines données de la littérature suggèrent cependant que la navette pyruvate/citrate pourrait opérer dans certains types cellulaires.

Dans le foie, l'anaplérose est relié principalement à la régulation de la néoglucogénèse et donc au contrôle de la production de glucose hépatique (Large et Beylot 1999). Certaines données de la littérature suggèrent cependant que l'anaplérose, et plus précisément le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate, serait aussi importante pour la régulation du métabolisme des acides gras. Tout d'abord, le citrate et le malate sont les deux métabolites les plus exportés des mitochondries hépatiques en réponse au pyruvate. À l'opposé, l'isocitrate et l' α -cétooglutarate ne sont que peu exportés (MacDonald 2004). De plus, une récente étude a démontré l'implication de ACL dans la régulation du métabolisme des acides gras dans les hépatocytes (Wang *et al.* 2009). En effet, la diminution de l'expression de ACL spécifiquement dans le foie des souris db/db a conduit à une réduction significative du contenu des hépatocytes en acétyl-CoA et en malonyl-CoA ainsi qu'une diminution importante de la lipogénèse. Finalement, l'expression de l'enzyme malique est modulée dans les cellules hépatiques en réponse aux nutriments et aux hormones, suggérant que cette enzyme est impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique (Hillgartner *et al.* 1995). Ainsi, le NADPH produit par l'enzyme malique pourrait contribuer à la synthèse *de novo* des acides gras dans les cellules hépatiques, bien que le NADPH soit majoritairement produit par la voie des pentoses phosphates dans ce type cellulaire (Rognstad et Katz 1979). Pris dans leur ensemble, ces données de la littérature suggèrent la présence d'une navette pyruvate/citrate dans le cytoplasme des cellules hépatiques. Le rôle de la navette pyruvate/citrate dans le foie serait de produire du malonyl-CoA pour à la fois favoriser la lipogénèse ainsi que pour réguler le métabolisme des lipides en fonction de l'état nutritionnel de l'organisme.

Tout comme pour le foie, le rôle d'une navette pyruvate/citrate dans les adipocytes serait principalement relié au contrôle du métabolisme des acides gras. En effet, la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes requiert l'expression de gènes spécifiquement impliqués dans la régulation de la synthèse *de novo* des acides gras, de leur transport et de leur métabolisme à travers les réactions d'estérification. Or, diverses études ont corrélé l'augmentation de l'expression et de l'activité enzymatique de la PC, de ACL et de ME à la différenciation des adipocytes (résumé dans (Jitrapakdee *et al.* 2006). De plus,

l'échange du citrate et du malate entre la mitochondrie et le cytoplasme est nécessaire à l'accumulation des acides gras dans les adipocytes (Kajimoto *et al.* 2005; Mizuarai *et al.* 2005). L'ensemble de ces études suggère donc un rôle pour la navette pyruvate/citrate dans la synthèse des acides gras associée à la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. En fait, la présence de la navette pyruvate/citrate dans les adipocytes avait été proposée il y a de nombreuses années (Ballard et Hanson 1967) sans toutefois avoir été confirmée à ce jour.

De son côté, le processus d'anaplérose dans le cerveau semble relié à la production de neurotransmetteur. Tout d'abord, l'expression de la PC a été observée dans différents types cellulaires du cerveau (Murin *et al.* 2009). Dans les astrocytes, l'anaplérose à travers la PC est nécessaire à la production du glutamate, un important neurotransmetteur sécrété par les neurones (Gamberino *et al.* 1997; Sibson *et al.* 2001; Lebon *et al.* 2002). Ce mécanisme n'implique toutefois pas la navette pyruvate/citrate. Cette dernière pourrait cependant jouer un rôle dans la régulation de la synthèse de l'acétylcholine. L'acétylcholine est un neurotransmetteur impliqué autant dans le système nerveux central que celui périphérique. Son action est médiée à travers les récepteurs muscariniques et nicotiniques. L'acétylcholine est synthétisée dans le cytoplasme des neurones pré-synaptiques cholinergiques à partir de la choline et de l'acétyl-CoA dans une réaction catalysée par la choline acyltransférase. Fait intéressant, l'expression de ACL a été observée dans la terminaison nerveuse cholinergique (Szutowicz et Lysiak 1980) et le citrate, provenant du métabolisme du pyruvate, serait impliqué dans la synthèse de l'acétylcholine (Sterling et O'Neill 1978; Szutowicz *et al.* 1982). Des études plus approfondies seront cependant nécessaires afin de déterminer la présence de la navette pyruvate/citrate et son rôle possible dans la régulation de la synthèse de l'acétylcholine.

Ainsi, outre dans les cellules β pancréatiques, le cycle du pyruvate, et plus particulièrement de la navette pyruvate/citrate, semble opérationnel dans d'autres types cellulaires afin de contrôler différents processus biologiques comme la régulation du métabolisme des acides gras dans le foie et le tissu adipeux et la production de

l'acétylcholine dans le cerveau. Il est aussi important de rappeler que le malonyl-CoA, découlant de la production de l'acétyl-CoA par ACL, est reconnu pour son rôle critique dans la régulation du métabolisme des acides gras dans divers tissus de l'organisme (Ruderman et Prentki 2004; Saggerson 2008). Finalement, ACL joue aussi un rôle important dans les cellules cancéreuses afin d'assurer la production de l'acétyl-CoA nécessaire à la synthèse *de novo* des acides gras, un processus indispensable à la prolifération des cellules cancéreuses (Swinnen *et al.* 2006).

Est-ce que le cycle du pyruvate, et plus précisément la navette pyruvate/citrate, pourrait être une cible pharmacologique

Le but ultime de la recherche sur le diabète est d'en comprendre les différents aspects physiopathologiques afin de prévenir son développement et/ou de découvrir les traitements nécessaires à sa guérison. Il existe présentement sur le marché pharmaceutique différents médicaments aidant les patients atteints du diabète de type 2 à réguler leur glycémie sanguine. Parmi ceux-ci, deux grandes classes de médicaments sont présentement offerts afin de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques : les sulfonylurées et les analogues du GLP-1. Les sulfonylurées induisent la sécrétion d'insuline en activant la fermeture des canaux K_{ATP} -dépendant suite à leur liaison à la sous-unité Sur1. La dépolarisation de la membrane plasmique qui s'ensuit induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant et l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium nécessaire à l'exocytose des vésicules d'insuline (Proks *et al.* 2002).

De son côté, le GLP-1 est une hormone sécrétée par le tractus intestinal suite à la prise alimentaire qui exerce son action en se liant à son récepteur, exprimé notamment dans les cellules β pancréatiques. Les analogues du GLP-1 ont divers effets bénéfiques sur les cellules β conduisant à une augmentation de la fonction sécrétoire ainsi que la préservation de la masse cellulaire. Cette classe de médicament comprend aussi les inhibiteurs de DDP-4

(de l'anglais dipeptidyl peptidase 4), l'enzyme dégradant le GLP-1 (Drucker et Nauck 2006).

Malgré les médicaments offerts aux patients diabétiques, le diabète demeure à ce jour une maladie incurable. Il est donc intéressant de s'interroger sur l'implication possible des navettes du pyruvate, et plus précisément de la navette pyruvate/citrate, dans le traitement du diabète. Nous avons démontré dans la présente thèse que la navette pyruvate/citrate était importante pour la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Guay *et al.* 2007). De plus, certaines données de la littérature suggèrent que cette navette du pyruvate pourrait être impliquée dans les mécanismes d'hypersécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques afin de compenser pour la résistance des tissus périphériques (Liu *et al.* 2002). Cette activation de la navette pyruvate/citrate serait cependant perdue chez les patients diabétiques (MacDonald *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la navette pyruvate/citrate chez les patients diabétiques de type 2 pourrait favoriser la préservation de la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ainsi, en théorie, l'activité de ACL et/ou de ME pourrait être une cible pharmaceutique.

En pratique, l'activation du flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate est complexe puisque nous ne connaissons pas l'élément limitant de cette navette. Ainsi, la stimulation de l'activité enzymatique de ACL ou de ME ne corrèlera pas nécessairement avec l'élévation de la production du NADPH ou du malonyl-CoA, les facteurs de couplage métabolique nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline. De plus, chez les patients diabétiques, l'intégrité fonctionnelle des mitochondries est affectée dans les tissus périphériques (Lowell et Shulman 2005). Il en est fort probablement de même pour les cellules β pancréatiques (Maechler et Wollheim 2001). Ainsi, le développement d'une stratégie thérapeutique afin d'activer la navette pyruvate/citrate pourrait ne pas être suffisante à la restauration de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez les patients diabétiques.

Par contre, la poursuite des recherches sur les mécanismes reliant la production de facteurs de couplage métabolique à l'exocytose des vésicules d'insuline permettra de découvrir de nouvelles cibles pharmacologiques. Par exemple, le NADPH semble induire la sécrétion d'insuline en stimulant l'activité enzymatique de la nNOS ou/et de la glutarédoxine. L'étude du rôle de la nNOS et de la glutarédoxine dans la sécrétion d'insuline permettra de comprendre comment ces protéines régulent les composantes de l'exocytose et conduira ainsi à l'identification de cibles pharmaceutiques potentielles.

La continuation de la recherche sur les mécanismes reliant la production de facteurs de couplage métabolique par la navette pyruvate/citrate à l'exocytose des vésicules d'insuline est donc nécessaire afin de pouvoir identifier de nouvelles cibles pharmacologiques conduisant au traitement du diabète. Idéalement, les traitements à développer se devraient d'être complémentaires à ceux offerts présentement sur le marché, soit les sulfonylurées et les analogues du GLP-1.

Conclusion

En conclusion, les études présentées dans cette thèse suggèrent que la navette pyruvate/citrate est importante pour la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le flux métabolique à travers la navette pyruvate/citrate conduit à la production dans le cytoplasme de deux facteurs de couplage métabolique, le NADPH et le malonyl-CoA. Les mécanismes reliant le NADPH à la sécrétion d'insuline demeurent à être déterminés, mais ils pourraient inclure l'activité de la nNOS et/ou de la glutarédoxine ainsi que l'inhibition des canaux K_v . De son côté, le mécanisme de régulation de la sécrétion d'insuline par le malonyl-CoA a été précédemment décrit dans la littérature. Le malonyl-CoA, issu du la navette pyruvate/citrate, est un régulateur important du métabolisme des acides gras. L'augmentation de niveaux de malonyl-CoA en réponse au glucose conduit à la production de molécules lipidiques, notamment à travers la lipolyse par ATGL, nécessaires à la régulation de la sécrétion d'insuline. Cependant, les résultats obtenus remettent en question la nécessité de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate dans la régulation de

la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le rôle exact de IDHc dans ce processus demeure toutefois à être déterminé.

