Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche des mécanismes conduisant à l'importation de glucose dans des préadipocytes 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée: rôle dans l'apparition des triglycérides

Gilson, Audrey

Award date:
2004

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

Recherche des mécanismes conduisant à l'importation de glucose dans des préadipocytes 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée: rôle dans l'apparition de triglycérides

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Audrey GILSON

Septembre 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : + 32(0)81.72.44 – Téléfax= + 32(0)81.72.4420
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be
http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Recherche des mécanismes conduisant à l'importation de glucose dans des préadipocytes 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée : rôle dans l'apparition de triglycérides

GILSON Audrey

Résumé

La conséquence ultime de l'inhibition de l'activité bioénergétique des mitochondries est une inhibition des phosphorylations oxydatives dans la cellule. Parmi la multitude de symptomes observés dans les syndromes causés par des perturbations de l'activité bioénergétique des mitochondries, on retrouve une perturbation du métabolisme des lipides. La cellule eucaryote de mammifère est capable de répondre à un tel dysfonctionnement et une communication moléculaire rétrograde médiée par les radicaux libres de l'oxygène et/ou le calcium s'établit entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. Au laboratoire, nous étudions la réponse de cellules préadipocytaires (3T3-L1) à une inhibition des phosphorylations oxydatives mitochondriales induite par un traitement en présence d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire. Dans ces conditions, on observe un phénotype cellulaire caractérisé par l'accumulation de nombreuses petites vésicules de triglycérides dans le cytosol et une augmentation de l'incorporation du glucose dans les cellules.
Dans ce travail, nous avons étudié le transport de glucose induit par un traitement des cellules à l'antimycine A. Nous montrons que l'augmentation de l'incorporation de glucose et l'accumulation de triglycérides dans les cellules présentant un déficit énergétique sont médiées par un processus dépendant du calcium et non des radicaux libres. Nous montrons également et caractérisons un rôle de la voie PI3-K/Akt1/GSK3β dans l'incorporation de glucose par des 3T3-L1 dont la mitochondrie est inhibée. Finalement, le rôle du glucose dans l'apparition de triglycérides dans ces conditions est double : 1) du [^{14}C]-glucose incorporé dans la cellule est converti en triglycérides et 2) il active ChREBP, un facteur de transcription qui contrôle l'expression de gènes lipogéniques dans les cellules incubées en présence de l'inhibiteur des phosphorylations oxydatives.
Nous avons donc contribué à mieux comprendre les mécanismes par lesquels le glucose entre dans les préadipocytes 3T3-L1 présentant un dysfonctionnement mitochondrial et nous avons montré que ce glucose est responsable de l'accumulation et de la formation de triglycérides dans des préadipocytes incubés en présence d'un inhibiteur métabolique de l'activité mitochondriale.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Septembre 2004
Promoteur: Dr. T. Arnould

C'est en ce jour que m'est donné la joie de remercier au sein de cette noble assemblée, toutes les personnes (ou presque...) qui, d'une manière ou d'une autre ont contribué à l'aboutissement de ces quatre années d'étude.

Merci à Thierry Arnould dont la renommée qui entoure sa légitime compétence dispense de tous commentaires et de toutes éloges qui ne rendraient qu'imparfaitement l'estime que nous lui tenons tous.

Merci à Sébastien, cordial, stimulant qui, inlassablement m' a aidée dans mon travail avec patience et efficacité.

J'adresse toute ma reconnaissance à Audrey, Aurélia, Sylvianne, Jerôme, Jean-Phi, Nihale pour leurs encouragements dans les moments où j'en avais besoin.

Merci à Nancy pour sa contribution généreuse et spontanée de la soirée du 23 août.

Une attention toute particulière et une immense gratitude à ma Choupi pour sa présence de tous de les instants et son aide précieuse durant ces quatre années.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et Mika qui ont enduré avec patience mes nombreux états d'âme et qui n'ont jamais failli à me soutenir dans les moments de doute...

Merci à tous, Audrey.

LISTE DES ABREVIATIONS

$\Delta\psi m$	Potentiel de membrane mitochondrial
AA	Antimycine A
aa	acide aminé
ACC	Acetyl-Coenzyme A Carboxylase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine Diphosphate
ADRP	Adipose Differenciation-Related Protein
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléoside
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
AMPKK	AMP-activated Protein Kinase Kinase
AP-1	Activating Protein-1
ARN r	Acide RiboNucléique ribosomal
ARN t	Acide RiboNucléique de transfert
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATP	Adénosine Triphosphate
BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N'N'-tetraacetic acid
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumine
C/EBPα	CCAAT/Enhancer-Binding Protein α
CACT	Carnitine Acyl-Carnitine Translocase
CaM	Calmodulin
CaMK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase
CaMKK	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase
CAP	Cbl-Associated Protein
ChRE	Carbohydrate Responsive Element
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMV	CytoMégaloVirus
CoA	Coenzyme A
cpm	coups par minute
CPT	Carnitine Palmitoyl Transférase
CREB	cAMP-Responsive Element-Binding protein
Cu/Zn SOD	Cuivre/Zinc SuperOxyde Dismutase
DAG	DiAcylGlycerol
DHAP	Dihydroxy-Acétonephosphate
DHAPAT	Dihydroxyacétone Phosphate-Acyl Transférase
DHG	Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose
DO	Densité Optique
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

EGCG	Epigallocatéchine-Gallate
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetra Acetic acid
eNOS	endothelial Nitric-Oxide Synthase
ERK	Extracellular Regulated Kinase
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FACS	Fatty Acyl-CoA Synthetase
$FADH_2$	Flavine Adenine Dinucleotide (réduit)
FAS	Fatty Acid Synthase
FAT	Fatty Acid Translocase
FATP	Fatty Acid Transporter Protein
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone
GLUT	Glucose Transporter
GPAT	Glycérol-3-Phosphate-Acyl Transférase
GPD	Glycérol-3Phosphate Déshydrogénase
GPX	GSH Peroxydase
Grb 2	Growth factor receptor bound protein 2
GS	Glycogen Synthase
GSH	Gluthatione
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
GSV	GLUT 4 Storage Vesicles
H^+	Proton
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HDL	High Density Lipoprotein
HRP	Horse Radish Peroxydase
IF	Immuno-Fluorescence
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL	Interleukine
IP	Inositol Phosphate
IRS	Insulin Receptor Substrate
JNK	cJun NH_2-terminal Kinase
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LHON	Leber's Hereditary Optic Neuropathy
L-PK	Liver-Pyruvate Kinase
LPL	LipoProtein Lipase
LSM	Lipomatose Symétrique Multiple
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDM	Mitochondrial Diabetes Mellitus
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers

MnSOD	Manganese SuperOxide Dismutase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycine
NAC	N-Acetyl-L-Cystéine
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NLS	Nuclear Localisation Sequence
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDH	Pyruvate Deshydrogenase
PDK	Phosphatidyl inositol Dependent Kinase
PFA	Paraformaldéhyde
PFK	PhosphoFructoKinase
PH	Pleckstrin Homology
PI-3 K	Phosphatidyl Inositol–3 Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIG	Phosphoinositolglycans
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLC	PhosphoLipase C
PP2C	Protein Phosphatase 2C
PTB	PhosphoTyrosine Binding
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
PVDF	Polyvinylidènedifluoride
RE	Réticulum Endoplasmique
RLU	Relative Light Units
RNS	Reactive Nitrogen Species
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodine Receptor
SCAP	SREBP Cleavage Activating Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SH2	Src Homology 2
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide Attachment protein Receptor
Sp1	Specificity protein 1
SRE	Sterol Regulatory Element
SREBP	Sterol Responsive Element-Binding Protein
TBS	Tris Buffer Saline
TLC	Thin Layer Chromatography
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Wnt	Wingless-type

TABLE DES MATIERES

I INTRODUCTION *1*

I.1 Les mitochondries et les pathologies associées **1**

I.1.1 Les grandes fonctions mitochondriales 1

I.1.1.1 Cycle de Krebs 1

I.1.1.2 Production d'ATP par les phosphorylations oxydatives 2

I.1.1.3 La β-oxydation des acides gras 2

I.1.1.4 La production de ROS (Reactive Oxygen Species) 3

I.1.1.5 Mitochondrie et homéostasie cellulaire du calcium 3

I.1.2 La communication rétrograde mitochondrie-noyau 4

I.1.3 Pathologies d'origine mitochondriale 5

I.1.4 Pathologies mitochondriales associées à une dérégulation du métabolisme lipidique 6

I.2 Le métabolisme glucidique et lipidique **7**

I.2.1 Importation du glucose dans la cellule 7

I.2.1.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline 7

I.2.1.2 Les transporteurs glucidiques 7

I.2.1.3 Les mécanismes de régulation des transporteurs du glucose 9

I.2.1.3.1 Voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 K) 9

Activation de la PI-3 K par l'insuline 9

Activation de la protéine kinase B (PKB) 10

La glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) 11

Activation de la protéine kinase Cλ (PKCλ) 12

Activation de la p70 S6 kinase 12

I.2.1.3.2 Voie des Cbl/CAP 13

I.2.1.3.3 Voie des p38 -MAPK (mitogen activated protein kinase) 13

I.2.1.3.4 Voie de l'AMPK 14

I.2.2 Métabolisme du glucose 14

I.2.2.1 Le glucose en tant que source d'énergie 14

I.2.2.2 Le glucose en tant que régulateur de l'activité de facteurs de transcription 15

I.2.3 Métabolisme des acides gras et des triglycérides 16

I.2.3.1 Système d'importation des acides gras dans les cellules 16

I.2.3.2 Système d'importation des acides gras dans la mitochondrie 17

I.2.3.2 La β-oxydation mitochondriale des acides gras 17

I.2.3.3 Synthèse cytosolique des acides gras 17

I.2.3.4 Synthèse des triglycérides 18

Contexte de la recherche et objectifs du mémoire *19*

II MATERIEL ET METHODES *21*

II.1 Culture cellulaire et sous-cultures **21**

II.2 Incubations des cellules avec l'inhibiteur des phosphorylations oxydatives **21**

II.3 Coloration des triglycérides à l'Oil Red O **22**

II.4 Dosage des protéines par la méthode de Bradford **22**

II.5 Mesure de l'incorporation de 2-déoxy-[1, 2-^{3}H]-D glucose **22**

II.6 Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale **23**

II.7 Dosage in vitro de l'activité de la PI-3 kinase après immunoprécipitation **24**

II.8 Dosage in vitro de l'activité de la GSK-3β après immunoprécipitation **25**

II.9 Dosage in vitro de l'activité de la PKCλ après immunoprécipitation **26**

II.10 Western Blotting **26**

II.10.1 Préparation des échantillons 27

II.10.2 Séparation des protéines par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) 27

II.10.3 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF par un système d'électrotransfert « semi-dry » 28

II.10.4 Révélation en chémiluminescence 28

II.11 Transfection des cellules 3T3-L1 avec un système rapporteur luciférase répondant à ChREBP **29**

II.12 Recherche de l'effet de l'AMPK sur l'incorporation de glucose **30**

II.13 Mise en évidence de la conversion du glucose en triglycérides **30**

II.14 Analyse statistique des résultats **31**

III RESULTATS ET DISCUSSIONS ***32***

III.1 Recherche de l'implication éventuelle des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale **32**

III.1.1 Effets de la taxifoline et de la L-ergothionéine sur l'accumulation de triglycérides dans des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A 33

III.1.2 Effet de la N-acétyl-L-cystéine sur l'incorporation de glucose par les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A 33

III.2 Etude du rôle de l'AMPK dans la réponse des cellules 3T3-L1 à l'inhibition de l'activité mitochondriale **34**

III.3 Etude du rôle de la voie de la PI-3 K dans la réponse des cellules 3T3-L1 à l'inhibition de l'activité mitochondriale **36**

III.3.1 Mise en évidence de la forme phosphorylée de la protéine IRS-1 par des marquages en immunofluorescence en des observations en microscopie confocale 37

III.3.Recherche de l'abondance de la sous-unité catalytique (p110α) de la PI-3 K par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale 38

III.3.3 Recherche de l'abondance et de la localisation de pAkt par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale 40

III.4 Etude de l'implication de la GSK-3β dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale **43**

III.5 Etude de l'état d'activité de la PKCλ immunoprécipitée à partir de 3T3-L1 préalablement incubées en présence d'antimycine A 44

III.6 Etude de l'importance de l'actine dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale **45**

III.7 Recherche de l'origine métabolique des triglycérides dans des cellules 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée par l'antimycine A **46**

II.7.1 Etude de l'activité transcriptionnelle de ChREBP par transfection des cellules 3T3-L1 avec un système rapporteur luciférase 47

III.7.2 Mise en évidence de la conversion du glucose en triglycérides dans les cellules 3T3-L1 48

IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES ***49***

V BIBLIOGRAPHIE ***53***

I. Introduction

I. Introduction

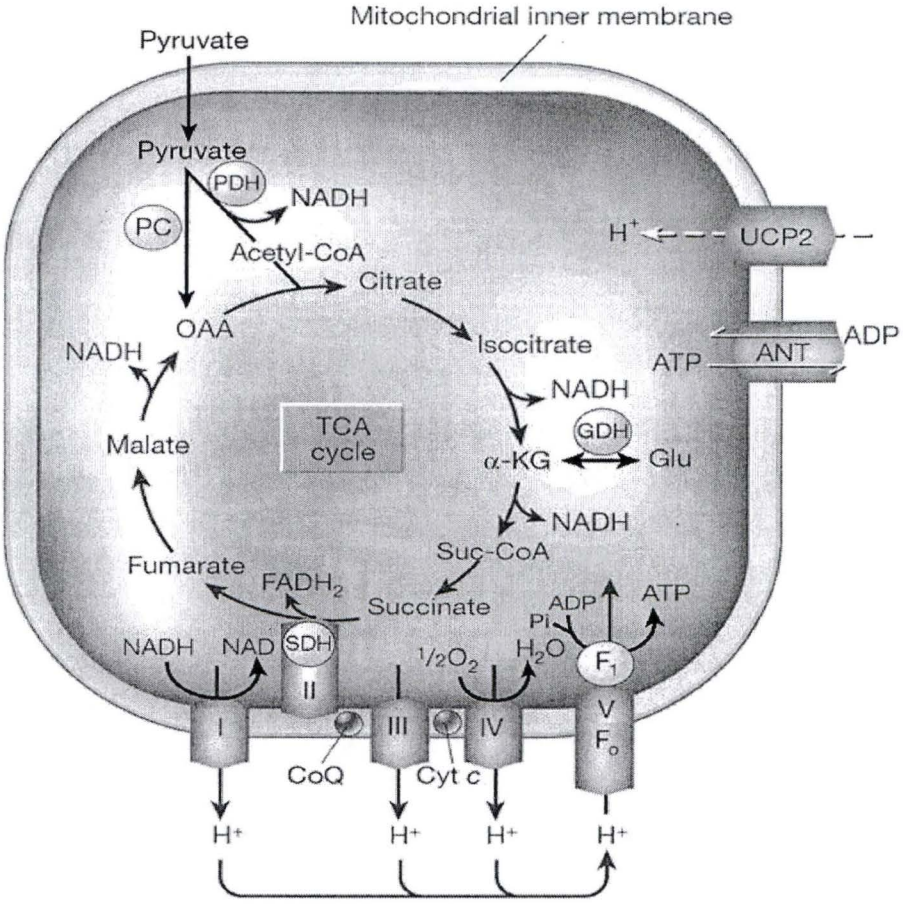


Figure I.1 : Représentation des principales étapes du cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs et de la disposition des 5 complexes assurant les phosphorylations oxydatives. Après son entrée dans la mitochondrie, le pyruvate est oxydé, décarboxylé et estérifié au coenzyme A (CoA), pour générer de l'acétyl-CoA, qui sera complètement oxydé par un cycle de huit réactions successives générant du CO_2, de l'ATP et des cofacteurs réduits (NADH et $FADH_2$) qui donneront respectivement leurs électrons aux complexes I et II de la chaîne des transporteurs d'électrons.

I INTRODUCTION

La mitochondrie est un organite impliqué dans de nombreux processus métaboliques et homéostasiques, dont le plus important est la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives. De nombreux enzymes, transporteurs, substrats et cofacteurs participent à la synthèse d'ATP dans la mitochondrie. Un déficit dans l'un de ces effecteurs de la production d'ATP peut donc conduire à un stress énergétique mitochondrial. Par exemple, de nombreuses mutations ou délétions dans l'ADN mitochondrial ou nucléaire affectant par exemple, un gène codant pour une protéine impliquée dans les phosphorylations oxydatives, ont été identifiées dans la pathogenèse de différentes « maladies mitochondriales ». Parmi celles-ci, certaines sont associées à une dérégulation de l'homéostasie lipidique. Afin d'étudier ce phénomène au niveau cellulaire, nous recherchons, au laboratoire, les modifications du métabolisme lipidique dans des cellules pré-adipocytaires soumises à un stress énergétique mitochondrial.

I.1 Les mitochondries et les pathologies associées

La mitochondrie est un carrefour métabolique important dans la cellule. Sa structure délimitée par une double membrane définissant quatre compartiments (membrane mitochondriale externe, espace intermembranaire, membrane mitochondriale interne, matrice) lui permet d'assurer de nombreuses fonctions très spécialisées. La matrice mitochondriale renferme de nombreux enzymes et cofacteurs impliqués, entre autres, dans des processus oxydatifs comme le cycle de Krebs, la β-oxydation des acides gras et la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives. La matrice mitochondriale renferme également plusieurs molécules (de 2 à 10) d'ADN circulaire double brins localisées dans des régions particulières appelées nucléoïdes (Kanki et al., 2004), ainsi que la machinerie nécessaire pour assurer leur expression (ARN polymérase, ribosomes) et leur réplication (ADN polymérase γ). Chez l'homme, cet ADN mitochondrial (16,6 kb) code pour 13 protéines mitochondriales qui entrent dans la composition de la chaîne des transporteurs d'électrons et de la F_0-F1 ATP synthase, 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et 16S). Toutes les autres protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires, ce qui nécessite une coordination et une communication moléculaire entre les deux génomes. De plus, la mitochondrie est impliquée dans l'homéostasie cellulaire du calcium, dans la formation et/ou la libération de messagers secondaires comme les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS) ou encore dans la mort cellulaire par apoptose, fonction que nous ne détaillerons pas dans la suite de ce travail. Nous allons rappeler très brièvement quelques fonctions mitochondriales essentielles et décrire la participation de cet organite à ces processus cellulaires complexes.

I.1.1 Les grandes fonctions mitochondriales

I.1.1.1 Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques oxyde l'acétyl-CoA généré à partir du pyruvate formé par la glycolyse ou généré à partir de la β-oxydation des acides gras (figure I.1). L'acétyl-CoA est condensé à l'oxaloacétate pour générer du citrate par la citrate synthase. Dans ce cycle, huit réactions successives libèrent différentes molécules : des

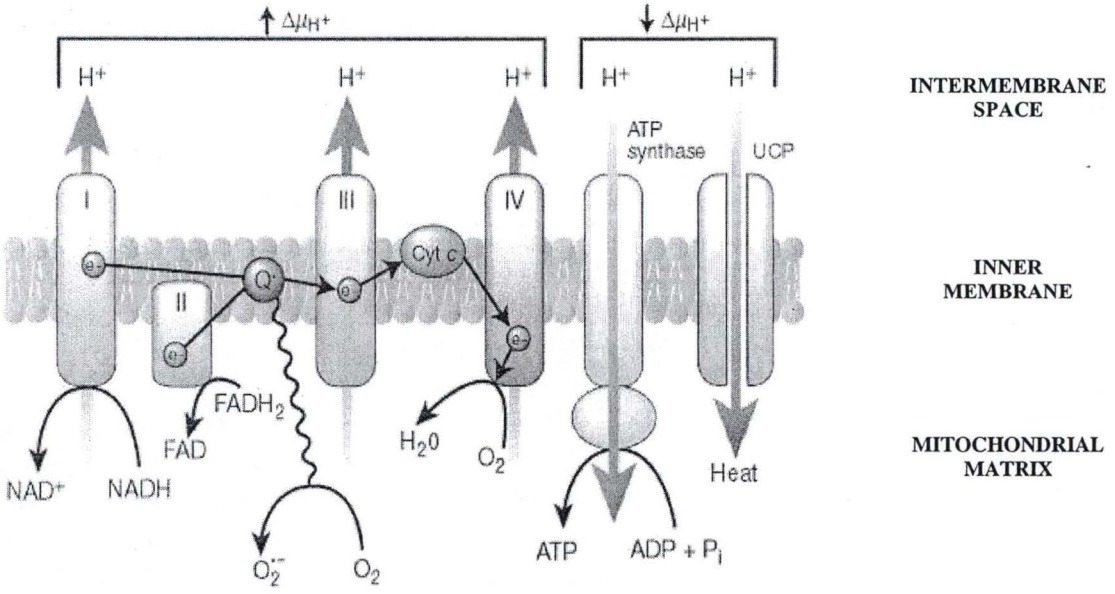


Figure I.2 : Représentation schématique des complexes assurant les phosphorylations oxydatives. Les électrons issus du NADH et du $FADH_2$ sont donnés à la NADH déhydrogénase (I) ou à la succinate déhydrogénase (II), puis à l'ubiquinone (Q). Le complexe ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase (III) transfère les électrons un à un au cytochrome c (Cyt c), qui les cède ensuite à la cytochrome c oxydase (IV) , dans laquelle se trouve le site de réduction de l'oxygène en eau. Les protons (H^+) expulsés par les complexes respiratoires lors du transfert des électrons retournent dans la matrice mitochondriale via l'ATP synthase (V), qui phosphoryle l'ADP en ATP, ou via les UCPs, protéines découplantes, qui permettent le retour des protons dans la matrice mitochondriale sans synthétiser d'ATP et libèrent donc l'énergie du gradient électrochimique sous forme de chaleur.

cofacteurs réduits (NADH et $FADH_2$) qui donneront respectivement leurs électrons aux complexes I et II de la chaîne des transporteurs d'électrons, de l'ATP et du CO_2, la forme la plus oxydée du carbone, qui est libéré dans le sang par diffusion à travers les membranes mitochondriales et plasmiques.

I.1.1.2 Production d'ATP par les phosphorylations oxydatives

Les phosphorylations oxydatives génèrent de l'ATP au moyen de cinq complexes enzymatiques multiprotéiques localisés dans la membrane mitochondriale interne (MMI). Les complexes I à IV constituent la chaîne des transporteurs d'électrons et le complexe V (F_0-F_1 ATP synthase) est le site de la formation d'ATP (figure I.2).

Deux électrons du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) sont captés par le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) et transférés à l'ubiquinone, une petite molécule navette située dans la membrane interne, pour former l'ubiquinol. Les électrons de l'ubiquinol sont ensuite transférés un par un via le complexe III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase) au cytochrome c, situé dans l'espace intermembranaire. Le complexe IV (cytochrome c oxydase) oxyde enfin le cytochrome c et réduit l'oxygène en eau. Ce transfert d'électrons est couplé à une forte libération d'énergie, car le NADH possède un fort pouvoir réducteur (-320 mV) et l'oxygène un fort pouvoir oxydant (+ 810 mV). L'énergie libérée est convertie en un gradient électrochimique de protons ($\Delta\psi m$) et en une différence de pH (ΔpH) générés par l'expulsion de protons dans l'espace intermembranaire par les complexes (I, III et IV) lors du transport des électrons. La F_0-F_1 ATP synthase (complexe V) utilise l'énergie de ce gradient électrochimique de protons pour phosphoryler l'ADP en ATP (Krauss, 2001). Cette production d'ATP peut être inhibée par des molécules bloquant le passage des électrons au niveau de l'un des complexes de la chaîne respiratoire. Par exemple, la stigmatelline, le myxothiazol et l'antimycine A sont des inhibiteurs qui ciblent le complexe III ; leurs mécanismes d'action sont présentés à la figure I.3. L'antimycine A, suite à sa liaison au cytochrome b562, inhibe le transfert d'électrons du cytochrome b562 à l'ubiquinone et favorise donc la capture des électrons directement par l'O_2, qui génère alors des radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot(-)}$). La stigmatelline et le myxothiazol bloquent l'oxydation de l'ubiquinol (QH_2) issu du complexe I ou II. Remarquons que l'antimycine A est connue pour augmenter la production de ROS par la mitochondrie, alors que la production de radicaux libres n'est pas détectable quand le complexe III est inhibé par la stigmatelline ou le myxothiazol (Raha et al., 2000).

I.1.1.3 La β-oxydation des acides gras

La dégradation des lipides par la β-oxydation mitochondriale alimente le cycle de Krebs par la transformation des acides gras en acétyl-CoA et la chaîne des transporteurs d'électrons par la production de NADH et $FADH_2$. La β-oxydation des acides gras est le processus catabolique le plus exergonique dans la cellule ; en effet, l'oxydation d'un gramme de lipides libère plus d'énergie (9 kcal/g) que l'oxydation d'un gramme de glucose (4 kcal/g). De plus, les acides gras à longue chaîne (plus de 20 carbones) représentent une source d'énergie importante nécessaire au fonctionnement de certains tissus tels que les tissus musculaires striés squelettiques et cardiaques. En effet, en conditions physiologiques, les cardiomyocytes de rat retirent essentiellement leur énergie (60-70%) sous forme d'ATP par la β-oxydation des acides gras (Kudo et al., 1995). Cependant, Huss *et al.* montrent que les

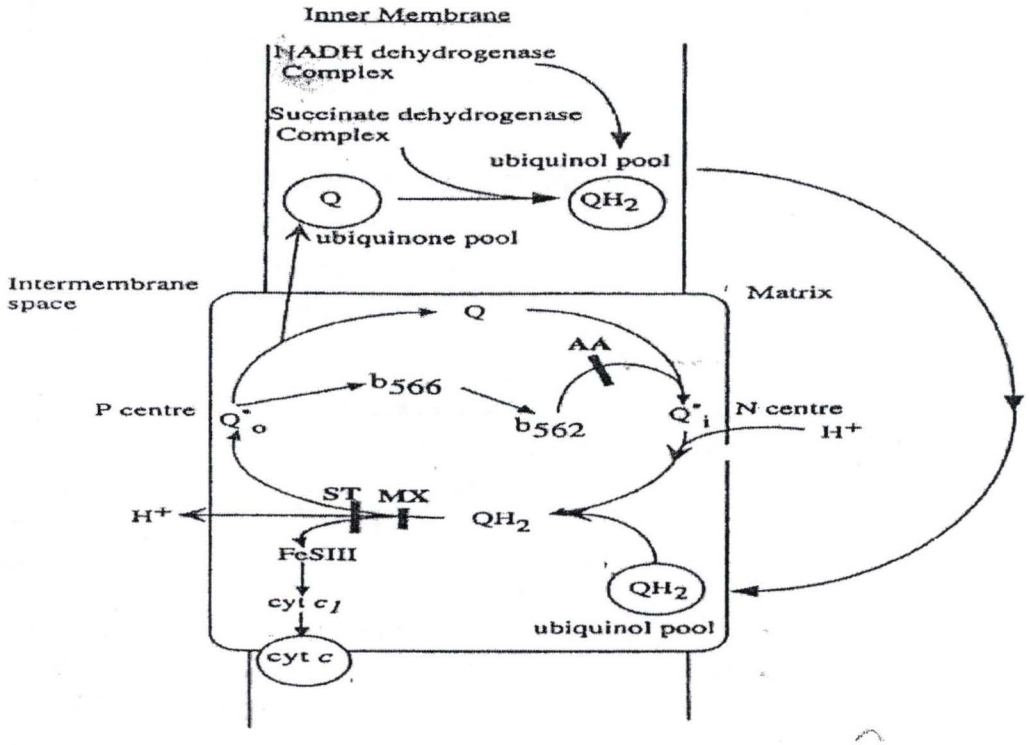


Figure I.3 : Représentation du complexe III et de ses inhibiteurs (Stigmatelline (ST), myxothiazol (MX) et antimycine A (AA)). La stigmatelline et le myxothiazol empêchent l'oxydation de l'ubiquinol (QH_2) issu du complexe I ou II. L'antimycine A inhibe l'oxydation du cytochrome b562 par l'ubiquinone (Q) (D'après Raha *et al.*, 2000).

$$O_2 \xrightarrow{+1\ e^-} \mathbf{O_2^{\cdot(-)}} \xrightarrow[+2\ H^+]{+1\ e^-} \mathbf{H_2O_2} \xrightarrow[+1\ H^+]{Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}} H_2O + \mathbf{OH^{\cdot}} \xrightarrow[+1\ H^+]{+1\ e^-} H_2O$$

Figure I.4 : Quatre réactions de réduction monovalente successives génèrent les différents ROS (en gras). $O_2^{\cdot(-)}$ = radical superoxyde. H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène $OH^{\cdot}$ = radical hydroxyle.

cardiomyocytes s'adaptent aux conditions hypoxiques en favorisant la voie de la glycolyse plutôt que la β-oxydation, dans le but de préserver leur capacité de produire de l'énergie (Huss et al., 2001). Contrairement à la synthèse des acides gras qui est entièrement cytosolique, la β-oxydation se passe dans la matrice mitochondriale (voir point I.2.3.2) et dans les peroxysomes, organites également capables de β-oxyder partiellement les acides gras à longue chaîne.

I.1.1.4 La production de ROS (Reactive Oxygen Species)

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire sont notamment produits lors de la respiration mitochondriale. En effet, une partie des électrons (2-3 %) peuvent s'échapper de la chaîne des transporteurs d'électrons, principalement au niveau des complexes I et III, pour être captés par l'oxygène et former le radical superoxyde $O_2^{\cdot (-)}$ puis par des réactions subséquentes, les autres ROS (figure I.4).

Ces dérivés radicalaires de l'oxygène sont très réactionnels (temps de demi-vie étant égal à 10^{-9} s) et responsables de nombreux dommages cellulaires. En effet, ils sont susceptibles de réagir avec les molécules biologiques possédant des doubles liaisons et induire, entre autres, la peroxydation des lipides, la dénaturation des protéines et l'altération des acides nucléiques (figure I.5). L'ADN mitochondrial est particulièrement exposé et sensible aux ROS en raison de la proximité des sites de production et de l'absence de protéine histone. De plus, les mitochondries ne possèdent pas l'ensemble des systèmes de réparation retrouvés parmi l'ADN nucléaire (Wei, 1998). Les cellules se protègent de ces attaques radicalaires grâce à différentes enzymes anti-oxydantes qui possèdent chacune une fonction spécialisée et des anti-oxydants non enzymatiques comme les vitamines C et E. Les superoxydes dismutases (à Cu/Zn dans le cytosol et à Mn dans la mitochondrie) catalysent la dismutation de 2 $O_2^{\cdot (-)}$ en O_2 et H_2O_2, la catalase décompose 2 H_2O_2 en 2 H_2O et O_2, et la glutathione peroxydase dégrade les peroxydes (H_2O_2, peroxydes lipidiques).

A côté des effets délétères des ROS, de nombreuses études montrent également un rôle potentiel des ROS en tant que messagers secondaires intracellulaires capables d'influencer certains processus cellulaires. Par exemple, les ROS régulent l'activité de certains facteurs de transcription comme NF-κB (nuclear factor-κB), AP-1 (activating protein-1) ou Sp1, sensibles à l'état redox de la cellule (Lavrovsky et al., 2000). Au niveau cellulaire, les ROS participent également au contrôle des mécanismes de prolifération (Torres and Forman, 2003), de différenciation (Kang and Zheng, 2004; Kusmartsev and Gabrilovich, 2003) et d'apoptose (Honda et al., 2004).

I.1.1.5 Mitochondrie et homéostasie cellulaire du calcium

Les mitochondries jouent un rôle important dans l'homéostasie du Ca^{++} cellulaire. La concentration cytosolique en Ca^{++} libre qui, dans des cellules eucaryotes de mammifères varie entre 50 et 150 nM, peut être augmentée par deux grands mécanismes : premièrement par la libération du Ca^{++} à partir de stocks intracellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE) (Hajnoczky et al., 2002), et deuxièmement par un influx de Ca^{++} provenant du milieu extracellulaire par des canaux calciques de la membrane plasmique (Munaron et al., 2004). Lors d'une élévation rapide de la concentration cytosolique en Ca^{++}, les mitochondries accumulent rapidement le Ca^{++}, puis le libère lentement dans le cytosol. Les mitochondries jouent donc un rôle de « tampon » local, qui évite les effets cytotoxiques pro-apoptotiques

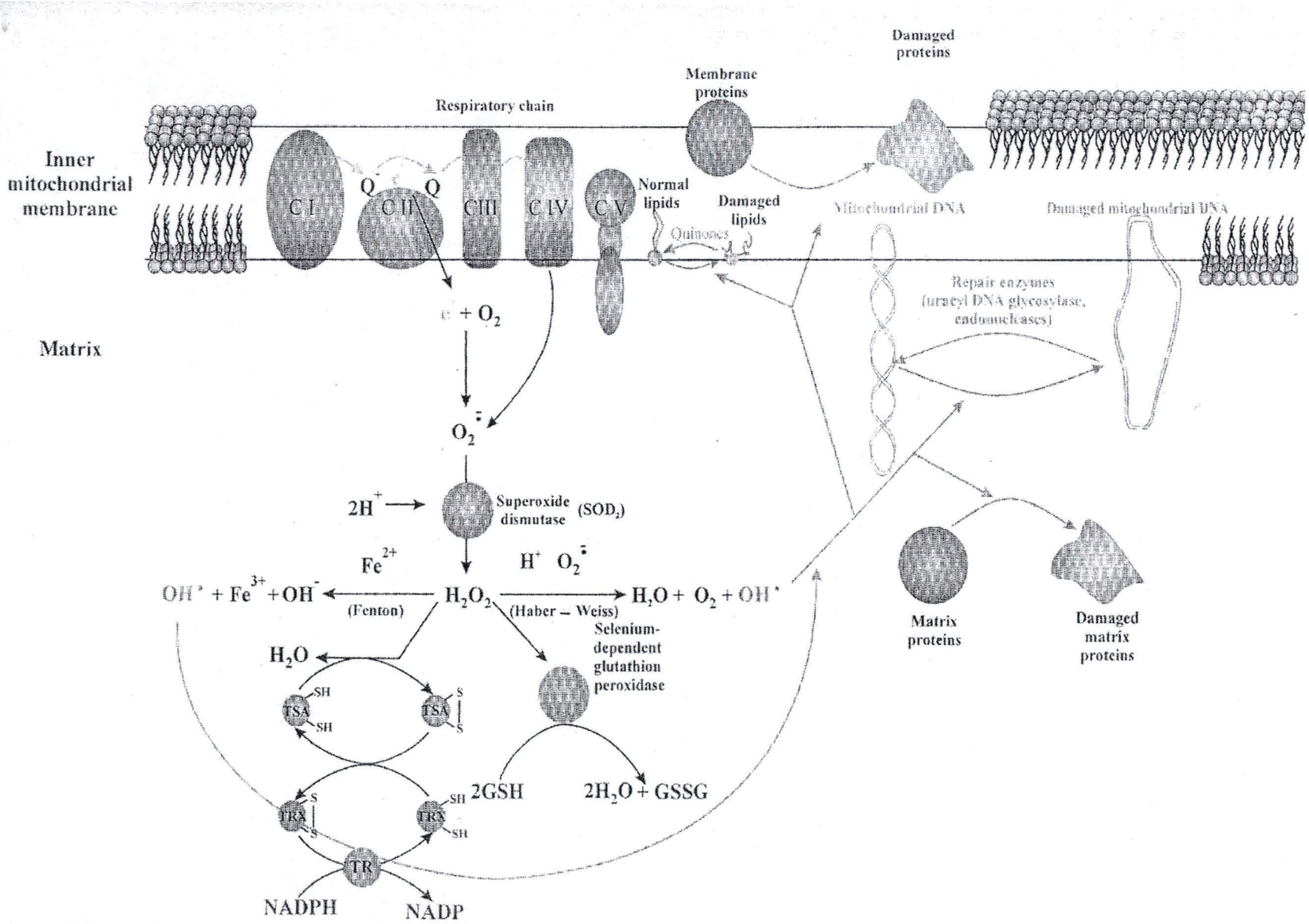


Figure I.5 : Effets des ROS produits par la mitochondrie sur les lipides, protéines et acides nucléiques mitochondriaux (D'après Lestienne, 1999).