Perspectives

Lors de la présente thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication des navettes du pyruvate, découlant du métabolisme du glucose, dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Nous avons démontré un rôle pour la navette pyruvate/citrate dans ce processus, mais remis en question l'importance de la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate. De nombreuses avenues sont à considérer pour la continuation de ce projet. Nos travaux ont permis de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées dans la génération du NADPH et du malonyl-CoA, deux facteurs de couplage métabolique, en réponse au glucose. Cependant, les mécanismes reliant l'élévation du NADPH en réponse au glucose à la régulation de l'exocytose des vésicules d'insuline demeurent à être caractérisés. De son côté, la régulation de la sécrétion d'insuline par le malonyl-CoA implique une redirection du métabolisme des acides gras vers le cycle triglycéride/acides gras libre. D'autres travaux sont nécessaires pour identifier précisément quelles sont les molécules lipidiques signalétiques impliquées dans la régulation de l'exocytose des vésicules d'insuline et par quels mécanismes.

La suite logique de nos travaux est cependant de poursuivre l'étude de l'implication des flux métaboliques à travers les navettes du pyruvate dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Dans une première étude, nous suggérons de déterminer quels sont les flux métaboliques, reliés au métabolisme mitochondrial du glucose, qui sont activés dans les cellules β pancréatiques en réponse à une élévation du glucose. Dans une deuxième étude, nous nous intéressons au rôle de la navette pyruvate/citrate dans les mécanismes de compensation des cellules β pancréatiques à la résistance à l'insuline des tissus périphériques qui conduisent à une hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose.

Projet #1 : Identification à l'aide du marquage à l'isotope stable carbone 13 des flux métaboliques dans les cellules β pancréatiques : détermination de l'importance relative de chacune des navettes du pyruvate.

Nos travaux ainsi que ceux de d'autres groupes de recherche ont permis de suggérer la présence de trois navettes du pyruvate dans les cellules β pancréatiques (MacDonald 1995; Ronnebaum *et al.* 2006; Guay *et al.* 2007; Pongratz *et al.* 2007). Ces navettes découlant du métabolisme mitochondrial du glucose seraient importantes afin de produire dans le cytoplasme des facteurs de couplage métabolique régulant la sécrétion d'insuline. Les études effectuées sur le sujet ont testé l'importance de diverses composantes de ces navettes dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Cependant, aucune étude n'a démontré que le flux métabolique à travers l'une de ces navettes était augmenté en réponse au glucose ou n'en a corrélé une diminution à la réduction de la sécrétion d'insuline. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion d'insuline, il est nécessaire d'identifier les flux métaboliques activés en réponse au glucose.

Dans une étude précédente des groupes des laboratoires des Drs Schuit et Prentki, l'utilisation de traceurs radioactifs du glucose nous a permis de déterminer que la quasi-totalité du glucose qui entre dans les cellules β est oxydé à travers la glycolyse et le cycle de Krebs (Schuit *et al.* 1997). Très peu de glucose est donc métabolisé à travers le cycle des pentoses phosphates et très peu de pyruvate est converti en lactate. De plus, cette approche a permis d'estimer que 40% du pyruvate produit en réponse au glucose entre dans le cycle de Krebs via la PC. Ainsi, le flux métabolique reliant l'entrée du glucose dans la glycolyse à l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs est connu dans les cellules β pancréatiques. Cependant, le flux métabolique reliant la sortie des intermédiaires du cycle de Krebs (cataplérose) à la production de facteurs de couplage métabolique par les navettes du pyruvate demeure à être identifié.

Afin de réaliser notre étude, les cellules INS 832/13 seront incubées en présence de substrats marqués à l'isotope stable carbone 13 (^{13}C), par exemple le $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose.

L'enrichissement en ^{13}C des atomes de carbone des différents intermédiaires du cycle de Krebs et des composantes des navettes du pyruvate sera ensuite mesuré par un chromatogramme en phase gazeuse couplé à un spectre de masse (GC/MS) et comparé à leur abondance naturel (i.e. sans marquage au ^{13}C). Cette approche a été utilisée dans le cœur et le foie afin de déterminer les paramètres des flux métaboliques impliqués dans la régulation de processus biologiques et patho-physiologiques (Beylot *et al.* 1993; Des Rosiers *et al.* 1995; Comte *et al.* 1997; Des Rosiers *et al.* 2004). Voici quelques exemples de résultats attendus suite à l'incubation des cellules INS 832/13 en présence de ^{13}C -glucose. La détection du pyruvate enrichi une ou deux fois (nommé M+1 et M+2, respectivement) en ^{13}C confirmera la présence de l'activité de la ME. La différence entre le flux métabolique à travers la PC et celui de la citrate synthétase permettra d'évaluer le taux d'exportation du malate, provenant de l'oxaloacétate, dans le cytoplasme. Les résultats obtenus avec cette approche sont nombreux et complexes. L'expertise de nos collaborateurs, le Dr Des Rosiers et le Dr Brunengraber, sera précieuse pour l'interprétation des résultats. L'ensemble des données recueillies par cette approche nous permettra de déterminer les flux métaboliques à travers les différentes navettes du pyruvate dans les cellules INS 832/13 en réponse au glucose (Des Rosiers *et al.* 1995). Des études pilotes seront aussi effectuées afin de vérifier s'il est possible d'effectuer ce type d'expériences dans les îlots pancréatiques de rat, et ultiment humains. Les résultats de ces études pilotes dépendront vraisemblablement de l'impact de la diversité cellulaire des îlots sur les flux métaboliques et de la quantité de cellules primaires requises.

La mise au point de cette technologie dans notre laboratoire nous permettra par la suite d'étudier l'impact de la diminution de l'expression des enzymes des navettes du pyruvate sur les flux métaboliques des cellules β pancréatiques. Les résultats obtenus seront corrélés à la production de facteurs de couplage métabolique et à la sécrétion d'insuline. L'ensemble de ces données nous permettra de déterminer le mécanisme précis par lequel le cycle du pyruvate conduit à la production de facteur de couplage métabolique nécessaire à la régulation de la sécrétion d'insuline.

Projet #2 : Détermination de l'implication de la navette pyruvate/citrate dans les mécanismes de compensation de la cellule β pancréatique à la résistance à l'insuline des tissus périphériques.

Afin de compenser pour la résistance à l'insuline des tissus périphériques, les cellules β pancréatiques augmentent les niveaux d'insuline sécrétés en réponse au glucose ainsi qu'aux acides gras (Liu *et al.* 2002; Nolan *et al.* 2006a). La navette pyruvate/citrate pourrait être une voie métabolique importante pour la transduction des signaux métaboliques conduisant à l'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose et aux acides gras (voir Discussion).

Afin d'étudier l'importance de la navette pyruvate/citrate dans les mécanismes d'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose, le modèle des rats ZF sera utilisé (Nolan *et al.* 2006a). Les rats ZF sont obèse, hyperlipidémiques mais normoglycémiques puisque leurs cellules β sécrètent de 2 à 3 fois plus d'insuline en réponse au glucose comparativement aux rats contrôles ZL. Une étude précédente a corrélé l'augmentation de la sécrétion d'insuline à l'élévation de l'activité des enzymes PC, MEc et MDH dans les îlots de rats ZF comparativement à ceux des rats ZL (Liu *et al.* 2002). L'inhibition de la PC par l'acide phénylacétique a réduit les niveaux d'insuline sécrétée en réponse au glucose. Ces résultats démontrent l'implication du métabolisme du pyruvate à travers la PC dans les mécanismes d'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose dans les rats ZF. Le modèle des rats ZF nous permettra donc de valider notre hypothèse, soit que le cycle du pyruvate à travers la navette pyruvate/citrate joue un rôle important dans l'hypersécrétion d'insuline par les îlots pancréatiques.

Une étude pilote devra tout d'abord être effectuée afin de déterminer si l'isolation et la mise en culture pour quelques jours des îlots de rats ZF affectent les mécanismes conduisant à l'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. Si tel est le cas, des études alternatives devront être réalisées afin de pouvoir tester notre hypothèse (voir ci-bas dans études alternatives). Si, après vérification, les îlots de rats ZF

sécrètent de l'insuline en réponse au glucose et aux acides gras à des concentrations plus élevées que les îlots de rats contrôles ZL, nous pourrions procéder à une première série d'expérience visant à déterminer le rôle de différentes composantes de la navette pyruvate/citrate dans l'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose. Plus précisément, nous testerons l'importance de trois étapes de la navette pyruvate/citrate, soit la sortie du citrate de la mitochondrie et les activités enzymatiques de ACL et de la MEc. Les îlots de rats ZF seront tout d'abord incubés en présence ou non des inhibiteurs des transporteurs d'acides di- et tricarboxyliques, le n-butylmalonate et le 1,2,3-benzènetricarboxylate respectivement. Chez les rats sains Sprague-Dawley, l'incubation des îlots en présence du 1,2,3-benzènetricarboxylate a conduit à une réduction des niveaux de citrate cytosolique et a corrélé avec une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Joseph *et al.* 2006), ce qui suggère que notre approche est adéquate.

Par la suite, le rôle de l'activité de ACL et de MEc sera évalué par la réduction de leur expression à l'aide de shRNA (Guay *et al.* 2007). Puisque le taux de transfection des cellules dispersées d'îlots pancréatiques est faible, la stratégie de la co-transfection avec un plasmide codant pour la forme humaine de l'hormone de croissance sera utilisée (Lilja *et al.* 2004). La mesure de la sécrétion de l'hormone de croissance en réponse au glucose permettra de corrélérer la diminution de l'expression de ACL ou MEc avec une réduction de l'exocytose des vésicules contenant l'insuline et l'hormone de croissance. Finalement, l'effet de la diminution de l'expression de ACL sur la sécrétion d'insuline par les îlots de rats ZF sera confirmé par l'utilisation du radicicol, un inhibiteur spécifique de ACL.

Si la navette pyruvate/citrate est importante pour l'hypersécrétion de l'insuline dans les rats ZF, l'inhibition de chacune de ces trois composantes devrait corrélérer avec une réduction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. La mesure du malonyl-CoA et du ratio NADPH/NADP⁺ dans notre modèle permettra de déterminer si ces facteurs de couplage métabolique sont impliqués dans les mécanismes d'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose.

L'obtention de résultats négatifs suggérerait cependant qu'un processus de compensation existe dans les îlots de rats ZF afin de préserver le cycle du pyruvate et l'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose. Dans ce cas, la mesure du cycle du pyruvate sera nécessaire afin de confirmer cette hypothèse (Lu *et al.* 2002).

Études alternatives

Afin de réaliser les expériences décrites ci-haut, nous devons cultiver les cellules dispersées des îlots de rats ZF durant quelques jours. En effet, la diminution de l'expression des enzymes cibles par la technologie des RNAi nécessite une attente de 48 à 96 h. Il est possible que cette culture des îlots *ex vivo* entraîne une adaptation des cellules β et conduit à une perte des caractéristiques hypersécrétrices des îlots des rats ZF. Advenant ce cas, les expériences utilisant les inhibiteurs pharmacologiques devront être réalisées dans les heures suivant l'isolation des îlots. Une stratégie expérimentale alternative devra cependant être adoptée afin d'étudier le rôle de l'activité enzymatique de ACL et de MEc dans la régulation de l'hypersécrétion d'insuline. Une avenue intéressante serait de comparer les flux métaboliques activés en réponse au glucose entre les îlots de rats ZF et ceux de rats contrôles ZL. Pour ce faire, les îlots de rats ZL et ZF, fraîchement isolés, devront être incubés en présence de glucose marqué au carbone 13 afin de pouvoir analyser l'incorporation des atomes de carbone marqués dans les métabolites impliqués dans les différentes navettes du pyruvate. Les limitations possibles de cette approche sont la diversité cellulaire des îlots pancréatiques et la quantité de cellules primaires requises pour mesurer l'incorporation des atomes de ^{13}C dans les différents métabolites d'intérêts. Si nous réussissons à mettre cette technologie au point, nous pourrons par la suite utiliser la même stratégie afin de déterminer les flux métaboliques découlant du métabolisme du glucose qui sont affectés chez les rats ZF diabétiques (soit les rats ZDF).

Finalement, il serait intéressant de comparer les niveaux de malonyl-CoA et de NADPH dans les îlots de rats ZF à ceux des rats ZL afin de déterminer s'ils corrèlent avec l'hypersécrétion de l'insuline en réponse au glucose dans les rats ZF.

Bibliographie

- Aguilar-Bryan, L., C. G. Nichols, S. W. Wechsler, J. P. t. Clement, A. E. Boyd, 3rd, G. Gonzalez, H. Herrera-Sosa, K. Nguy, J. Bryan and D. A. Nelson (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268(5209): 423-6.
- Aizawa, T. and M. Komatsu (2005). Rab27a: a new face in beta cell metabolism-secretion coupling. *J Clin Invest* 115(2): 227-30.
- Aizawa, T., Y. Sato, F. Ishihara, N. Taguchi, M. Komatsu, N. Suzuki, K. Hashizume and T. Yamada (1994). ATP-sensitive K⁺ channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): C622-7.
- Akesson, B., R. Henningson, A. Salehi and I. Lundquist (1999). Islet constitutive nitric oxide synthase and glucose regulation of insulin release in mice. *J Endocrinol* 163(1): 39-48.
- Alquier, T., M. L. Peyot, M. G. Latour, M. Kebede, C. M. Sorensen, S. Gesta, C. Ronald Kahn, R. D. Smith, T. L. Jetton, T. O. Metz, M. Prentki and V. Poitout (2009). Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 58(11): 2607-15.
- Altshuler, D., J. N. Hirschhorn, M. Klannemark, C. M. Lindgren, M. C. Vohl, J. Nemesh, C. R. Lane, S. F. Schaffner, S. Bolk, C. Brewer, T. Tuomi, D. Gaudet, T. J. Hudson, M. Daly, L. Groop and E. S. Lander (2000). The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26(1): 76-80.
- AmericanDiabetesAssociation (2005). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 28 Suppl 1: S37-42.
- Ammon, H. P. and J. Steinke (1972). Effect of 6-aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: difference between glucose, tolbutamide and aminophylline. *Endocrinology* 91(1): 33-8.
- Andersen, G., C. S. Rose, Y. H. Hamid, T. Drivsholm, K. Borch-Johnsen, T. Hansen and O. Pedersen (2003). Genetic variation of the GLUT10 glucose transporter (SLC2A10) and relationships to type 2 diabetes and intermediary traits. *Diabetes* 52(9): 2445-8.
- Antinozzi, P. A., L. Segall, M. Prentki, J. D. McGarry and C. B. Newgard (1998). Molecular or pharmacologic perturbation of the link between glucose and lipid

- metabolism is without effect on glucose-stimulated insulin secretion. A re-evaluation of the long-chain acyl-CoA hypothesis. *J Biol Chem* 273(26): 16146-54.
- Ashcroft, F. M. and F. M. Gribble (1998). Correlating structure and function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Trends Neurosci* 21(7): 288-94.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison and S. J. Ashcroft (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312(5993): 446-8.
- Ashcroft, F. M., P. Proks, P. A. Smith, C. Ammala, K. Bokvist and P. Rorsman (1994). Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J Cell Biochem* 55 Suppl: 54-65.
- Attali, V., M. Parnes, Y. Ariav, E. Cerasi, N. Kaiser and G. Leibowitz (2006). Regulation of insulin secretion and proinsulin biosynthesis by succinate. *Endocrinology* 147(11): 5110-8.
- Bahl, J. J., M. Matsuda, R. A. DeFronzo and R. Bressler (1997). In vitro and in vivo suppression of gluconeogenesis by inhibition of pyruvate carboxylase. *Biochem Pharmacol* 53(1): 67-74.
- Ballard, F. J. and R. W. Hanson (1967). The citrate cleavage pathway and lipogenesis in rat adipose tissue: replenishment of oxaloacetate. *J Lipid Res* 8(2): 73-9.
- Basabe, J. C., J. M. Farina and R. A. Chieri (1976). Studies on the dynamics and mechanism of glibenclamide-induced insulin secretion. *Horm Metab Res* 8(6): 413-9.
- Bauer, D. E., G. Hatzivassiliou, F. Zhao, C. Andreadis and C. B. Thompson (2005). ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene* 24(41): 6314-22.
- Beffy, P., A. D. Lajoix, P. Masiello, S. Dietz, S. Peraldi-Roux, T. Chardes, G. Ribes and R. Gross (2001). A constitutive nitric oxide synthase modulates insulin secretion in the INS-1 cell line. *Mol Cell Endocrinol* 183(1-2): 41-8.
- Ben-Haroush, A., Y. Yogev and M. Hod (2004). Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 21(2): 103-13.
- Bento, J. L., D. W. Bowden, J. C. Mychaleckyj, S. Hirakawa, S. S. Rich, B. I. Freedman and F. Segade (2005). Genetic analysis of the GLUT10 glucose transporter (SLC2A10)

polymorphisms in Caucasian American type 2 diabetes. *BMC Med Genet* 6: 42.

- Bertram, R., A. Sherman and L. S. Satin (2007). Metabolic and electrical oscillations: partners in controlling pulsatile insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(4): E890-900.
- Bertrand, G., N. Ishiyama, M. Nenquin, M. A. Ravier and J. C. Henquin (2002). The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J Biol Chem* 277(36): 32883-91.
- Best, L. and S. Tomlinson (1988). Inhibition of pyruvate oxidation in rat islets by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. Differential effects on insulin secretion and inositol lipid metabolism. *Biochem Pharmacol* 37(10): 2019-22.
- Beylot, M., S. F. Previs, F. David and H. Brunengraber (1993). Determination of the ¹³C-labeling pattern of glucose by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 212(2): 526-31.
- Binas, B., H. Danneberg, J. McWhir, L. Mullins and A. J. Clark (1999). Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization. *Faseb J* 13(8): 805-12.
- Bindokas, V. P., A. Kuznetsov, S. Sreenan, K. S. Polonsky, M. W. Roe and L. H. Philipson (2003). Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *J Biol Chem* 278(11): 9796-801.
- Blachier, F., V. Leclercq-Meyer, J. Marchand, M. C. Woussen-Colle, P. C. Mathias, A. Sener and W. J. Malaisse (1989). Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Functional response of islets to L-arginine and L-ornithine. *Biochim Biophys Acta* 1013(2): 144-51.
- Bonen, A., J. J. Luiken and J. F. Glatz (2002). Regulation of fatty acid transport and membrane transporters in health and disease. *Mol Cell Biochem* 239(1-2): 181-92.
- Boucher, A., D. Lu, S. C. Burgess, S. Telemaque-Potts, M. V. Jensen, H. Mulder, M. Y. Wang, R. H. Unger, A. D. Sherry and C. B. Newgard (2004). Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue. *J Biol Chem* 279(26): 27263-71.

- Briscoe, C. P., M. Tadayyon, J. L. Andrews, W. G. Benson, J. K. Chambers, M. M. Eilert, C. Ellis, N. A. Elshourbagy, A. S. Goetz, D. T. Minnick, P. R. Murdock, H. R. Sauls, Jr., U. Shabon, L. D. Spinage, J. C. Strum, P. G. Szekeres, K. B. Tan, J. M. Way, D. M. Ignar, S. Wilson and A. I. Muir (2003). The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278(13): 11303-11.
- Broca, C., L. Brennan, P. Petit, P. Newsholme and P. Maechler (2003). Mitochondria-derived glutamate at the interplay between branched-chain amino acid and glucose-induced insulin secretion. *FEBS Lett* 545(2-3): 167-72.
- Brown, G. K. (2000). Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23(3): 237-46.
- Brun, T., E. Roche, F. Assimacopoulos-Jeannet, B. E. Corkey, K. H. Kim and M. Prentki (1996). Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes* 45(2): 190-8.
- Bryla, J., M. Michalik, J. Nelson and M. Erecinska (1994). Regulation of the glutamate dehydrogenase activity in rat islets of Langerhans and its consequence on insulin release. *Metabolism* 43(9): 1187-95.
- Buchanan, T. A. and A. H. Xiang (2005). Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 115(3): 485-91.
- Butler, A. E., J. Janson, S. Bonner-Weir, R. Ritzel, R. A. Rizza and P. C. Butler (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1): 102-10.
- Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2334-9.
- Carobbio, S., F. Frigerio, B. Rubi, L. Vetterli, M. Bloksgaard, A. Gjinovci, S. Pournourmohammadi, P. L. Herrera, W. Reith, S. Mandrup and P. Maechler (2009). Deletion of glutamate dehydrogenase in beta-cells abolishes part of the insulin secretory response not required for glucose homeostasis. *J Biol Chem* 284(2): 921-9.
- Chan, C. B. and R. M. MacPhail (1996). KATP channel-dependent and -independent pathways of insulin secretion in isolated islets from *fa/fa* Zucker rats. *Biochem Cell*

Biol 74(3): 403-10.