(Orrenius et al., 2003) induits par de fortes concentrations en Ca^{++} libre cytosolique. Cependant, même en conditions basales, le Ca^{++} entre dans la mitochondrie par un transporteur de type uniport hautement spécifique, en fonction du gradient électrochimique (Carafoli, 1987). Il est ensuite relargué dans le cytosol par un antiport qui échange un Ca^{++} pour deux Na^{+} ou deux H^{+} (Babcock and Hille, 1998; Gunter and Pfeiffer, 1990).

Le calcium intracellulaire est un messager secondaire important capable de réguler de nombreuses voies de signalisation après s'être fixé sur la calmoduline (CaM), une protéine capable de fixer du calcium sur quatre sites. La fixation du calcium provoque un changement de conformation de la calmoduline qui peut alors se fixer à différentes protéines et réguler leur activité, comme la calpaïne, une cystéine protéase (Blanchard et al., 1996), les protéines chaperonnes calnexine et calreticuline du réticulum endoplasmique (Michalak et al., 2002), ou les CaMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinases) (Colbran et al., 1988). L'activation d'une isoforme de ces enzymes (CaMK IV) par le Ca^{++} est notamment un mécanisme important permettant la réponse adaptative d'une cellule à une inhibition de l'activité mitochondriale (Arnould et al., 2002).

I.1.2 La communication rétrograde mitochondrie-noyau

L'inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale et de la synthèse d'ATP induit un stress énergétique qui oblige la cellule à ralentir son activité métabolique et à modifier l'expression de certains gènes nucléaires suite à l'activation de voies de signalisation intracellulaires. La *réponse adaptative* de la cellule soumise à un stress énergétique implique donc que les mitochondries déficientes communiquent, au niveau moléculaire, leur état d'activité au reste de la cellule en général et au noyau en particulier. Parmi les messagers secondaires participant à l'activation de voies de signalisation, on retrouve l'AMP, le calcium et les ROS.

L'activation de voies de signalisation par les mitochondries non fonctionnelles induit de nombreux changements d'ordre métabolique dans la cellule, soit en régulant l'activité d'enzymes, soit en modifiant l'activité de facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de différents gènes dans le noyau codant pour des protéines mitochondriales ou non. Ce processus s'appelle la *communication rétrograde mitochondrie-noyau.*

Comme nous l'avons vu, la mitochondrie non fonctionnelle modifie donc l'abondance de messagers secondaires capables d'activer différentes voies de signalisation, comme le calcium, qui active par exemple la voie des CaMK (Colbran et al., 1989). La respiration mitochondriale s'accompagne également d'une production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS). Ces dérivés réactionnels de l'oxygène peuvent eux aussi jouer le rôle de messagers secondaires. Dans les adipocytes, les ROS contrôlent notamment la prolifération cellulaire (Carriere et al., 2003) et l'activité des voies relatives aux trois familles des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Erk 1/2, JNKs et p38 MAPKs) (Lennon et al., 2002).

La communication rétrograde mitochondrie-noyau a d'abord été étudiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae rho0* (déplétée en ADNmt) (Liao and Butow, 1993), puis, plus récemment, dans les cellules de mammifères (Arnould et al., 2002; Biswas et al., 1999). Par exemple, dans des cellules soumises à un stress énergétique induit par une déplétion partielle en ADNmt ou par un traitement des cellules avec une molécule découplante (CCCP), par hypoxie ou encore par l'utilisation de drogues ou d'ionophores, on observe une augmentation de la concentration en calcium cytosolique $[Ca^{2+}]_c$ capable de réguler l'expression de nombreux gènes nucléaires par des voies dépendantes de kinases et de phosphatases comme

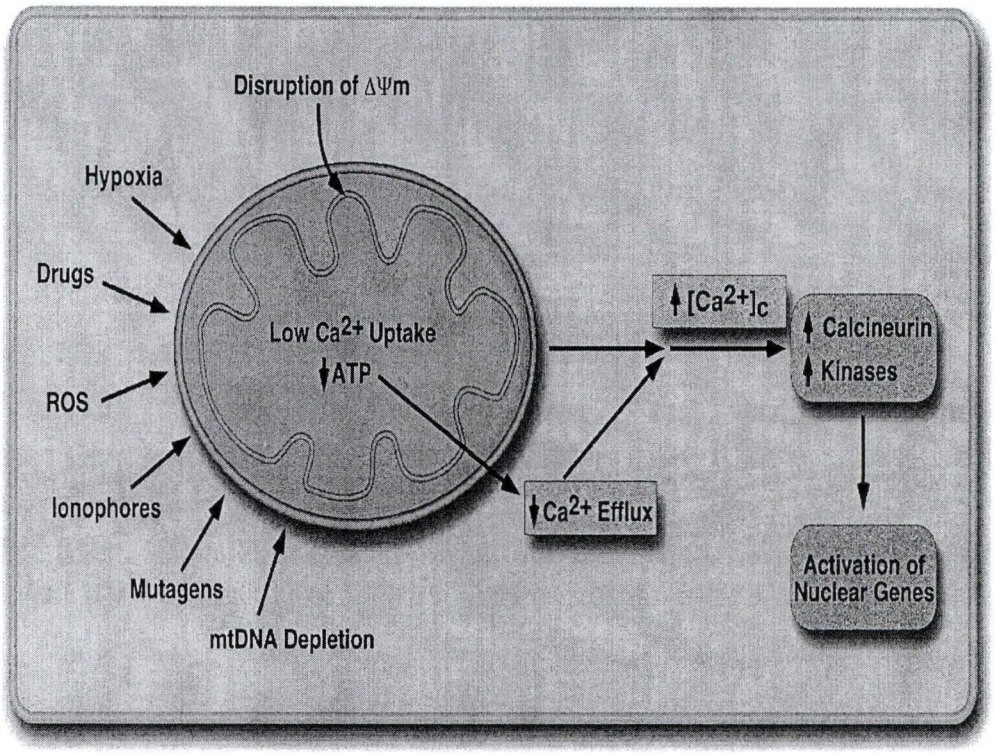


Figure I.6 : Schéma illustrant l'implication d'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre $[Ca^{2+}]_c$ dans la voie de signalisation rétrograde entre les mitochondries et le noyau. La dissipation du potentiel de membrane mitochondrial et la réduction du contenu en ATP induites par des causes aussi variées que l'hypoxie, des drogues, des dérivés radicalaires (ROS), des ionophores ou la déplétion en ADNmt affectent l'homéostasie du calcium. Une augmentation de la concentration en calcium cytosolique active alors la calcineurine et plusieurs kinases (D'après Butow *et al.*, 2004).

la calcineurine (figure I.6). Parmi les gènes surexprimés, on retrouve de nombreux gènes codant des transporteurs au calcium du réticulum endoplasmique comme le récepteur à ryanodine (RyR1) ou des gènes codant pour des protéines stockant le calcium intracellulaire comme la calsequestrine (Amuthan et al., 2002; Biswas et al., 1999). Des travaux réalisés au laboratoire ont également permis de montrer que dans différents modèles cellulaires présentant une déficience mitochondriale (déplétion en ADN mitochondrial ; inhibition des phosphorylations oxydatives; cellules cybrides portant la mutation A8344G dans le génome mitochondrial responsable du syndrome MERRF, voir point I.1.3), une augmentation de la concentration cytosolique en calcium active le facteur de transcription CREB (cAMP-response element-binding protein) phosphorylé par la CaMK IV. L'activation de CREB permet son association avec le facteur de transcription p53, qui induit ensuite l'expression du gène p21, un inhibiteur du cycle cellulaire (Arnould et al., 2002). Dans ce modèle de communication rétrograde, l'activation de CREB et de p53 constitue donc l'un des mécanismes utilisés par la cellule pour répondre au stress énergétique en ralentissant son cycle cellulaire.

Les études *in vitro* de la communication rétrograde initiée par la mitochondrie non fonctionnelle dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial (ou cellules rho0) permettent de mieux comprendre la pathogenèse, au niveau cellulaire, des symptômes associés aux maladies d'origine mitochondriale.

I.1.3 Pathologies d'origine mitochondriale

Chez l'homme, un dysfonctionnement mitochondrial d'ordre énergétique peut avoir plusieurs origines. La plupart des pathologies mitochondriales, une centaine identifiées à l'heure actuelle, sont héréditaires car elles résultent de mutations dans des gènes codant pour des protéines mitochondriales souvent impliquées dans les phosphorylations oxydatives (Graeber and Muller, 1998). Cependant, il existe d'autres formes de maladies mitochondriales provoquées par des agents exogènes tels que certains médicaments anti-rétroviraux qui ont pour effets secondaires d'inhiber la réplication de l'ADN mitochondrial et la synthèse des protéines mitochondriales (Kakuda, 2000).

De nombreuses mutations ponctuelles ou délétions responsables des pathologies mitochondriales ont été identifiées (tableau I.1). La plupart sont situées soit dans l'ADN génomique (maladies à transmission mendélienne), soit dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) (malalies à transmission matrilinéaire) dans des gènes codant pour des protéines de la chaîne des transporteurs d'électrons. Lorsqu'elles touchent l'ADNmt, ces mutations peuvent également survenir dans les gènes codant pour les ARNt et ARNr mitochondriaux.

Les symptômes cliniques engendrés par une mutation affectant un gène codant pour une protéine mitochondriale peuvent être très variés : ils dépendent du tissu atteint et du degré d'hétéroplasmie de cette mutation dans le tissu. Par exemple, le syndrome MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) peut provenir de la substitution d'une guanine en adénine en position 8344 (A8344G) dans le gène codant l'$ARNt^{Lys}$ mitochondrial (Shoffner et al., 1990); cette myopathie accompagnée de crises d'épilepsie se caractérise, dans les cellules musculaires, par l'accumulation de mitochondries sous le sarcolemme. Une forme de diabète (MDM : mitochondrial diabetes mellitus) peut également survenir suite à une mutation dans le gène codant pour une sous-unité des complexes respiratoires I, II ou III (Gerbitz et al., 1996). De plus, une même mutation peut générer des syndromes différents, comme la substitution G14459A dans le gène mitochondrial de la sous-unité 6 du complexe I (ND6) qui peut donner lieu à la maladie de Leber (LHON) ou à la dystonie, selon le degré d'hétéroplasmie (Novotny et al., 1986), ou encore la mutation T8356C (ARN^{Lys}) responsable

MALADIE	CARACTERISTIQUES
Ophtalmoplégie externe progressive chronique (CPEO)	Paralysie des muscles oculaires réduisant la mobilité des yeux et myopathie d'origine mitochondriale.
Dystonie	Mouvements anormaux, rigidité musculaire ; souvent dégénérescence des noyaux gris centraux du cerveau.
Syndrome de Kearns-Sayre (KSS)	Paralysie des muscles oculaires et myopathie, associées à des troubles tels que détérioration de la rétine, maladie cardiaque, surdité, diabète et insuffisance rénale.
Syndrome de Leigh	Perte progressive des capacités motrices et verbales et dégénérescence des noyaux gris centraux ; maladie de l'enfance potentiellement mortelle.
Neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON)	Cécité temporaire ou permanente due à une lésion du nerf optique.
Encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux (MELAS)	Fonctionnement anormal du tissu cérébral entraînant des crises d'épilepsie, des paralysies locales temporaires et une démence, associées à une myopathie mitochondriale et une acidose du sang.
Epilepsie myoclonique et myopathie mitochondriale (MERRF)	Crises d'épilepsie, détérioration des muscles, qui présentent souvent des « fibres rouges en lambeaux » *(ragged-red fibers ou RRF)*, surdité et démence possibles.
Faiblesse musculaire neurogène, ataxie et rétinite pigmentaire (NARP)	Perte de la force et de la coordination musculaire, accompagnée d'une dégénérescence cérébrale locale et d'une détérioration de la rétine.

Tableau I.1 : Liste de quelques maladies provoquées par une mutation ou une délétion au niveau de l'ADN mitochondrial et symptômes associés (D'après Wallace, 1997).

des syndrômes MERRF et MELAS (Masucci et al., 1997). Enfin, des mutations différentes peuvent provoquer le même syndrome, comme dans la maladie de Leber qui peut résulter de quatre substitutions aux positions G3460A (NDI), G11778A (ND4), G14459A (ND6) ou T14484C (ND6) de l'ADN mitochondrial humain (Graeber and Muller, 1998).

Ces considérations soulignent la complexité et la diversité des pathologies mitochondriales. Dans la suite de cette introduction, nous nous focaliserons sur les pathologies mitochondriales associées à une perturbation de la distribution et du métabolisme des graisses.

I.1.4 Pathologies mitochondriales associées à une dérégulation du métabolisme lipidique

Les acides gras, très peu solubles en milieu aqueux, sont principalement transportés dans le sang dans des structures organisées telles que les chylomicrons et les lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL). Ces structures contiennent des compositions et proportions différentes en acides gras estérifiés au glycérol (triglycérides), ou au cholestérol (cholestéryl-ester), du cholestérol libre, ainsi que des protéines (apoprotéines) qui assurent la structure des lipoprotéines et la reconnaissance par des récepteurs exprimés par de nombreux types cellulaires. La LPL (lipoprotein lipase) est une enzyme qui se charge de libérer les acides gras présents dans les lipoprotéines. Les acides gras sont ensuite incorporés par les cellules pour y être oxydés (cardiomyocytes, myocytes,...) ou stockés sous forme de triglycérides et de cholestéryl-ester (adipocytes) (Ginsberg, 1998).

Certaines pathologies d'origine mitochondriale induisent des perturbations dans l'homéostasie lipidique. Dans certains cas, les acides gras peuvent s'accumuler dans le sang (hyperlipidémie) ou dans des tissus non adipeux (comme le cœur ou le muscle), et induire des effets « lipotoxiques » (Unger, 2002).

Par exemple, on observe l'accumulation pathologique de triglycérides dans les muscles squelettiques de patients portant la mutation (A8344G) responsable du syndrome MERRF. Ce syndrome est également associé, dans certains cas, à la lipomatose symétrique multiple (LSM) (Munoz-Malaga et al., 2000; Naumann et al., 1997), une maladie associée à une déficience énergétique mitochondriale (Klopstock et al., 1997) et caractérisée par la formation de « lipomes » contenant des adipocytes blancs atypiques et multivésiculaires au niveau de la nuque et de la partie supérieure du tronc (Zancanaro et al., 1990). Certaines thérapies anti-rétrovirales, mentionnées au point I.1.3, induisent également une redistribution des lipides dans l'organisme (Kakuda, 2000). Ces thérapies combinent généralement des molécules qui ont pour effet secondaire d'inhiber certains processus comme la réplication de l'ADNmt et la maturation de protéines mitochondriales (Brinkman et al., 1999). Ces différentes pathologies suggèrent donc l'existence d'un lien entre l'activité mitochondriale et le métabolisme des lipides. L'accumulation de lipides dans des tissus non adipeux est également observée dans certains types cellulaires soumis à des conditions de stress énergétiques. Par exemple, l'incubation de cardiomyocytes en hypoxie, une condition qui inhibe les phosphorylations oxydatives, induit l'apparition de vésicules cytosoliques de triglycérides liée à une diminution de l'importation mitochondriale des acides gras par la CPT-1 et donc une diminution de leur β-oxydation. Les acides gras s'accumulant dans le cytosol sont alors estérifiés en triglycérides (Huss et al., 2001).

La présence de lipides dans des tissus non adipeux comme le muscle, le foie ou le pancréas peut avoir des conséquences néfastes sur le métabolisme cellulaire et certaines voies de signalisation à la base de ces pathologies. Ces effets dits « lipotoxiques » comprennent

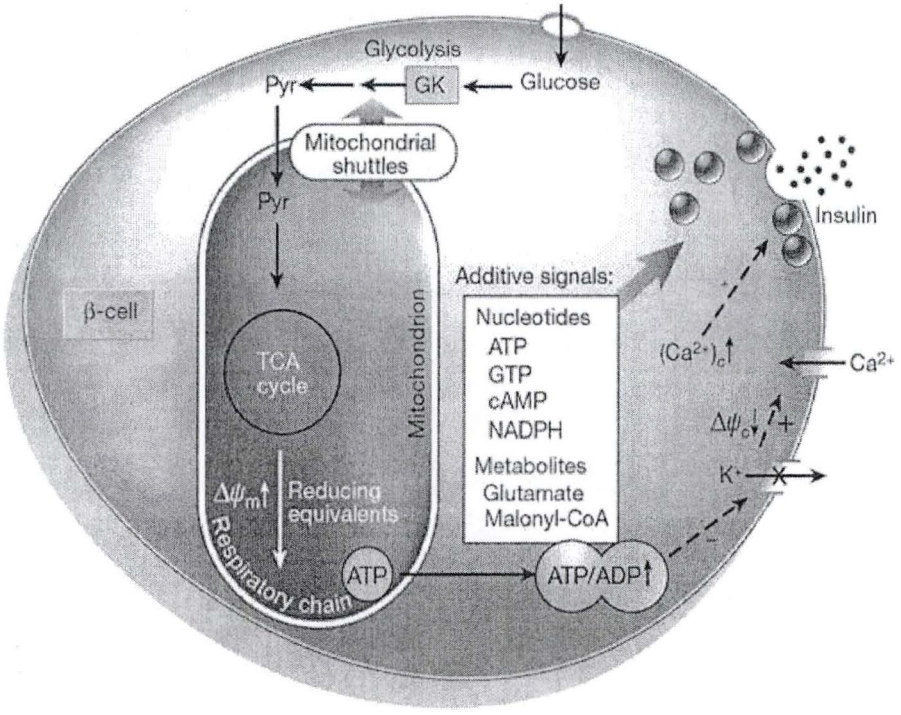


Figure I.7 : Représentation des mécanismes conduisant à la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. L'entrée du glucose dans la cellule induit une augmentation de la quantité d'ATP dans la cellule, responsable de la fermeture de canaux potassiques dans la membrane plasmique et d'une dépolarisation membranaire subséquente. La dépolarisation stimule alors l'entrée du calcium dans la cellule par un canal calcique voltage-dépendant. L'augmentation de concentration intracellulaire en calcium contrôle la sécrétion d'insuline dans les cellules β par un mécanisme d'exocytose.

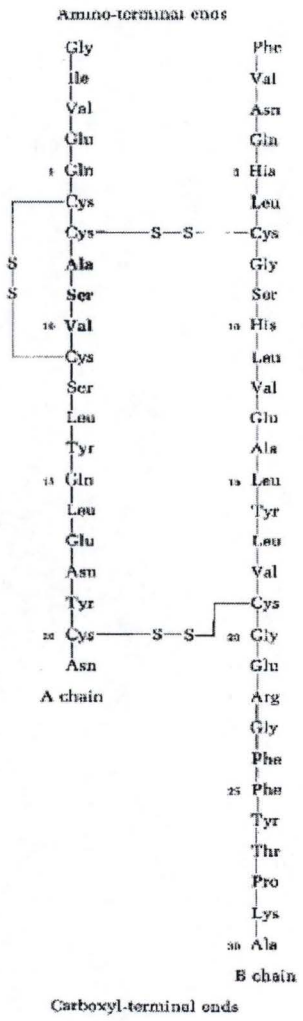


Figure I.8 : Représentation de la structure primaire de l'insuline.

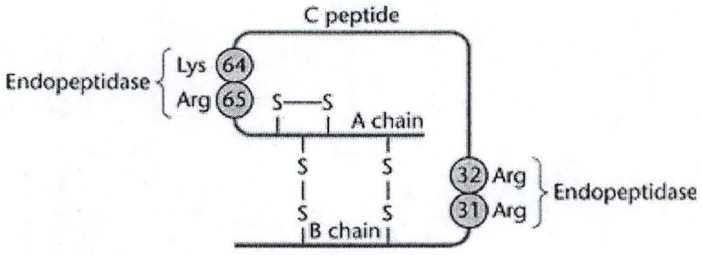


Figure I.9 : L'insuline est une hormone formée après protéolyse partielle libérant deux chaînes peptidiques A et B réunies par deux ponts disulfures et le peptide C.

notamment le phénomène de résistance à l'insuline observé par exemple chez les patients obèses atteints de diabète de type II, dont la lipidémie élevée (taux d'acides gras libres dans le sang) s'accompagne aussi d'une accumulation de lipides dans les cellules β du pancréas (Unger, 1995). La résistance à l'insuline dans le muscle a aussi été associée à une élévation du contenu en lipides dans les myocytes (Blaak, 2003). Nous développerons ce phénomène de résistance à l'insuline au point I.2.1.3.1.

I.2 Le métabolisme glucidique et lipidique

I.2.1 Importation du glucose dans la cellule

I.2.1.1 Biosynthèse et sécrétion de l'insuline

L'insuline est une hormone anabolique essentielle pour la croissance, le développement et le métabolisme du glucose, des protéines et des graisses. Elle est produite et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas en réponse à une élévation de la glycémie (concentration en glucose dans le sang) (Le Roith and Zick, 2001; Virkamaki et al., 1999). Ce phénomène nécessite plusieurs étapes (figure I.7). Tout d'abord, le glucose pénètre dans les cellules β, par diffusion facilitée, à travers le transporteur GLUT 2 (voir point I.2.1.2). Sa métabolisation génère de l'ATP dont la concentration intracellulaire augmente, ce qui entraîne la fermeture de canaux potassiques responsable d'une dépolarisation de la membrane plasmique à l'origine de l'ouverture de canaux à calcium voltage-dépendants. L'entrée du calcium dans la cellules β provoque alors la sécrétion d'insuline dans la circulation sanguine suite à l'exocytose de vésicules contenant l'hormone.

L' insuline est constituée de deux chaînes polypeptidiques A et B reliées entre elles par deux ponts disulfures (figure I.8). Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur, la pro-insuline, transporté dans l'appareil de Golgi (figure I.9). La pro-insuline est alors clivée par deux endopeptidases afin de générer le peptide C et l'insuline, libérés dans le sang à partir de vésicules de sécrétion issues de l'appareil de Golgi. L'insuline peut alors réguler le métabolisme des tissus sensibles à l'insuline (foie, muscle squelettique, tissu adipeux,...), en stimulant notamment l'incorporation de glucose par les cellules et en activant les synthèses de glycogène et de lipides (lipogenèse).

I.2.1.2 Les transporteurs glucidiques

L'entrée du glucose dans les cellules de mammifères à travers la membrane plasmique, imperméable au glucose, est médiée par un système de transport. L'incorporation de glucose par la cellule fait suite, dans de nombreux types cellulaires, à une stimulation insulinique ou est induite par la contraction musculaire et est assurée par les GLUTs (glucose transporters), une famille de transporteurs de glucose, selon un mécanisme de transport facilité. Toutefois, certaines cellules, comme les cellules β des îlots de Langerhans ne répondent pas à une stimulation à l'insuline et incorporent le glucose grâce à un type de transporteur (GLUT 2) qui agit comme un senseur de glucose.

Les GLUTs sont composés de 12 domaines transmembranaires, constitué chacun d'une longueur d'environ 500 acides aminés, et possèdent les extrémités amino- et carboxy-

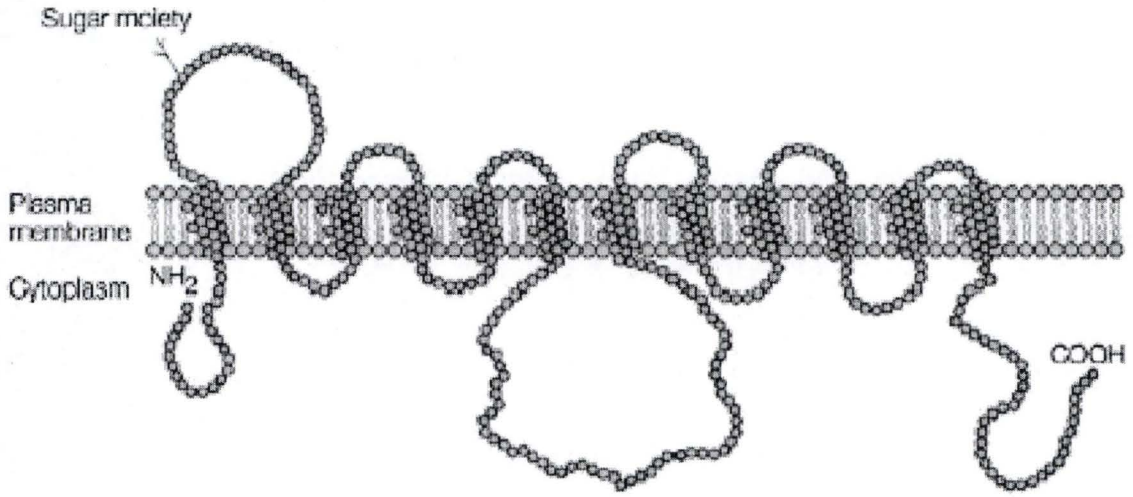


Figure I.10 : Topologie membranaire des transporteurs de glucose GLUT 1 et GLUT 4 (D'après Bryant *et al.*, 1993).

Nom	Distribution tissulaire	Fonctions
GLUT1	Érythrocytes, cellules endothéliales, cerveau, placenta, muscle et tissu adipeux	Transport du glucose basal et à travers la barrière hémato-encéphalique
GLUT2	Foie, cellules bêta du pancréas, intestin, rein	Transport bidirectionnel du glucose dans les hépatocytes. Libère le glucose par les cellules de l'intestin et du rein. Senseur de glucose dans les cellules bêta du pancréas
GLUT3	Humain : cerveau, tissu adipeux, rein, foie, muscle Autres espèces : limitée au cerveau	Transport principal du glucose au niveau des neurones
GLUT4	Muscle squelettique et cardiaque, tissu adipeux blanc et brun	Transport du glucose régulé par l'insuline et la contraction
GLUT5	Intestin, tissu adipeux, muscle, cerveau, rein	Transport du fructose
GLUT6	Pseudogène	----------
GLUT8/ GLUTX1	Blastocytes, testicules, muscle squelettique	Transport du glucose insulino-sensible au niveau des blastocytes
GLUT9	Leucocytes, cerveau, foie, rein	Transport du glucose, mécanismes de régulation inconnus
GLUT10	Foie, pancréas	Proposé comme gène de susceptibilité au diabète
GLUT11	Muscle squelettique et cardiaque	Transport du glucose, mécanismes de régulation inconnus
GLUT12	Muscle squelettique, tissu adipeux et petit intestin	Transport du glucose, mécanismes de régulation inconnus

Tableau I.2 : Description des isoformes de transporteurs de glucose chez les mammifères reprenant leur(s) distribution(s) tissulaire(s) et leur(s) fonction(s) physiologique(s).

terminales localisées dans le cytosol (figure I.10) (Bryant et al., 2002). Ils forment une famille de protéines qui compte, à ce jour, 13 isoformes (GLUT1-GLUT12 et HMIT) qui diffèrent par leur spécificité relative au type d'hexoses transportés, par leur caractéristique cinétique et leur distribution tissulaire (tableau I.2) (Wood and Trayhurn, 2003). Sur base des homologies de séquence et des similarités de structure, trois sous-classes de transporteurs ont été définies : la classe I (GLUTs 1-4) comprend les transporteurs de glucose, la classe II (GLUTs 5, 7, 9, 11) regroupe les transporteurs au fructose et la classe III (GLUTs 6, 8, 10, 12 et HMIT) contient les membres atypiques de la famille des GLUTs encore peu connus actuellement (Bryant et al., 2002). Les isoformes exprimées par les adipocytes (GLUT 1 et 4) sont celles qui nous intéresseront dans ce travail.

Le transporteur de glucose GLUT 1 est principalement exprimé dans le cerveau, les érythrocytes, le placenta et dans une moindre mesure dans les tissus insulino-sensibles tels que les muscles squelettiques et cardiaques, les tissus hépatiques et adipeux. Dans les adipocytes, il a été montré que l'insuline induit une augmentation de la translocation de GLUT 1 dans la membrane plasmique, accompagnée d'une diminution concomitante de l'abondance de ce transporteur dans un réservoir interne encore mal caractérisé (Czech et al., 1993; Slot et al., 1991).

GLUT 4, dont l'expression est restreinte aux tissus insulino-sensibles, représente plus de 90 % de la totalité des transporteurs de glucose exprimés dans le muscle squelettique, cardiaque et dans les tissus adipeux blanc et brun (Holman et al., 1990; Marette et al., 1992). Dans les adipocytes, près de la moitié des transporteurs GLUT 4 sont localisés dans des vésicules intracellulaires spécialisées appelées GLUT 4 Storage Vesicles (GSV) (Rea and James, 1997). Suite à une stimulation par l'insuline, ces GSV migrent et fusionnnent avec la membrane plasmique. Ce phénomène de translocation initiée par l'insuline est cinq fois plus important pour GLUT 4 que pour GLUT 1 dans les tissus adipeux (Calderhead et al., 1990; Holman et al., 1990).

La translocation des GSV en membrane plasmique fait intervenir des éléments du cytosquelette. Les microtubules et les filaments d'actine jouent le rôle de « rails » sur lesquels les vésicules GLUT 4 peuvent migrer afin d'atteindre la membrane plasmique, favorisant ainsi indirectement la fréquence des événements de fusion avec cette dernière. En effet, la translocation de GLUT 4 induite par l'insuline et l'incorporation de glucose qui en résulte sont partiellement inhibées par des agents qui déstabilisent les réseaux d'actine et de tubuline tels que respectivement la cytochalasine D et le nocodazole (Olson et al., 2001; Tsakiridis et al., 1999). Des protéines de liaison à l'actine comme la spectrine sont également associées aux GSV et permettent leur fixation aux microfilaments (Tsakiridis et al., 1999).

L'amarrage et la fusion des vésicules GLUT 4 à la membrane plasmique nécessitent l'intervention des protéines SNAREs (soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor) associées aux compartiments vésiculaires (v-SNAREs) ou aux compartiments de surface (t-SNAREs). Les GSV portent également à leur surface des protéines VAMP-2 (vesicle-associated membrane protein-2) capables de reconnaître des protéines de la famille t-SNARE, la syntaxine 4 et SNAP 23, sur la membrane plasmique permettant ainsi la formation d'un complexe ternaire sous le contrôle de la protéine Munc 18c, puis la fusion des membranes et l'apport des transporteurs GLUT 4 dans la membrane plasmique (Cheatham et al., 1996; Tellam et al., 1997; Volchuk et al., 1996).

Le calcium est également nécessaire à la translocation de GLUT 4, probablement en régulant l'activité de la voie de la PI-3K/Akt (voir point I.2.1.3.1), et en facilitant la fusion entre les GSV et la membrane plasmique (Whitehead et al., 2001).

Signalons enfin que le transport du glucose dans la cellule adipeuse est non seulement régulé par la translocation et donc l'abondance en membrane plasmique des GLUT 1 et 4 mais également par l'activité intrinsèque du transporteur qui peut être régulée par la voie des

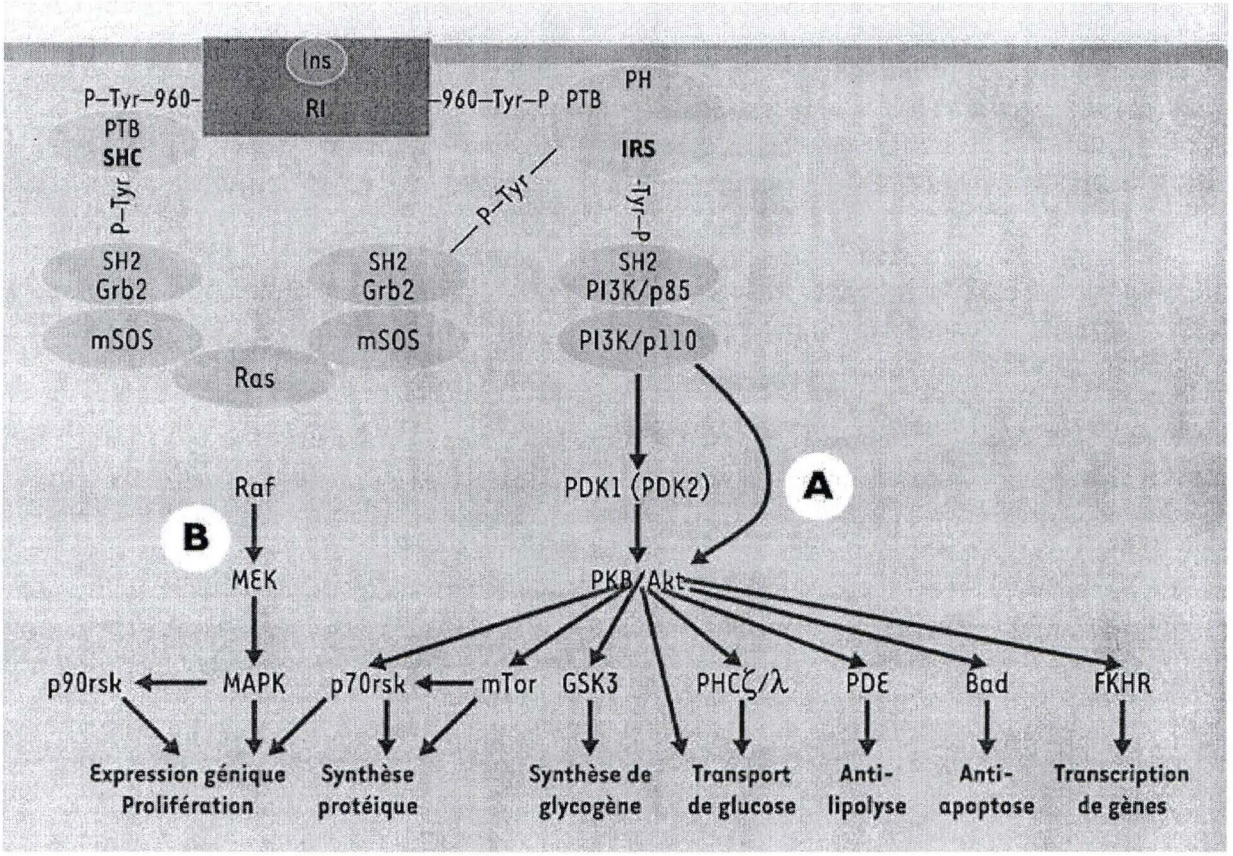


Figure I.11 : Voies de transduction du signal initiées par la liaison de l'insuline (Ins) à son récepteur (RI). Le recrutement d'IRS par le récepteur à l'insuline activé par autophosphorylation au niveau de la Tyr960 stimule son association avec la PI-3 K via sa sous-unité régulatrice p85. Les phosphoinositides produits par la sous-unité catalytique de la PI-3 K (p110) peuvent alors activer PDK1, qui active à son tour Akt. De multiples protéines sont phosphorylées par Akt et médient les nombreux effets de l'insuline effet de l'insuline.

p38 MAPK en réponse à l'insuline (voir point I.2.3.2) (Furtado et al., 2002; Konrad et al., 2002; Niu et al., 2003).