- Charles, S., T. Tamagawa and J. C. Henquin (1982). A single mechanism for the stimulation of insulin release and $^{86}\text{Rb}^+$ efflux from rat islets by cationic amino acids. *Biochem J* 208(2): 301-8.
- Chouinard, S. W., F. Lu, B. Ganetzky and M. J. Macdonald (2000). Evidence for voltage-gated potassium channel beta-subunits with oxidoreductase motifs in human and rodent pancreatic beta cells. *Receptors Channels* 7(3): 237-43.
- Cline, G. W., R. L. Lepine, K. K. Papas, R. G. Kibbey and G. I. Shulman (2004). ^{13}C NMR isotopomer analysis of anaplerotic pathways in INS-1 cells. *J Biol Chem* 279(43): 44370-5.
- Comte, B., G. Vincent, B. Bouchard, M. Benderdour and C. Des Rosiers (2002). Reverse flux through cardiac NADP(+)-isocitrate dehydrogenase under normoxia and ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(4): H1505-14.
- Comte, B., G. Vincent, B. Bouchard and C. Des Rosiers (1997). Probing the origin of acetyl-CoA and oxaloacetate entering the citric acid cycle from the ^{13}C labeling of citrate released by perfused rat hearts. *J Biol Chem* 272(42): 26117-24.
- Cook, D. L. and C. N. Hales (1984). Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311(5983): 271-3.
- Corkey, B. E., M. C. Glennon, K. S. Chen, J. T. Deeney, F. M. Matschinsky and M. Prentki (1989). A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 264(36): 21608-12.
- Corkey, B. E., K. Tornheim, J. T. Deeney, M. C. Glennon, J. C. Parker, F. M. Matschinsky, N. B. Ruderman and M. Prentki (1988). Linked oscillations of free Ca^{2+} and the ATP/ADP ratio in permeabilized RINm5F insulinoma cells supplemented with a glycolyzing cell-free muscle extract. *J Biol Chem* 263(9): 4254-8.
- Cruz, W. S., G. Kwon, C. A. Marshall, M. L. McDaniel and C. F. Semenkovich (2001). Glucose and insulin stimulate heparin-releasable lipoprotein lipase activity in mouse islets and INS-1 cells. A potential link between insulin resistance and beta-cell dysfunction. *J Biol Chem* 276(15): 12162-8.

- Curry, D. L., L. L. Bennett and G. M. Grodsky (1968). Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 83(3): 572-84.
- Dawson, P. A., J. C. Mychaleckyj, S. C. Fossey, S. J. Mihic, A. L. Craddock and D. W. Bowden (2001). Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 74(1-2): 186-99.
- De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers and F. Schuit (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96(5): 2489-95.
- Deeney, J. T., M. Kohler, K. Kubik, G. Brown, V. Schultz, K. Tornheim, B. E. Corkey and P. O. Berggren (2001). Glucose-induced metabolic oscillations parallel those of Ca(2+) and insulin release in clonal insulin-secreting cells. A multiwell approach to oscillatory cell behavior. *J Biol Chem* 276(40): 36946-50.
- Delghingaro-Augusto, V., C. J. Nolan, D. Gupta, T. L. Jetton, M. G. Latour, M. Peshavaria, S. R. Madiraju, E. Joly, M. L. Peyot, M. Prentki and J. Leahy (2009). Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52(6): 1122-32.
- Depre, C., M. H. Rider and L. Hue (1998). Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur J Biochem* 258(2): 277-90.
- Des Rosiers, C., L. Di Donato, B. Comte, A. Laplante, C. Marcoux, F. David, C. A. Fernandez and H. Brunengraber (1995). Isotopomer analysis of citric acid cycle and gluconeogenesis in rat liver. Reversibility of isocitrate dehydrogenase and involvement of ATP-citrate lyase in gluconeogenesis. *J Biol Chem* 270(17): 10027-36.
- Des Rosiers, C., C. A. Fernandez, F. David and H. Brunengraber (1994). Reversibility of the mitochondrial isocitrate dehydrogenase reaction in the perfused rat liver. Evidence from isotopomer analysis of citric acid cycle intermediates. *J Biol Chem* 269(44): 27179-82.
- Des Rosiers, C., S. Lloyd, B. Comte and J. C. Chatham (2004). A critical perspective of the use of (13)C-isotopomer analysis by GCMS and NMR as applied to cardiac metabolism. *Metab Eng* 6(1): 44-58.

- Detimary, P., G. Van den Berghe and J. C. Henquin (1996). Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem* 271(34): 20559-65.
- Devendra, D., E. Liu and G. S. Eisenbarth (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *Bmj* 328(7442): 750-4.
- Di Cianni, G., R. Miccoli, L. Volpe, C. Lencioni and S. Del Prato (2003). Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19(4): 259-70.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3(3): 153-65.
- Drucker, D. J. and M. A. Nauck (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368(9548): 1696-705.
- Egido, E. M., J. Rodriguez-Gallardo, R. A. Silvestre and J. Marco (2002). Inhibitory effect of ghrelin on insulin and pancreatic somatostatin secretion. *Eur J Endocrinol* 146(2): 241-4.
- Elayat, A. A., M. M. el-Naggar and M. Tahir (1995). An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* 186 (Pt 3): 629-37.
- Erecinska, M., J. Bryla, M. Michalik, M. D. Meglasson and D. Nelson (1992). Energy metabolism in islets of Langerhans. *Biochim Biophys Acta* 1101(3): 273-95.
- Eto, K., Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, T. Sugiyama, T. Kishimoto, N. Takahashi, N. Yamauchi, N. Kubota, S. Murayama, T. Aizawa, Y. Akanuma, S. Aizawa, H. Kasai, Y. Yazaki and T. Kadowaki (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283(5404): 981-5.
- Fajans, S. S., G. I. Bell and K. S. Polonsky (2001). Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345(13): 971-80.

- Farfari, S., V. Schulz, B. Corkey and M. Prentki (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.
- Flamez, D., V. Berger, M. Kruhoffer, T. Orntoft, D. Pipeleers and F. C. Schuit (2002). Critical role for cataplerosis via citrate in glucose-regulated insulin release. *Diabetes* 51(7): 2018-24.
- Fransson, U., A. H. Rosengren, F. C. Schuit, E. Renstrom and H. Mulder (2006). Anaplerosis via pyruvate carboxylase is required for the fuel-induced rise in the ATP:ADP ratio in rat pancreatic islets. *Diabetologia* 49(7): 1578-86.
- Frigerio, F., M. Casimir, S. Carobbio and P. Maechler (2008). Tissue specificity of mitochondrial glutamate pathways and the control of metabolic homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8): 965-72.
- Froguel, P., H. Zouali, N. Vionnet, G. Velho, M. Vaxillaire, F. Sun, S. Lesage, M. Stoffel, J. Takeda, P. Passa and et al. (1993). Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328(10): 697-702.
- Fujiwara, K., F. Maekawa and T. Yada (2005). Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca²⁺ signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-type Ca²⁺ channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4): E670-7.
- Gamberino, W. C., D. A. Berkich, C. J. Lynch, B. Xu and K. F. LaNoue (1997). Role of pyruvate carboxylase in facilitation of synthesis of glutamate and glutamine in cultured astrocytes. *J Neurochem* 69(6): 2312-25.
- Gembal, M., P. Detimary, P. Gilon, Z. Y. Gao and J. C. Henquin (1993). Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 91(3): 871-80.
- Gembal, M., P. Gilon and J. C. Henquin (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.
- Gerich, J. E. (1998). The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19(4): 491-503.

- Gilon, P. and J. C. Henquin (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endocr Rev* 22(5): 565-604.
- Gilon, P., M. A. Ravier, J. C. Jonas and J. C. Henquin (2002). Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 Suppl 1: S144-51.
- Giuffrida, F. M. and A. F. Reis (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes Obes Metab* 7(4): 318-26.
- Gloyn, A. L., M. N. Weedon, K. R. Owen, M. J. Turner, B. A. Knight, G. Hitman, M. Walker, J. C. Levy, M. Sampson, S. Halford, M. I. McCarthy, A. T. Hattersley and T. M. Frayling (2003). Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(2): 568-72.
- Grant, S. F., G. Thorleifsson, I. Reynisdottir, R. Benediktsson, A. Manolescu, J. Sainz, A. Helgason, H. Stefansson, V. Emilsson, A. Helgadottir, U. Styrkarsdottir, K. P. Magnusson, G. B. Walters, E. Palsdottir, T. Jonsdottir, T. Gudmundsdottir, A. Gylfason, J. Saemundsdottir, R. L. Wilensky, M. P. Reilly, D. J. Rader, Y. Bagger, C. Christiansen, V. Gudnason, G. Sigurdsson, U. Thorsteinsdottir, J. R. Gulcher, A. Kong and K. Stefansson (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38(3): 320-3.
- Guay, C., S. R. Madiraju, A. Aumais, E. Joly and M. Prentki (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.
- Guillam, M. T., P. Dupraz and B. Thorens (2000). Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes* 49(9): 1485-91.
- Guillam, M. T., E. Hummler, E. Schaerer, J. I. Yeh, M. J. Birnbaum, F. Beermann, A. Schmidt, N. Deriaz and B. Thorens (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat Genet* 17(3): 327-30.
- Gulbis, J. M., S. Mann and R. MacKinnon (1999). Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit. *Cell* 97(7): 943-52.
- Gunawardana, S. C., J. V. Rocheleau, W. S. Head and D. W. Piston (2006). Mechanisms of