I.2.1.3 Les mécanismes de régulation des transporteurs du glucose

La régulation de l'incorporation du glucose par les cellules en réponse à l'insuline est d'une importance majeure dans le contrôle de sa métabolisation ultérieure, de son stockage sous forme de glycogène dans les hépatocytes ou de sa conversion en graisse dans les tissus musculaires et adipeux (Farese, 2001).

L'effet de l'insuline sur le transport du glucose, qui représente sans doute l'un des effets les mieux étudiés de l'hormone, illustre la diversité et la complexité des voies de signalisation initiées par l'insuline. Par exemple, la translocation et l'activation de GLUT 4 met en jeu, selon le type cellulaire et le type de stimulation, des enzymes telles que la PI-3 kinase, Akt, la PKC λ, la p38 MAPK et l'AMPK . Dans la suite de cette introduction, nous détaillerons, le rôle de ces différentes kinases impliquées dans le transport et le métabolisme du glucose dans les adipocytes en réponse à une stimulation par l'insuline.

I.2.1.3.1 Voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3 K)

Activation de la PI-3 K par l'insuline

L'insuline se fixe à son récepteur membranaire de type « tyrosine kinase », un hétérotétramère composé de deux sous-unités α et de deux sous-unités β reliées entre elles par des ponts disulfures (Ebina et al., 1985). Cette liaison induit un changement de conformation du récepteur et mène à l'activation de ses domaines à activité tyrosine-kinase localisés dans le domaine cytoplasmique des sous-unités β qui s'activent par transphosphorylation. La phosphorylation du récepteur à l'insuline se produit sur de nombreux résidus, dont la tyrosine 960 qui est importante pour le recrutement d'IRS (insulin receptor substrate), une protéine appartenant à une famille de 4 membres (IRS-1 à –4). Ses principaux représentants, IRS-1 et IRS-2, jouent un rôle important dans les actions métaboliques de l'insuline. IRS-1 est principalement exprimée dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux alors qu'IRS-2 se retrouve majoritairement dans le foie (Bruning et al., 1997; Yamauchi et al., 1996). Les protéines IRS qui sont des protéines adaptatrices se positionnent au niveau de la face cytosolique de la membrane plasmique par leur domaine PH (pleckstrin homology) un module de 120 aa qui reconnaît probablement des phosphoinositides membranaires comme le PI-4,5-P2, le PI-3,4-P2 et le PI-3,4,5-P3. L'IRS positionne ainsi son domaine PTB (phosphotyrosine binding), adjacent au domaine PH, en face de la tyrosine 960 phosphorylée du récepteur à l'insuline, s'y fixe et est alors phosphorylée à son tour par le récepteur (figure I.11). La protéine IRS phosphorylée est ensuite reconnue par les domaines SH2 (src homology 2) des protéines relais, comme la protéine adaptatrice Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) intervenant dans l'activation des p42/p44 MAPK (mitogen-activated protein kinases) et la sous-unité régulatrice p85 de la PI-3 K.

Parmi les quatre classes de PI-3 K décrites dans les cellules de mammifères, la plus connue est la famille IA comprenant des enzymes constituées d'un hétérodimère composé d'une sous-unité régulatrice de 85 kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110 kDa (p110) pour lesquelles existent de nombreuses isoformes : p85α, p85β, p55α/AS53, $p55^{PIK}$,

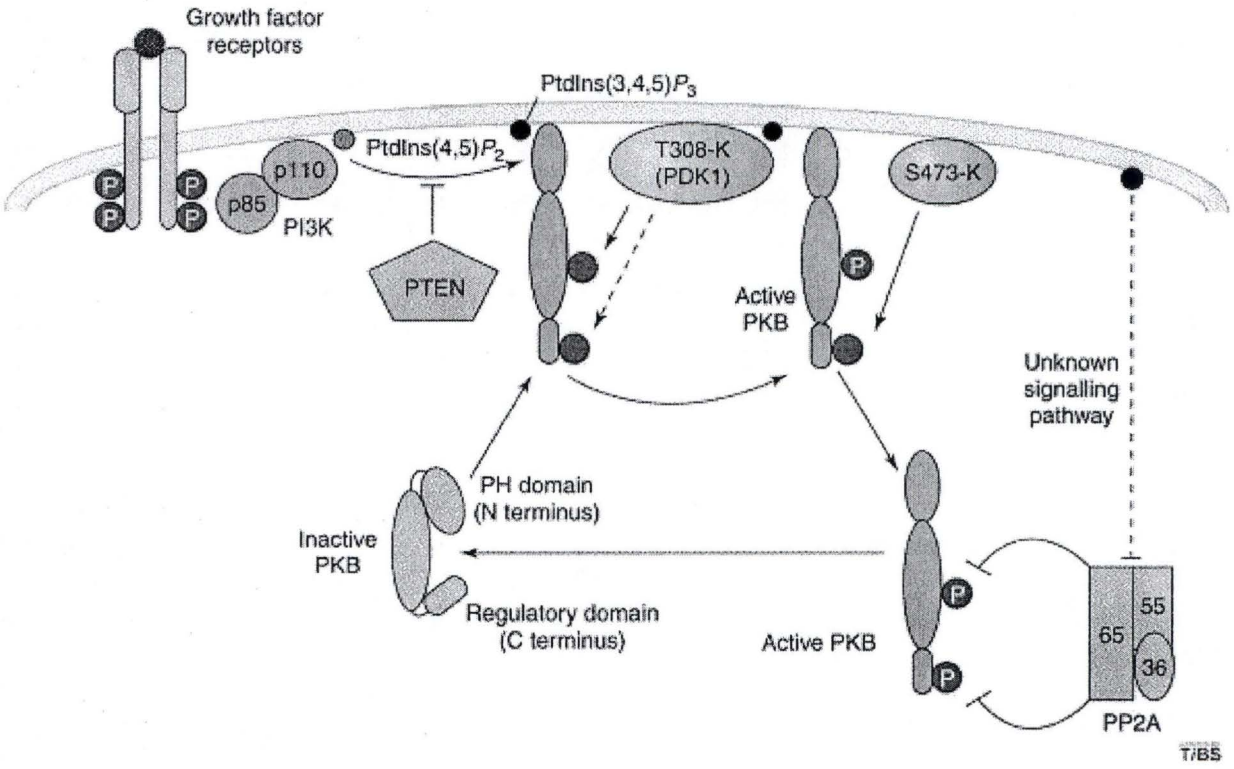


Figure I.12 : Mécanismes de régulation de l'activité d'Akt/PKB par la voie de la PI-3 K. Le phophatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) produit par la PI-3 K stimule le recrutement d'Akt/PKB inactive vers la membrane. La phosphorylation de la Thr308 par PDK1 et de la Ser473 par PDK2 induit l'activation maximale d'Akt/PKB, qui peut se dissocier de la membrane plasmique et phosphoryler différents substrats. La régulation négative de l'activité d'Akt/PKB est assurée par déphosphorylation médiée par PP2A (protein phosphatase 2A) (D'après Brazil *et al.*, 2001).

p50α et p110-α, -β, -γ, -δ (Inukai et al., 1997; Otsu et al., 1991; Pons et al., 1995). La sous-unité régulatrice p85α, exprimée de manière ubiquiste, contient notamment deux domaines SH2 ayant une affinité pour les résidus tyrosine phosphorylés présents dans les protéines IRS recrutées. La sous-unité catalytique p110 est, quant à elle, responsable de l'activité « lipid kinase » de l'enzyme, au niveau de la membrane plasmique mais aussi de la membrane nucléaire (Kim, 1998; Neri et al., 1994).

Les PI-3 kinases sont capables de phosphoryler certains inositides membranaires (les phosphoinositides) en position D-3 du groupe inositol (Stein and Waterfield, 2000; Wymann and Pirola, 1998). Elles catalysent de cette manière la phosphorylation de deux substrats spécifiques : le phosphatidylinositol-4-phosphate (ou PI-4-P) et le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (ou PI-4,5-P2), générant ainsi respectivement le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate (PI-3,4-P2) et le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (ou PI-3,4,5-P3) (Franke et al., 1997). La liaison de l'insuline à son récepteur s'accompagne donc d'une déplétion en PI-4,5-P2 suite à sa phosphorylation en PI-3,4,5-P3 par la PI-3 kinase, et à sa dégradation en DAG (diacylglycérol) et en IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate) par la PLC (phospholipase C), une autre enzyme activée par l'insuline. C'est cette déplétion en PI-4,5-P2, qui peut être induite expérimentalement par la néomycine (molécule qui « masque » le PI-4,5-P2), qui selon certains auteurs serait responsable de l'incorporation de glucose par les cellules stimulées par l'insuline. En effet, l'inhibition de la PI-3 kinase (par la wortmannine) supprime la translocation de GLUT 4 et l'incorporation de glucose induites par l'insuline (Okada et al., 1994), alors que la présence de néomycine restaure le transport du glucose dans ces conditions (James et al., 2004). Ces phosphoinositides agissent comme messagers secondaires dans de nombreuses voies de transduction comprenant celles essentielles à la prolifération (Yamauchi et al., 1993), à la survie cellulaire (Dudek et al., 1997), au réarrangement du cytosquelette (Kadowaki et al., 1986) et au trafic de vésicules (Jones et al., 1998).

Signalons qu'une perturbation des voies de signalisation initiées par l'insuline, comme celle de la PI-3 K, semble jouer un rôle important dans le phénomène de désensibilisation à l'insuline. En effet, la phosphorylation de l'IRS-1/2 sur des résidus sérine, l'un des effecteurs de la cascade transductionnelle activée par l'insuline, disrupte son association avec le récepteur à l'insuline et empêche leur phosphorylation sur des tyrosines et donc l'activation des effecteurs situés en aval, comme la PI-3 kinase. De nombreux facteurs comme le TNFα (tumor necrosis factor α), l'hyperinsulinémie et l'hyperlipidémie semblent induire la phosphorylation inhibitrice des IRS (Le Marchand-Brustel et al., 2003). Les modifications du métabolisme lipidique observées dans certaines pathologies mitochondriales peuvent donc avoir de nombreux effets secondaires sur la signalisation cellulaire et le métabolisme d'autres substrats énergétiques comme le glucose.

Activation de la protéine kinase B (PKB)

La protéine kinase B, aussi connue sous le nom de protéine RAC ou Akt, est une sérine/thréonine kinase de 59 kDa activée dans un grand nombre de types cellulaires tels les cellules hématopoïétiques ou les adipocytes par une variété de facteurs de croissance (IGF-1, PDGF, EGF, bFGF), de cytokines (IL-3) ainsi que par l'insuline à travers un mécanisme de phosphorylation dépendant de la PI-3 K (Burgering and Coffer, 1995; Songyang et al., 1997).

Trois isoformes de PKB ont été identifiés, PKBα, -β, -γ (Cheng et al., 1992; Jones et al., 1991; Konishi et al., 1995). Ces isoformes sont composées de trois régions distinctes : un domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH) dans la partie N-terminale, suivi par un domaine catalytique et d'une courte région régulatrice C-terminale. Le domaine catalytique est apparenté, sur base d'homologies de séquences, à celui de la protéine kinase A (PKA) et

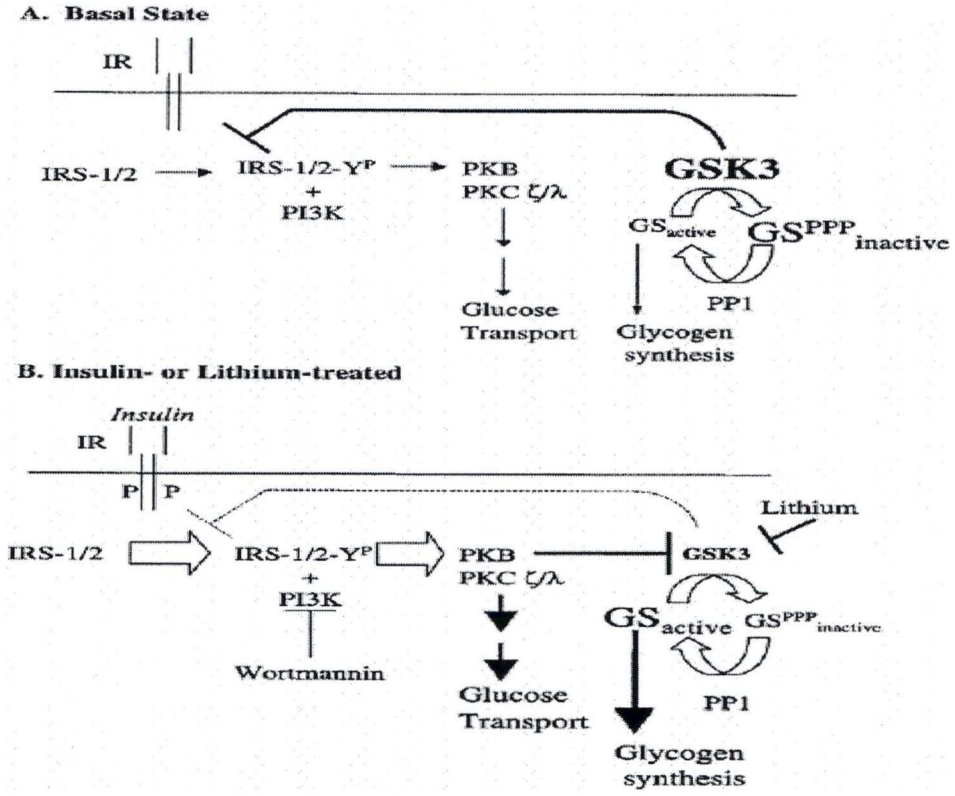


Figure I.13 : Représentation des mécanismes de régulation du transport du glucose et de la synthèse de glycogène par la GSK3. **(A)** En absence d'insuline, la GSK3 constitutivement active phosphoryle la Glycogen Synthase (GS), la maintenant dans son état inactif. Elle permet également de phosphoryler un effecteur en amont de la PI-3 K sur des résidus sérine comme IRS, réduisant ainsi l'incorporation de glucose. **(B)** En présence d'insuline, les activations successives du récepteur à l'insuline, de l'IRS et de la PI-3 K mènent à la phosphorylation et à l'inactivation de la GSK3 par la PKB (Akt). Ceci conduit à l'activation de la GS assurant le stockage du glucose sous forme de glycogène. Suite à l'inactivation de la GSK3, la phosphorylation d'IRS sur des résidus sérines diminue, ce qui favorise l'activation de la voie PI-3 K et le transport du glucose (D'après Orena *et al.*, 2000).

de la protéine kinase C (PKC). PKB/Akt agit comme médiateur dans les réponses cellulaires induites par l'insuline et l' IGF-1 (insulin-like growth factor-1) telles que la stimulation du transport du glucose, l'inhibition de la GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β), et semble également promouvoir la survie cellulaire par l'inhibition de l'apoptose (Andjelkovic et al., 1997).

Le PI-3,4,5-P3 produit par la PI-3 kinase, activée suite à la liaison de l'insuline à son récepteur, joue le rôle de messager secondaire. Il permet le recrutement, à la membrane plasmique, de la sérine/thréonine kinase Akt/PKB qui se lie au PI-3,4,5-P3 via son domaine PH. L'interaction de la kinase Akt/PKB avec le PI-3,4,5-P3 n'active pas directement l'enzyme mais permet plutôt aux protéines kinase PDK-1 et PDK-2 (phosphatidyl inositol dependent kinase-1, -2) d'activer Akt/PKB par la phosphorylation de la thréonine 308 du domaine catalytique et/ou de la sérine 473 de l'extrémité C-terminale (Alessi et al., 1996) (figure I.12). Suite à son activation, Akt/PKB se dissocie de la membrane plasmique et peut ensuite phosphoryler certains substrats comme l'enzyme GSK-3β (glycogen synthase kinase 3β), la protéine mTOR (mammalian target of rapamycine) et l'enzyme eNOS (endothelial nitric-oxide synthase) (Montagnani et al., 2001). Dans les adipocytes, Akt activée peut également migrer dans le noyau où elle phosphoryle différents substrats tels que les facteurs de transcription de la famille forkhead (Neri et al., 2002). L'activation d'Akt/PKB par la voie de la PI-3 K semble impliquée dans le transport du glucose induit par l'insuline dans de nombreux modèles cellulaires dont les adipocytes (Sakaue et al., 1997; Tanti et al., 1997) mais c'est un sujet controversé(Kotani et al., 1998).

Récemment et dans les adipocytes, il a été rapporté que la CaMKKα (calmodulin-dependent kinase kinase α) ainsi que la CaMK II (calmodulin-dependent kinase II) participent également à l'activation de la voie PI-3 K-Akt/PKB par l'insuline en phosphorylant directement Akt sur le résidu thréonine 308 (Benzeroual et al., 2000; Okuno et al., 2000; Yang et al., 2000).

La glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β)

La GSK-3β est une sérine/thréonine kinase initialement identifiée en raison de son action régulatrice dans le métabolisme du glycogène. La GSK-3β est une enzyme constitutivement active dans les cellules au repos qui est donc essentiellement régulée par une inactivation via différents mécanismes : phosphorylation de résidus sérine, déphosphorylation de résidus tyrosine, séquestration au sein de complexes protéiques et changement de la localisation subcellulaire (Doble and Woodgett, 2003). Elle intervient dans un grand nombre de voies de transduction dont celles médiées par l'insuline et par les glycoprotéines de la famille Wnt (Ding et al., 2000).

Dans la voie insulinique, la GSK-3β est inhibée suite à une phosphorylation de la sérine 9 par Akt/PKB. L'inhibition de la GSK-3β s'accompagne d'une activation de la GS (glycogen synthase), l'enzyme qui catalyse la biosynthèse du glycogène (Cohen, 1999; Cross et al., 1995).

Le rôle de la GSK-3β dans le stockage du glucose sous forme de glycogène dans les hépatocytes est bien établi (Lavoie et al., 1999). Par contre, son rôle dans le transport du glucose est encore controversé dans la littérature. En effet, d'après une étude récente, l'inhibition de la GSK-3β par le lithium stimule le transport du glucose dans les 3T3-L1 (Orena et al., 2000) (figure I.13) alors que l'équipe de Summers et al., rapporte que la GSK-3β contribue bien à la régulation de la synthèse de glycogène stimulée par l'insuline mais n'est pas responsable de l'augmentation de l'incorporation de glucose par les adipocytes 3T3-

L1 (Summers et al., 1999). Le mode d'action de l'effet de l'inhibition de la GSK-3β sur l'importation du glucose par les cellules est encore inconnu, mais l'hypothèse avancée est que la GSK-3β contribue, dans une cellule au repos, à l'inactivation de la voie PI-3 K, peut-être en phosphorylant les protéines IRS sur des résidus sérines qui empêchent la phosphorylation des résidus tyrosine suite à la stimulation par l'insuline.

Activation de la protéine kinase Cλ (PKCλ)

La famille des protéines kinases C (des sérine/thréonine kinases) est hétérogène et comprend 12 isoformes réparties en trois catégories : classique ou conventionnelle (cPKC), nouvelle (nPKC) et atypique (aPKC) (Nicolin et al., 2004). Ces isoformes se caractérisent par des différences dans leur expression tissulaire, leur localisation et les facteurs capables de les activer. Ainsi, les PKC atypiques, comprenant les isoformes ζ et λ, contrairement aux PKC conventionnelles ou nouvelles, ne sont activées ni par le diacylglycérol (messager secondaire dérivé du PI-4,5-P2 produit par l'action de la phospholipase C) ni par les esters de phorbols. Ces isoformes atypiques peuvent néanmoins être activées, entre autres, par les phosphoinositides (PI-3,4,5-P3 et PI-4,5-P2) générés suite à l'activation de la PI-3 kinase par l'insuline (Bandyopadhyay et al., 1997).

Des découvertes récentes suggèrent que les PKC atypiques sont des régulateurs positifs du métabolisme du glucose stimulé par l'insuline. En effet, dans les adipocytes 3T3-L1, la forme active de la PKC λ phosphorylée par la PDK-1 semble nécessaire à l'association des GSV aux microtubules (Imamura et al., 2003; Kim et al., 2003) et à la translocation subséquente de GLUT 4 en membrane plasmique (Czech and Corvera, 1999; Kotani et al., 1998; Standaert et al., 1999). De plus, il a été montré dans les adipocytes, que la surexpression de la forme sauvage de cette enzyme augmente le transport basal du glucose ainsi que le transport du glucose induit par l'insuline, alors que la surexpression d'un dominant négatif de cette enzyme provoque l'effet inverse (Bandyopadhyay et al., 1997). Cependant, le rôle éventuel des PKC atypiques dans la translocation des transporteurs au glucose est toujours controversé dans la littérature (Tsuru et al., 2002). Les PKC conventionnelles et nouvelles, quant à elles, ne semblent pas participer au transport du glucose (Gibbs et al., 1991).

Activation de la p70 S6 kinase

La p70 S6 kinase est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire. Le substrat principal de cette kinase est la protéine S6, un composant de la sous-unité ribosomale 40S. Sous forme phosphorylée, cette dernière initie la traduction des ARN messagers codant pour des protéines ribosomiques et des facteurs d'élongation (Jefferies et al., 1997). L'activité de cette kinase, régulée par l'insuline et les facteurs de croissance, a donc un effet positif sur la synthèse protéique (Smith et al., 1980).

Ainsi, la synthèse protéique induite par l'insuline implique le tandem PI-3 kinase/PKB par le biais de la P70 S6 kinase. Le contrôle de l'activité de la p70 S6 kinase par PKB se fait de manière indirecte via la kinase mTOR. En effet, mTOR phosphoryle deux substrats majeurs impliqués dans l'initiation et l'élongation de la traduction protéique : p70 S6 kinase et 4E-BP (elF-4^E binding protein) (Burnett et al., 1998).

Si le rôle de p70S6K dans le contrôle de la traduction est bien décrit, son action dans le métabolisme du glucose est encore peu étudié.

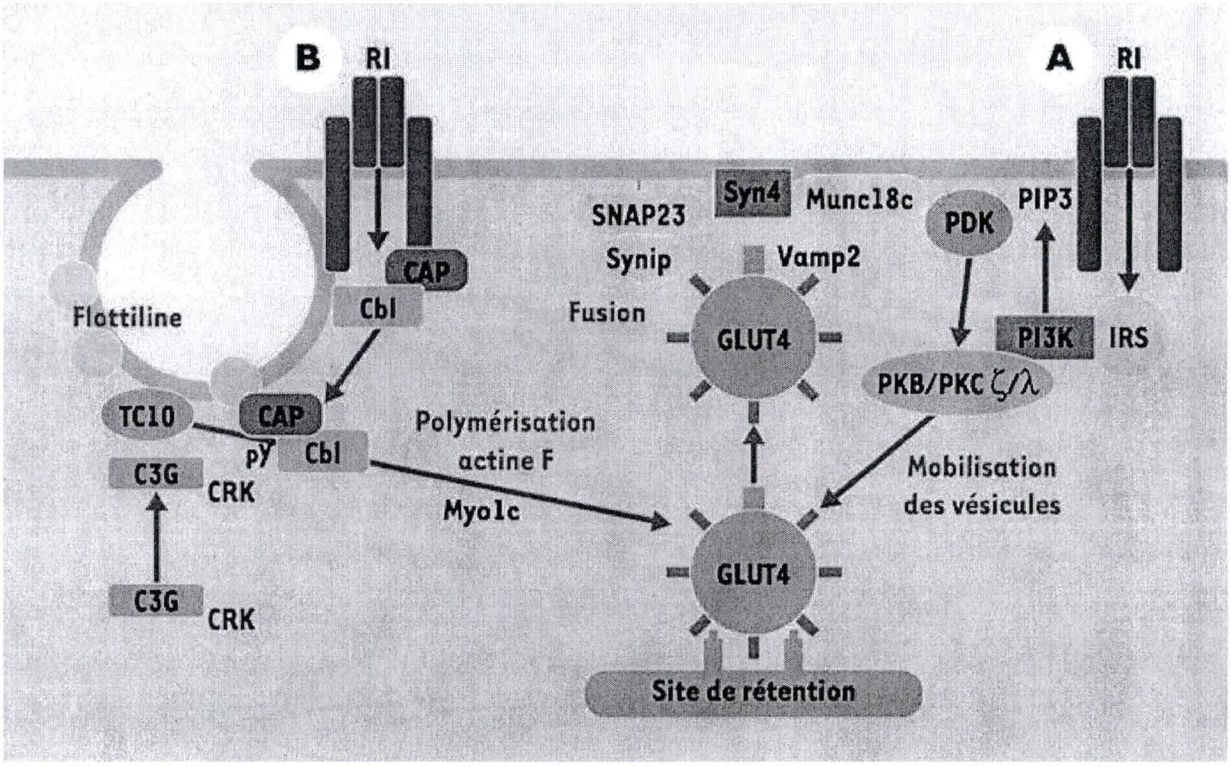


Figure I.14 : Modèle reprenant les voies contrôlant la translocation de GLUT 4 induites par l'insuline. La voie PI-3 K stimulée par l'insuline menant à l'activation de PKB/Akt et des PKC (λ et ζ) et la voie PI-3 K-indépendante des CAP/Cbl, conduisent à la translocation de GLUT4 en membrane plasmique (D'après Capeau, 2003).

I.2.1.3.2 Voie des Cbl/CAP

Toutes les actions de l'insuline ne sont pas médiées par la voie de la PI-3 kinase. Tel est le cas d'une voie médiée par la protéine Cbl, un autre substrat du récepteur à l'insuline, activée uniquement dans les adipocytes différenciés (Ribon and Saltiel, 1997) (figure I.14).

La membrane plasmique des adipocytes est caractérisée par la présence de multiples cavéoles, soit d'étroites invaginations de la membrane plasmique enrichies en cavéolines, en cholestérol et en sphingolipides. Ces cavéoles constituent un endroit privilégié pour l'importation de nombreuses molécules comme le cholestérol, participent au trafic vésiculaire et aux processus de signalisation (Dupree et al., 1993; Rothberg et al., 1992). On retrouve ces cavéoles dans des régions spécialisées de la membrane plasmique riches en cholestérol appelées : « lipid rafts ». Des études récentes suggèrent que les cavéoles jouent un rôle essentiel dans l'initiation de voies de transduction indépendantes de la PI-3 K qui conduisent à l'insertion de GLUT 4 en membrane plasmique.

En effet, la phosphorylation de la protéine oncogène Cbl par le récepteur activé de l'insuline (Ribon et al., 1998) et son interaction avec une protéine adaptatrice CAP (Cbl-associated protein) sont impliquées dans le transport du glucose induit par l'insuline dans les adipocytes différenciés. Une fois formé, le complexe CAP-Cbl se dissocie du récepteur à l'insuline et migre vers des microdomaines lipidiques (lipid rafts) où il se lie à une protéine cavéolaire : la flotilline. CAP-Cbl s'associe alors avec CrkII, une protéine adaptatrice, et C3G, un facteur d'échange de nucléotides à guanine (GEF) qui active TC10, une protéine de la famille des Rho GTPases également associée aux « lipid rafts » et qui est l'effecteur moléculaire impliqué dans la translocation de GLUT4 en membrane plasmique suite à un remodelage des filaments d'actine.

I.2.1.3.3 Voie des p38 -MAPK (mitogen activated protein kinase)

Les MAPK appartiennent à une famille complexe de sérine/thréonine kinases activées par différents stimuli et régulant de nombreux mécanismes cellulaires. Trois grandes classes de MAPK ont été identifiées : les *extracellular-regulated kinases* (ERK 1/2 ou p42/p44) activées par les facteurs de croissance et l'insuline, les *c-Jun NH_2-terminal kinases* (JNKs) et les p38 MAPK, classiquement activées par les stress oxydatifs et les radiations UV (Widmann et al., 1999).

Récemment, plusieurs évidences laissent penser que l'enzyme p38 MAPK pourrait contribuer à la stimulation de l'activité intrinsèque des transporteurs de glucose en réponse à l'insuline (Furtado et al., 2002). Le rôle potentiel de cette kinase dans le transport du glucose a initialement été mis en évidence par l'observation d'une diminution de l'incorporation de glucose par des adipocytes 3T3-L1 stimulés par l'insuline en présence de SB203580, un inhibiteur spécifique de p38 MAPK (Sweeney et al., 1999). De plus, la surexpression d'un dominant négatif de p38 MAPK inhibe également le transport du glucose induit par l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1 et ce, indépendamment de la translocation de GLUT 4 en membrane plasmique (Somwar et al., 2002). De nombreuses autres études montrent également que l'activité de GLUT 4 est régulée par l'insuline via la voie des p38 MAPK (Furtado et al., 2002; Konrad et al., 2002; Niu et al., 2003).

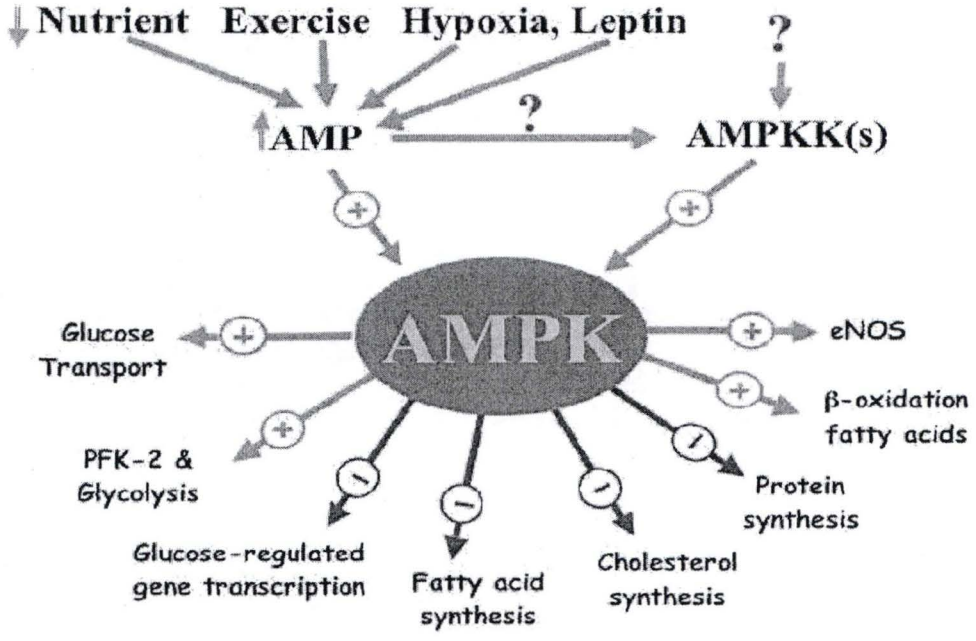


Figure I.15 : Rôles de l'AMPK dans le métabolisme du glucose, des lipides et du cholestérol. En réponse à une augmentation de la concentration cellulaire en AMP induite par différents stimuli (exercice physique, hypoxie...), l'AMPK est activée par fixation de l'AMP et par phosphorylation médiée par l'AMPKK. Cette kinase active alors puis active les voies cataboliques et réprime les voies anaboliques dans la cellule.

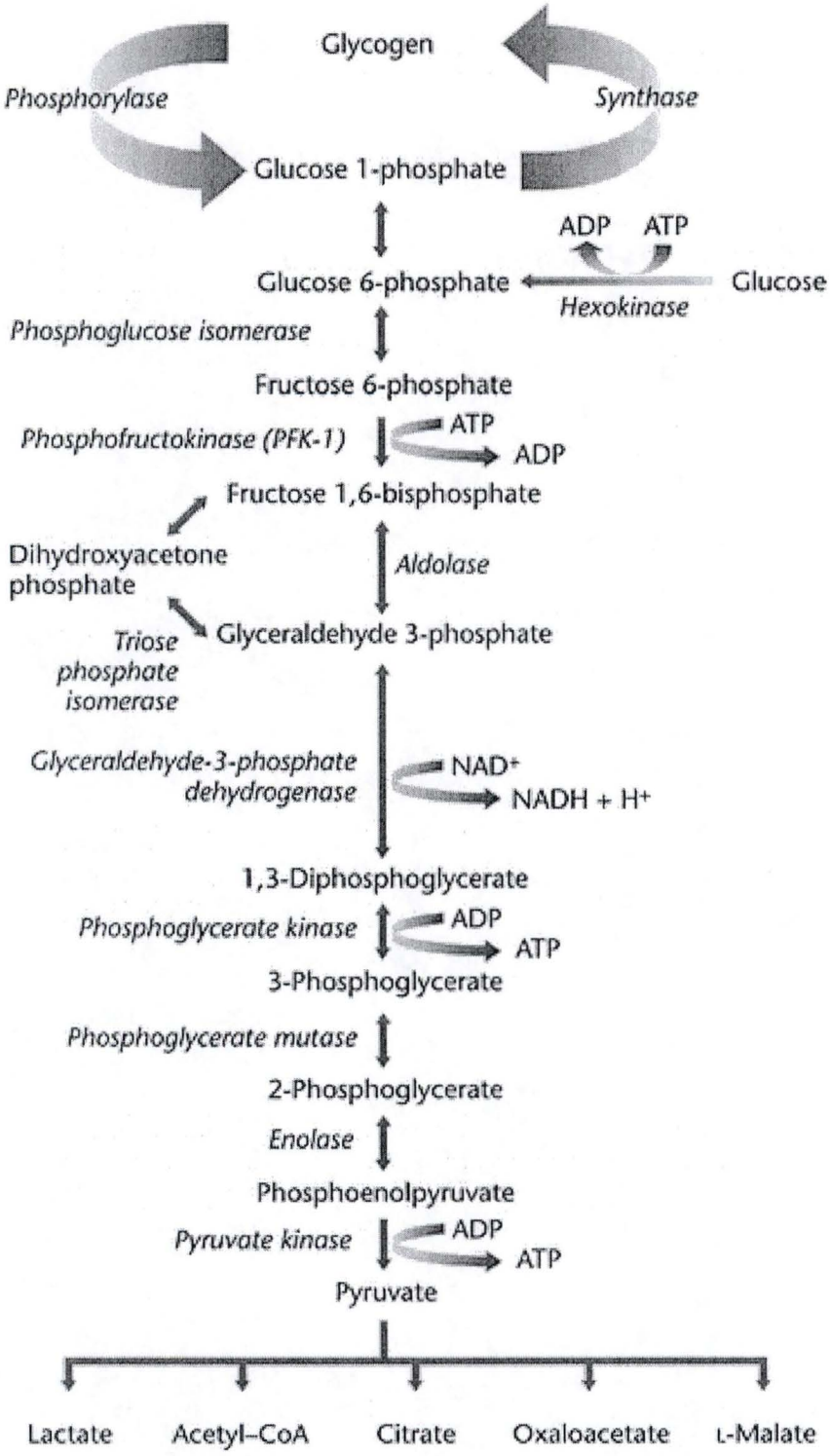


Figure I.16 : La glycolyse : une voie métabolique conduisant à la formation de pyruvate et impliquant de nombreuses réactions.

I.2.1.3.4 Voie de l'AMPK

L'AMPK (AMP-dependent kinase) est une sérine/thréonine kinase hétérotrimérique composée d'une sous-unité catalytique α (63 kDa), pour laquelle deux isoformes α1 et α2 existent ainsi que de deux sous-unités régulatrices β (38 kDa) et γ (35 kDa), également présentes sous plusieurs isoformes β1 et β2 et γ1, γ2 et γ3 (Hardie et al., 1998). Cette kinase est activée par différents stress métaboliques tels que l'exercice musculaire, l'ischémie ou une déficience énergétique qui augmentent le ratio AMP/ATP intracellulaire (figure I.15.). Le mécanisme d'activation de cette kinase est très complexe. L'interaction de l'AMP avec l'AMPK active cette dernière par une régulation allostérique et induit un changement conformationnel qui augmente sa capacité à devenir un meilleur substrat pour son activateur l'AMPKK. Cette kinase en amont, également activée par l'AMP, phosphoryle l'AMPK au niveau de la sous-unité α sur la thréonine 172. De plus, le changement conformationnel diminue la reconnaissance de l'AMPK par des protéines phosphatases comme PP-2C (protein phosphatase-2C) pouvant l'inactiver (Davies et al., 1989; Moore et al., 1991). L'AMPK est un senseur énergétique qui protège la cellule du stress énergétique en inhibant l'anabolisme et en activant le catabolisme en vue de restaurer le taux d'ATP (Hardie and Carling, 1997). Ainsi, elle inhibe la synthèse du glycogène et des acides gras, tout en favorisant la glycolyse et la β-oxydation des acides gras (Hardie et al., 1998). L'AMPK inhibe également la synthèse des triglycérides (Muoio et al., 1999).

Dans le muscle squelettique, l'AMPK est également connue pour stimuler l'augmentation de l'incorporation de glucose indépendante de l' insuline (Winder and Hardie, 1999). En effet, l'AICAR (5-amino-imidazolecarboxamide riboside), est converti en ZMP dans la cellule, un analogue de l'AMP couramment utilisé pour activer l'AMPK et stimule le transport du glucose dans le muscle et dans le tissu adipeux (Bergeron et al., 1999). Toutefois, le rôle éventuel de l'AMPK dans le transport du glucose dans les adipocytes est controversé. En effet, l'incubation des adipocytes 3T3-L1 avec l'AICAR inhibe l'augmentation de l'incorporation de glucose stimulée par l'insuline. Cet effet est, en partie, expliqué par une diminution de la translocation de GLUT 4 en membrane plasmique (Salt et al., 2000).

I.2.2 Métabolisme du glucose

I.2.2.1 Le glucose en tant que source d'énergie

La glycolyse est l'une des plus importantes voies du métabolisme des cellules animales nécessaire pour la libération d'énergie à partir du glucose, en anaérobiose ou en aérobiose.

La glycolyse est une voie d'oxydation partielle du glucose qui mène à la production nette de deux molécules d'ATP, de deux NADH et de deux molécules de pyruvate à partir d'une molécule de glucose (figure I.16). Le pyruvate formé peut alors être oxydé et décarboxylé en acétyl-CoA dans les mitochondries par la pyruvate déshydrogénase (PDH). L'acétyl-CoA sera à son tour complètement oxydé dans le cycle de Krebs. La glycolyse est un processus régulé. Les trois sites de régulation de cette voie métabolique se situent au niveau de trois enzymes allostériques catalysant les réactions irréversibles de la glycolyse à savoir l'hexokinase, la phosphofructokinase 1 (PFK1) et la pyruvate kinase. Cette régulation est conditionnée par l'état énergétique de la cellule. En effet, les principaux signaux qui vont

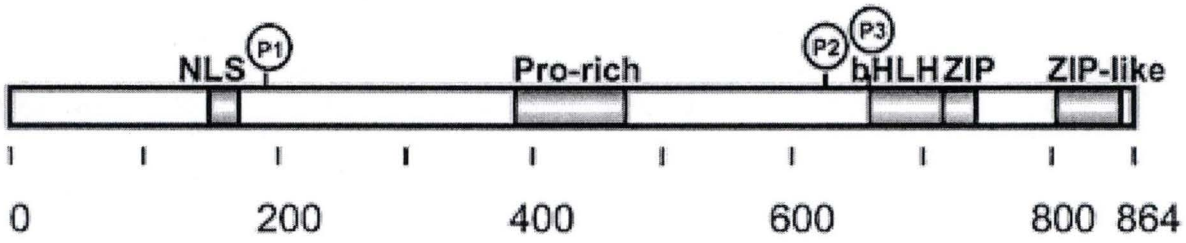


Figure I.17 : Représentation schématique des différents domaines du facteur de transcription ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein). Cette protéine contient un signal de localisation nucléaire (NLS), un domaine riche en proline (Pro-rich), un domaine bHLH/Zip et Zip-like ainsi que trois sites de phosphorylation potentiels pour la PKA (protein kinase A) indiqués par P1, P2, P3 (D'après Kawaguchi *et al.*, 2001).

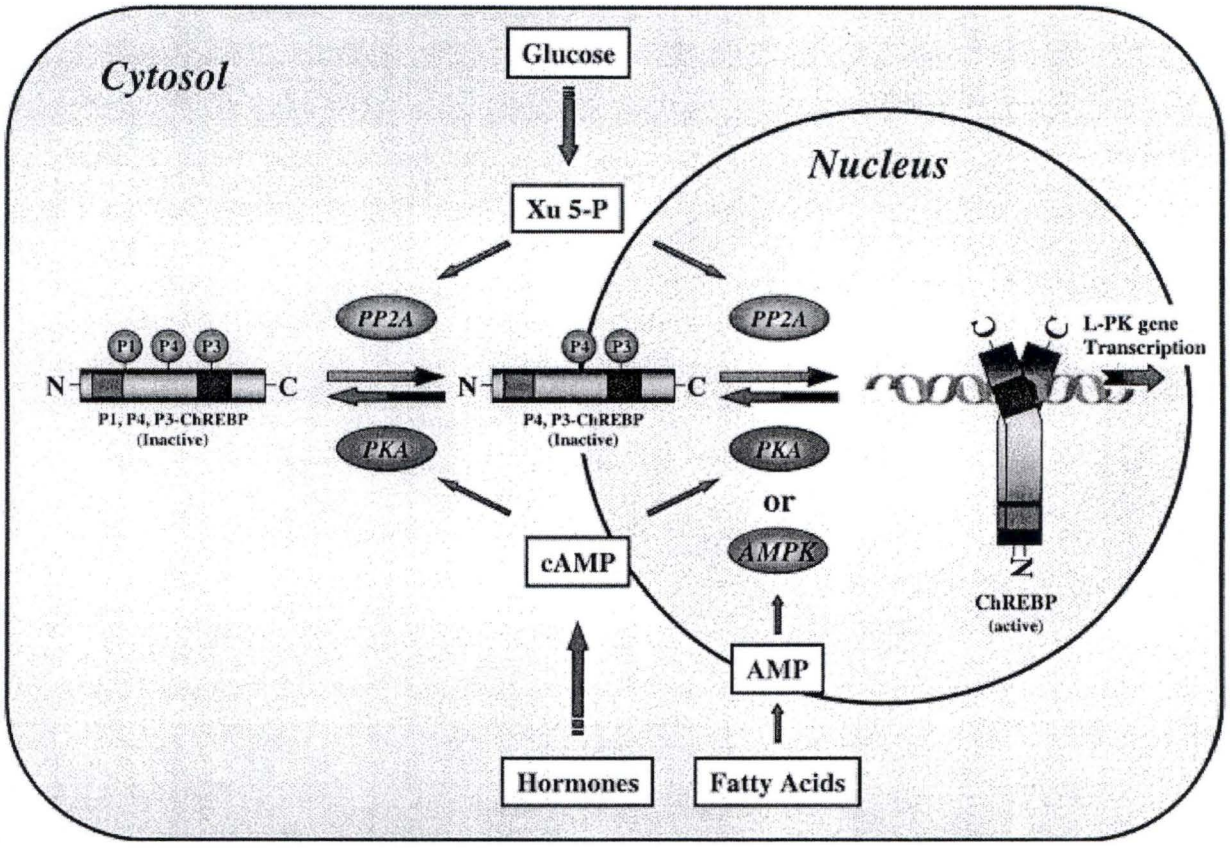


Figure I.18 : Représentation schématique des mécanismes d'activation et de désactivation du facteur de transcription ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) dans le contrôle de la transcription de la L-PK par des mécanismes de déphosphorylations/phosphorylations impliquant la protéine phosphatase 2A (PP2A) et les kinases PKA et AMPK (D'après Kawaguchi *et al.*, 2001).

réguler la glycolyse sont le rapport ATP/AMP, le taux de citrate (premier produit formé dans le cycle de Krebs) et le niveau de fructose-2,6-bisphosphate.

En présence d'oxygène, l'énergie emmagasinée dans des cofacteurs réduits générés lors de la glycolyse et du cycle de Krebs (NADH, $FADH_2$) peut être convertie en ATP, à la suite des phosphorylations oxydatives alimentées par la chaîne de transport d'électrons. Cependant, en absence d'oxygène ou lors d'un dysfonctionnement mitochondrial, l'activité glycolytique est augmentée et génère de l'ATP en « circuit fermé » grâce à la fermentation lactique. Dans cette voie métabolique, les électrons du NADH sont cédés au pyruvate pour former de l'acide lactique et ainsi régénérer le pool de NAD^+ disponible pour la glycolyse (Lopaschuk, 2001).

I.2.2.2 Le glucose en tant que régulateur de l'activité de facteurs de transcription

Une concentration élevée en glucose dans la cellule augmente la transcription de gènes codant plusieurs enzymes de la glycolyse comme la L-PK (Liver-Pyruvate Kinase) et la PFK (PhosphoFructoKinase), et induit l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse comme l'ACC (Acétyl-CoA Carboxylase) et la FAS (Fatty Acid Synthase) (Troiano and Flegal, 1999). On a longtemps pensé que la transcription des gènes codant ces enzymes était régulée par l'insuline et le glucagon, mais il a été montré que les nutriments eux-mêmes pouvaient intervenir dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes (Girard et al., 1997; Towle et al., 1997). En effet, le glucose ou plus exactement un de ses dérivés dans la cellule, le xylulose-5-phosphate, peut augmenter l'activité ou induire la transcription des facteurs ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) et SREBP-1c (sterol-responsive element-binding protein-1c). L'activité de ChREBP est régulée par des mécanismes de phosphorylations/déphosphorylations, alors que SREBP est activé par un clivage protéolytique partiel en réponse à l'insuline (Uyeda et al., 2002).

ChREBP est une protéine de 864 aa qui contient plusieurs domaines fonctionnels comprenant un signal de localisation nucléaire (NLS) situé à proximité de l'extrémité N-terminale, un domaine riche en proline, un domaine bHLH/Zip ainsi qu'un domaine « Zip-like » (leucine-zipper-like) (figure I.17) (Kawaguchi et al., 2001). ChREBP contient également trois sites de phosphorylation pour la PKA : la sérine 196 (P1) située à proximité du site NLS, la sérine 626 (P2) voisine de la séquence bHLH/Zip et la thréonine 666 (P3) localisée dans le domaine de liaison à l'ADN. Ces sites jouent un rôle crucial dans l'activation de ChREBP par le glucose et dans son inactivation par l'AMPc et l'AMP (figure I.18). En effet, l'importation nucléaire et l'activation transcriptionnelle de ChREBP qui reconnaît la séquence E-box (5'-CACGTG-3') dans le promoteur des gènes cibles sont respectivement régulées par les sites P1et P3. Leur phosphorylation par la PKA inhibe l'activité de ChREBP et maintient le facteur dans le cytosol. En présence de dérivés du glucose comme le xylulose-5-phosphate, la PP2A (protein phosphatase 2A) est activée et déphosphoryle successivement P1 permettant la translocation de ChREBP dans le noyau et P3 induisant la liaison du facteur aux éléments ChREB présents dans les promoteurs des gènes cibles.

SREBP fait partie de la famille des facteurs de transcription bHLH-Zip synthétisés sous forme de précurseurs inactifs ancrés dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Il existe 3 isoformes de SREBP, désignés par SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. Les deux premières isoformes dérivent d'un même gène suite à l'usage de sites d'initiation de la transcription alternatifs qui produit une forme sauvage et une version tronquée d'une partie de l'exon 1, désignées respectivement par 1a et 1c (Brown and Goldstein, 1997). Chaque précurseur de 1150 aa est organisé en trois domaines regroupant le domaine NH_2-terminal qui

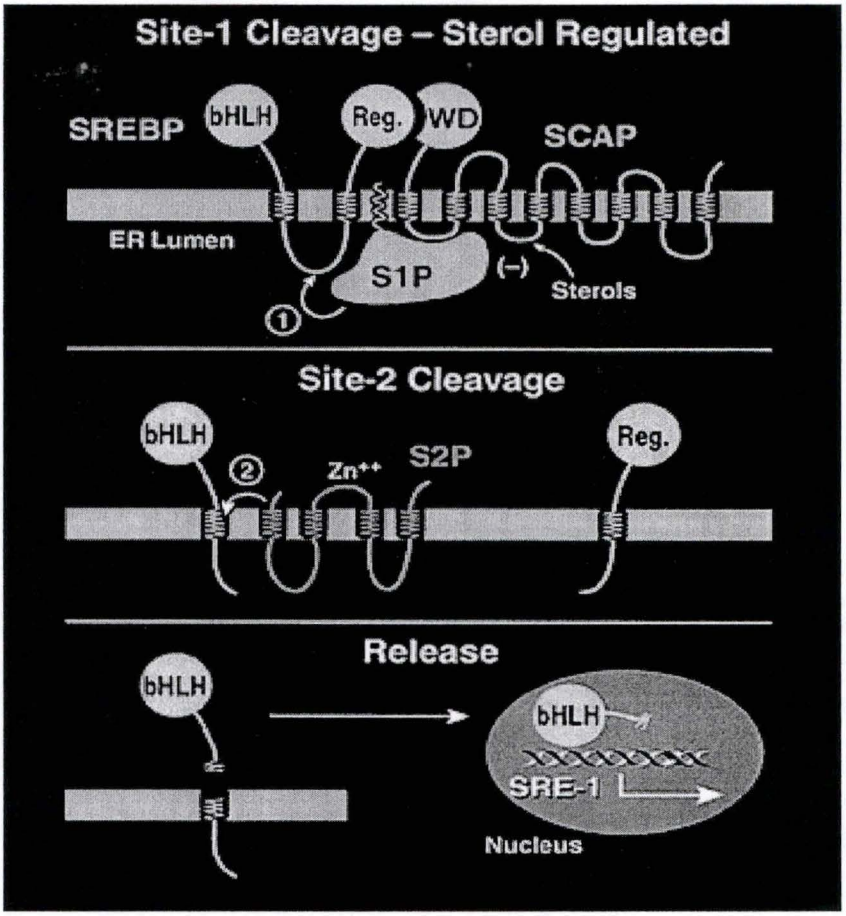


Figure I.19 : Représentation du mécanisme d'activation par clivage protéolytique partiel de SREBP dans la membrane du reticulum endoplasmique. Ce clivage protéolytique est initié par la sérine protéase Site 1p (S1P), qui reconnaît le complexe SCAP-SREBP et clive SREBP dans la boucle luminale. Ce clivage a notamment lieu lorsque les cellules sont privées de stérols. Une fois les deux fragments de SREBP séparés, Site 2p (S2P), la seconde enzyme, clive le domaine NH_2-terminal bHLHZip de SREBP. Après ce second clivage protéolytique, le domaine NH_2-terminal bHLHZip de SREBP doté d'une activité de transactivation quitte la membrane du RE et entre dans le noyau où il active la transcription de gènes cibles en se liant à ses séquences consensus SRE-1 et E-box (D'après Brown *et al.*, 1999).

contient la région bHLH/Zip pour la liaison à l'ADN, deux segments transmembranaires hydrophobes reliés par une boucle qui pénètre dans la lumière du réticulum endoplasmique et un domaine COOH-terminal ayant une fonction régulatrice.

Ces différentes isoformes activent l'expression de plus d'une trentaine de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, des acides gras, des triglycérides, des phospholipides et de la glycolyse (Horton and Shimomura, 1999). SREBP1, bien connu pour contrôler l'expression du gène du récepteur aux LDL (Low Density Lipoprotein) en réponse à une déplétion intracellulaire en stérols (Streicher et al., 1996), peut également contrôler l'expression de gènes lipogéniques tels que la L-PK, l'ACC et la FAS en réponse à l'insuline et au glucose (Foretz et al., 1999). L'activation de ces facteurs de transcription commence par la formation d'un complexe avec la protéine SCAP (SREBP Cleavage Activating Protein) qui escorte les SREBPs au complexe de Golgi où ils sont séquentiellement clivés par deux protéases S1P (Site 1 Protease) et S2P (Site 2 Protease) (figure I.19) (Sakai et al., 1998). La partie amino-terminale est alors libérée de la membrane du RE et accède ainsi au noyau pour activer la transcription de gènes cibles en se liant soit à sa séquence consensus SRE-1 (sterol regulatory element-1) soit à une séquence palindromique E-box (5'-CAXXTG-3') qui sont présentes dans les promoteurs de gènes lipogéniques tels que l'ACC et la FAS (Horton et al., 2002; Osborne, 2000).

I.2.3 Métabolisme des acides gras et des triglycérides

Les principaux lipides de l'alimentation animale sont constitués essentiellement de triglycérides, de phospholipides et de stérols. La digestion de ces lipides s'effectue au niveau du duodénum et est sous la dépendance de lipases et d'estérases pancréatiques. Absorbés au niveau des entérocytes, les produits de la digestion des lipides sont transformés en triglycérides et transportés par le sang sous forme de chylomycrons. Les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés en acides gras libres et en glycérol dans les capillaires des tissus adipeux et des muscles squelettiques par la lipoprotéine lipase (Ginsberg, 1998). Les acides gras libres formés restent dans ces tissus tandis que le glycérol est transporté au foie et aux reins, où il est transformé en dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la glycolyse, par l'action de la glycérol kinase et de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase.

I.2.3.1 Système d'importation des acides gras dans les cellules

Les acides gras issus de la dégradation des lipoprotéines sont importés dans les cellules par différents mécanismes (Dutta-Roy, 2000). Les acides gras libres peuvent soit diffuser directement à travers la membrane plasmique, soit être transportés dans la cellule au moyen de protéines membranaires spécifiques. Trois transporteurs ont été identifiés à ce jour : FAT-CD36 (Fatty Acid Translocase/Clusters Differenciation 36), FATP (Fatty Acid Transporter Protein) et ADRP (Adipose Differenciation-Related Protein). De plus, des protéines notamment associées à la membrane plasmique contrôlent l'activation des acides gras par estérification au coenzyme A (FACS, Fatty Acyl-CoA Synthethase) et le transport des acides gras dans le cytosol (FABP, Fatty Acid Binding Protein) (Duplus and Forest, 2002; Duplus et al., 2000). Ces protéines sont insérées ou associées à la membrane plasmique et possèdent une spécificité de transport selon la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras. Cependant, les fonctions physiologiques probablement multiples et la régulation de

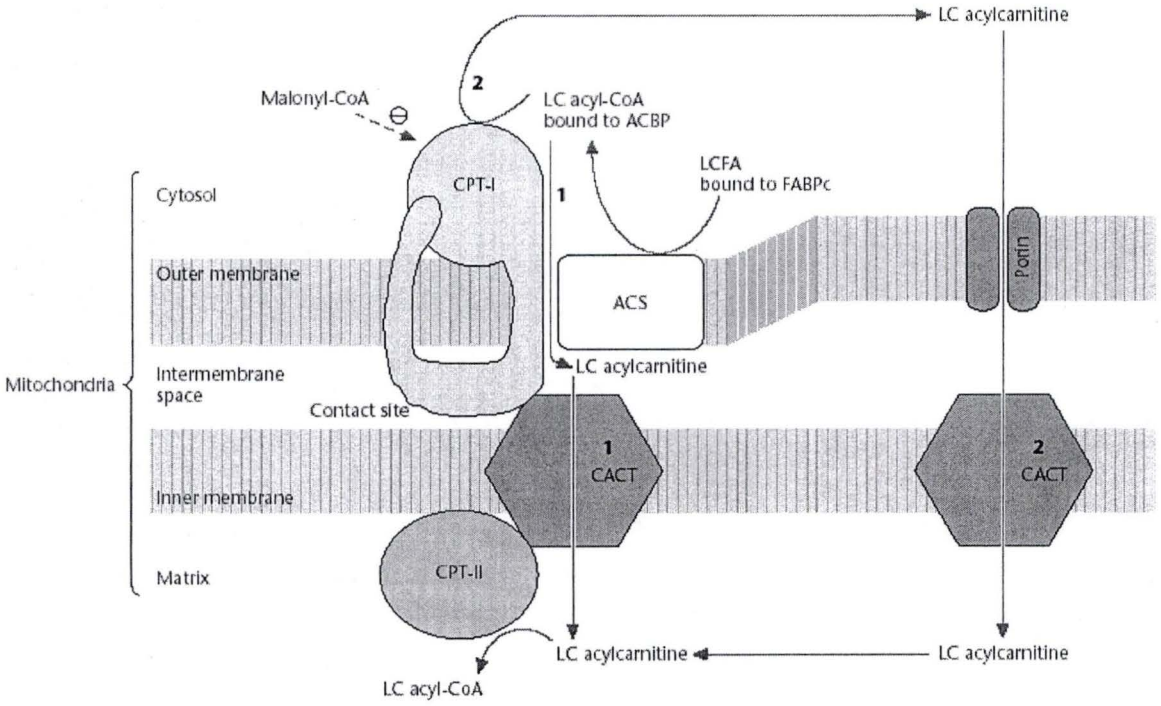


Figure I.20 : Importation des acides gras dans la mitochondrie par le système de la CPT. Les acyl-CoA sont estérifiés à la carnitine par la CPT-1, puis transloqués dans la matrice mitochondriale par la CACT. La CPT-2 régénère alors l'acyl-CoA et la carnitine, qui retourne dans la membrane mitochondriale externe grâce à la CACT (Morio *et al.*, 2003).

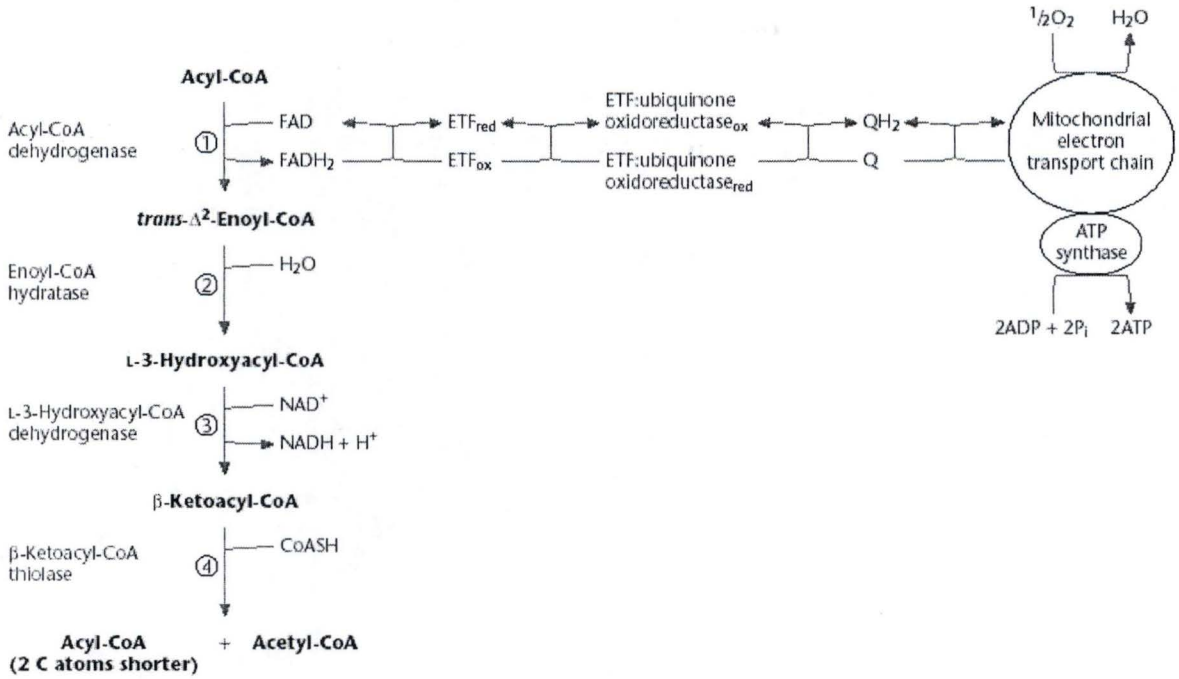


Figure I.21 : Schéma reprenant les différentes étapes du cycle de la β-oxydation des acides gras dans la matrice mitochondriale (D'après Morio *et al.*, 2003).

l'activité et de l'expression de ces transporteurs restent encore peu connues (Bonen et al., 2000).

I.2.3.2 Système d'importation des acides gras dans la mitochondrie

Les acides gras cytosoliques, activés sous forme d'acyl-CoA par la FACS, ne sont pas directement transportés à travers les membranes mitochondriales, mais transférés à une molécule de carnitine par l'action de la CPT-1 (carnitine palmytoyltransférase-1), une enzyme localisée sur la face externe de la membrane mitochondriale externe (figure I.20). L'acyl-carnitine est ensuite transporté à travers les membranes mitochondriales et l'espace intermembranaire par la CACT (carnitine acyl-carnitine translocase). Sur la face interne de la membrane mitochondriale interne, du côté de la matrice, la carnitine palmytoyltransférase-2 (CPT-2), catalyse la régénération de l'acyl-CoA et de la carnitine.

La vitesse de la β-oxydation des acides gras est contrôlée par la vitesse du transport de ceux-ci à travers la membrane mitochondriale externe médié par la CPT-1 (Mascaro et al., 1998). L'activité de la CPT-1 peut être modulée par le taux de malonyl-CoA cytosolique. En effet, le malonyl-CoA, formé par l'ACC est un régulateur allostérique négatif de la CPT-1. Lorsqu'il s'accumule dans la cellule, il inhibe ainsi l'entrée des acyls-CoA dans la mitochondrie, diminue la β-oxydation des acides gras et favorise donc leur estérification en triglycérides dans le cytosol (Eaton, 2002).

C'est également par une régulation du taux de malonyl-CoA dans la cellule que l'on explique le contrôle exercé par l'AMPK sur l'équilibre entre les voies de dégradation et de biosynthèse des acides gras. En effet, une fois activée, l'AMPK peut inhiber l'ACC par phosphorylation sur la Ser79, ce qui diminue la synthèse de malonyl-CoA et favorise donc la β-oxydation des acides gras, suite à la levée d'inhibition exercée par cette molécule sur la CPT-1 (Chen et al., 2000).

I.2.3.2 La β-oxydation mitochondriale des acides gras

La β-oxydation des acides gras saturés se déroule par des cycles répétés comportant quatre réactions enzymatiques (figure I.21) : une oxydation, une hydratation, une seconde oxydation et une thiolyse qui libère une molécule d'acétyl-CoA et une chaîne d'acyl-CoA plus courte de deux atomes de carbones que dans le cycle précédent. Chaque cycle de β-oxydation produit également une molécule de NADH et une molécule de $FADH_2$. L'acétyl-CoA libéré à chaque cycle pourra entrer dans le cycle de Krebs afin de générer du $FADH_2$ et du NADH supplémentaires. Ces cofacteurs réduits seront alors réoxydés par les complexes qui assurent les phosphorylations oxydatives pour former de l'ATP (Van den Branden and Vamecq, 2003).

I.2.3.3 Synthèse cytosolique des acides gras

Chez les mammifères, les lipides néosynthétisés qui possèdent une chaîne hydrocarbonée de 16 à 18 carbones constituent plus de 90 % de tous les acides gras cellulaires. La synthèse des acides gras est entièrement cytosolique et nécessite, comme unique précurseur, l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA provenant de l'oxydation du glucose ou des acides gras s'accumule dans la matrice mitochondriale et entre dans le cycle de Krebs. Cet acétyl-CoA passe alors dans le cytosol sous forme de citrate où l'ATP-citrate lyase catalyse la

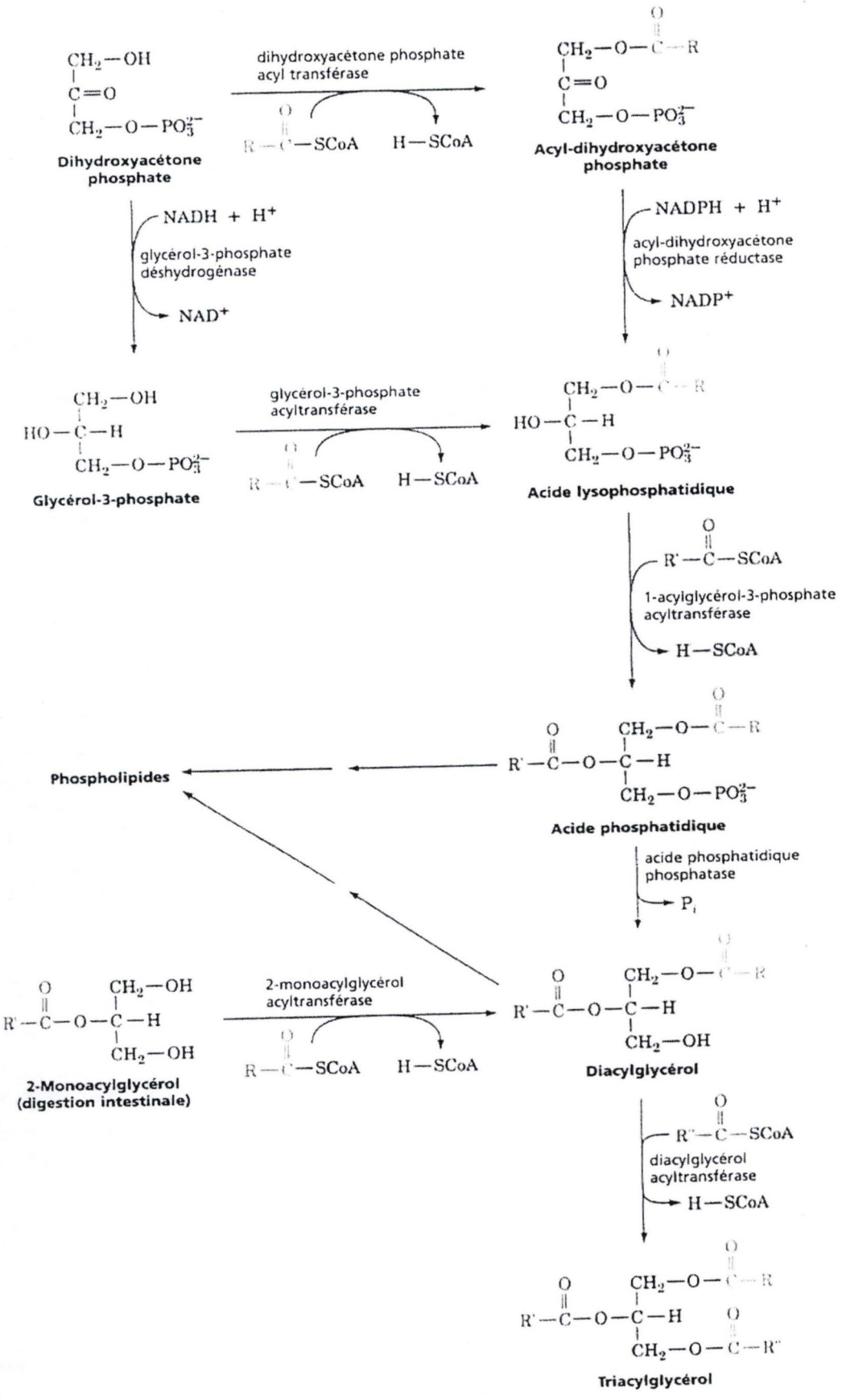


Figure I.22 : Représentation de la voie de synthèse des triglycérides (D'après Voet et Voet., 1998).

conversion du citrate en acétyl-CoA et en oxaloacétate. L'acétyl-CoA peut, de cette façon, servir de substrat à la synthèse cytosolique des acides gras. La formation de malonyl-CoA par carboxylation de l'acétyl-CoA constitue l'étape initiale de la synthèse des acides gras et est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Le malonyl-CoA est ensuite pris en charge par un complexe multienzymatique, appelé fatty acid synthase (FAS), qui lui ajoute successivement plusieurs molécules d'acétyl-CoA. Le principal acyl-CoA produit pas la FAS est le palmitoyl-CoA. Pour les acides gras à chaîne plus longue, l'élongation se poursuit soit dans les mitochondries soit sur le réticulum endoplasmique, grâce à l'action d'élongases. D'autres enzymes peuvent également intervenir afin de catalyser la mono-insaturation des acides gras (désaturases) (Flatt, 1970).

I.2.3.4 Synthèse des triglycérides

L'excès en nutriments caloriques d'origine alimentaire (essentiellement glucides et lipides) déclenche leur mise en réserve, principalement sous forme de triglycérides, qui constituent la forme majeure de stockage d'énergie chez les animaux. Les triglycérides sont essentiellement synthétisés dans le tissu adipeux, le foie et les intestins, par une voie de biosynthèse qui implique l'estérification successive de trois chaînes d'acides gras au glycérol-3-phosphate.

Ce précurseur des triglycérides est généré par la GPD (glycérol-3-phosphate déshydrogénase), qui catalyse la première réaction de la voie de synthèse des triglycérides à partir de DHAP (dihydroxy-acétonephosphate), un dérivé du glucose (figure I.22). L'ajout du premier acide gras au glycérol-3-phosphate est assuré par la GPAT (glycérol-3-phosphate-acyl transférase) pour générer de l'acide lysophosphatidique. Une voie alternative permet grâce à la DHAPAT (dihydroxyacétonephospate-acyl transférase) de greffer le premier acide gras directement sur la DHAP, qui est ensuite réduite en acide lysophosphatidique, un précurseur pour les triglycérides mais aussi pour les phospholipides membranaires. Après déphosphorylation de l'acide lysophosphatidique en diacylglycérol (DAG), deux acyl transférases successives lui ajoutent enfin deux autres chaînes d'acides gras pour former des triacylglycérols, ou triglycérides, qui sont stockés sous forme de vésicules cytosoliques (Coleman et al., 2000; Hajra et al., 2000).