- time-dependent potentiation of insulin release: involvement of nitric oxide synthase. *Diabetes* 55(4): 1029-33.
- Guyton, A. and J. Hall. (2000). Textbook of Medical Physiology. United States: W.B. Saunders Company, 1064 p.
- Halestrap, A. P. (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148(1): 85-96.
- Hamilton, J. A. and F. Kamp (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes* 48(12): 2255-69.
- Hasan, N. M., M. J. Longacre, S. W. Stoker, T. Boonsaen, S. Jitrapakdee, M. A. Kendrick, J. C. Wallace and M. J. MacDonald (2008). Impaired anaplerosis and insulin secretion in insulinoma cells caused by small interfering RNA-mediated suppression of pyruvate carboxylase. *J Biol Chem* 283(42): 28048-59.
- Hatzivassiliou, G., F. Zhao, D. E. Bauer, C. Andreadis, A. N. Shaw, D. Dhanak, S. R. Hingorani, D. A. Tuveson and C. B. Thompson (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8(4): 311-21.
- Hauge-Evans, A. C., A. J. King, D. Carmignac, C. C. Richardson, I. C. Robinson, M. J. Low, M. R. Christie, S. J. Persaud and P. M. Jones (2009). Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes* 58(2): 403-11.
- Heart, E., G. W. Cline, L. P. Collis, R. L. Pongratz, J. P. Gray and P. J. Smith (2009). Role for malic enzyme, pyruvate carboxylation, and mitochondrial malate import in glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(6): E1354-62.
- Hedekov, C. J. (1980). Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev* 60(2): 442-509.
- Hedekov, C. J. and K. Capito (1975). The pentose cycle and insulin release in isolated mouse pancreatic islets during starvation. *Biochem J* 152(3): 571-6.
- Hedekov, C. J., K. Capito and P. Thams (1987). Cytosolic ratios of free [NADPH]/[NADP⁺] and [NADH]/[NAD⁺] in mouse pancreatic islets, and nutrient-induced insulin secretion. *Biochem J* 241(1): 161-7.

- Henquin, J. C. (1980). Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release: studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia* 18(2): 151-60.
- Henquin, J. C. (1992). Adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channels may not be the sole regulators of glucose-induced electrical activity in pancreatic B-cells. *Endocrinology* 131(1): 127-31.
- Henquin, J. C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49(11): 1751-60.
- Henquin, J. C., S. Charles, M. Nenquin, F. Mathot and T. Tamagawa (1982). Diazoxide and D600 inhibition of insulin release. Distinct mechanisms explain the specificity for different stimuli. *Diabetes* 31(9): 776-83.
- Henquin, J. C. and H. P. Meissner (1986). Cyclic adenosine monophosphate differently affects the response of mouse pancreatic beta-cells to various amino acids. *J Physiol* 381: 77-93.
- Herrero, L., B. Rubi, D. Sebastian, D. Serra, G. Asins, P. Maechler, M. Prentki and F. G. Hegardt (2005). Alteration of the malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase I interaction in the beta-cell impairs glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 54(2): 462-71.
- Hillgartner, F. B., L. M. Salati and A. G. Goodridge (1995). Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiol Rev* 75(1): 47-76.
- Hohmeier, H. E., H. Mulder, G. Chen, R. Henkel-Rieger, M. Prentki and C. B. Newgard (2000). Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 49(3): 424-30.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54: 237-71.
- Horikawa, Y., N. Oda, N. J. Cox, X. Li, M. Orho-Melander, M. Hara, Y. Hinokio, T. H. Lindner, H. Mashima, P. E. Schwarz, L. del Bosque-Plata, Y. Oda, I. Yoshiuchi, S. Colilla, K. S. Polonsky, S. Wei, P. Concannon, N. Iwasaki, J. Schulze, L. J. Baier, C. Bogardus, L. Groop, E. Boerwinkle, C. L. Hanis and G. I. Bell (2000). Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus.

Nat Genet 26(2): 163-75.

- Hoy, M., P. Maechler, A. M. Efanov, C. B. Wollheim, P. O. Berggren and J. Gromada (2002). Increase in cellular glutamate levels stimulates exocytosis in pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 531(2): 199-203.
- Hu, L., J. T. Deeney, C. J. Nolan, M. L. Peyot, A. Ao, A. M. Richard, E. Luc, N. J. Faergeman, J. Knudsen, W. Guo, M. Sorhede-Winzell, M. Prentki and B. E. Corkey (2005). Regulation of lipolytic activity by long-chain acyl-coenzyme A in islets and adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(6): E1085-92.
- Itoh, Y., Y. Kawamata, M. Harada, M. Kobayashi, R. Fujii, S. Fukusumi, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Tanaka, H. Uejima, H. Tanaka, M. Maruyama, R. Satoh, S. Okubo, H. Kizawa, H. Komatsu, F. Matsumura, Y. Noguchi, T. Shinohara, S. Hinuma, Y. Fujisawa and M. Fujino (2003). Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature* 422(6928): 173-6.
- Ivarsson, R., R. Quintens, S. Dejonghe, K. Tsukamoto, P. in 't Veld, E. Renstrom and F. C. Schuit (2005). Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes* 54(7): 2132-42.
- Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, W. Yan, H. F. Sims, B. Gibson and R. W. Gross (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279(47): 48968-75.
- Jensen, M. V., J. W. Joseph, O. Ilkayeva, S. Burgess, D. Lu, S. M. Ronnebaum, M. Odegaard, T. C. Becker, A. D. Sherry and C. B. Newgard (2006). Compensatory responses to pyruvate carboxylase suppression in islet beta-cells. Preservation of glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(31): 22342-51.
- Jensen, M. V., J. W. Joseph, S. M. Ronnebaum, S. C. Burgess, A. D. Sherry and C. B. Newgard (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(6): E1287-97.
- Jin, T. and L. Liu (2008). The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 22(11): 2383-92.
- Jitrapakdee, S., A. Vidal-Puig and J. C. Wallace (2006). Anaplerotic roles of pyruvate

carboxylase in mammalian tissues. *Cell Mol Life Sci* 63(7-8): 843-54.

Jo, S. H., M. K. Son, H. J. Koh, S. M. Lee, I. H. Song, Y. O. Kim, Y. S. Lee, K. S. Jeong, W. B. Kim, J. W. Park, B. J. Song and T. L. Huh (2001). Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* 276(19): 16168-76.

Johnson, J. H., C. B. Newgard, J. L. Milburn, H. F. Lodish and B. Thorens (1990). The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *J Biol Chem* 265(12): 6548-51.

Jones, P. M. and S. J. Persaud (1998). Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev* 19(4): 429-61.

Joseph, J. W., M. V. Jensen, O. Ilkayeva, F. Palmieri, C. Alarcon, C. J. Rhodes and C. B. Newgard (2006). The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(47): 35624-32.

Joseph, J. W., M. L. Odegaard, S. M. Ronnebaum, S. C. Burgess, J. Muehlbauer, A. D. Sherry and C. B. Newgard (2007). Normal flux through ATP-citrate lyase or fatty acid synthase is not required for glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*.

Kaaja, R. and T. Ronnema (2008). Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *Rev Diabet Stud* 5(4): 194-202.

Kajimoto, K., H. Terada, Y. Baba and Y. Shinohara (2005). Essential role of citrate export from mitochondria at early differentiation stage of 3T3-L1 cells for their effective differentiation into fat cells, as revealed by studies using specific inhibitors of mitochondrial di- and tricarboxylate carriers. *Mol Genet Metab* 85(1): 46-53.

Kajimoto, Y. and H. Kaneto (2004). Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 1011: 168-76.

Kano, T., M. Shimizu-Sasamata, P. L. Huang, M. A. Moskowitz and E. H. Lo (1998). Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. *Neuroscience* 86(3): 695-9.

Kashima, Y., T. Miki, T. Shibasaki, N. Ozaki, M. Miyazaki, H. Yano and S. Seino (2001).

- Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* 276(49): 46046-53.
- Kelley, G. G., K. C. Zawulich and W. S. Zawulich (1994). Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology* 134(4): 1648-54.
- Khan, A., Z. C. Ling and B. R. Landau (1996). Quantifying the carboxylation of pyruvate in pancreatic islets. *J Biol Chem* 271(5): 2539-42.
- Kieffer, T. J., R. S. Heller, C. G. Unson, G. C. Weir and J. F. Habener (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology* 137(11): 5119-25.
- Kim, S. Y., S. M. Lee, J. K. Tak, K. S. Choi, T. K. Kwon and J. W. Park (2007). Regulation of singlet oxygen-induced apoptosis by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Mol Cell Biochem* 302(1-2): 27-34.
- Kim, S. Y. and J. W. Park (2003). Cellular defense against singlet oxygen-induced oxidative damage by cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Free Radic Res* 37(3): 309-16.
- King, H., R. E. Aubert and W. H. Herman (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21(9): 1414-31.
- Klatt, P., B. Heinzl, M. John, M. Kastner, E. Bohme and B. Mayer (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent cytochrome c reductase activity of brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267(16): 11374-8.
- Klonoff, D. C. and D. M. Schwartz (2000). An economic analysis of interventions for diabetes. *Diabetes Care* 23(3): 390-404.
- Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, S. E. Fowler, R. F. Hamman, J. M. Lachin, E. A. Walker and D. M. Nathan (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6): 393-403.
- Kourie, J. I. (1998). Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1): C1-24.

- Lajoix, A. D., S. Badiou, S. Peraldi-Roux, T. Chardes, S. Dietz, C. Aknin, F. Tribillac, P. Petit and R. Gross (2006). Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) is a new regulator of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 55(12): 3279-88.
- Lajoix, A. D., M. Pugniere, F. Roquet, J. C. Mani, S. Dietz, N. Linck, F. Faurie, G. Ribes, P. Petit and R. Gross (2004). Changes in the dimeric state of neuronal nitric oxide synthase affect the kinetics of secretagogue-induced insulin response. *Diabetes* 53(6): 1467-74.
- Lajoix, A. D., H. Reggio, T. Chardes, S. Peraldi-Roux, F. Tribillac, M. Roye, S. Dietz, C. Broca, M. Manteghetti, G. Ribes, C. B. Wollheim and R. Gross (2001). A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cells controls insulin secretion. *Diabetes* 50(6): 1311-23.
- Lang, J. (1999). Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259(1-2): 3-17.
- Large, V. and M. Beylot (1999). Modifications of citric acid cycle activity and gluconeogenesis in streptozotocin-induced diabetes and effects of metformin. *Diabetes* 48(6): 1251-7.
- Latour, M. G., T. Alquier, E. Oseid, C. Tremblay, T. L. Jetton, J. Luo, D. C. Lin and V. Poitout (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.
- Lebon, V., K. F. Petersen, G. W. Cline, J. Shen, G. F. Mason, S. Dufour, K. L. Behar, G. I. Shulman and D. L. Rothman (2002). Astroglial contribution to brain energy metabolism in humans revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy: elucidation of the dominant pathway for neurotransmitter glutamate repletion and measurement of astrocytic oxidative metabolism. *J Neurosci* 22(5): 1523-31.
- Lee, S. M., H. J. Koh, D. C. Park, B. J. Song, T. L. Huh and J. W. Park (2002). Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med* 32(11): 1185-96.
- Lee, S. M., S. Y. Park, S. W. Shin, I. S. Kil, E. S. Yang and J. W. Park (2009). Silencing of

- cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase by small interfering RNA enhances the sensitivity of HeLa cells toward staurosporine. *Free Radic Res* 43(2): 165-73.
- Leloup, C., C. Tourrel-Cuzin, C. Magnan, M. Karaca, J. Castel, L. Carneiro, A. L. Colombani, A. Ktorza, L. Casteilla and L. Penicaud (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58(3): 673-81.
- Lenzen, S., J. Drinkgern and M. Tiedge (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 20(3): 463-6.
- Liang, Y. and F. M. Matschinsky (1991). Content of CoA-esters in perfused rat islets stimulated by glucose and other fuels. *Diabetes* 40(3): 327-33.
- Liang, Y., H. Najafi, R. M. Smith, E. C. Zimmerman, M. A. Magnuson, M. Tal and F. M. Matschinsky (1992). Concordant glucose induction of glucokinase, glucose usage, and glucose-stimulated insulin release in pancreatic islets maintained in organ culture. *Diabetes* 41(7): 792-806.
- Lilja, L., J. U. Johansson, J. Gromada, S. A. Mandic, G. Fried, P. O. Berggren and C. Bark (2004). Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+)-dependent exocytosis. *J Biol Chem* 279(28): 29534-41.
- Lin, W. H., L. M. Chuang, C. H. Chen, J. I. Yeh, P. S. Hsieh, C. H. Cheng and Y. T. Chen (2006). Association study of genetic polymorphisms of SLC2A10 gene and type 2 diabetes in the Taiwanese population. *Diabetologia* 49(6): 1214-21.
- Lindstrom, J., P. Ilanne-Parikka, M. Peltonen, S. Aunola, J. G. Eriksson, K. Hemio, H. Hamalainen, P. Harkonen, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Mannelin, M. Paturi, J. Sundvall, T. T. Valle, M. Uusitupa and J. Tuomilehto (2006). Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. *Lancet* 368(9548): 1673-9.
- Liu, H., R. Colavitti, Rovira, II and T. Finkel (2005a). Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 97(10): 967-74.
- Liu, Y. Q., J. Han, P. N. Epstein and Y. S. Long (2005b). Enhanced rat beta-cell

- proliferation in 60% pancreatectomized islets by increased glucose metabolic flux through pyruvate carboxylase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(3): E471-8.
- Liu, Y. Q., T. L. Jetton and J. L. Leahy (2002). beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem* 277(42): 39163-8.
- Liu, Y. Q., J. A. Moibi and J. L. Leahy (2004). Chronic high glucose lowers pyruvate dehydrogenase activity in islets through enhanced production of long chain acyl-CoA: prevention of impaired glucose oxidation by enhanced pyruvate recycling through the malate-pyruvate shuttle. *J Biol Chem* 279(9): 7470-5.
- Liu, Y. Q., P. W. Nevin and J. L. Leahy (2000). beta-cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279(1): E68-73.
- Lowell, B. B. and G. I. Shulman (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307(5708): 384-7.
- Lu, D., H. Mulder, P. Zhao, S. C. Burgess, M. V. Jensen, S. Kamzolova, C. B. Newgard and A. D. Sherry (2002). ¹³C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5): 2708-13.
- MacDonald, M. J. (1981). High content of mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in pancreatic islets and its inhibition by diazoxide. *J Biol Chem* 256(16): 8287-90.
- MacDonald, M. J. (1982). Evidence for the malate aspartate shuttle in pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 213(2): 643-9.
- MacDonald, M. J. (1993a). Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Arch Biochem Biophys* 305(2): 205-14.
- MacDonald, M. J. (1993b). Glucose enters mitochondrial metabolism via both carboxylation and decarboxylation of pyruvate in pancreatic islets. *Metabolism* 42(10): 1229-31.

- MacDonald, M. J. (1995). Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *J Biol Chem* 270(34): 20051-8.
- MacDonald, M. J. (2003). The export of metabolites from mitochondria and anaplerosis in insulin secretion. *Biochim Biophys Acta* 1619(1): 77-88.
- MacDonald, M. J. (2004). Production and export of metabolites from liver and heart mitochondria and anaplerosis. *Mol Cell Biochem* 258(1-2): 201-10.
- MacDonald, M. J., S. Efendic and C. G. Ostenson (1996a). Normalization by insulin treatment of low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of the GK rat. *Diabetes* 45(7): 886-90.
- MacDonald, M. J. and L. A. Fahien (2000). Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem* 275(44): 34025-7.
- MacDonald, M. J., L. A. Fahien, L. J. Brown, N. M. Hasan, J. D. Buss and M. A. Kendrick (2005). Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(1): E1-15.
- MacDonald, M. J., L. A. Fahien, J. D. Buss, N. M. Hasan, M. J. Fallon and M. A. Kendrick (2003a). Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells. *J Biol Chem* 278(51): 51894-900.
- Macdonald, M. J., N. M. Hasan and M. J. Longacre (2008). Studies with leucine, beta-hydroxybutyrate and ATP citrate lyase-deficient beta cells support the acetoacetate pathway of insulin secretion. *Biochim Biophys Acta* 1780(7-8): 966-72.
- MacDonald, M. J., M. J. Longacre, E. C. Langberg, A. Tibell, M. A. Kendrick, T. Fukao and C. G. Ostenson (2009). Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52(6): 1087-91.
- MacDonald, M. J. and L. K. Marshall (2000). Mouse lacking NAD⁺-linked glycerol phosphate dehydrogenase has normal pancreatic beta cell function but abnormal metabolite pattern in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 384(1): 143-53.
- MacDonald, M. J., D. I. McKenzie, T. M. Walker and J. H. Kaysen (1992). Lack of glyconeogenesis in pancreatic islets: expression of gluconeogenic enzyme genes in

- islets. *Horm Metab Res* 24(4): 158-60.
- Macdonald, M. J., A. D. Smith, 3rd, N. M. Hasan, G. Sabat and L. A. Fahien (2007). Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem*.
- MacDonald, M. J., J. Tang and K. S. Polonsky (1996b). Low mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 45(11): 1626-30.
- MacDonald, P. E., A. M. Salapatek and M. B. Wheeler (2003b). Temperature and redox state dependence of native Kv2.1 currents in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* 546(Pt 3): 647-53.
- MacDonald, P. E. and M. B. Wheeler (2003). Voltage-dependent K(+) channels in pancreatic beta cells: role, regulation and potential as therapeutic targets. *Diabetologia* 46(8): 1046-62.
- Maechler, P., S. Carobbio and B. Rubi (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 38(5-6): 696-709.
- Maechler, P. and C. B. Wollheim (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402(6762): 685-9.
- Maechler, P. and C. B. Wollheim (2001). Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414(6865): 807-12.
- Malecki, M. T. and W. Mlynarski (2008). Monogenic diabetes: implications for therapy of rare types of disease. *Diabetes Obes Metab* 10(8): 607-16.
- Martin, B. C., J. H. Warram, A. S. Krolewski, R. N. Bergman, J. S. Soeldner and C. R. Kahn (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet* 340(8825): 925-9.
- Matschinsky, F. M. (2002). Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* 51 Suppl 3: S394-404.
- McGarry, J. D. and N. F. Brown (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase

- system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 244(1): 1-14.
- McGarry, J. D. and R. L. Dobbins (1999). Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 42(2): 128-38.
- McKenna, M. C., H. S. Waagepetersen, A. Schousboe and U. Sonnewald (2006). Neuronal and astrocytic shuttle mechanisms for cytosolic-mitochondrial transfer of reducing equivalents: current evidence and pharmacological tools. *Biochem Pharmacol* 71(4): 399-407.
- McVie-Wylie, A. J., D. R. Lamson and Y. T. Chen (2001). Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 72(1): 113-7.
- Meglsson, M. D., P. T. Burch, M. Hoenig, W. L. Chick and F. M. Matschinsky (1983). Identification and significance of glucokinase in transplantable insulinomas. *J Biol Chem* 258(4): 2094-7.
- Meglsson, M. D. and F. M. Matschinsky (1984). New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* 246(1 Pt 1): E1-13.
- Mizuarai, S., S. Miki, H. Araki, K. Takahashi and H. Kotani (2005). Identification of dicarboxylate carrier Slc25a10 as malate transporter in de novo fatty acid synthesis. *J Biol Chem* 280(37): 32434-41.
- Mohlke, K. L., A. D. Skol, L. J. Scott, T. T. Valle, R. N. Bergman, J. Tuomilehto, M. Boehnke and F. S. Collins (2005). Evaluation of SLC2A10 (GLUT10) as a candidate gene for type 2 diabetes and related traits in Finns. *Mol Genet Metab* 85(4): 323-7.
- Mulder, H., L. S. Holst, H. Svensson, E. Degerman, F. Sundler, B. Ahren, P. Rorsman and C. Holm (1999). Hormone-sensitive lipase, the rate-limiting enzyme in triglyceride hydrolysis, is expressed and active in beta-cells. *Diabetes* 48(1): 228-32.
- Mulder, H., D. Lu, J. t. Finley, J. An, J. Cohen, P. A. Antinozzi, J. D. McGarry and C. B. Newgard (2001). Overexpression of a modified human malonyl-CoA decarboxylase blocks the glucose-induced increase in malonyl-CoA level but has no impact on insulin secretion in INS-1-derived (832/13) beta-cells. *J Biol Chem* 276(9): 6479-84.