La mobilisation des triglycérides à partir des stocks intracellulaires est assurée par la HSL (hormone-sensitive lipase), qui hydrolyse les triglycérides en glycérol et en acides gras. La balance entre la lipogenèse et la lipolyse implique de nombreuses hormones et voies cellulaires, revues par Noguchi *et al.* (Noguchi et al., 1992). De manière générale, la lipogenèse et le stockage des triglycérides sont stimulés par des hormones anabolisantes comme l'insuline (Itani and Arslanian, 1985; Moustaid et al., 1996), alors que la lipolyse est induite par le glucagon (Perea et al., 1995) et les catécholamines (Holm, 2003).

Contexte de la recherche et objectifs du mémoire

Le sujet de ce mémoire se base sur des travaux antérieurs réalisés au laboratoire dans le cadre de la thèse de S.Vankoningsloo qui étudie le métabolisme glucidique et lipidique de pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à un stress énergétique induit par une inhibition des phosphorylations oxydatives.

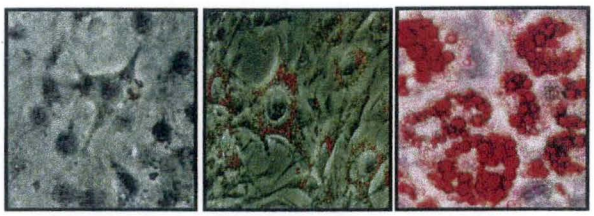
L'inhibiteur mitochondrial utilisé pour induire le stress énergétique est l'antimycine A (AA), un inhibiteur du complexe III de la chaîne des transporteurs d'électrons. Comme illustré à la figure I.23 A, l'antimycine A induit l'apparition de vésicules cytosoliques de triglycérides dans les cellules 3T3-L1 ici mises en évidence par une coloration à l'Oil Red O. Ce phénotype multivésiculaire diffère de celui d'un adipocyte mature différencié suite à un traitement des préadipocytes en présence d'un cocktail pro-adipogène contenant 5 µg/ml d'insuline, 300 µM de dibutyryl-AMP cyclique et de 1 µM dexaméthasone. Dans ce travail, nous rechercherons les mécanismes permettant d'expliquer les effets de l'antimycine A sur l'accumulation de triglycérides aux niveaux cellulaire et moléculaire. La quantification de l'absorbance des tapis cellulaires après coloration à l'Oil Red O (figure I.23 B) montre que la quantité de triglycérides intracellulaires augmente au cours d'une incubation avec l'AA (10 nM). L'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A est également dose-dépendante entre 0,5 et 10 nM (figure I.23 C). La concentration de 10 nM en antimycine A sera utilisée tout au long de ce travail car elle induit une accumulation de triglycérides hautement significative mais peu de cytotoxicité. La cytotoxycité, quantifiée par un test de libération de la LDH (lactate déshydrogénase) est inférieure à 5 %.

L'objectif de la thèse de S. Vankoningsloo est de rechercher les mécanismes cellulaires responsables de la formation de ces vésicules de triglycérides dans les pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à une perturbation de l'activité énergétique de la mitochondrie. Une partie de son travail porte sur l'étude du rôle éventuel joué par le glucose dans l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A. En effet, le glucose est un nutriment fortement incorporé dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A, et ce de manière spécifique car son entrée dans la cellule est totalement inhibée par la cytochalasine B, un inhibiteur des GLUTs, comme illustré à la figure I.24 A pour un temps d'incubation des cellules de 2 jours avec l'inhibiteur. Ce temps a été choisi sur base d'expériences préliminaires (cinétiques) qui montrent que l'incorporation de glucose est élevée pendant les 8 jours de traitement avec l'antimycine A et est déjà maximal après 2 jours. Nous conserverons ce temps dans ce travail pour les tests d'incorporation de glucose. Les figures I.24 B-C montrent également que l'incorporation de glucose dans les 3T3-L1 induite par l'antimycine A semble impliquer une voie de signalisation dépendante de l'activité de la PI-3 K et du calcium. En effet, elle est inhibée de manière dose-dépendante par le LY294002 (un inhibiteur spécifique de la PI-3 K) et par le BAPTA-AM (un chélateur de calcium intracellulaire).

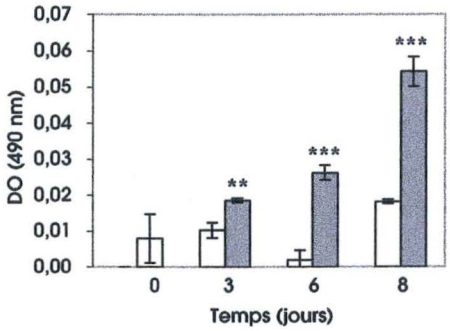
En plus d'inhiber l'incorporation de glucose, ces deux molécules réduisent également l'accumulation de triglycérides dans les 3T3-L1 induite par l'antimycine A (figure I.25 A-B). La PI-3 K et le calcium sont donc des effecteurs moléculaires potantiels dans les mécanismes qui conduisent à l'importation de glucose et à l'accumulation de triglycérides dans la cellule 3T3-L1 soumise à un stress énergétique. C'est sur base de ces données que nous avons émis l'hypothèse que le glucose pourrait être responsable de l'accumulation de triglycérides observée dans ces conditions.

Dans ce mémoire, nous poursuivrons un double objectif. La première partie du travail sera consacrée à la recherche des effecteurs moléculaires impliqués dans l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A dans les 3T3-L1. Nous rechercherons donc les kinases potentiellement impliquées dans la translocation de transporteurs au glucose (GLUT) dans la membrane des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A et doserons leur activité. Parmi ces kinases, nous nous sommes intéressés aux kinases situées en aval de la PI-3 K et à l 'AMPK. Dans la deuxième partie, nous rechercherons le(s) rôle(s) joué(s) par le glucose dans l'accumulation de triglycérides dans les cellules 3T3-L1 induite par un traitement avec l'antimycine A. Nous rechercherons d'une part le rôle potentiel du glucose en tant que messager secondaire capable d'activer des facteurs de transcription impliqués dans l'expression d'enzymes lipogéniques et, d'autre part, nous rechercherons si le glucose est converti en triglycérides dans les cellules 3T3-L1 traitées avec l'antimycine A.

A



B



C

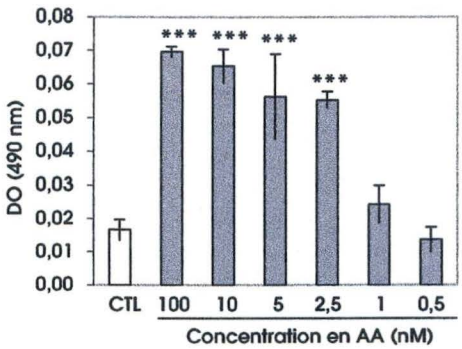


Figure I.23 : Effet de l'antimycine A sur le contenu intracellulaire en triglycérides des 3T3-L1. **(A)** Micrographies de 3T3-L1 prises au microscope à contraste de phase après 8 jours d'incubation des cellules en présence ou en absence (contrôles, CTL) d'antimycine A (AA) à 10 nM ou d'un cocktail hormonal stimulant la différenciation adipocytaire (1 µM dexaméthasone, 300 µM dibutyryl-AMP cyclique, 5 µg/ml insuline), et coloration des triglycérides à l'Oil Red O. **(B)** Quantification au spectrophotomètre de l'absorbance à 490 nm de tapis de cellules 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, colonnes blanches) pendant des temps croissants en présence d'AA à 10 nM et colorées à l'Oil Red O. **(C)** Quantification au spectrophotomètre de l'absorbance à 490 nm de tapis de cellules 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 8 jours en présence d'AA à différentes concentrations et colorées avec l'Oil Red O. Les résultats sont exprimés en valeurs de DO à 490 nm comme les moyennes ± un écart-type pour n=3. (**) et (***): significativement différent des contrôles correspondants avec $p<0,01$ et $p<0,001$comme déterminé par ANOVA 1 et contrastes de Scheffé.

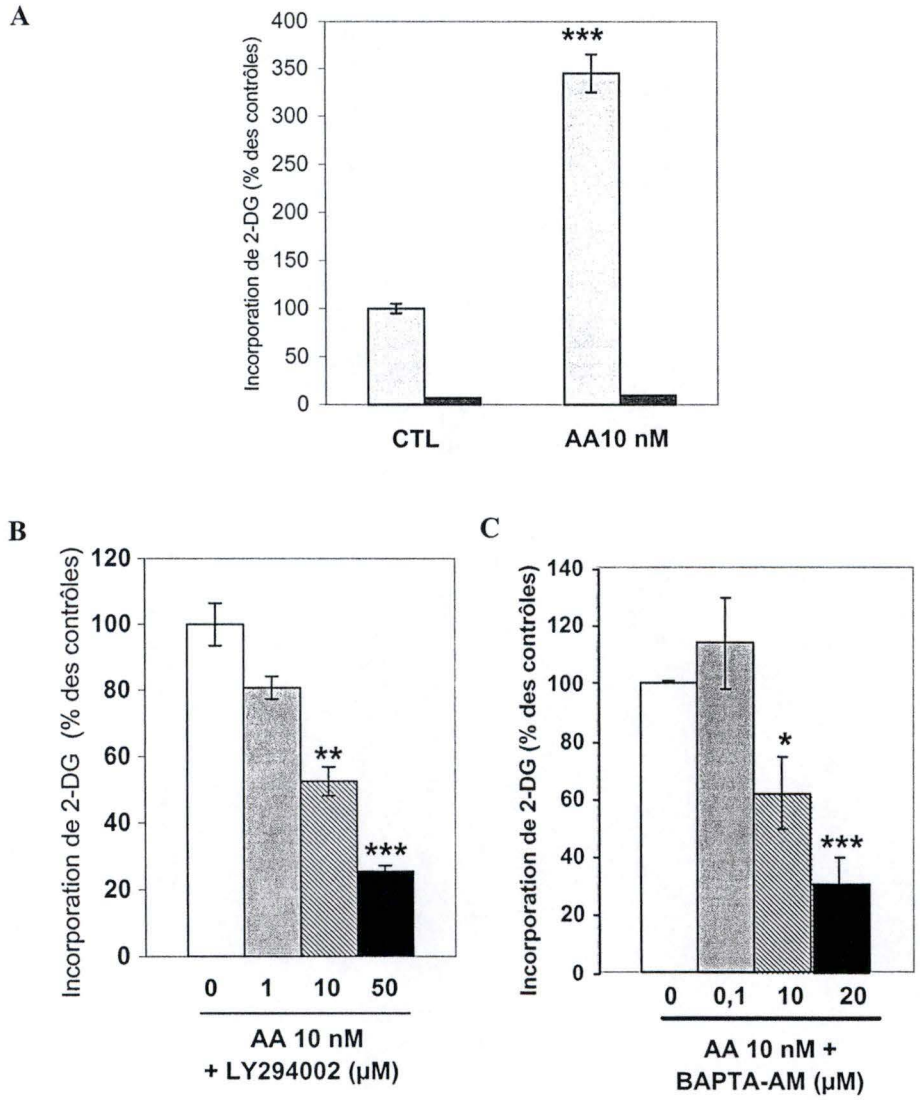
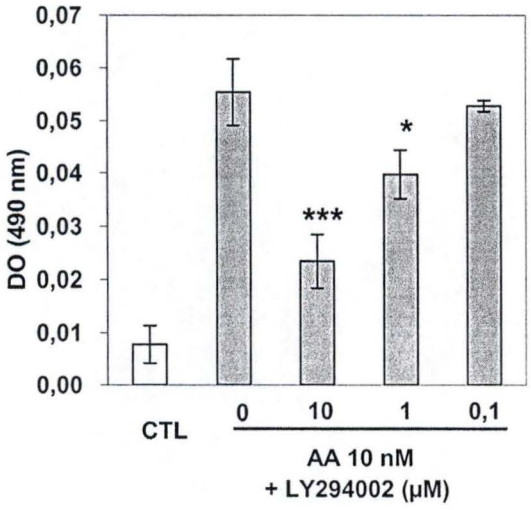


Figure I.24 : (A) Les 3T3-L1 sont incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 2 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM, puis pré-incubées (colonnes noires) ou non (colonnes grises) pendant 4 h avec de la cytochalasine B (40 nM). Les cellules sont esuite incubées pendant 30 min avec 1 µCi/ml de déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG). La radioactivité associée aux lysats cellulaires est mesurée dans un compteur à scintillations. **(B-C)** Les 3T3-L1 sont incubées ou non pendant 2 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM, puis pré-incubées pendant 3 h avec du LY294002 **(B)** ou avec du BAPTA-AM **(C)** avant le test d'incorporation de 2-DG. Les résultats sont exprimés en cpm/µg de protéines et présentés en pourcentages des contrôles correspondants comme les moyennes ± un écart-type pour n=3. (*), (**) et (***): significativement différent du contrôle correspondant avec $p<0,05$, $p<0,01$ et $p<0,001$ comme déterminé par ANOVA 1 et contrastes de Scheffé.

A



B

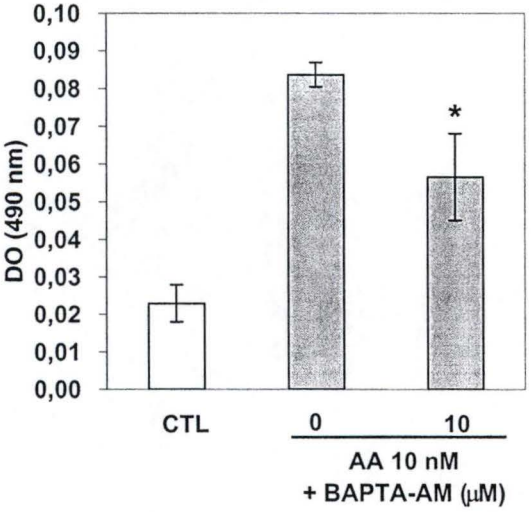


Figure I.25 : Effet d'un inhibiteur de la PI-3 K et d'un chélateur de calcium intracellulaire sur le contenu en triglycérides dans les 3T3-L1. **(A)** Les cellules sont incubées pendant 8 jours en présence ou en absence (contrôles, CTL) d'antimycine A (AA) à 10 nM, avec ou sans LY294002, puis les triglycérides sont colorés à l'Oil Red O. **(B)** Les 3T3-L1 sont incubées pendant 8 jours en présence ou en absence (contrôles, CTL) d'antimycine A (AA) à 10 nM avec ou sans BAPTA-AM, puis les triglycérides sont colorés à l'Oil Red O. L'absorbance des tapis cellulaires est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm. Les résultats sont exprimés en valeurs de D.O à 490 nm comme les moyennes ± un écart-type pour n=3. (*) et (***): significativement différent des contrôles correspondants avec $p<0,05$ et $p<0,001$ comme déterminé par ANOVA 1 et contrastes de Scheffé.

II. Matériel et méthodes

II MATERIEL ET METHODES

II.1 Culture cellulaire et sous-cultures

Les cellules 3T3-L1 sont des pré-adipocytes issus d'embryons murins et proviennent de l'ATCC (American Tissue and Cell Collection, USA). Elles sont cultivées jusqu'à confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (T75, Corning, USA) dans du milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose) contenant 4500 mg/l de glucose (Gibco BRL, Grande-Bretagne) et 10 % de SVF (sérum de veau foetal) (Gibco BRL, Grande-Bretagne). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37 °C et dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2 (Heraeus, Allemagne).

Une fois à confluence, les cellules sont sous-cultivées dans de nouvelles boîtes dont le type est fonction de l'utilisation ultérieure. Après avoir enlevé le milieu de culture, les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 ; pH 7,4) préchauffé à 37°C, afin d'éliminer les résidus de sérum. On traite ensuite les cellules avec 2 ml d' une solution de trypsine (0,5 g/l) et d'EDTA (Ethylène Diamine TétrAcétique, Gibco BRL). Après quelques minutes, les cellules se détachent de la boîte de culture et sont alors resuspendues dans un volume de 10 ml de DHG contenant 10 % de SVF. La suspension cellulaire est alors répartie dans de nouvelles boîtes de culture ou dans des boîtes de culture multipuits selon l'expérience à réaliser.

II.2 Incubations des cellules avec l'inhibiteur des phosphorylations oxydatives

L'inhibiteur pharmacologique des phosphorylations oxydatives utilisé dans ce travail est l'antimycine A (AA, Sigma, USA), un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire. Sur base de résultats obtenus dans le cadre de la thèse de doctorat de S.Vankoningsloo, la concentration utilisée est de 10 nM. Cette concentration induit une diminution rapide de la quantité d'ATP intracellulaire d'environ 40 % dans les 3T3-L1 et est non toxique pour les cellules.

L'AA est dilué dans du DHG-L1 contenant 10 % de SVF. La composition de ce milieu est identique à celle du DHG, mais ne contient que 1,5 g/l de $NaHCO_3$ pour 3,7 g/l dans le DHG. Les incubations des cellules avec l'AA, ensemencées dans des boîtes de 75 cm^2 ou des boîtes multipuits (Corning, USA), commencent lorsque les cellules sont confluentes, soit 3 jours après la sous-culture à 50 % de confluence. Les expériences sont réalisées après 2 ou 8 jours d'incubation et le milieu DHG-L1 + 10 % de SVF est alors renouvelé tous les 2 jours en présence de l'inhibiteur mitochondrial à la même concentration.

II.3 Coloration des triglycérides à l'Oil Red O

Cette méthode est la plus couramment utilisée afin de visualiser et de quantifier les triglycérides dans la cellule (Koopman et al., 2001). Elle se base sur la fixation d'un colorant (l'Oil Red O) ayant une forte affinité pour les graisses neutres.

L'Oil Red O à 0,2 % dans de l'isopropanol (Merck, Allemagne) est mélangé avec une solution de dextrine (Sigma, USA) à 1 % dans de l'eau (v/v : 3/2), puis filtré sur un filtre Whatman 2V (Whatman, Grande-Bretagne). Les cellules 3T3-L1, cultivées en plaques à 24 puits (Corning, USA) et incubées ou non en présence d'antimycine A à 10 nM, sont rincées avec 1 ml de PBS, fixées pendant 2 min avec 0,5 ml de paraformaldéhyde à 3,7 % (PFA ; Merck, Allemagne) puis incubées pendant 30 min avec 0,5 ml de la solution d'Oil Red O. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec 1 ml de PBS et l'absorbance des tapis cellulaires est mesurée dans un spectrophotomètre à 490 nm (Ultramark, Biorad, Allemagne).

II.4 Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode couramment utilisée permet de mesurer la concentration en protéines dans un échantillon (Bradford, 1976).

Pour chaque test, à 1 ml de colorant dilué 5x dans H_2O et filtré (Bio-Rad, USA), est ajoutée, toutes les 30 s, une quantité donnée de protéines à doser (entre 3µl et 10 µl du volume d'échantillon). Après 5 min, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 595 nm de 30 s en 30 s. Un blanc (solution dans laquelle les protéines sont resuspendues : NaOH ou tampon de lyse) et un étalon BSA (Bovine Serum Albumin) de concentration connue (2 µg/µl) sont également réalisés. Tous les dosages sont réalisés en doubles. La concentration en protéines dans l'échantillon est déterminée grâce à l'étalon BSA par la formule suivante :

$$\frac{((\text{moyenne test-moyenne blanc})/(\text{moyenne étalon-moyenne blanc})) \times 5}{\text{volume de l'échantillon (en µl)}} = \mu g \text{ de protéines}/\mu l$$

Remarque : 5 correspond à la quantité de protéines dans l'étalon (2,5 µl × 2 µg/µl)

II.5 Mesure de l'incorporation de 2-déoxy-[1, 2-^{3}H]-D glucose

Cette technique nous a permis de quantifier l'incorporation de glucose par des cellules 3T3-L1 incubées ou non en présence d'antimycine A. Le 2-déoxy-[1, 2-^{3}H]-D-glucose (PerkinElmer, USA) est un analogue du glucose non métabolisable qui pénètre dans les cellules par les transporteurs au glucose. Après plusieurs rinçages, la radioactivité associée à la population cellulaire est donc le reflet du taux d'incorporation de glucose par les cellules et permet donc de mesurer le flux de glucose à travers la membrane plasmique.

Les tests d'incorporation de glucose sont réalisés après 2 jours d'incubation des 3T3-L1 avec de l'AA à 10 nM. Dans certaines expériences, les cellules sont également pré-incubées pendant 2 h en présence de différentes molécules comme l'antioxydant NAC (N-acétyl cystéine à 1mM ou 30 mM), un activateur de l'AMPK tel que l'AICAR à 500 µM, un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine comme la cytochalasine D à 0,05 µM, 1

μM ou 20 μM ou encore comme un inhibiteur de la GSK-3β (SB 216763 à 1 μM ou 10 μM).

Au terme des incubations, les cellules sont rincées une fois avec 1,5 ml de HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) ne contenant pas glucose et dont la composition par litre est : 8 g NaCl ; 0,4 g KCl ; 60 mg $Na_2HPO_4.2H_2O$; 60 mg KH_2PO_4 ; 100 mg $MgSO_4.7H_2O$; 100 mg $MgCl_2.6H_2O$; 350 mg $NaHCO_3$; pH 7,4) puis incubées pendant 30 min à 37 °C en présence de 2-déoxy-[1, 2-^{3}H]-D-glucose (29,80 Ci/mmole) dilué dans du HBSS à 1 μCi/ml. Les 3T3-L1 sont ensuite à nouveau rincées une fois avec du HBSS puis lysées dans 200 μl de NaOH 0,5 N pendant 45 min sous agitation et à température ambiante. A partir des lysats homogénéisés, des aliquotes de 25 μl sont prélevés afin de réaliser un dosage de protéines par la méthode de Bradford (voir point II.4). Afin d'éviter tout « quenching » lors du comptage de la radioactivité, 175 μl d'HCl 0,5 N sont ajoutés aux 175 μl de lysats. Enfin, 300 μl sont prélevés et dilués dans 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas) et le comptage de la radioactivité est réalisé dans un compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, USA). Un blanc est également réalisé en mesurant la quantité de glucose radioactif associée à la surface cellulaire. Ceci se fait en ajoutant le glucose radioactif (1 μCi/ml dans du HBSS) sur les cellules, avant de les rincer et de les lyser immédiatement. Ces valeurs « blancs » sont soustraites des valeurs des tests. Les valeurs obtenues sont exprimées en cpm (coups par minute) et les résultats sont rapportés à la quantité de protéines dans l'échantillon et donc exprimés en cpm/μg de protéines comme la moyenne ± un écart-type pour n = 3 ou 4.

II.6 Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale

Cette technique qui a été utilisée dans le cadre de ce travail pour la détection de plusieurs formes phosphorylées de protéines dont celle de l'AMPK (Thr172), d'IRS-1 (Tyr941), d'Akt1 (Thr308 et Ser 473) ainsi que pour la détection de p110α permet de visualiser et de localiser une protéine d'intérêt dans une cellule, suite à l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique. Cet anticorps primaire est lui-même détecté grâce à un anticorps secondaire anti-immunoglobuline (anti-Ig) couplé à un fluorochrome. La visualisation se fait par l'excitation du fluorochrome à une longueur d'onde déterminée par le laser du microscope confocal. Les intensités lumineuses pour chaque point en provenance d'un plan focal sont amplifiées dans un photomultiplicateur puis digitalisées. L'image de l'échantillon est reconstruite point par point par un balayage suivant les axes X et Y. La localisation du noyau des cellules peut s'effectuer par contre-marquage au TOPRO-3 (Molecular Probes, USA) qui émet de la fluorescence lorsqu'il se trouve intercalé dans les acides nucléiques double brins.

Les cellules, ensemencées dans des boîtes de culture à 24 puits sur des lamelles couvre-objets (Vel, Knittel Glaser, Allemagne) sont incubées pendant 2 jours avec de l'AA à 10 nM, puis éventuellement traitées pendant 2 h avec 20 μM de cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (Sigma, USA), 10 μM de BAPTA-AM, un chélateur intracellulaire du calcium (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N'N'-tetraacetic acid) (Sigma, USA) ou 30 mM de NAC, un antioxydant (Sigma, USA).

Les cellules sont ensuite rincées avec 1 ml de PBS préchauffé à 37 °C et fixées pendant 10 min, à température ambiante, avec 500 μl de paraformaldéhyde (Merk,

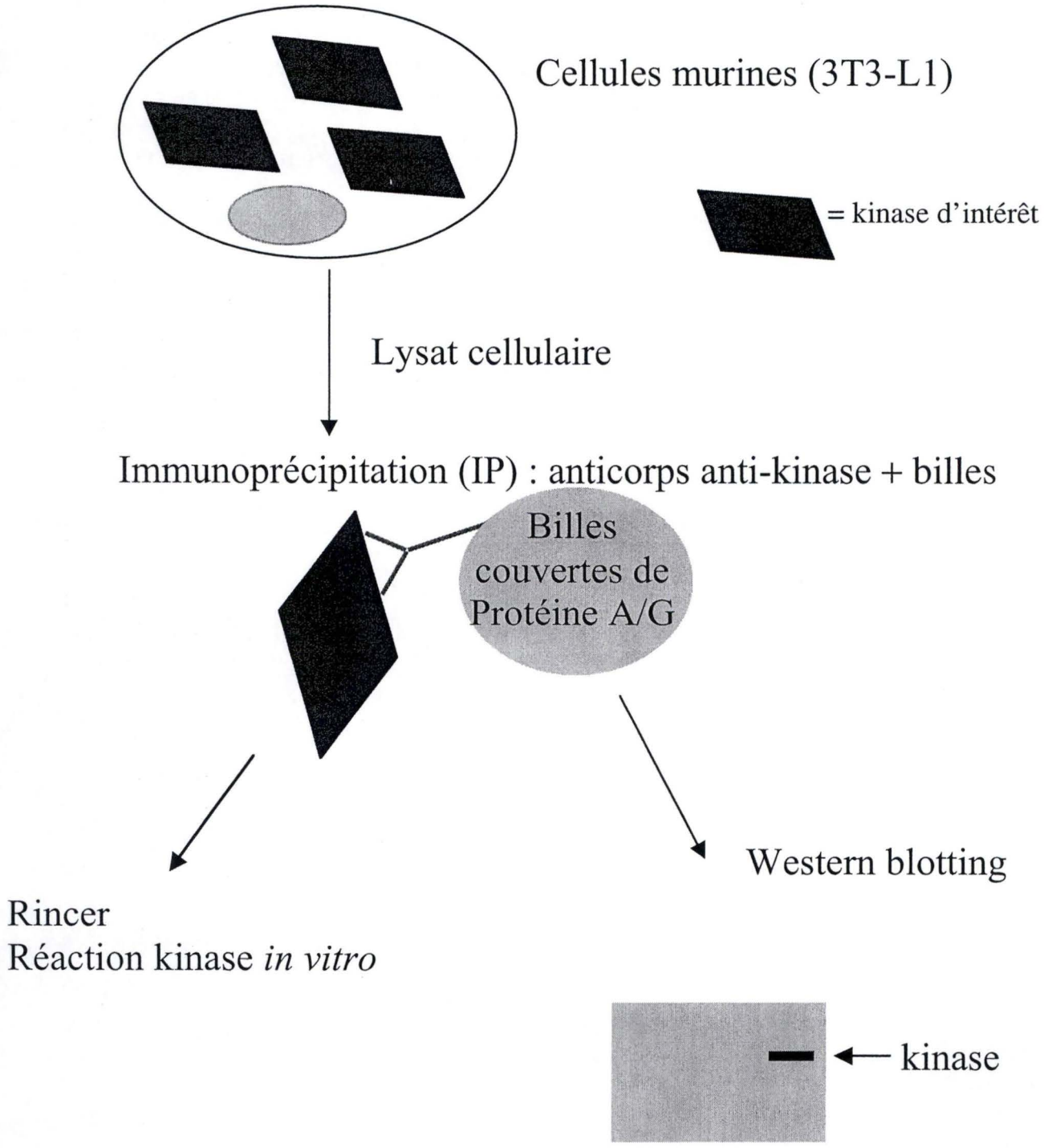


Figure II.1 : Schéma reprenant les différentes étapes de l'immunoprécipitation de kinases. Les cellules sont lysées et les lysats sont incubés avec un anticorps reconnaissant un ou plusieurs des épitopes de la protéine. Les lysats sont ensuite incubés avec des billes d'agarose couvertes de protéines A et G ayant une forte affinité pour le fragment Fc des anticorps. La kinase ainsi immunoprécipitée est récupérée afin de réaliser un test d'activité *in vitro* et une analyse de son abondance par un Western blot.

Allemagne) à 4 % également préchauffé à 37°C. Après un nouveau rinçage avec 1 ml de PBS, les cellules sont perméabilisées pendant 5 min à l'aide de 500 µl de PBS contenant 1% de Triton X-100. Avant d'être mise en présence de l'anticorps primaire, les 3T3-L1 sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS contenant 1% de BSA (Sigma, USA). Les cellules sont ensuite incubées, en chambre humide, pendant 16 h à 4°C avec un anticorps primaire de chèvre anti-pTyr941-IRS-1 (Biosource, USA), un anticorps anti-pThr308-Akt1 (Cell Signaling, Westburg, Pays-Bas), un anticorps anti-pSer473-Akt (Cell Signaling, Westburg, Pays-Bas) ou anti-pThr172-AMPK (Cell Signaling, Westburg, Pays-Bas) ou pendant 2 h, à température ambiante, avec un anticorps anti-p110α (Upsate, USA). Les anticorps primaires sont dilués 100 X dans du PBS-BSA 1 %. Ensuite, les cellules sont rincées trois fois avec 1 ml de PBS-BSA 1 % puis incubées pendant une heure à température ambiante et dans l'obscurité, avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa (Ex : 488 nm ; Em : 519 nm) (Molecular Probes, USA) dilué 500 x dans du PBS-BSA 1 %. Les cellules sont alors rincées deux fois avec 1 ml de PBS-BSA 1 % et finalement avec 1 ml de PBS. Après ce dernier rinçage, les noyaux sont marqués au TOPRO-3 (Molecular Probes, USA). Pour cela, les cellules sont incubées 35 min, à température ambiante et dans l'obscurité, avec du TOPRO-3 dilué 80 x dans une solution contenant 2 mg/ml d'ARNase (ICN, USA), puis rincées 3 x avec du PBS. Le montage sur lame porte-objets dégraissées à l'alcool (Memzel-Gloser, Allemagne) est réalisé en retournant les lamelles couvre-objets sur une goutte de Mowiol (Calbiochem, USA) préchauffé à 56°C tout en évitant la formation de bulles d'air. Les lames sont alors placées pendant une nuit à 4°C et à l'obscurité pour permettre la polymérisation du milieu de montage avant de visualiser les cellules au microscope confocal (Leica, Allemagne).

Le marquage en immunofluorescence de l'actine a été réalisé au moyen de l' α-phalloïdine (Molecular Probes, USA), un peptide bicyclique autofluorescent qui se lie au site de l'actine F (actine polymérisée). Après fixation et perméabilisation, les cellules sont incubées pendant 2 h, à température ambiante et dans l'obscurité, avec la phalloïdine diluée 50 x dans le PBS-BSA 1 %. Ensuite, les cellules sont rincées 2 x avec du PBS-BSA 1 % puis une fois avec du PBS seul avant de monter les lamelles couvre-objets sur les lames porte-objets comme décrit ci-dessus.

II.7 Dosage in vitro de l'activité de la PI-3 kinase après immunoprécipitation

Le principe général d'une immunoprécipitation consiste à enrichir un lysat en une protéine à partir d'un lysat cellulaire clair avec un anticorps spécifique. L'activité d'une kinase immunoprécipitée peut être dosée *in vitro* en mettant cette kinase en présence d'un substrat phosphorylable et d'ATP. Cette technique nous a permis de doser les activités de différentes kinases telles que la PI-3 K, la GSK-3β et la PKCλ. Le principe général de l'immunoprécipitation est présenté à la figure II.1.

Les 3T3-L1, ensemencées à confluence dans des boîtes de 75 cm^2 (T75, Corning, USA), sont incubées pendant 48 h en présence d'antimycine A à 10 nM. Elles sont ensuite rincées 3 x avec 10 ml de Tampon A froid (20 mM Tris ; pH 7,4, 137 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 0,1 mM $Na3VO_4$) et râclées dans 1 ml de tampon de lyse froid (Tampon A, 1 % NP-40 (Sigma, USA), cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne)). Les lysats sont incubés 20 min à 4°C sous agitation puis centrifugés 10 min à 13000 rpm (4°C). Un volume de chaque échantillon correspondant à 1,4 mg de protéines est prélevé. On ajoute alors 5 µg d'anticorps anti-p85 (Upstate, USA) pendant 1 h à 4°C, puis 60 µl de billes

d'agarose tapissées de protéines A/G Plus (Oncogene, USA) pendant 1 h à 4°C, afin d'immunoprécipiter la PI-3 K par sa sous-unité régulatrice. Un contrôle sans anticorps est également réalisé. Les immunocomplexes (PI-3 K-anticorps1-anticorps2-billes) sont alors rincés 3 x avec 1 ml de tampon de lyse, 3 x avec 1 ml de Tampon B (100 mM Tris ; pH 7,4, 0,1 mM Na_3VO_4, 5 mM LiCl) et 2 x avec 1 ml de Tampon C (10 mM Tris ; pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM Na_3VO_4). Lors du dernier rinçage, 250 µl de suspension sont prélevés afin de réaliser une analyse en, Western blotting, de l'abondance de la sous-unité p85 immunoprécipitée (voir point II.10). On resuspend ensuite les immunocomplexes dans un tampon de réaction composé de 50 µl de Tampon C, 20 µg de phosphatidylinositol (= substrat) (Avanti Lipids, USA) et 10 µl de $MgCl_2$ à 100 mM. Le solvant du phosphatidylinositol ($CHCl_3$) a été préalablement évaporé sous un flux d'argon, puis le phosphatidylinositol a été resuspendu par sonication (20 x 30 s) à 2 µg/µl dans du tampon MOPS 25 mM-EGTA 1 mM. Nous avons également réalisé un deuxième type de contrôle sans phosphatidylinositol. La réaction débute quand on ajoute la mixture réactionnelle contenant pour un test : 1 µl $MgCl_2$ 100 mM, 1 µl ATP 4,4 mM, 1,5 µl H_2O et 15 µCi de [γ-^{32}P]ATP (Perkin Elmer, USA). La réaction est incubée à 37 °C pendant 10 min avant d'être stoppée par l'addition de 20 µl de HCl 6 N et de 160 µl d'un mélange de $CH_3OH/CHCl_3$ (v/v : 1:1). Après 10 min de centrifugation à 13000 rpm, 50 µl de la phase organique (phase inférieure) sont déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince de silice (Thin Layer Chromatography, TLC, Analtech). La migration des échantillons en TLC est réalisée pendant 90 min dans une chambre hermétique saturée en solvants organiques utilisés pour la migration et composés d'un mélange de $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O:NH_4OH (60:47:11:3,2). Après séchage à l'air libre, la plaque de silice est emballée dans du papier cellophane et exposée à un film autoradiographique (Hyperfilm MP, Amersham, Grande-Bretagne) pendant 10 jours à –70°C avant de révéler le film selon le protocole décrit au point II.10.4 pour le Western blotting.

II.8 Dosage in vitro de l'activité de la GSK-3β après immunoprécipitation

Les cellules 3T3-L1 ensemencées à confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Corning, USA) sont incubées pendant 48 h en présence d'antimycine A (10 nM). Les cellules sont ensuite lysées dans 1 ml de tampon de lyse froid (10 mM Tris-HCl ; pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 mM Na_3VO_4, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne)). Les lysats sont centrifugés 15 min à 13000 rpm à 4°C, puis les lysats clairs sont incubés pendant 2 h à 4°C avec 5 µg d'anticorps anti-GSK-3β (Cell Signaling, Westburg, Pays-Bas). Les immunocomplexes sont immobilisés sur 60 µl de billes d'agarose tapissées de protéines A/G Plus (Oncogene, USA), incubées pendant 1 h à 4°C. Les immunocomplexes sont ensuite lavés deux fois avec 800 µl de tampon de lyse. Durant le second lavage, 200 µl de chaque échantillon sont prélevés pour analyser l'abondance de la GSK-3β dans les immunoprécipitats par Western blotting (voir point II.10). Les complexes sont finalement rincés avec 500 µl de tampon de réaction (20 mM Tris-HCl ; pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothréitol) puis incubés pendant 30 min à 30 °C dans 50 µl de tampon de réaction contenant 50 µM de CREB-phosphopeptide (NEB, Grande-Bretagne), 20 µM d'ATP (Sigma, USA) et 10 µCi/test de [γ-^{32}P]ATP (Perkin Elmer, USA). Dans certaines conditions, de l'acétate de lithium (LiAc, un inhibiteur de la GSK-3β) a été ajouté à 40 µM au moment du dosage. Au terme de la réaction et après une centrifugation de 1 min à 3000 rpm, un aliquot de 25 µl est déposé et maintenu 2 min sur une membrane de phosphocellulose ayant une forte affinité pour les peptides phosphorylés (Pierce, USA), avant le rinçage de la membrane avec

500 µl de H_3PO_4 75 mM pour éluer l'ATP et les peptides non-phosphorylés. Le comptage de la radioactivité associée aux membranes est réalisé dans un compteur à scintillations (2100 TR Packard Instrument Company, USA). La radioactivité est proportionnelle à l'activité kinase de la GSK-3β.

II.9 Dosage in vitro de l'activité de la PKCλ après immunoprécipitation

Pour le dosage de la PKCλ, nous avons utilisé le kit « IQ Ser/Thr Kinase assay » (Pierce, Grande-Bretagne) dont le principe est de mettre la PKCλ immunoprécipitée en présence d'ATP et d'un substrat peptidique qui comporte un motif de phosphorylation reconnu par la PKCλ et qui est couplé à une sonde fluorescente. Si la PKCλ est active, le peptide est phosphorylé. Un « réactif IQ » (fourni dans le kit) est ensuite ajouté. Ce réactif se fixe sur les peptides phosphorylés, dont il éteint la fluorescence par une réaction de *quenching*. Donc, les intensités de fluorescence mesurées seront inversément proportionnelles à l'activité kinase de la PKCλ dans les échantillons.

Les cellules 3T3-L1 ensemencées à confluence dans des boîtes de culture de 75 cm^2 (Corning, USA) sont incubées pendant 48 h en présence d'antimycine A (10 nM) ou pendant 15 min en présence d'insuline (100 nM ou 865 nM), puis lysées dans 300 µl de tampon de lyse froid (20 mM Tris ; pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,25 M sucrose, 1,2 mM EGTA, 20 mM β-mercaptoéthanol, 1 % Triton X-100, 0,5 % NP-40, cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Allemagne) et de phosphatases (1 mM Na_3VO_4, 5 mM NaF, 10 mM p-nitrophénylphosphate, 10 mM β-glycérophosphate). Les lysats sont incubés pendant 30 min à 4°C, puis centrifugés pendant 15 min à 4°C. Les lysats clairs obtenus sont ensuite incubés pendant 2 h à 4°C avec 5 µg d'anticorps anti-PKCλ (Transduction Laboratories, USA), puis pendant 1 h à 4°C avec 60 µl de billes d'agarose tapissées de protéines A/G Plus (Oncogene, USA). Un contrôle sans anticorps est également réalisé. Les immunocomplexes sont rincés deux fois avec 800 µl de tampon de lyse et une fois dans 500 µl de tampon de réaction (50 mM Tris-HCl ; pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM NaF, cocktail d'inhibiteurs de protéases, 4 µg/50 µl de phosphatidylsérine), puis repris dans 40 µl de tampon de réaction contenant 200 µM ATP (Sigma) et 65 µM d'un peptide synthétique dérivé de la MBP (myelin basic protein) phosphorylable par la PKCλ et autofluorescent. Après 30 ou 90 min de réaction à 30°C, les complexes sont sédimentés par une centrifugation de 1 min à 13000 rpm et 30 µl du surnageant sont déposés dans une plaque à 96 puits (Greiner, Allemagne). L'ajout de 120 µl de "réactif IQ", fourni dans le kit, permet d'éteindre la fluorescence des peptides qui ont été phosphorylés par la kinase par une réaction de *quenching*. La mesure de fluorescence (Ex : 585 ; Em : 612 nm) dans un spectrofluorimètre (SLM AMINCO, USA) est donc inversément proportionnelle à l'activité de la PKCλ. L'abondance de la PKCλ immunoprécipitée dans les différents échantillons a été analysée par Western blotting (voir point II.10).

II.10 Western Blotting

Cette technique a été utilisée afin de contrôler les quantités de protéines p85, PKCλ et GSK-3β immunoprécipitées au cours des tests d'activité kinase in vitro décrits au point II.7-8-9.

Les échantillons protéiques sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS qui dénature les protéines et leur confère des charges négatives. Les protéines vont alors migrer dans le gel sous l'impulsion d'un courant électrique. La distance de migration d'une protéine dépend de son poids moléculaire. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride). La protéine d'intérêt est alors détectée à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre un ou plusieurs de ses épitopes puis par un deuxième anticorps couplé à l'enzyme HRP (Horse Radish Peroxydase) reconnaissant le fragment Fc des anticorps. La révélation est réalisée en présence d'un substrat de la peroxydase et de luminol. L'oxydation du luminol s'accompagne de production de lumière qui peut être détectée à l'aide d'un film radiographique.

II.10.1 Préparation des échantillons

On ajoute aux aliquotes prélevés après immunoprécipitation et avant les dosages d'activité kinase un équivolume de sample buffer 2X (0,06 M Tris ; pH 6,8, 2,4 % SDS, 10 % glycérol, 0,02 % bleu bromophénol, 6 % β-mercaptoéthanol) puis on porte les échantillons à 100 °C pendant 5 min avant de les centrifuger brièvement et de les charger sur le gel.

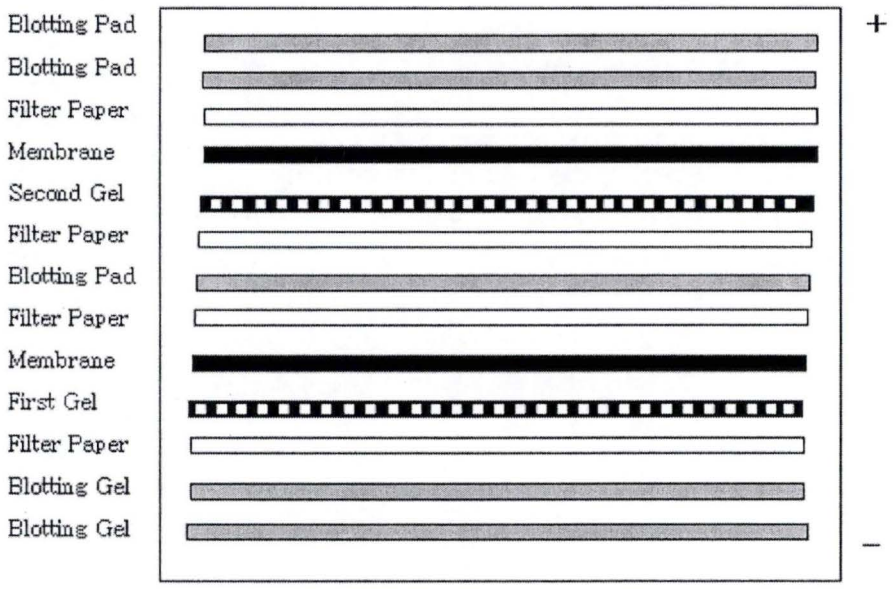
II.10.2 Séparation des protéines par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

La séparation des protéines par électrophorèse nécessite deux gels de composition différente. Le premier gel coulé (« running gel ») permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Celui-ci est coulé entre des plaques de montage verticales. Après 45 min de polymérisation, le second gel (« stacking gel ») est ensuite coulé jusqu'au bord des plaques avant d'y insérer un « peigne » pour former des puits. La composition des gels est la suivante :

Gel de séparation 10 % :
. 15 ml de polyacrylamide 30 % (Biorad)
. 7,5 ml H_2O
. 22,5 ml *buffer A* (90 ml Tris-HCl 2 M pH 8,8; 285 ml Tris-base 2 M; 10 ml SDS 20 %; 115 ml H_2O)
. 200 µl ammonium persulfate (APS) 25 % (Pharmacia-Biotech)
. 75 µl TEMED (Pharmacia-Biotech)

Gel de concentration:
. 3 ml de polyacrylamide 30 % (Biorad)
. 7 ml H_2O
. 10 ml *buffer B* (121 ml Tris-HCl 2 M pH 6,8; 4 ml Tris-base 2 M; 10 ml SDS 20 % ; 365 ml H_2O)
. 40 µl ammonium persulfate (APS) 25 % (Pharmacia-Biotech)
. 15 µl TEMED (Pharmacia-Biotech)

Le montage est placé dans une cuve remplie de tampon de migration ou « running buffer » (0,05 M Tris-base; 0,38 M glycine; 0,1 % SDS). Les échantillons et l'étalon (SeeBluePlus 2,



Système sandwich

Figure II.2 : Représentation schématique du système « sandwich » permettant le transfert de protéines du gel de polyacrylamide sur une membrane. La membrane est imbibée de méthanol, rincée par du tampon de transfert et surmontée du gel. Ceux-ci sont placés entre deux papiers Wathman puis entre deux éponges imbibées de tampon de transfert.

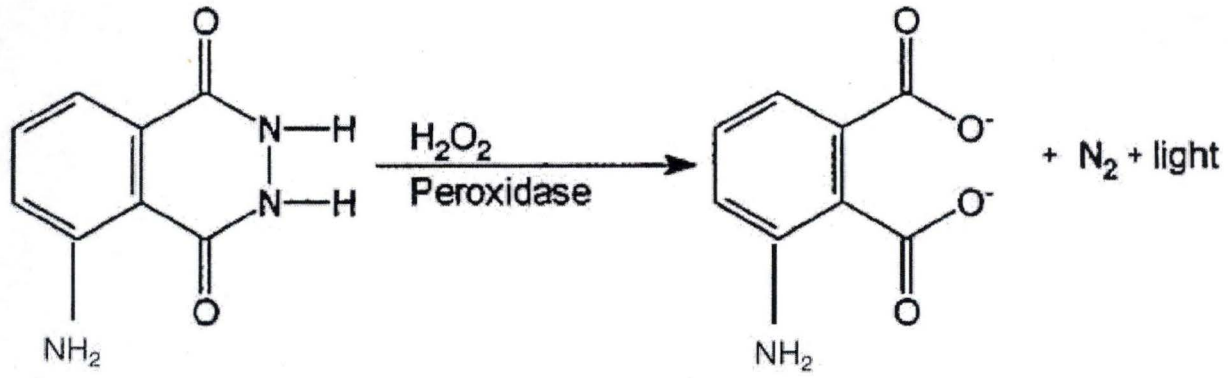


Figure II.3 : Réaction d'oxydation du luminol par la peroxydase. L'HRP (Horse radish peroxydase) oxyde le luminol en 3-aminophtalate en présence d'H_2O_2. Les photons produits par la réaction iront imprimer un film auto-radiographique.

Invitrogen, USA) sont déposés dans le fond des puits et migrent pendant 45 min à 35 mA (à travers le « stacking gel ») puis pendant 4 h à 45 mA (à travers le « running gel »).

II.10.3 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF par un système d'électrotransfert « semi-dry »

Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, Amersham, Grande-Bretagne) pour permettre la détection de la protéine d'intérêt au moyen d'un anticorps. A la fin de l'électrophorèse, le gel est démoulé. La membrane de PVDF est immergée pendant 1 min dans du méthanol puis dans du tampon de transfert (0,5 M Tris-base ; pH 8,3 ; 0,76 M glycine; 0,1 % SDS et 15 % en méthanol). On réalise alors le montage en « sandwich » suivant : la membrane (vers l'anode) et le gel (vers la cathode) sont placés entre deux papiers Whatman imbibés de tampon de transfert (Macherey-Nagel), puis entre deux éponges également imbibées de tampon (figure II.2). Il faut absolument éviter la formation de bulles d'air entre les différentes couches du montage pour obtenir un transfert homogène. On applique alors un courant de 30 mA entre les électrodes pendant 16 h pour permettre le transfert et la fixation des protéines à la membrane de PVDF.

II.10.4 Révélation en chémiluminescence

Les incubations des membranes avec les anticorps sont réalisées dans du tampon TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween 20) de composition : 2,4 g/l Tris; pH 7,4 ; 8 g/l NaCl, auquel on ajoute 0,1 % de Tween-20 pour obtenir du TBS-T. Afin de saturer les sites de liaison non spécifiques que pourraient reconnaître les anticorps primaires et secondaires utilisés, la membrane est bloquée 3 h sous agitation dans du TBS-T contenant 5 % de lait en poudre Gloria (Nestlé, Belgique) avant d'être incubée pendant 2 h avec l'anticorps primaire anti-p110α (Upstate, USA), anti-GSK-3β (Cell Signaling, Westburg, Pays-Bas) ou anti-PKCλ (Transduction Laboratories, USA), dilué 1000 fois dans du TBS-T contenant 5 % de lait. Ensuite, la membrane est rincée 3 x 5 min au TBS-T contenant 5 % de lait, puis incubée 45 min avec un anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 2000 fois dans du TBS-T contenant 5 % de lait. Trois derniers rinçages de 20 min dans le TBS-T sont réalisés avant d'incuber la membrane 5 min dans une solution contenant 50 % d'H_2O_2 et de 50 % de luminol (ECL, Pierce). La réaction catalysée par la peroxydase est illustrée à la figure II.3. En chambre noire, on expose alors un film autoradiographique (Hyperfilm MP, Amersham, Grande-Bretagne) sur la membrane, pendant des périodes variables allant de quelques secondes à quelques minutes, de manière à obtenir l'exposition souhaitée et des signaux non saturés. Après exposition, le film est plongé quelques minutes dans une solution de révélateur (Ilford imaging, Grande-Bretagne) puis rincé à l'eau distillée avant d'être fixé quelques minutes dans une solution de fixateur (Ilford imaging, Grande-Bretagne). Le film est ensuite rincé à l'eau pour éliminer toute trace de fixateur, et séché à l'air libre avant d'être scanné.

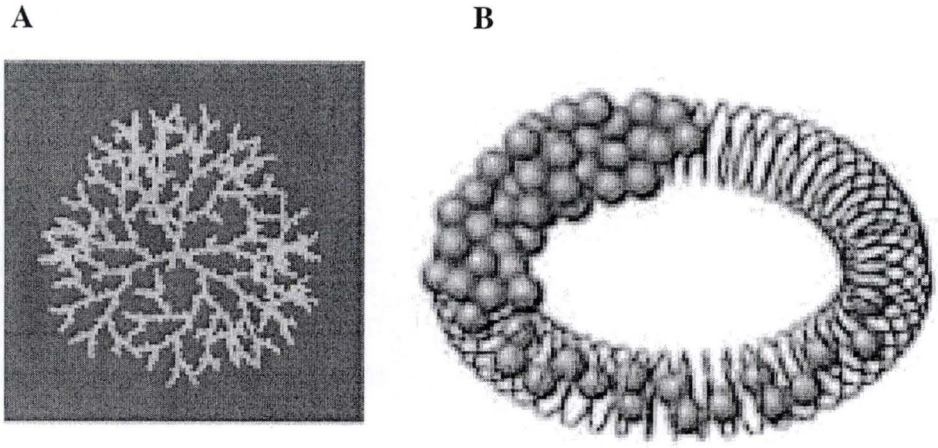


Figure II.4 : Représentation schématique de la structure du dendrimère polycationique utilisé comme vecteur de transfection **(A)** et de son interaction avec l'ADN **(B)**. L'agent SuperFect (représenté par les billes) interagit avec l'ADN afin de former une structure circulaire compacte chargée positivement lui permettant de rentrer dans la cellule.

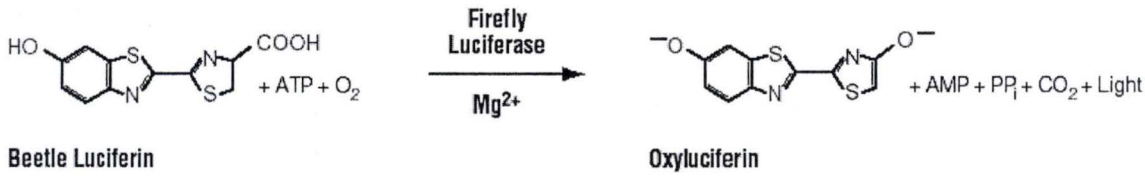


Figure II.5 : Schéma présentant la réaction d'oxydation catalysée par la luciférase. En présence de magnésium, d'ATP, d'oxygène et de la luciférase, la luciférine est oxydée en oxyluciférine. Cette réaction génère également de l'AMP, du phosphate inorganique, du CO_2 et des photons.

II.11 Transfection des cellules 3T3-L1 avec un système rapporteur luciférase répondant à ChREBP

Par cette technique, nous avons cherché à mettre en évidence l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription ChREBP dans des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A (10 nM).

Cette technique permet de mettre en évidence l'action transactivatrice d'un facteur de transcription en mesurant l'activité de la luciférase exprimée et codée par un gène inséré dans un plasmide et placé sous le contrôle d'un promoteur capable de fixer le facteur de transcription d'intérêt. Les cellules sont transfectées avec un plasmide par la méthode du SuperFect (Qiagen, Allemagne), un dendrimère polycationique de structure sphérique représenté à la figure II.4. Cette molécule chargée positivement va lier les groupements phosphates de l'ADN, permettant la formation de complexes Superfect-ADN compacts possédant une charge nette positive. Les cellules sont également transfectées avec un vecteur d'expression contenant le gène de la β-galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort de type CMV (CytoMégaloVirus), ceci afin de corriger la variabilité due à l'efficience de transfection. La luciférase catalyse, en présence d'ATP, la formation de luciféryl-adénylate. Ce produit est ensuite oxydé en oxyluciférine en présence d'oxygène. C'est la libération de photons produits au cours de cette réaction que l'on peut mesurer à l'aide d'un luminomètre pourvu d'un photodétecteur. Cette réaction est schématisée à la figure II.5. L'activité de la luciférase est dosée grâce au kit « Luciferase Reporter Assay System » (Promega, USA) et est donc exprimée en RLU (Relative Light Unit) et rapportée à l'activité β-galactosidase (exprimée en unité de densité optique) afin de normaliser les résultats.

Des cellules 3T3-L1 sont ensemencées dans des boîtes de culture à 12 puits (Corning, USA), à une densité correspondant à 50 % de confluence. Le lendemain, elles sont co-transfectées pendant 6 h au SuperFect dans un ratio 1 :5 (1 µg ADN, 5 µg d'agent de transfection) avec un plasmide rapporteur luciférase (0,75 µg/puits) placé sous le contrôle du promoteur de la L-pyruvate kinase de souris, sensible au facteur de transcrition ChREBP généreusement fourni par le Prof. Uyeda (Kawaguchi et al., 2001), et par un vecteur d'expression pCMV/β-galactosidase (0,25 µg/puits). Les cellules sont incubées sans passer par une phase de récupération en présence d'antimycine A (10 nM) pendant 24 h ou 48 h. Les cellules sont ensuite lysées pendant 15 min sous agitation dans 150 µl de *Passive Lysis Buffer* (Promega, USA). L'activité luciférase est alors dosée dans un bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas) sur un aliquote de 20 µl de lysat ajoutés à 100 µl de mixture réactionnelle contenant le substrat et est exprimée en RLU. Un dosage d'activité de la β-galactosidase est également effectué sur 40 µl de lysat ajoutés, dans les puits d'une plaque à 96 puits (Greiner, Allemagne), à 40 µl de tampon de réaction de composition pour 50 ml : 5 ml de $NaHPO_4$ 0,2 M ; pH 7,3 ; 50 µl de $MgCl_2$ 2 M ; 350 µl de β-mercaptoéthanol (Fluka, Suisse) ; 66,5 mg O-nitro-phényl-galactopyranoside (Sigma, USA) et 45 ml d'H_2O. L'absorbance du produit de réaction est mesurée après 15, 30 ou 60 min d'incubation à 37°C dans un spectrophotomètre (Ultramark, Biorad, Allemagne) à 405 nm. Les résultats normalisés pour l'activité β-galactosidase sont donc exprimés en RLU/D.O et représentent la moyenne ± un écart-type pour n=3.

II.12 Recherche de l'effet de l'AMPK sur l'incorporation de glucose

La transfection au SuperFect ne fournit qu'un taux de transfection d'environ 10 % pour les cellules 3T3-L1, réfractaires à de nombreuses méthodes de transfection. Si ceci ne pose pas de problème pour mesurer l'activité luciférase après transfection d'un système rapporteur, grâce à la grande sensibilité de cette technique, ce taux de transfection est insuffisant pour rechercher l'effet de la surexpression d'un dominant négatif ou positif sur un test faisant appel à l'ensemble de la population cellulaire. Nous avons donc utilisé la technique d'électroporation avec le Nucléofector (Amaxa, Pays-Bas) mise au point au laboratoire sur les cellules 3T3-L1 par S. Vankoningsloo. Dans ces conditions, on peut obtenir un taux de transfection d'au moins 50 %. L'électroporation consiste à soumettre les cellules à un champ électrique. La création de pores transitoires dans les membranes permet à l'ADN mis en présence d'entrer dans la cellule et dans le noyau.

Les cellules provenant de 2 boîtes de culture de 75 cm^2 confluentes sont rincées, trypsinisées et comptées dans une chambre de Neubauer (Marienfeld, Allemagne). Pour un test, 350000 cellules sont prélevées, centrifugées 10 min à 1000 rpm et resuspendues dans 100 µl de solution R (Amaxa, Pays-Bas). On ajoute alors 5 µg d'ADN plasmidique d'intérêt (un plasmide d'expression codant un dominant négatif α1-AMPK (généreusement donné par le Prof. Carling (Woods et al., 2000)) ou le vecteur vide PGL2) aux cellules qui sont ensuite transférées dans une cuvette d'électroporation. Les cellules sont finalement soumises au programme U-24 du Nucleofector, diluées dans 500 µl de DHG + 10 % SVF (37 °C) puis ensemencées dans une boîte de culture à 12 puits en présence d'1 ml de DHG + 10 % SVF, préalablement préchauffée à 37 °C. Après 4 h d'incubation dans l'étuve à 37 °C, les milieux sont renouvelés et les cellules sont incubées pendant 2 jours en présence d'antimycine A (10 nM) et un test d'incorporation de glucose est réalisé comme décrit précédemment (voir point II.5).

II.13 Mise en évidence de la conversion du glucose en triglycérides

Les cellules 3T3-L1 sont ensemencées dans des boîtes de culture de 25 cm^2 (Corning, USA) puis incubées pendant 8 jours en présence d'antimycine A à 10 nM avec renouvellement de milieux tous les 2 jours. Les cellules sont ensuite rincées une fois avec 5 ml de PBS puis incubées avec 5 µM de Glucose D-[^{14}C(U)] (303 mCi/mmol) (PerkinElmer, USA) pendant 90 min à l'étuve à 37°C, puis les triglycérides sont extraits comme décrit brièvement ci-après. Les cellules sont rincées avec 5 ml PBS, puis râclées dans 3 ml d'un mélange CH_3OH/H_2O (v/v : 2/0,8) dont on prélève 50 µl afin de doser la concentration en protéines par la méthode de Bradford (voir point II.4). Les triglycérides sont extraits par l'ajout de 1 ml de $CHCl_3$ et une nouvelle extraction est réalisée sur la phase aqueuse avec 1 ml de $CHCl_3$. Après évaporation du solvant au speed-vacuum 80 min à 37 °C, les triglycérides sont resuspendus dans 300 µl d'un mélange $CHCl_3/CH_3OH$ (v/v : 2/1) et un comptage de la radioactivité associée aux triglycérides est réalisé sur des aliquotes de 200 µl dans un compteur à scintillations.

II.14 Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont exprimés comme la moyenne ou la moyenne ± un écart-type en fonction du nombre de tests réalisés. Nous avons établi la validité statistique de nos résultats à chaque fois que c'était possible et que le nombre de réplicats (n) le permettait.

L'analyse de la variance (ANOVA 1) et des contrastes de Scheffé a été utilisée pour tester la signification statistique des différences entre moyennes.

III. Résultats et discussions

III RESULTATS ET DISCUSSIONS

La première partie de ce mémoire portera sur l'identification de messagers secondaires et de voies de signalisation potentiellement impliquées dans la réponse cellulaire de pré-adipocytes 3T3-L1 à une inhibition des phosphorylations oxydatives. Plus particulièrement, nous rechercherons leur(s) rôle(s) dans l'augmentation du transport du glucose mesurée dans des pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à un traitement en présence d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne des transporteurs d'électrons (Figure I.24 A).

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire montrent que le calcium est un messager secondaire important impliqué dans la régulation du transport du glucose et dans l'accumulation de triglycérides induits par l'antimycine A. Nous allons maintenant rechercher le rôle potentiel joué par les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) libérés par la mitochondrie dans l'accumulation de triglycérides et l'incorporation de glucose dans les cellules 3T3-L1 soumises à un stress énergétique.

III.1 Recherche de l'implication éventuelle des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale

La production de ROS par la chaîne de transporteurs d'électrons est augmentée en présence de certains inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale comme l'antimycine A. Ces ROS, dont les effets sont fonction des concentrations, peuvent être toxiques mais peuvent également agir en tant que messagers secondaires capables d'influencer certains processus cellulaires comme le transport du glucose, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Hrelia et al., 2002; Kang and Zheng, 2004; Lavrovsky et al., 2000; Torres and Forman, 2003). C'est la raison pour laquelle nous avons testé l'effet de trois molécules anti-oxydantes (la taxifoline, la L-ergothionéine et la N-acétyl-L-cystéine) possédant des mécanismes d'action différents, sur l'accumulation de triglycérides ou sur l'augmentation du transport du glucose induites par l'antimycine A dans des pré-adipocytes 3T3-L1. La taxifoline est un flavonoïde qui dégrade $O_2^{\cdot\,(-)}$ et H_2O_2 (Nakayama et al., 1993). La L-ergothionéine est une molécule possédant des groupements thiols pouvant détoxifier les radicaux hydroxyles $OH^{\cdot}$ et inhiber la peroxydation lipidique (Aruoma et al., 1997; Hartman and Hartman, 1987). La N-acétyl-L-cystéine (NAC) est la forme acétylée de la cystéine, plus efficacement absorbée et métabolisée. Elle constitue un précurseur dans la synthèse du glutathione, principal anti-oxydant intracellulaire nécessaire à l'activité de la GSH peroxydase (GPx), mais possède également des propriétés réductrices intrinsèques (Zafarullah et al., 2003). Les concentrations utilisées pour ces différents anti-oxydants ont été choisies sur base de la littérature (Aruoma et al., 1997; Nakayama et al., 1993; Zafarullah et al., 2003).

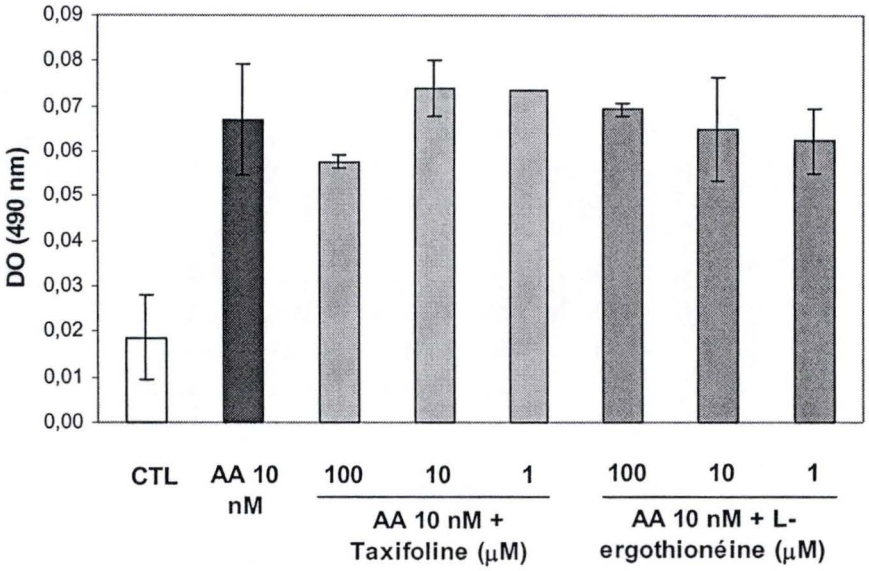


Figure III.1 : Effets de la taxifoline et de la L-ergothionéine sur l' accumulation de triglycérides induite par une incubation des 3T3-L1 en présence d'antimycine A. Les cellules sont incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM en présence ou en absence de taxifoline ou de L-ergothionéine (100 µM, 10 µM ou 1 µM). Le milieu est renouvelé tous les 2 jours. Au jour 8, les triglycérides sont colorés à l' Oil Red O et l' absorbance des tapis cellulaires est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance (D.O) et représentent la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3).

III.1.1 Effets de la taxifoline et de la L-ergothionéine sur l'accumulation de triglycérides dans des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A

La figure III.1 montre les effets de la taxifoline et de la L-ergothionéine sur l'accumulation de triglycérides induite par une incubation des 3T3-L1 en présence d'antimycine A à 10 nM pendant 8 jours. La taxifoline ou la L-ergothionéine (100 μM, 10 μM ou 1 μM) est ajoutée ou non (cellules contrôles) au milieu de culture des 3T3-L1 pendant toute la durée de l'incubation des cellules en présence d'antimycine A. Au terme des incubations, on réalise une coloration des triglycérides à l'Oil Red O et on mesure l'absorbance des tapis cellulaires à 490 nm dans un spectrophotomètre. On constate que la quantité de triglycérides accumulée est bien augmentée dans les cellules incubées en présence d'antimycine A mais n'est pas significativement modifiée par la présence des deux anti-oxydants testés et ce, quelle que soit la concentration utilisée.

Contrairement au calcium, les ROS ne semblent donc pas participer à une voie de signalisation conduisant à la formation de vésicules de triglycérides induite par une inhibition de l'activité mitochondriale. Ces résultats sont en accord avec le fait que la stigmatelline, un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transporteurs d'électrons qui n'augmente pas la production de ROS dans la mitochondrie (Raha et al., 2000), induit également l'apparition de vésicules de triglycérides dans les 3T3-L1 (S. Vankoningsloo, thèse en cours). Cependant, il existe de très nombreux anti-oxydants qui agissent à différents niveaux dans la cellule. Il serait intéressant de confirmer les résultats de la figure III.1 avec d'autres anti-oxydants.

III.1.2 Effet de la N-acétyl-L-cystéine sur l'incorporation de glucose par les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A

Comme nous l'avons vu, le glucose pourrait jouer un rôle important dans l'accumulation des triglycérides. En effet, le chélateur intracellulaire de Ca^{2+} (BAPTA-AM) et un inhibiteur de la PI-3 K (LY294002) diminuent le transport de glucose stimulé par l'antimycine A ainsi que l'accumulation de triglycérides induite par cet inhibiteur mitochondrial (figures I.24 B-C et figures I.25 A-B). Nous avons donc cherché à mettre en évidence un rôle éventuel des ROS dans l'incorporation de glucose par des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Dans cette expérience, nous testerons l'effet de la N-acétyl-L-cystéine (NAC). En effet, cette molécule, couramment utilisée dans la littérature, est un précurseur de glutathione, un anti-oxydant physiologique.

Le test d'incorporation de 2-DG (2-deoxy-[^{3}H] glucose) a été réalisé sur des cellules incubées pendant 2 jours avec l'antimycine A à 10 nM puis pré-incubées ou non pendant 2 h en présence de la NAC à la concentration de 1 ou 30 mM. Les cellules sont alors incubées pendant 30 min en présence du 2-DG (1 μCi/ml) dilué dans du HBSS contenant ou non la NAC aux mêmes concentrations. Les résultats sont présentés à la figure III.2.

Nous observons que la NAC n'a aucun effet, aux concentrations testées, sur l'augmentation du transport de 2-DG induite par l'antimycine A alors que le BAPTA l'inhibe d'une manière dépendante de la concentration (figure I.24 C). Tout comme pour la formation de vésicules de triglycérides, l'importation de glucose par les 3T3-L1 incubées en présence

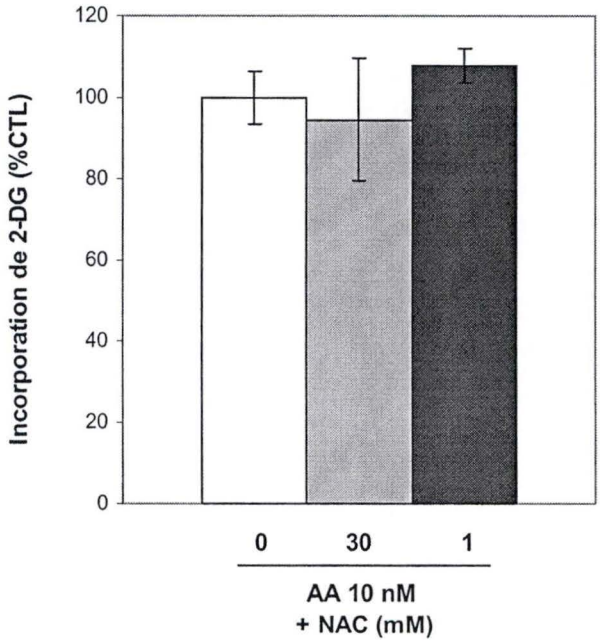


Figure III.2 : Effet de la N-acétyl-L-cystéine sur l'augmentation d' incorporation de déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG) par des 3T3-L1 induite par l' antimycine A. Les cellules sont incubées pendant 2 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM, puis pré-incubées ou non pendant 2 h en présence de N-acétyl-L-cystéine (30 mM, 1 mM). Pour le test, les cellules sont incubées pendant 30 min en présence de 2-DG (1µCi/ml) dilué dans du HBSS contenant ou non (0) de la N acétyl-L-cystéine aux mêmes concentrations. Les cellules sont ensuite rincées, lysées, la radioactivité est comptée sur un aliquot de 300 µl et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en coups par minute (cpm) rapportés aux quantités de protéines (cpm/µg de protéines) et sont exprimés arbitrairement en pourcentages des cellules contrôles comme la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (n=4).

d'antimycine A ne semble donc pas médiée par la production de ROS. Toutefois, comme dit ci-dessus, il faudrait utiliser d'autres anti-oxydants et des temps de pré-incubation plus longs pour confirmer ces résultats.