- Mulder, H., S. Yang, M. S. Winzell, C. Holm and B. Ahren (2004). Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* 53(1): 122-8.
- Murin, R., M. Cesar, B. S. Kowtharapu, S. Verleysdonk and B. Hamprecht (2009). Expression of pyruvate carboxylase in cultured oligodendroglial, microglial and ependymal cells. *Neurochem Res* 34(3): 480-9.
- Nagashima, K., A. Takahashi, H. Ikeda, A. Hamasaki, N. Kuwamura, Y. Yamada and Y. Seino (2004). Sulfonylurea and non-sulfonylurea hypoglycemic agents: pharmacological properties and tissue selectivity. *Diabetes Res Clin Pract* 66 Suppl 1: S75-8.
- Narayan, K. M., J. P. Boyle, T. J. Thompson, S. W. Sorensen and D. F. Williamson (2003). Lifetime risk for diabetes mellitus in the United States. *Jama* 290(14): 1884-90.
- Newsholme, P., K. Bender, A. Kiely and L. Brennan (2007). Amino acid metabolism, insulin secretion and diabetes. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1180-6.
- Nicholls, L. I., E. K. Ainscow and G. A. Rutter (2002). Glucose-stimulated insulin secretion does not require activation of pyruvate dehydrogenase: impact of adenovirus-mediated overexpression of PDH kinase and PDH phosphate phosphatase in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 291(4): 1081-8.
- Nilsson, T., V. Schultz, P. O. Berggren, B. E. Corkey and K. Tornheim (1996). Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free Ca²⁺ in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Biochem J* 314 (Pt 1): 91-4.
- Nolan, C. J., J. L. Leahy, V. Delghingaro-Augusto, J. Moibi, K. Soni, M. L. Peyot, M. Fortier, C. Guay, J. Lamontagne, A. Barbeau, E. Przybytkowski, E. Joly, P. Masiello, S. Wang, G. A. Mitchell and M. Prentki (2006a). Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49(9): 2120-30.
- Nolan, C. J., M. S. Madiraju, V. Delghingaro-Augusto, M. L. Peyot and M. Prentki (2006b). Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2: S16-23.
- Nolan, C. J. and M. Prentki (2008). The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 19(8): 285-91.

- Noske, A. B., A. J. Costin, G. P. Morgan and B. J. Marsh (2008). Expedited approaches to whole cell electron tomography and organelle mark-up in situ in high-pressure frozen pancreatic islets. *J Struct Biol* 161(3): 298-313.
- Owen, O. E., S. C. Kalhan and R. W. Hanson (2002). The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J Biol Chem* 277(34): 30409-12.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122): 524-6.
- Palmieri, F. (2004). The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447(5): 689-709.
- Pappan, K. L., Z. Pan, G. Kwon, C. A. Marshall, T. Coleman, I. J. Goldberg, M. L. McDaniel and C. F. Semenkovich (2005). Pancreatic beta-cell lipoprotein lipase independently regulates islet glucose metabolism and normal insulin secretion. *J Biol Chem* 280(10): 9023-9.
- Park, K. S., A. Wiederkehr, C. Kirkpatrick, Y. Mattenberger, J. C. Martinou, P. Marchetti, N. Demareux and C. B. Wollheim (2008). Selective actions of mitochondrial fission/fusion genes on metabolism-secretion coupling in insulin-releasing cells. *J Biol Chem* 283(48): 33347-56.
- Permutt, M. A., J. Wasson and N. Cox (2005). Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest* 115(6): 1431-9.
- Peyot, M. L., J. P. Gray, J. Lamontagne, P. J. Smith, G. G. Holz, S. R. Madiraju, M. Prentki and E. Heart (2009a). Glucagon-like peptide-1 induced signaling and insulin secretion do not drive fuel and energy metabolism in primary rodent pancreatic beta-cells. *PLoS One* 4(7): e6221.
- Peyot, M. L., C. Guay, M. G. Latour, J. Lamontagne, R. Lussier, M. Pineda, N. B. Ruderman, G. Haemmerle, R. Zechner, E. Joly, S. R. Madiraju, V. Poitout and M. Prentki (2009b). Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 284(25): 16848-59.
- Peyot, M. L., C. J. Nolan, K. Soni, E. Joly, R. Lussier, B. E. Corkey, S. P. Wang, G. A. Mitchell and M. Prentki (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(7): 1733-42.

Pi, J., Y. Bai, Q. Zhang, V. Wong, L. M. Floering, K. Daniel, J. M. Reece, J. T. Deeney, M. E. Andersen, B. E. Corkey and S. Collins (2007). Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56(7): 1783-91.

Pipeleers, D. G., F. C. Schuit, P. A. in't Veld, E. Maes, E. L. Hooghe-Peters, M. Van de Winkel and W. Gepts (1985). Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release. *Endocrinology* 117(3): 824-33.

Poitout, V. and R. P. Robertson (2002). Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143(2): 339-42.

Pongratz, R. L., R. G. Kibbey, G. I. Shulman and G. W. Cline (2007). Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *J Biol Chem* 282(1): 200-7.

Porte, D., Jr. (2001). Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes Metab Res Rev* 17(3): 181-8.

Poulsen, P., K. O. Kyvik, A. Vaag and H. Beck-Nielsen (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia* 42(2): 139-45.

Prentki, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol* 134(3): 272-86.

Prentki, M., E. Joly, W. El-Assaad and R. Roduit (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. and S. R. Madiraju (2008). Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29(6): 647-76.

Prentki, M. and C. J. Nolan (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116(7): 1802-12.

- Prentki, M., K. Tornheim and B. E. Corkey (1997). Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 *Suppl* 2: S32-41.
- Prentki, M., S. Vischer, M. C. Glennon, R. Regazzi, J. T. Deeney and B. E. Corkey (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.
- Prokopenko, I., M. I. McCarthy and C. M. Lindgren (2008). Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet* 24(12): 613-21.
- Proks, P., F. Reimann, N. Green, F. Gribble and F. Ashcroft (2002). Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes* 51 *Suppl* 3: S368-76.
- Reinbothe, T. M., R. Ivarsson, D. Q. Li, O. Niazi, X. Jing, E. Zhang, L. Stenson, U. Bryborn and E. Renstrom (2009). Glutaredoxin-1 mediates NADPH-dependent stimulation of calcium-dependent insulin secretion. *Mol Endocrinol* 23(6): 893-900.
- Rhee, S. G. (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312(5782): 1882-3.
- Robertson, R. P. and J. S. Harmon (2006). Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med* 41(2): 177-84.
- Roduit, R., P. Masiello, S. P. Wang, H. Li, G. A. Mitchell and M. Prentki (2001). A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes* 50(9): 1970-5.
- Roduit, R., C. Nolan, C. Alarcon, P. Moore, A. Barbeau, V. Delghingaro-Augusto, E. Przybykowski, J. Morin, F. Masse, B. Massie, N. Ruderman, C. Rhodes, V. Poitout and M. Prentki (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.
- Rognstad, R. and J. Katz (1979). Effects of 2,4-dihydroxybutyrate on lipogenesis in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 254(23): 11969-72.
- Ronnebaum, S. M., O. Ilkayeva, S. C. Burgess, J. W. Joseph, D. Lu, R. D. Stevens, T. C. Becker, A. D. Sherry, C. B. Newgard and M. V. Jensen (2006). A pyruvate cycling

- pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 281(41): 30593-602.
- Ronnebaum, S. M., M. V. Jensen, H. E. Hohmeier, S. C. Burgess, Y. P. Zhou, S. Qian, D. MacNeil, A. Howard, N. Thornberry, O. Ilkayeva, D. Lu, A. D. Sherry and C. B. Newgard (2008). Silencing of cytosolic or mitochondrial isoforms of malic enzyme has no effect on glucose-stimulated insulin secretion from rodent islets. *J Biol Chem* 283(43): 28909-17.
- Rorsman, P. (1997). The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40(5): 487-95.
- Rorsman, P. and E. Renstrom (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 46(8): 1029-45.
- Rose, C. S., G. Andersen, Y. H. Hamid, C. Glumer, T. Drivsholm, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, O. Pedersen and T. Hansen (2005). Studies of relationships between the GLUT10 Ala206Thr polymorphism and impaired insulin secretion. *Diabet Med* 22(7): 946-9.
- Rubi, B., H. Ishihara, F. G. Hegardt, C. B. Wollheim and P. Maechler (2001). GAD65-mediated glutamate decarboxylation reduces glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 276(39): 36391-6.
- Ruderman, N. and M. Prentki (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3(4): 340-51.
- Rung, J., S. Cauchi, A. Albrechtsen, L. Shen, G. Rocheleau, C. Cavalcanti-Proenca, F. Bacot, B. Balkau, A. Belisle, K. Borch-Johnsen, G. Charpentier, C. Dina, E. Durand, P. Elliott, S. Hadjadj, M. R. Jarvelin, J. Laitinen, T. Lauritzen, M. Marre, A. Mazur, D. Meyre, A. Montpetit, C. Pisinger, B. Posner, P. Poulsen, A. Pouta, M. Prentki, R. Ribel-Madsen, A. Ruokonen, A. Sandbaek, D. Serre, J. Tichet, M. Vaxillaire, J. F. Wojtaszewski, A. Vaag, T. Hansen, C. Polychronakos, O. Pedersen, P. Froguel and R. Sladek (2009). Genetic variant near *IRS1* is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet*.
- Saggerson, D. (2008). Malonyl-CoA, a key signaling molecule in mammalian cells. *Annu Rev Nutr* 28: 253-72.

- Sato, Y., T. Aizawa, M. Komatsu, N. Okada and T. Yamada (1992). Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* *41*(4): 438-43.
- Sato, Y., M. Anello and J. C. Henquin (1999). Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive K^{+} channels in beta cells. *Endocrinology* *140*(5): 2252-7.
- Sato, Y. and J. C. Henquin (1998). The K^{+} -ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose: in search of the underlying mechanism. *Diabetes* *47*(11): 1713-21.
- Saxena, R., B. F. Voight, V. Lyssenko, N. P. Burtt, P. I. de Bakker, H. Chen, J. J. Roix, S. Kathiresan, J. N. Hirschhorn, M. J. Daly, T. E. Hughes, L. Groop, D. Altshuler, P. Almgren, J. C. Florez, J. Meyer, K. Ardlie, K. Bengtsson Bostrom, B. Isomaa, G. Lettre, U. Lindblad, H. N. Lyon, O. Melander, C. Newton-Cheh, P. Nilsson, M. Orho-Melander, L. Rastam, E. K. Speliotes, M. R. Taskinen, T. Tuomi, C. Guiducci, A. Berglund, J. Carlson, L. Gianniny, R. Hackett, L. Hall, J. Holmkvist, E. Laurila, M. Sjogren, M. Sterner, A. Surti, M. Svensson, R. Tewhey, B. Blumenstiel, M. Parkin, M. Defelice, R. Barry, W. Brodeur, J. Camarata, N. Chia, M. Fava, J. Gibbons, B. Handsaker, C. Healy, K. Nguyen, C. Gates, C. Sougnez, D. Gage, M. Nizzari, S. B. Gabriel, G. W. Chirn, Q. Ma, H. Parikh, D. Richardson, D. Ricke and S. Purcell (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* *316*(5829): 1331-6.
- Scheepers, A., H. G. Joost and A. Schurmann (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* *28*(5): 364-71.
- Schuit, F., A. De Vos, S. Farfari, K. Moens, D. Pipeleers, T. Brun and M. Prentki (1997). Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *J Biol Chem* *272*(30): 18572-9.
- Sekine, N., V. Cirulli, R. Regazzi, L. J. Brown, E. Gine, J. Tamarit-Rodriguez, M. Girotti, S. Marie, M. J. MacDonald, C. B. Wollheim and et al. (1994). Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *J Biol Chem* *269*(7): 4895-902.
- Sener, A. and W. J. Malaisse (1980). L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* *288*(5787): 187-9.