Nous avons donc montré que, parmi les messagers secondaires principaux connus pour leur rôle dans la réponse cellulaire à un dysfonctionnement de l'activité mitochondriale, les ROS générés lorsque la chaîne de transporteurs d'électrons est inhibée présence d'AA ne contribuent ni à l'accumulation de triglycérides ni à l'augmentation du transport de glucose dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Le stress oxydatif induit par la peroxydation lipidique est pourtant connu pour augmenter l'incorporation de glucose dans les cardiomyocytes (Hrelia et al., 2002). Cependant, le transport de glucose est soumis à différentes régulations selon le type cellulaire. Dans les 3T3-L1, nous n'avons pas pu mettre en évidence un rôle des ROS dans l'augmentation du transport de glucose induit par l'antimycine A. Par contre, le calcium semble jouer un rôle important dans ces deux processus. L'augmentation de la concentration en calcium a déjà été impliquée à de nombreuses reprises dans la réponse adaptative de cellules soumises à un stress énergétique d'origine mitochondriale (Arnould et al., 2002; Biswas et al., 1999; Butow and Avadhani, 2004).

Sur base de résultats d'expériences réalisées au laboratoire avant ce travail, nous savons que le glucose fortement incorporé par les 3T3-L1 en présence d'antimycine A est nécessaire à l'accumulation de triglycérides observée dans les mêmes conditions. Puisque l'incorporation de glucose dans la cellule est assurée par des transporteurs spécifiques (GLUTs) dont l'expression, la translocation en membrane plasmique et l'activité sont contrôlées par de multiples voies de signalisation intracellulaires comme la voie de l'AMPK, de la PI-3 K ou encore les voies stimulées par le calcium, nous avons recherché, dans la suite de ce travail, les voies de signalisation activées par les mitochondries dont l'activité respiratoire est altérée et leur rôle éventuel dans l'augmentation de l'incorporation de glucose par les 3T3-L1 en réponse à l'antimycine A (Elmendorf, 2002; Furtado et al., 2002; Holmes and Dohm, 2004).

III.2 Etude du rôle de l'AMPK dans la réponse des cellules 3T3-L1 à l'inhibition de l'activité mitochondriale

La voie de l'AMPK présente un intérêt majeur dans le contexte d'une déficience mitochondriale et du métabolisme lipidique. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction (point I.2.1.3.4), cette enzyme est un médiateur-clé dans les processus régénérateurs d'ATP. En réponse à une chute d'ATP et suite à son activation par l'AMP et à une phosphorylation par l'AMPKK, elle augmente l'activité d'enzymes intervenant dans des voies cataboliques (glycolyse, β-oxydation des acides gras...) (Hardie, 1999). L'AMPK peut notamment inhiber l'ACC par phosphorylation sur la sérine 79 et contribue ainsi à diminuer la concentration cellulaire en malonyl-CoA, dont l'effet inhibiteur sur la CPT-1 est alors levé. Ceci conduit à une augmentation du transport des acides gras dans la mitochondrie et donc, en une plus grande disponibilité des acides gras pour les enzymes de la β-oxydation mitochondriale. Par son action sur l'ACC, elle bloque également la synthèse des acides gras **(Merrill et al., 1997)**. Dans les muscles squelettiques, l'AMPK est également impliquée dans l'effet stimulateur de la contraction musculaire sur le transport du glucose. En effet, en induisant la translocation ou en augmentant l'activité des transporteurs de glucose comme GLUT 1 et GLUT 4 (Barnes et al., 2002; Li et al., 2004), l'AMPK activée permet à la cellule musculaire en contraction de produire plus d'ATP (Winder and Hardie, 1999). C'est sur ce

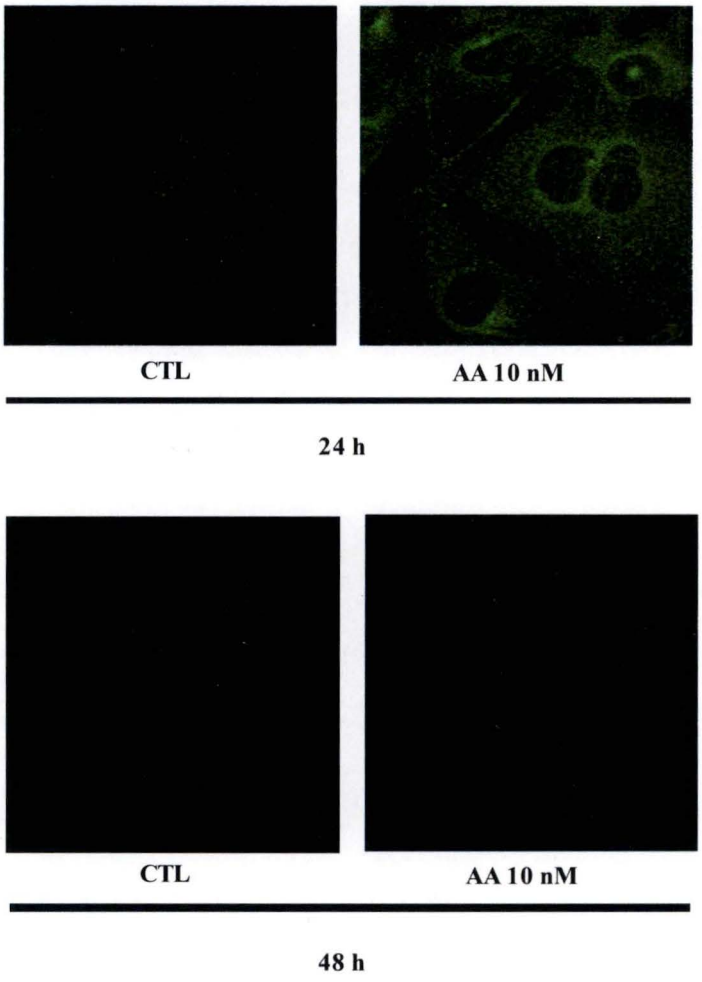


Figure III.3 : Effet de l'antimycine A sur la phosphorylation de l'AMPK. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la forme phosphorylée de l' AMPK sur la Thr172 dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM pendant 24 h ou 48 h. Les cellules sont fixées avec 3,7 % de PFA, perméabilisées avec 1 % de Triton X-100, marquées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la thréonine 172 phosphorylée de l'AMPK (anti-pThr172 AMPK), puis avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa réemettant de la fluorescence à 519 nm.

dernier point que nous allons nous focaliser maintenant en recherchant l'implication éventuelle de l'AMPK dans l'augmentation du transport du glucose dans les cellules 3T3-L1 soumises à un stress énergétique.

Nous avons d'abord caractérisé l'état d'activation de l'AMPK dans des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Pour cela, nous avons réalisé un marquage en immunofluorescence de la forme phosphorylée de l'AMPK sur la thréonine 172 (pThr172-AMPK) et des observations en microscopie confocale. En effet, la phosphorylation de l'AMPK médiée par l'AMPKK est un excellent indicateur de l'état d'activation de cette enzyme (Carling, 2004). Le marquage a été réalisé après 24 h ou 48 h d'incubation des cellules avec l'antimycine A à 10 nM. Les cellules ont été fixées, perméabilisées, mises en présence d'un anticorps primaire anti-pThr172-AMPK, puis d'un anticorps secondaire conjugué à une molécule fluorescente (Alexa Ex : 488 nm) (figure III.3).

On constate que l'abondance de la forme phosphorylée de l'AMPK augmente fortement dans le cytosol des cellules incubées pendant 24 h avec l'antimycine A. Cependant, cette phosphorylation n'est plus observée après 48 h de traitement. L'activation de l'AMPK dans les 3T3-L1 par l'antimycine A semble donc transitoire, un résultat en accord avec les données de la littérature.

Afin de rechercher un rôle potentiel de l'AMPK dans le transport du glucose induit par l'antimycine A, nous avons réalisé un test d'incorporation d'un analogue radioactif non métabolisable du glucose (2-[^{3}H]DG) sur des cellules 3T3-L1 incubées ou non pendant 48 h (temps établi sur base d'expériences préliminaires pour lequel nous observons une augmentation de l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A) avec l'antimycine A à 10 nM puis pré-incubées ou non pendant 3 h avec de l'AICAR à 500 µM (figure III.4). L'AICAR est métabolisé dans la cellule en ZMP, un analogue structural de l'AMP, qui active l'AMPK et l'AMPKK (Moore et al., 1991). La concentration et le temps d'incubation en présence d'AICAR ont été déterminés sur base d'expériences préliminaires menées au laboratoire sur la β-oxydation des acides gras qui montrent qu'une incubation des cellules pendant 3 h en présence de cette molécule à 500 µM suffisent à augmenter fortement la β-oxydation des acides gras dans les cellules (S. Vankoningsloo, thèse en cours). Dans nos conditions expérimentales, nous n'obtenons que peu ou pas d'effet de l'AICAR sur l'incorporation de glucose par les cellules contrôles pas plus que sur l'augmentation de l'incorporation induite par l'antimycine A.

Afin de rechercher l'effet éventuel de l'activation transitoire de l'AMPK observée dans les cellules 3T3-L1 incubées pendant 24 h en présence d'antimycine A sur l'incorporation de glucose mesurée après 48 h d'incubation nous avons tenté d'inhiber l'activité de l'AMPK en transfectant des cellules 3T3-L1 par électroporation avec un plasmide d'expression codant pour un dominant négatif de cette enzyme (α1-DN AMPK) (Woods et al., 2000).

Des tests préliminaires ont été réalisés au laboratoire afin d'optimaliser la technique de transfection des 3T3-L1 par électroporation, car ces cellules sont très difficiles à transfecter. Dans ces conditions optimales, nous observons une efficience de transfection supérieure à 50 % déterminée après transfections des cellules avec un plasmide d'expression codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) suivies de comptages des cellules fluorescentes par rapport à un nombre total de cellules (transfectées et non-transfectées). Ce taux de transfection devrait être suffisant pour pouvoir mettre en évidence des effets éventuels de la surexpression de ce

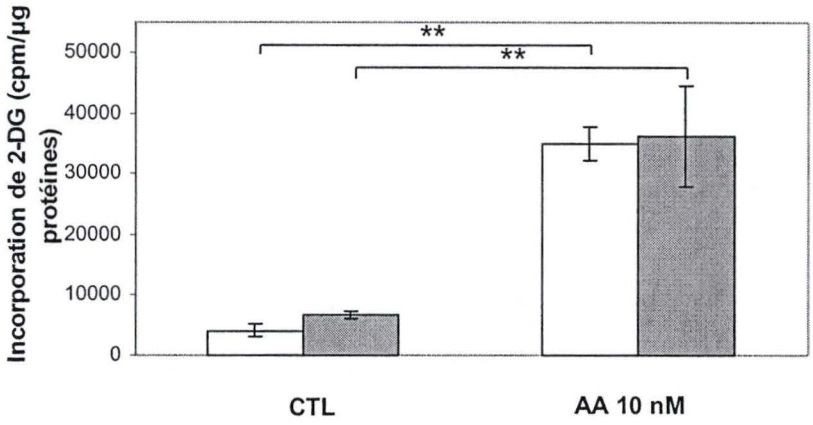


Figure III.4 : Effet de l'AICAR sur l'incorporation de 2-déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG) par des 3T3-L1. Les cellules sont incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 48 h en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM, puis pré-incubées ou non pendant 3 h en présence d'AICAR (500 µM) avant d'être incubées pendant 30 min en présence de 2-DG (1 µCi/ml) dilué dans du HBSS contenant ou non de l'AICAR (500 µM). Les cellules sont ensuite rincées, lysées, la radioactivité est comptée sur un aliquot de 300 µl et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en coups par minute (cpm) rapportés aux quantités de protéines (cpm/µg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (n=4). (**) : différence significative par rapport au contrôle correspondant avec $p<0,01$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

dominant négatif sur le taux d'incorporation de glucose par les 3T3-L1 incubées avec l'antimycine A.

Nous avons donc transfecté des cellules 3T3-L1 avec un vecteur d'expression codant pour le dominant négatif α1-DN AMPK. Les cellules contrôles ont été transfectées avec un plasmide d'expression codant pour la GFP. Après 4 h de récupération, les cellules ont été incubées pendant 48 h avec l'antimycine A à 10 nM avant d'être soumises à un test d'incorporation de 2-[^{3}H]DG. Les résultats, présentés à la figure III.5, montrent que la surexpression du dominant négatif de l'AMPK n'a pas d'effet sur l'incorporation de glucose basale ou induite par l'inhibiteur. En effet, les cellules transfectées avec le plasmide codant pour le dominant négatif α1-DN AMPK présentent un taux d'incorporation de glucose comparable à celui observé pour des cellules de la même condition expérimentale préalablement transfectées avec le vecteur codant pour la GFP. Ce résultat suggère que, dans les 3T3-L1, l'AMPK n'est pas impliquée dans l'augmentation de transport de glucose induite par l'antimycine A. Cependant, bien que l'efficacité de ce dominant négatif ait été bien démontrée dans la littérature (Woods et al., 2000), nous n'avons pas vérifier le niveau d'expression de la construction dans nos conditions expérimentales. Nous ne pouvons donc pas exclure que l'absence d'effet soit causée par un faible niveau d'expression de l'α_1-DN-AMPK. Cependant, il serait difficile de rechercher son niveau d'expression par Western blotting en raison même du mécanisme d'action supposé de ce dominant négatif. En effet, α_1-DN-AMPK résulte en une mutation de l'aspartate 157 en une alanine dans le motif DFG du sous-domaine VII de la sous-unité catalytique, domaine essentiel à la liaison du MgATP de la kinase. L'α_1-DN-AMPK entre donc en compétition pour la liaison avec les sous-unités β et γ de l'AMPK mais son poids moléculaire attendu est le même que la forme endogène (Woods et al., 2000).

Nous avons donc montré que l'AMPK est bien activée transitoirement par l'antimycine A dans les pré-adipocytes 3T3-L1, mais que cette enzyme ne semble pas jouer de rôle dans l'augmentation d'incorporation de glucose stimulée par cet inhibiteur. Une autre étude montre que l'AICAR inhibe le transport du glucose stimulé par l'insuline dans les 3T3-L1 (Salt et al., 2000). Ces données suggèrent donc que l'AMPK ne contrôle le transport de glucose que dans certains types cellulaires et que son action est également fonction du stimulus. Par exemple, l'activation de l'AMPK par l'AICAR stimule le transport de glucose dans les tissus musculaires squelettiques (Shearer et al., 2004) et cardiaques (Li et al., 2004), notamment en activant les p38α et p38β MAPK, qui augmentent l'activité de GLUT 4 et/ou la translocation de cet isoforme en membrane (Li et al., 2004), même si ce dernier point est controversé dans la littérature (Lemieux et al., 2003).

III.3 Etude du rôle de la voie de la PI-3 K dans la réponse des cellules 3T3-L1 à l'inhibition de l'activité mitochondriale

Rappelons que le transport du glucose à travers la membrane plasmique est assuré par des transporteurs spécifiques (GLUTs) et que les adipocytes expriment essentiellement les isoformes GLUT 1 et GLUT 4 (Joost and Thorens, 2001). Au repos, GLUT 1 est le principal transporteur présent en membrane plasmique et il assure le transport basal du glucose. GLUT 4 est, quant à lui, séquestré dans des vésicules de stockage cytosoliques (GSV/ Glut 4 storage vesicle). La translocation des GSV et leur fusion à la membrane plasmique sont induites, dans les 3T3-L1 et de nombreux autres types cellulaires, suite à une stimulation à l'insuline par des

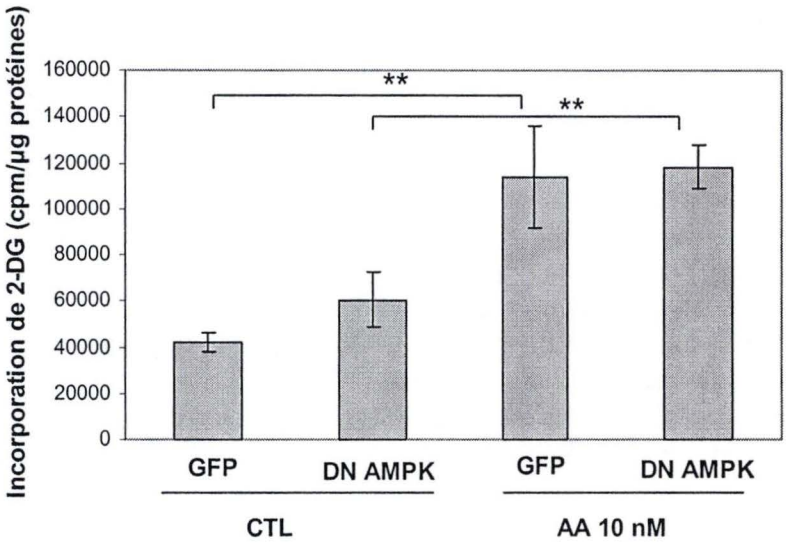


Figure III.5 : Effet de la surexpression d'un dominant négatif de l' AMPK sur l'incorporation de 2 déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG) par des 3T3-L1. Les cellules sont préalablement transfectées par la technique d' électroporation avec un plasmide d'expression codant pour le dominant négatif α1-AMPK (DN AMPK) ou pour la Green Fluorescent Protein (GFP), avant d'être incubées ou non (CTL) en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM pendant 48 h. Un test d'incorporation de 2-DG est ensuite réalisé. Les cellules sont incubées pendant 30 min en présence de 2-DG (1µCi/ml) dilué dans du HBSS. Les cellules sont ensuite rincées, lysées, la radioactivité est comptée sur un aliquot de 300 µl et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en coups par minute (cpm) rapportés aux quantités de protéines (cpm/µg de protéines). Ils représentent la moyenne ± un écart-type pour 4 valeurs (n=4). (**) : différence significative par rapport au contrôle correspondant avec $p<0,01$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

mécanismes dépendant de la PI-3 K et du calcium (Kotani et al., 1995; Whitehead et al., 2001).

Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont montré, par des analyses en Western blotting, que l'abondance de GLUT 4 est augmentée dans des préparations de membranes plasmiques purifiées de cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Ceci suggère que ce transporteur est transloqué en la membrane plasmique en réponse à l'antimycine A. De plus, le transport de glucose induit par cet inhibiteur mitochondrial est contrôlé par la PI-3 K et le calcium (voir figures I.24 B-C). Ces considérations permettent déjà de penser que l'incorporation de glucose stimulée par l'antimycine A est régulée par des mécanismes comparables à ceux impliqués dans le transport de glucose induit par l'insuline.

C'est pourquoi, dans le cadre de notre recherche concernant les différentes voies de signalisation éventuellement impliquées dans la réponse des 3T3-L1 à l'inhibition de l'activité mitochondriale, nous nous sommes intéressés à la voie de la PI-3 K. Nous tenterons d'identifier et de caractériser l'état d'activité de différents acteurs moléculaires de cette voie (comme l'IRS, la PI-3 K, Akt, GSK-3β, PKCλ) potentiellement impliqués dans l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A et de préciser le rôle joué par le calcium dans l'activation de cette voie de signalisation.

III.3.1 Mise en évidence de la forme phosphorylée de la protéine IRS-1 par des marquages en immunofluorescence en des observations en microscopie confocale

Les protéines IRS (insulin receptor substrate) jouent principalement le rôle de protéines adaptatrices lors de la transmission du signal insulinique dans la cellule. C'est suite à leur phosphorylation par le récepteur à l'insuline, par exemple sur la tyrosine 941, que sont recrutées différentes protéines-relais, dont la sous-unité régulatrice de la PI-3 K (p85). Cependant, la phosphorylation d'IRS sur des résidus tyrosine peut également être catalysée par d'autres tyrosine kinases, en aval de différentes stimulations non insuliniques. Par exemple, la GH (growth hormone) induit la phosphorylation d'IRS1 et d'IRS2 par JAK2 (Janus Kinase 2), l'association subséquente d'IRS1/2 avec la PI-3 K et son activation dans les adipocytes de rat (Ridderstrale and Tornqvist, 1996) et dans les hépatocytes de souris (Yamauchi et al., 1998). Les protéines $p125^{FAK}$ et $p59^{Lyn}$ sont également capables de phosphoryler IRS1 et d'induire l'activation de la PI-3 K dans des 3T3-L1 et des adipocytes de rat traités avec des PIG (phosphoinositoglycans) (Muller et al., 2000). La phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine, qui disrupte son interaction avec le récepteur à l'insuline, peut également être catalysée par plusieurs enzymes comme la JNK1 (Werner et al., 2004), la GSK-3β (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997), les p42/p44 (De Fea and Roth, 1997) et l'AMPK (Tamas et al., 2001), ainsi que par la PI-3 K elle-même, qui possède une activité sérine-kinase en plus de son activité lipid-kinase (Lam et al., 1994). La phosphorylation de résidus sérine sur l'IRS-1 par ces différentes kinases a été associée à la résistance à l'insuline, rencontrée notamment chez les individus diabétiques. Il existe donc de nombreuses voies de signalisation qui permettent d'activer ou de désensibiliser l'axe IRS-PI-3 K indépendamment d'une stimulation à l'insuline. Nous avons donc recherché si les effets insulino-mimétiques de l'antimycine A passent ou non par une phosphorylation de la protéine IRS-1 dans les 3T3-L1.

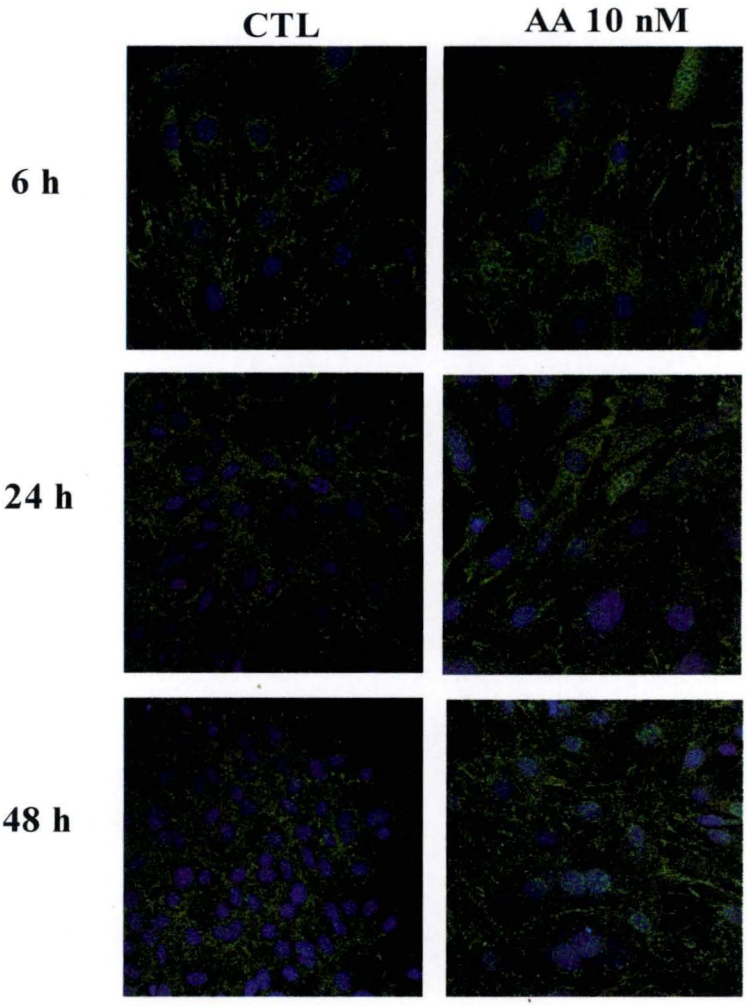


Figure III.6 : Effet de l' antimycine A sur la phosphorylation d' IRS-1 sur la tyrosine 941. Des cellules 3T3-L1 ont été incubées ou non (contrôles, CTL) en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM pendant 6 h, 24 h ou 48 h. Pour les marquages en immunofluorescence et la visualisation en microscopie confocale de la forme phosphorylée de la protéine IRS-1, les cellules sont fixées avec 3,7 % de PFA, perméabilisées avec 1 % de Triton X-100, marquées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la tyrosine 941 phosphorylée de l' IRS1 puis avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa (Ex : 488 nm) réemettant de la fluorescence à 519 nm. Un marquage au TO-PRO-3 permet également de visualiser le noyau des cellules.

Nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence de la forme phosphorylée d'IRS-1 sur la tyrosine 941 dans des cellules incubées pendant 6, 24 ou 48 h en présence d'antimycine A à 10 nM. Le jour du marquage, les cellules sont fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps primaire dirigé contre la tyrosine 941 phosphorylée de la protéine IRS-1. Le noyau des cellules est visualisé grâce à un contre-marquage au TO-PRO-3 (figure III.6).

Pour l'ensemble des conditions, on observe un marquage principalement cytosolique et membranaire, même si certains noyaux présentent un signal positif. Après 24 h et 48 h d'incubation avec l'antimycine A, on observe une très légère augmentation de l'abondance (mais très reproductible car obtenue dans trois expériences indépendantes) de pTyr941-IRS-1 dans les cellules. Ce résultat suggère donc que la phophorylation d'IRS-1 est légèrement augmentée dans les cellules incubées avec cet inhibiteur mitochondrial.

Ces données montrent que la localisation d'IRS-1 diffère de la localisation attendue (marquage en membrane plasmique) car nous obtenons un signal pour pIRS-1 dans le cytosol et le noyau en plus de la membrane plasmique. Cependant, même si les IRS s'associent principalement à des récepteurs de la membrane plasmique, la protéine IRS-1 peut également être transloquée dans le noyau, où elle participerait à la synthèse des ARN ribosomaux (Tu et al., 2002). Le marquage relativement diffus que nous avons obtenu et l'absence de marqueur pour la membrane plasmique ne permettent toutefois pas d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats. N'ayant aucune donnée sur l'abondance pTyr 941 IRS-1 en Western blotting, nous pouvons également mettre en cause une relative non-spécificité de l'anticorps. Afin de s'assurer qu'IRS-1 est bien phosphorylée sur la tyrosine 941 dans les cellules incubées en présence d'antimycine A et que l'anticorps reconnaît spécifiquement la protéine, il faudrait réaliser des expériences supplémentaires, comme des immunoprécipitations d'IRS-1 suivies d'une révélation de la forme phosphorylée d'IRS-1 en Western blotting. Si la phosphorylation d'IRS induite par l'antimycine A est confirmée, il faudra également déterminer la ou les kinase(s) responsable(s) de cette phosphorylation. D'autre part, nous rechercherons le rôle d'une diminution d'activité de phosphatases, comme la PTP-1 (protein tyrosine phosphatase-1), capables de déphosphoryler les protéines IRS (Kennedy and Ramachandran, 2000).

III.3.Recherche de l'abondance de la sous-unité catalytique (p110α) de la PI-3 K par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale

La PI-3 K est composée d'une sous-unité régulatrice p85, qui assure la fixation de l'enzyme aux IRS phosphorylées, et d'une sous-unité catalytique p110α, responsable de la phosphorylation des phosphatidylinositol-4-phosphate et –4,5-biphosphates (PI-4-P et PI-4,5-P2).

Etant donné que l'inhibition de la PI-3 K par le LY294002 inhibe l'augmentation du transport de glucose et l'accumulation de triglycérides induites par l'antimycine A dans les cellules 3T3-L1, nous avons tenté de mieux caractériser le rôle de cette enzyme dans notre modèle d'inhibition mitochondriale. Nous avons d'abord réalisé un marquage en immunofluorescence de la sous-unité p110α dans des 3T3-L1 incubées pendant 48 h avec de l'antimycine A à 10 nM (Figure III.7). On remarque que p110α présente une distribution

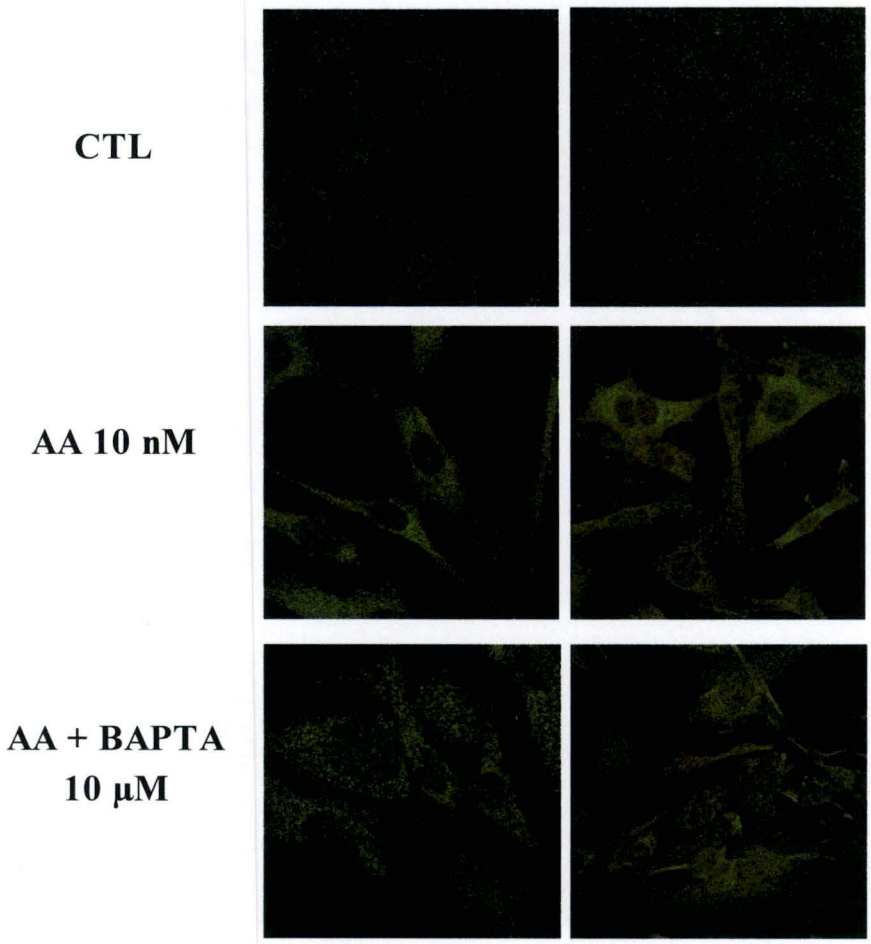


Figure III.7 : L' antimycine A induit l' expression de p110α par un mécanisme indépendant du calcium. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la sous-unité catalytique p110α de la PI-3 K dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 48 h en présence d' antimycine A (AA) à 10 nM en présence ou en absence de BAPTA-AM à 10 µM. Les cellules ont été fixées avec 3,7 % de PFA, perméabilisées avec 1 % de Triton X-100 puis marquées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine p110α et enfin incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa (Ex: 488 nm) réemettant de la fluorescence à 519 nm.

cytosolique homogène dans toutes les conditions. Cependant, l'abondance de la protéine est nettement plus importante dans les cellules préalablement incubées pendant 48 h avec l'antimycine A que dans les cellules contrôles. Afin de rechercher le rôle potentiel du calcium (qui inhibe également l'augmentation du transport de glucose induite par l'antimycine A) dans la surexpression de p110α induite par l'antimycine A, nous avons également testé l'effet du BAPTA-AM (10 μM) sur l'abondance de p110α. Dans ces conditions, nous n'observons aucune modification de l'abondance et aucun changement de la distribution de p110α.

Ces résultats mettent donc en évidence une importante augmentation de l'abondance cytosolique de p110α dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. Cette augmentation pourrait résulter d'une induction de la transcription de p110α ou d'un mécanisme post-transcriptionnel comme la stabilisation de l'ARNm ou de la protéine. Les facteurs de transcription et les mécanismes qui contrôlent l'expression de p110α ne sont pas encore identifiés. Partant de l'hypothèse d'une réponse transcriptionnelle, il est possible de prédire des sites de liaison potentiels pour différents facteurs de transcription sur base de la séquence nucléotidique du promoteur d'un gène d'intérêt, grâce aux sites DBTSS (Data Base of Transcriptional Start Sites, http://dbtss.hgc.jp) et TF Search (http://molsun1.cbrc.aist.go.jp/research/db/TFSEARCH.html). Une analyse du promoteur du gène codant pour p110α à l'aide de ces outils bioinformatiques a permis d'identifier des sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription GATA 1-2-3, CREB (cAMP-responsive element-binding protein) et C/EBPα (CCAAT/Enhancer-binding protein α). Ces facteurs de transcription sont, entre autres, des régulateurs de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (MacDougald and Lane, 1995; Tong et al., 2000). CREB est également impliqué dans la réponse adaptative de cellules soumises à différents stress énergétiques mitochondriaux (Arnould et al., 2002). Pour déterminer le rôle potentiel de ces facteurs dans la transcription et l'augmentation d'expression de p110α observée dans les cellules incubées avec l'antimycine A, nous pourrions par exemple tester l'effet de dominants négatifs ou d'ARN interférents spécifiques pour ces facteurs sur l'abondance de p110α.

Afin de chercher à savoir si la surexpression de p110α s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la PI-3 K, il était intéressant de doser l'activité de cette enzyme à partir des lysats de 3T3-L1 traitées avec de l'antimycine A. Ce dosage d'activité de la PI-3 K a été effectué dans une expérience préliminaire réalisée en fin de mémoire. Brièvement, la PI-3 K est immunoprécipitée à l'aide d'un anticorps anti-p85 à partir de lysats clairs préparés à partir de cellules incubées ou non pendant 48 h (temps pour lequel nous mesurons une forte augmentation du transport du glucose induite par l'antimycine A et dépendante de la PI-3 K). Les complexes immuns sont sédimentés par l'ajout de billes d'agarose couvertes de protéines A/G puis mis en présence d'un substrat de l'enzyme (L-α-phosphatidylinositol) et d'ATP marqué radioactivement au ^{32}P. Le produit de réaction est déposé sur une plaque de silice et soumis à une chromatographie sur couche mince (TLC). Une autoradiographie permet finalement de révéler la présence du substrat radioactif, dont l'abondance est directement proportionnelle à l'activité de la PI-3 K immunoprécipitée (figure III.8).

Nous avons d'abord vérifié, par Western blotting, la présence de la sous-unité catalytique p110α après immunoprécipitation de la sous-unité régulatrice p85 (figure III.8 A). On constate que p110α est bien co-immunoprécipitée lorsqu'on utilise un anticorps anti-p85, alors qu'elle n'est pas présente dans le contrôle réalisé en absence de l'anticorps anti-p85.