- Shankar, R. R., Y. Wu, H. Q. Shen, J. S. Zhu and A. D. Baron (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49(5): 684-7.
- Shapiro, H., S. Shachar, I. Sekler, M. Hershinkel and M. D. Walker (2005). Role of GPR40 in fatty acid action on the beta cell line INS-1E. *Biochem Biophys Res Commun* 335(1): 97-104.
- Sibson, N. R., G. F. Mason, J. Shen, G. W. Cline, A. Z. Herskovits, J. E. Wall, K. L. Behar, D. L. Rothman and R. G. Shulman (2001). In vivo (¹³C) NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J Neurochem* 76(4): 975-89.
- Skelly, R. H., B. Wicksteed, P. A. Antinozzi and C. J. Rhodes (2001). Glycerol-stimulated proinsulin biosynthesis in isolated pancreatic rat islets via adenoviral-induced expression of glycerol kinase is mediated via mitochondrial metabolism. *Diabetes* 50(8): 1791-8.
- Sladek, R., G. Rocheleau, J. Rung, C. Dina, L. Shen, D. Serre, P. Boutin, D. Vincent, A. Belisle, S. Hadjadj, B. Balkau, B. Heude, G. Charpentier, T. J. Hudson, A. Montpetit, A. V. Pshezhetsky, M. Prentki, B. I. Posner, D. J. Balding, D. Meyre, C. Polychronakos and P. Froguel (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130): 881-5.
- Stanley, C. A., Y. K. Lieu, B. Y. Hsu, A. B. Burlina, C. R. Greenberg, N. J. Hopwood, K. Perlman, B. H. Rich, E. Zammarchi and M. Poncz (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 338(19): 1352-7.
- Stein, D. T., V. Esser, B. E. Stevenson, K. E. Lane, J. H. Whiteside, M. B. Daniels, S. Chen and J. D. McGarry (1996). Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest* 97(12): 2728-35.
- Stein, D. T., B. E. Stevenson, M. W. Chester, M. Basit, M. B. Daniels, S. D. Turley and J. D. McGarry (1997). The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J Clin Invest* 100(2): 398-403.
- Steneberg, P., N. Rubins, R. Bartoov-Shifman, M. D. Walker and H. Edlund (2005). The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* 1(4): 245-58.

- Sterling, G. H. and J. J. O'Neill (1978). Citrate as the precursor of the acetyl moiety of acetylcholine. *J Neurochem* 31(2): 525-30.
- Stolar, M. W. and R. J. Chilton (2003). Type 2 diabetes, cardiovascular risk, and the link to insulin resistance. *Clin Ther* 25 *Suppl B*: B4-31.
- Straub, S. G., R. F. James, M. J. Dunne and G. W. Sharp (1998). Glucose activates both K(ATP) channel-dependent and K(ATP) channel-independent signaling pathways in human islets. *Diabetes* 47(5): 758-63.
- Straub, S. G. and G. W. Sharp (2002). Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18(6): 451-63.
- Strowski, M. Z., R. M. Parmar, A. D. Blake and J. M. Schaeffer (2000). Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141(1): 111-7.
- Stumvoll, M., B. J. Goldstein and T. W. van Haefen (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365(9467): 1333-46.
- Swinnen, J. V., K. Brusselmans and G. Verhoeven (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(4): 358-65.
- Szutowicz, A., J. Kabata and H. Bielarczyk (1982). The contribution of citrate to the synthesis of acetyl units in synaptosomes of developing rat brain. *J Neurochem* 38(5): 1196-204.
- Szutowicz, A. and W. Lysiak (1980). Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain. *J Neurochem* 35(4): 775-85.
- Tarasov, A., J. Dusonchet and F. Ashcroft (2004). Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes* 53 *Suppl 3*: S113-22.
- Tattersall, R. B. and S. S. Fajans (1975). A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24(1): 44-53.

- Thorens, B., H. K. Sarkar, H. R. Kaback and H. F. Lodish (1988). Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55(2): 281-90.
- Tiedge, M., S. Lortz, J. Drinkgern and S. Lenzen (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46(11): 1733-42.
- Tornheim, K. (1997). Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion? *Diabetes* 46(9): 1375-80.
- Tuomilehto, J., J. Lindstrom, J. G. Eriksson, T. T. Valle, H. Hamalainen, P. Ilanne-Parikka, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Rastas, V. Salminen and M. Uusitupa (2001). Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 344(18): 1343-50.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552(Pt 2): 335-44.
- Unger, R. H. (1991). Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* 251(4998): 1200-5.
- Valera, A., G. Solanes, J. Fernandez-Alvarez, A. Pujol, J. Ferrer, G. Asins, R. Gomis and F. Bosch (1994). Expression of GLUT-2 antisense RNA in beta cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem* 269(46): 28543-6.
- van de Werve, G., A. Lange, C. Newgard, M. C. Mechlin, Y. Li and A. Berteloot (2000). New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose 6-phosphatase system. *Eur J Biochem* 267(6): 1533-49.
- Voet, D. and J. G. Voet. (1995). Biochemistry. United States: John Wiley & Sons Inc., 1360 p.
- Wang, H. and P. B. Iynedjian (1997). Modulation of glucose responsiveness of insulinoma beta-cells by graded overexpression of glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4372-7.
- Wang, Q., L. Jiang, J. Wang, S. Li, Y. Yu, J. You, R. Zeng, X. Gao, L. Rui, W. Li and Y. Liu (2009). Abrogation of hepatic ATP-citrate lyase protects against fatty liver and

- ameliorates hyperglycemia in leptin receptor-deficient mice. *Hepatology* 49(4): 1166-75.
- Watkins, D. T. and M. Moore (1977). Uptake of NADPH by islet secretion granule membranes. *Endocrinology* 100(5): 1461-7.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5): 1047-53.
- Wilson, J. E. (1995). Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 126: 65-198.
- Winzell, M. S., K. Strom, C. Holm and B. Ahren (2006). Glucose-stimulated insulin secretion correlates with beta-cell lipolysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16 *Suppl 1*: S11-6.
- Xu, J., J. Han, Y. S. Long, P. N. Epstein and Y. Q. Liu (2008a). The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 51(11): 2022-30.
- Xu, J., J. Han, Y. S. Long, J. Lock, G. C. Weir, P. N. Epstein and Y. Q. Liu (2008b). Malic enzyme is present in mouse islets and modulates insulin secretion. *Diabetologia* 51(12): 2281-9.
- Yaney, G. C., V. Schultz, B. A. Cunningham, G. A. Dunaway, B. E. Corkey and K. Tornheim (1995). Phosphofructokinase isozymes in pancreatic islets and clonal beta-cells (INS-1). *Diabetes* 44(11): 1285-9.
- Yasuda, K., Y. Yamada, N. Inagaki, H. Yano, Y. Okamoto, K. Tsuji, H. Fukumoto, H. Imura, S. Seino and Y. Seino (1992). Expression of GLUT1 and GLUT2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes* 41(1): 76-81.
- Yorifuji, T., J. Muroi, A. Uematsu, H. Hiramatsu and T. Momoi (1999). Hyperinsulinism-hyperammonemia syndrome caused by mutant glutamate dehydrogenase accompanied by novel enzyme kinetics. *Hum Genet* 104(6): 476-9.
- Zhang, S. and K. H. Kim (1998). Essential role of acetyl-CoA carboxylase in the glucose-induced insulin secretion in a pancreatic beta-cell line. *Cell Signal* 10(1): 35-42.

- Zhou, L. and D. Y. Zhu (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20(4): 223-30.
- Zhou, Y. P., C. G. Ostenson, Z. C. Ling and V. Grill (1995). Deficiency of pyruvate dehydrogenase activity in pancreatic islets of diabetic GK rats. *Endocrinology* 136(8): 3546-51.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter and R. Zechner (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306(5700): 1383-6.
- Zimmet, P., K. G. Alberti and J. Shaw (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414(6865): 782-7.

Références provenant d'Internet :

Site web de l'Association Canadienne du Diabète (CDA), consulté le 19 mai 2009.

a) http://www.diabetes.ca/files/PrevalanceandCostFR_D3.pdf

b) http://www.diabetes.ca/files/DiabetesFrench_D3.pdf

Annexe 1

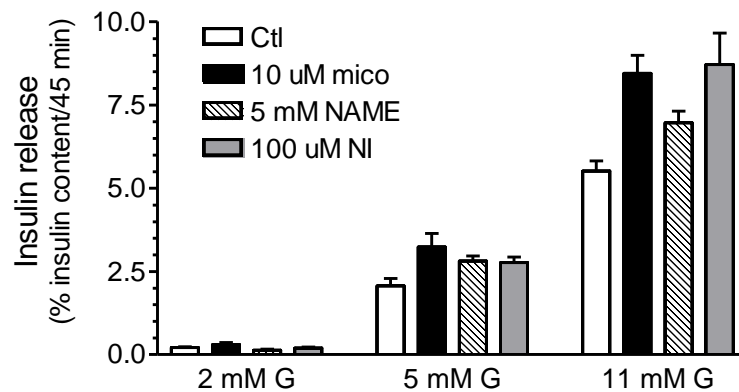


Figure 15 : L'inhibition de la nNOS stimule la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Résultats préliminaires : Les cellules INS 832/13 ont été incubées à 2, 5 ou 10 mM glucose en absence (ctl) ou en présence de différents inhibiteurs de la nNOS, soit le miconazole (mico), le nitro-L-arginine méthyl ester (NAME) ou le nitroindazole (NI). Les niveaux d'insuline sécrétés ont été normalisés par le contenu en insuline des cellules.