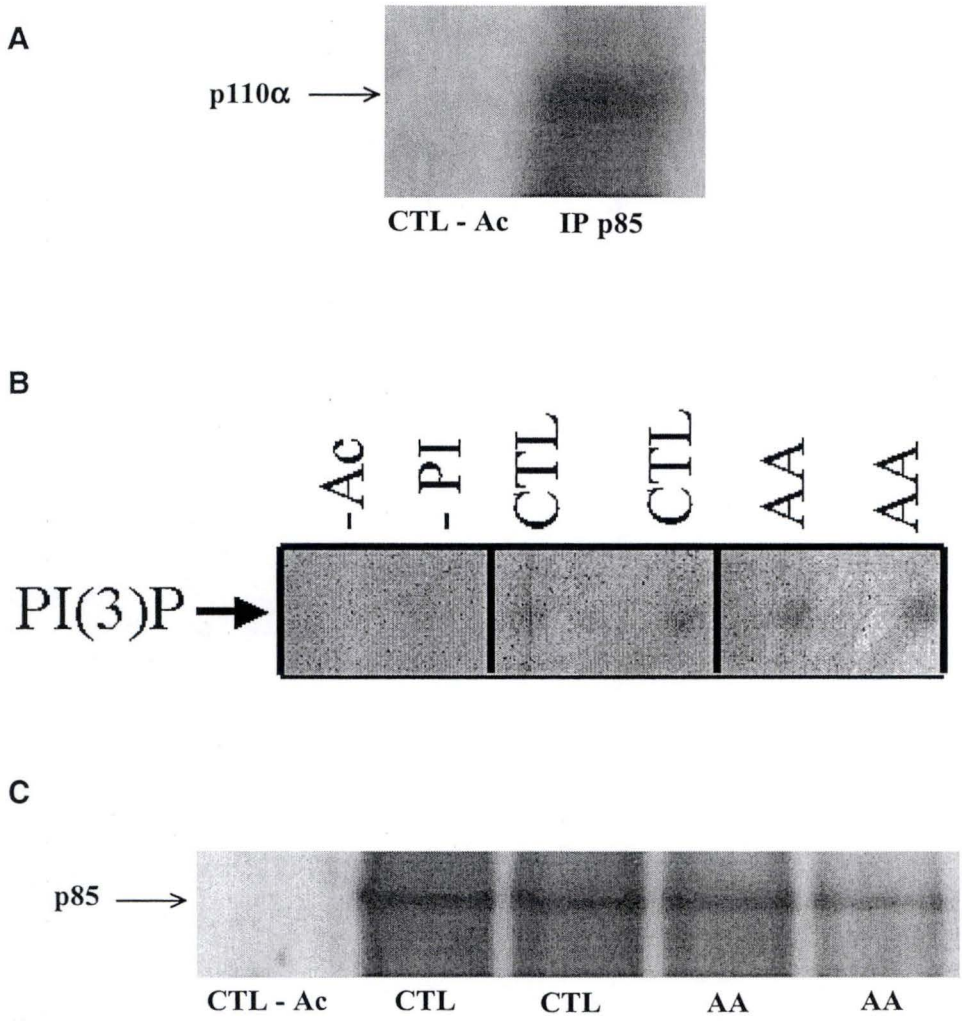


Figure III.8 : (A) Analyse en Western blotting de l'abondance de p110α après immunoprécipitation de p85 réalisée sur des cellules 3T3-L1 contrôles. (B) Dosage d'activité *in vitro* de la PI-3 K immunoprécipitée à partir de lysats de 3T3-L1 incubées ou non (CTL) pendant 48 h avec de l'antimycine A (AA) à 10 nM. Le dosage d'activité a été réalisé en présence de [γ ^{32}P]ATP et de L-α-phosphatidylinositol (PI), puis révélé suite à la migration du produit de réaction (PI-3-P) sur plaque de silice (= chromatographie sur couche mince) et autoradiographie. Les conditions -Ac et -PI représentent respectivement une immunoprécipitation réalisée sans anticorps anti-p85 et un test d'activité réalisé sans PI. (C) Analyse en Western blotting de l'abondance de p85 immunoprécipitée avant le dosage d'activité de la PI-3 K en (B).

Les résultats du dosage d'activité PI-3 K sont présentés à la figure III.8B. Dans cette expérience, nous détectons bien un spot correspondant à la migration de L-α-phosphatidylinositol marqué et à la position attendue (repérée grâce à la condition sans substrat « -PI »). Cependant, les signaux détectés pour la condition contrôle (activité basale de la PI-3 K) ne sont pas plus élevés dans les échantillons préparés à partir de cellules préalablement incubées en présence d'antimycine A à 10 nM. Sur base de ce résultat, nous pouvons dire que le dosage est fonctionnel et spécifique de la PI-3 K en raison de l'absence de substrat phosphorylé dans la condition d'immunoprécipitation sans anticorps (-Ac), mais nous ne pouvons pas conclure à une activation de la PI-3 K par l'antimycine A. Des mises au point seront réalisées ultérieurement au laboratoire pour tenter d'optimaliser ce dosage d'activité PI-3 K, en modifiant la quantité de matériel de départ, la concentration en substrat et la composition des tampons. Par ailleurs, signalons que l'activité de kinases mesurée *in vitro* n'est pas toujours le reflet de l'activité dans la cellule. Une analyse de l'abondance de p85 et/ou p110α immunoprécipitée par Western blotting devrait également permettre de vérifier l'abondance de l'enzyme engagée dans chaque test.

Cependant, même sans avoir pu obtenir de données directes sur l'activité de la PI-3 K, nous savons, sur base de l'effet d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme (le LY294002), que la PI-3 K est un médiateur-clé dans le transport du glucose et l'accumulation de triglycérides induits par l'antimycine A dans les 3T3-L1. Nous avons donc voulu tenter de caractériser l'état d'activation des effecteurs situés en aval de la PI-3 K.

III.3.3 Recherche de l'abondance et de la localisation de pAkt par des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale

Souvenons-nous que la PI-3 K, l'une des principales enzymes de la signalisation insulinique, phosphoryle les phosphoinositides membranaires en position 3, créant ainsi des messagers secondaires pour d'autres relais intracellulaires tels que Akt/PKB, GSK-3β et PKCλ impliqués dans les effets métaboliques de l'insuline comme par exemple le transport du glucose. Nous avons donc tenté de caractériser l'état d'activation de ces différentes enzymes ainsi que leur rôle éventuel dans l'augmentation de l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A dans des cellules 3T3-L1.

Nous avons d'abord recherché l'état de phosphorylation de la protéine Akt1/PKBα dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. En effet, suite à une stimulation par l'insuline, Akt1 est activée par la phosphorylation de ses résidus Ser473 et Thr308 (Alessi et al., 1996). Nous avons donc réalisé des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale pour rechercher l'état de phosphorylation d'Akt1 sur ces deux résidus dans nos conditions expérimentales. Nous avons également testé l'effet du BAPTA, un chélateur intracellulaire du calcium, sur l'état de phosphorylation d'Akt1, car la phosphorylation de la Thr 308 peut, entre autres, être catalysée par deux enzymes activées par le Ca^{2+}, la CaMKII et la CaMKKα (Okuno et al., 2000).

Les marquages ont été réalisés sur des cellules préalablement incubées pendant 48 h avec l'antimycine A à 10 nM. Dans certaines conditions, les cellules ont été pré-incubées pendant 3 h avec le BAPTA-AM à une concentration de 10 μM avant le marquage. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et mises en présence de l'anticorps primaire

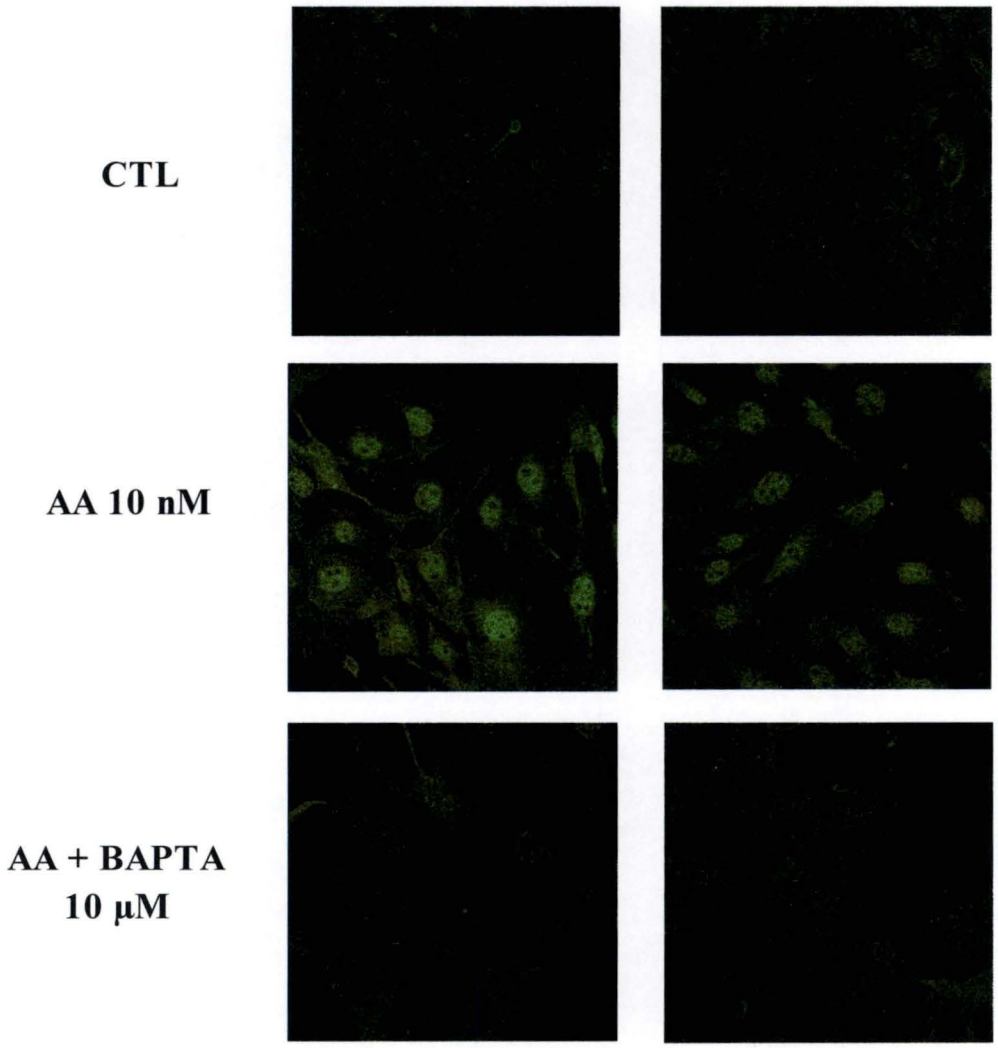


Figure III.9 : Effet de l' antimycine A sur la phosphorylation d'Akt1 sur la thréonine 308 dépendante du calcium. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la forme phosphorylée d'Akt1. Les cellules sont incubées ou non (contrôles, CTL) en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM. Après 48 h d' incubation en présence de l' inhibiteur, les cellules sont ou non pré-incubées pendant 3 h en présence de BAPTA-AM (10 µM). Les cellules sont alors fixées avec 3,7 % de PFA, perméabilisées avec 1 % de Triton X-100, marquées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la thréonine 308 phosphorylée d'Akt1, puis avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa (Ex : 488 nm) réémettant de la fluorescence à 519 nm.

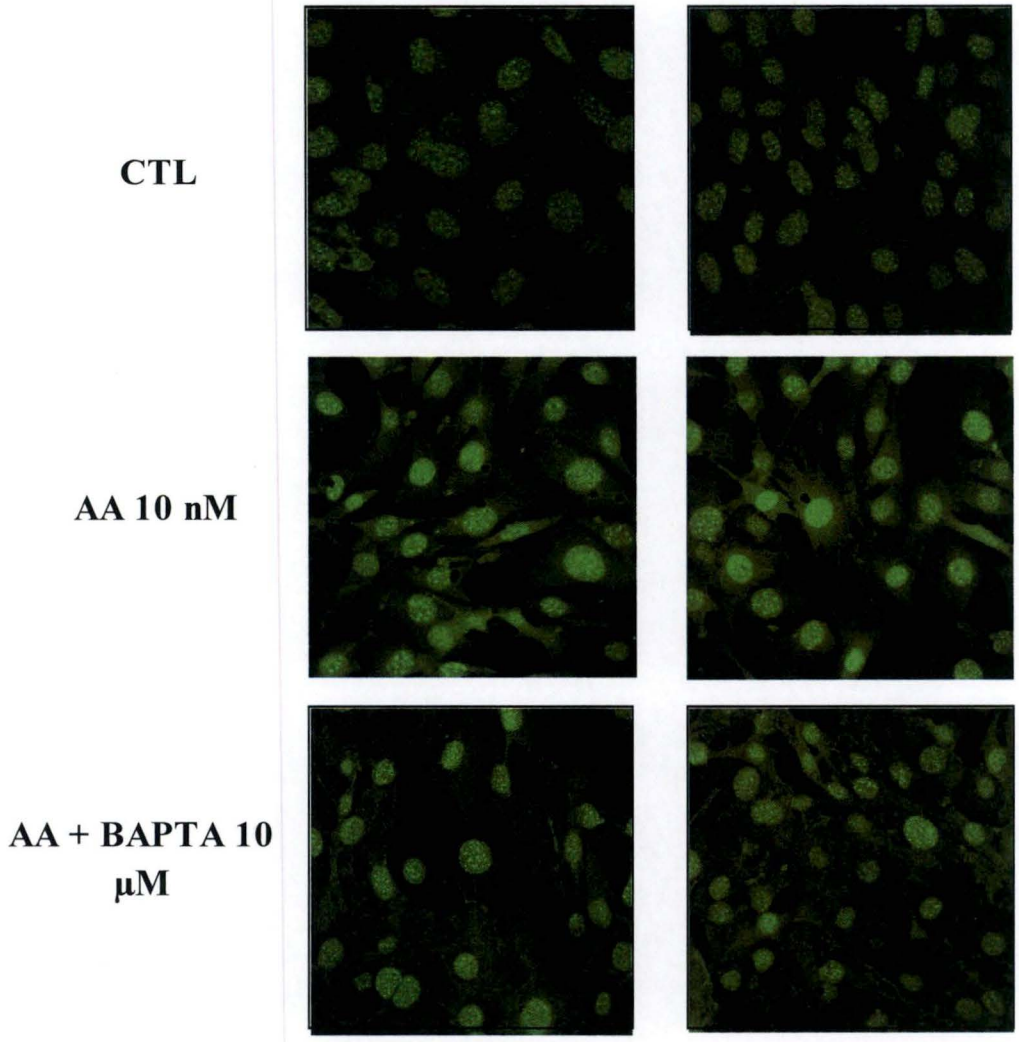


Figure III.10 : Effet de l' antimycine A sur la phosphorylation d'Akt1 sur la thréonine 473. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale de la forme phosphorylée d'Akt. Les cellules sont incubées ou non (contrôles, CTL) en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM. Après 48 h d'incubation en présence de l' inhibiteur, les cellules sont pré-incubées pendant 3 h en présence de BAPTA-AM (10 µM). Les cellules sont alors fixées avec 3,7 % de PFA, perméabilisées avec 1 % de Triton X-100, marquées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la thréonine 473 phosphorylée d'Akt1, puis avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa (Ex : 488 nm) réémettant de la fluorescence à 519 nm.

dirigé contre la forme phosphorylée d'Akt1 sur la thréonine 308 (pThr308-Akt1) ou sur la sérine 473 (pSer473-Akt1).

Les résultats obtenus pour le marquage de pThr308-Akt1 sont illustrés à la figure III.9. Les cellules contrôles présentent un signal très faible et diffus, qui suggère qu'Akt1 n'est pas ou peu phosphorylée sur la Thr308 dans les 3T3-L1. Par contre, une incubation des cellules avec l'antimycine A s'accompagne d'une forte augmentation de l'abondance de pThr308-Akt1 dans les noyaux. La phosphorylation d'Akt1 sur la Thr308 est de plus totalement inhibée suite à la pré-incubation des cellules en présence de BAPTA-AM, ce qui suggère que le calcium joue un rôle essentiel dans l'activation d'Akt1 induite par l'antimycine A.

La figure III.10 présente les résultats obtenus pour le marquage de pSer473-Akt1. On remarque que les cellules contrôles présentent déjà un marquage pour la forme phosphorylée d'Akt1 sur la sérine 473 et ce marquage est essentiellement nucléaire. Akt1 est donc déjà phosphorylée sur la Ser473 de manière basale dans les cellules 3T3-L1. On peut aussi observer que l'antimycine A augmente encore l'abondance de pSer473-Akt1 dans les noyaux. Dans ces conditions, les cellules présentent également un marquage cytosolique plus intense par rapport aux cellules contrôles. La pré-incubation des cellules en présence de BAPTA-AM semble induire une légère diminution de l'abondance nucléaire de la forme phosphorylée pSer473-Akt1. Cependant, l'intensité du signal de fluorescence reste plus élevée que dans les cellules contrôles.

Ces résultats montrent que la phosphorylation d'Akt1 est augmentée sur la Thr308 et la Ser473 dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. La quantification de l'abondance de pSer473-Akt1 mesurée par un test ELISA (Biosource), révèle que l'antimycine A induit, après 24 h et 48 h de traitement, une augmentation (2 fois) de l'abondance de pSer473-Akt1 (calculée par rapport à l'abondance totale de l'enzyme), ce qui confirme les résultats obtenus par les marquages en immunofluorescence à la figure III.10 (S. Vankoningsloo, thèse en cours). Ces phosphorylations, responsables de l'activation d'Akt lors d'une stimulation à l'insuline (Alessi et al., 1996), constituent un bon argument en faveur de l'activation de la kinase par l'antimycine A et donc de l'activation de la voie de la PI-3 K par cet inhibiteur. Afin de confirmer directement cette augmentation d'activité d'Akt1, nous pourrions également réaliser un dosage *in vitro* d'activité kinase de cette enzyme après immunoprécipitation.

Nous détectons les formes phosphorylées d'Akt1 essentiellement dans le noyau. Nous attendions un marquage cytosolique et/ou membranaire pour Akt1, étant donné que la PI-3 K possède une localisation cytosolique dans nos cellules (voir figure III.7). Cependant, la translocation nucléaire d'Akt1 suite à son activation par une stimulation insulinique a été montrée dans différents modèles cellulaires (PC12, COS7, HepG2) (Neri et al., 2002) et un mécanisme comparable pourrait peut-être se produire dans les cellules incubées en présence d'antimycine A.

Nous avons également montré que la chélation du Ca^{2+} intracellulaire par le BAPTA réduit partiellement (Ser473) ou totalement (Thr308) la phosphorylation d'Akt1 induite par l'antimycine A. Un résultat comparable a été observé par Worrall *et al*, qui montrent que la phosphorylation insulino-dépendante d'Akt sur la Thr308 est beaucoup plus sensible au BAPTA-AM que la phosphorylation de la Ser473 dans les 3T3-L1 (Worrall and Olefsky, 2002). Cependant, la kinase responsable de la phosphorylation d'Akt dépendante du Ca^{2+} n'est pas encore connue. En effet, la Thr308 est classiquement phosphorylée par PDK-1, une

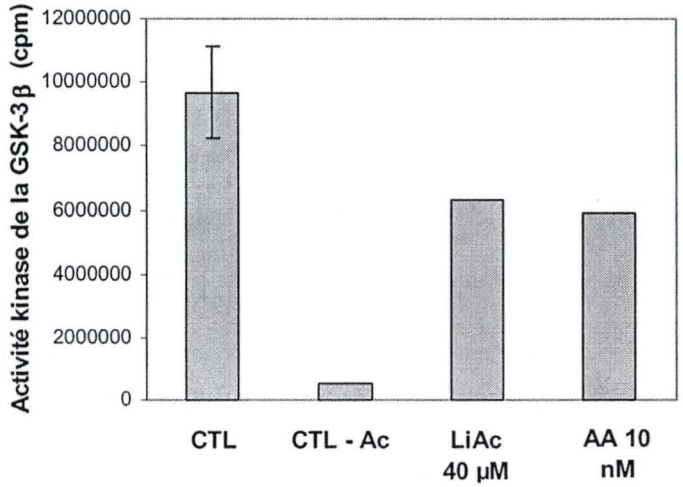
sérine/thréonine kinase en aval de la PI-3 K (Alessi et al., 1997), mais l'activité PDK-1 est insensible au BAPTA-AM dans les 3T3-L1, ce qui suggère que l'activité de cette enzyme n'est pas régulée par le calcium (Worrall and Olefsky, 2002). Il a été rapporté récemment dans la littérature que la Thr308 d'Akt1 peut également être phosphorylée par la CaMKKα et par la CaMK II (Okuno et al., 2000) : ces deux kinases dont l'activité est notamment régulée par le complexe calcium/calmoduline pourraient peut-être contribuer à la phosphorylation d'Akt1 sur la Thr308 induite par l'antimycine A et dépendante du calcium. Remarquons que la CaMKIV est impliquée dans la réponse de cellules soumises à un stress énergétique mitochondrial, notamment en phosphorylant le facteur de transcription CREB (Arnould et al., 2002). Afin de rechercher le rôle éventuel de l'un des membres de la famille des CaMK dans la phosphorylation d'Akt1 sur la Thr308 induite par l'antimycine A dans les 3T3-L1, il serait intéressant de tester l'effet de dominants négatifs des CaMKII et CaMKIV ou d'un inhibiteur spécifique (KN-93) des CaMK sur l'abondance de pThr308-Akt1.

La kinase responsable de la phosphorylation de la Ser473 a longtemps été désignée « PDK-2 » mais n'a jamais été identifiée. L'ILK (integrin-linked kinase), une kinase impliquée dans la transduction du signal médiée par les intégrines, peut phosphoryler la Ser473 d'Akt1 *in vitro* (Persad et al., 2001), mais ne semble pas être la kinase physiologique qui phosphoryle Akt1 *in vivo* (Sakai et al., 2003). La PKCα (protein kinase Cα) est également connue, *in vitro,* pour être capable de phosphoryler Akt1 sur la Ser473 en présence de calcium et de phospholipides (Partovian and Simons, 2004). Enfin, il a été montré récemment que la DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), une kinase activée par des dommages à l'ADN, peut aussi phosphoryler la Ser473 d'Akt1 (Feng et al., 2004). La DNA-PK semble être la (ou l'une des) kinase(s) qui phosphoryle Akt1 sur la Ser473 dans la cellule car l'introduction d'ARN interférents complémentaires de la séquence de la DNA-PK dans les cellules HEK293 inhibent la phosphorylation d'Akt1 sur ce résidu induite par l'insuline (Feng et al., 2004).

Il nous faut encore déterminer si l'activation d'Akt1 par l'antimycine A est impliquée ou non dans l'augmentation du transport de glucose induite par cet inhibiteur mitochondrial. Le rôle d'Akt dans le transport du glucose et plus particulièrement dans la translocation de GLUT 4 en membrane plasmique induite par l'insuline est déjà connu. En effet, la simple surexpression d'une forme constitutivement active d'Akt stimule la translocation de GLUT 4 dans les adipocytes 3T3-L1 (Kohn et al., 1996). Nous utiliserons un dominant négatif et une forme constitutivement active d'Akt1 pour tenter de mettre en évidence le rôle éventuel de cette kinase dans l'augmentation d'incorporation de glucose induite par l'antimycine A dans les 3T3-L1. De plus, il est possible qu'un autre effecteur situé en aval d'Akt1 soit impliqué dans ce phénomène. Parmi les enzymes phosphorylées par Akt1, la GSK-3β est une kinase importante dans la régulation du métabolisme du glucose. Rappelons que la phosphorylation de la GSK-3β sur la sérine 9, catalysée par Akt1, s'accompagne d'une baisse d'activité de l'enzyme qui est constitutivement active. La GSK-3β contrôle notamment le stockage de glucose sous forme de glycogène via la GS (glycogen synthase) (Burgering and Coffer, 1995; Cross et al., 1995) mais contribue peut-être aussi à la régulation de son incorporation dans la cellule 3T3-L1 stimulée avec de l'insuline (Orena et al., 2000).

Nous avons donc étudié l'état d'activité de la GSK-3β dans des 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A et recherché le rôle potentiel de cette kinase dans le transport du glucose induit par cet inhibiteur mitochondrial.

A



B

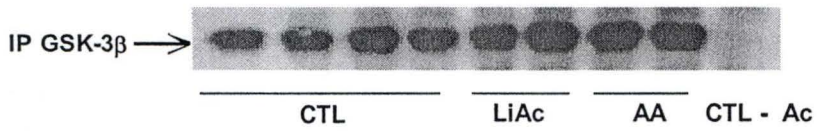


Figure III.11 : (A) Dosage d' activité de la GSK-3β *in vitro* après immunoprécipitation réalisée à partir de lysats clairs de 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 48 h avec de l' antimycine A (AA) à 10 nM. L' immunoprécipitation est effectuée pendant 2 h avec ou sans (CTL-Ac) 5 µg d' anticorps anti-GSK-3β. La réaction est réalisée en présence de 50 µM de substrat synthétique ("CREBtide"), de 10 µCi de [γ-^{32}P] ATP en présence ou en absence de 40 µM d' acétate de lithium (LiAc). Les produits de réaction sont déposés sur des membranes de phosphocellulose et après 2 rinçages à l' aide d'acide phosphorique 75 mM, la radioactivité associée aux membranes est comptée dans un compteur à scintillations. **(B)** Analysede l' abondance de la GSK-3β immunoprécipitée dans les différents échantillons par Western blotting .

III.4 Etude de l'implication de la GSK-3β dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale

Afin de caractériser l'état d'activité de la GSK-3β dans des cellules 3T3-L1 subissant un stress énergétique, un dosage d'activité kinase *in vitro* a été réalisé après immunoprécipitation de la GSK-3β à partir de lysats de cellules incubées pendant 48 h en présence d'antimycine A à 10 nM. Les immunoprécipitats sont ensuite mis en présence de [γ-^{32}P]ATP et d'un substrat synthétique constitué d'un peptide dont la séquence mime le site de phosphorylation de CREB sur la sérine 133 et son environnement en acides aminés. Après une réaction de 30 min à 30°C, le produit de la réaction est déposé sur une membrane de phosphocellulose. La radioactivité associée à la membrane après plusieurs rinçages à l'acide phosphorique (75 mM) est proportionnelle à l'abondance du substrat phosphorylé par l'enzyme et donc à l'activité de la GSK-3β. Dans certains échantillons, l'ajout d'acétate de lithium à 40 µM (un inhibiteur de la GSK-3β) au moment du dosage est utilisé comme un contrôle attestant de la spécificité de la kinase qui phosphoryle le substrat (figure III.11).

Nous observons que le dosage est bien dépendant de la présence d'anticorps dirigés contre la GSK-3β utilisés pour l'immunoprécipitation puisque la valeur du contrôle sans anticorps est beaucoup plus faible que toutes les autres. Nous constatons d'abord une forte activité de la GSK-3β dans les cellules contrôles, ce qui atteste de son activité constitutive. Nous observons également une baisse d'environ 40 % de l'activité GSK-3β immunoprécipitée à partir de cellules préalablement incubées 48 h en présence d'antimycine A par rapport aux contrôles. L'inhibition obtenue pour le dosage de la GSK-3β en présence de lithium (40 µM) est du même ordre ; c'est le taux d'inhibition maximal obtenu pour cet inhibiteur de la GSK-3β (Kim et al., 1999). L' analyse de l'abondance de la GSK-3β dans les différents échantillons par Western blotting montre que l'abondance de l'enzyme immunoprécipitée est comparable dans toutes les conditions expérimentales. Les différences d'activité obtenues ne sont donc pas dues à des variations de l'abondance de l'enzyme immunoprécipitée et engagée dans la réaction. Ces données suggèrent que l'antimycine A cause une inhibition de la GSK-3β et sont en accord avec les résultats obtenus précédemment pour l'activation de la voie PI-3 K/Akt1 dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence de cet inhibiteur mitochondrial.

Le rôle de la GSK-3β dans le stockage du glucose sous forme de glycogène, notamment dans les hépatocytes, est bien établi à ce jour et passe par une diminution de la phosphorylation inhibitrice de la GS (Burgering *et al.*, 1995 ; Cross *et al.*, 1995). Par contre, ses rôles et modes d'action dans l'incorporation du glucose par les cellules restent encore inconnu. Pour tenter de savoir si l'inhibition de l'activité de la GSK-3β joue ou non un rôle dans le transport de glucose dans les 3T3-L1, nous avons testé l'effet du SB 216763 (un inhibiteur spécifique de la GSK-3β) sur le taux d'incorporation de 2-[^{3}H]DG dans des cellules 3T3-L1 préalablement incubées ou non avec de l'antimycine A à 10 nM pendant 48 h (figure III.12).

Nous constatons que l'inhibiteur de la GSK-3β, quelle que soit la concentration utilisée, ne modifie pas ou très peu l'importation de 2-[^{3}H]DG stimulée par l'antimycine A. Par contre, le transport basal de glucose est augmenté significativement en présence de SB 216763 et ce, d'une manière dépendante de la concentration. Donc, l'inhibition de la GSK-3β semble être un mécanisme important dans la régulation du transport du glucose dans les 3T3-L1. Ceci est compatible avec des travaux antérieurs montrant que l'inhibition de la GSK-3β

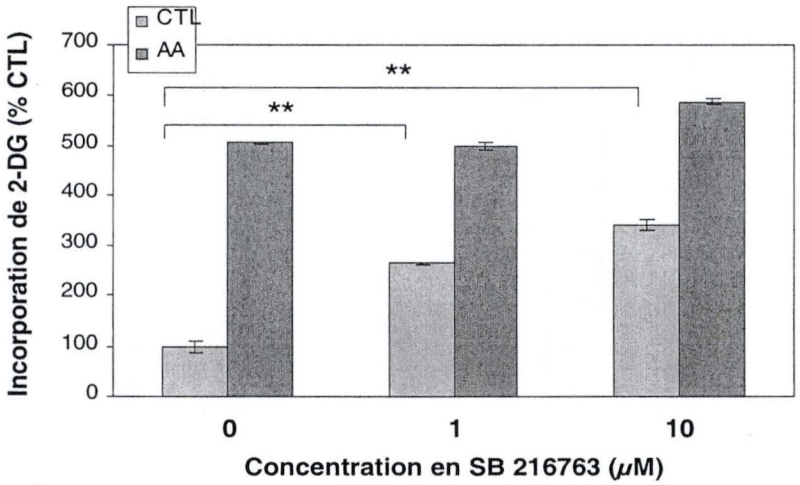


Figure III.12 : Effet du SB 216763 sur l'incorporation de 2-déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG) par des 3T3-L1. Les cellules sont traitées ou non (CTL) pendant 2 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM puis pré-incubées ou non (0) pendant 2 h en présence de SB 216763 (1 µM, 10 µM) et enfin incubées pendant 30 min en présence de 2-DG (1 µCi/ml) dilué dans du HBSS contenant ou non du SB 216763 aux mêmes concentrations. Les cellules sont ensuite rincées, lysées, la radioactivité est comptée sur un aliquot de 300 µl et les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en coups par minute (cpm) rapportés aux quantités de protéines (cpm/µg de protéines) et exprimés arbitrairement en pourcentages des contrôles (% CTL) comme la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n=3). (**) : significativement différent du CTL0 avec $p < 0,01$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

par le lithium stimule également le transport de glucose dans les 3T3-L1 (Orena et al., 2000). Nos résultats permettent ainsi de penser que l'effet de l'antimycine A sur l'incorporation de glucose passe, au moins partiellement, par la voie PI-3 K/Akt1/GSK3β. De plus, l'absence d'effet additif du SB 216763 sur l'augmentation de l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A suggère que l' inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne, à lui seul, une inhibition maximale de la GSK-3β.

Ces données sont en accord avec l'activation de l'axe PI-3 K/Akt1/GSK-3β par l'antimycine A dans les 3T3-L1 et avec l'augmentation subséquente du taux d'incorporation de glucose dans la cellule. Cependant, s'il semble clair que la GSK-3β est impliquée dans le transport du glucose mesuré dans les 3T3-L1 soumises à un stress énergétique mitochondrial, le mécanisme sous-jacent n'est pas encore connu. Orena *et al* proposent que la GSK-3β (constitutivement active dans une cellule au repos) est capable d'interférer avec le signaling de la PI-3 K, en amont de celle-ci, peut-être en disruptant l'interaction entre le récepteur à l'insuline et IRS-1 par phosphorylation de celle-ci sur des résidus sérine (Eldar-Finkelman and Krebs, 1997). L'inactivation de la GSK-3β par l'insuline ou le lithium diminuerait donc l'effet inhibiteur de la GSK-3β sur la voie PI-3 K activée par l'insuline et augmenterait dès lors l'entrée du glucose par un mécanisme dépendant de la PI-3 K dans la cellule en réponse à une stimulation par l'insuline (Orena et al., 2000).

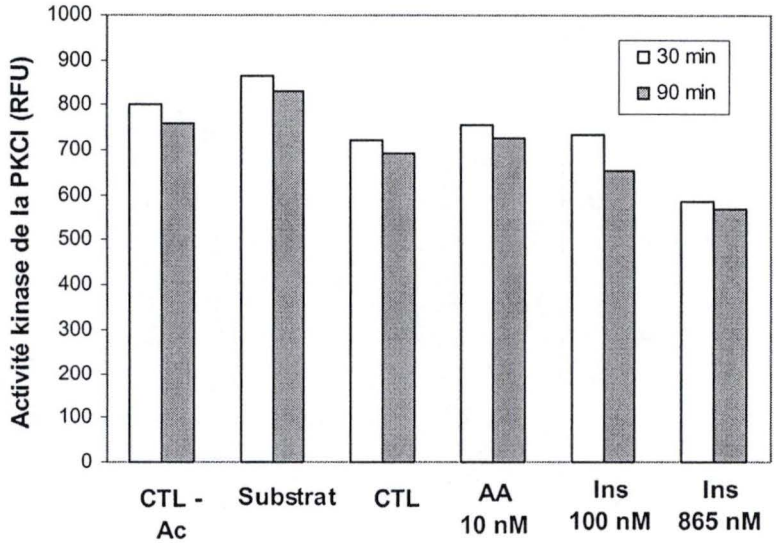
III.5 Etude de l'état d'activité de la PKCλ immunoprécipitée à partir de 3T3-L1 préalablement incubées en présence d'antimycine A

Comme nous l'avons vu au point I.2.1.3.1 de l'introduction, la PKCλ est également une kinase située en aval de la PI-3 K, susceptible d'interagir avec les vésicules intracellulaires GSV et capable d'induire la translocation du transporteur GLUT 4 en membrane plasmique en réponse à l'insuline dans les 3T3-L1 (Standaert et al., 1999). Afin de rechercher le rôle éventuel de cette kinase dans l'augmentation du transport de glucose induit par l'antimycine A dans les 3T3-L1, nous avons réalisé un dosage d'activité de la PKCλ *in vitro* après immunoprécipitation.

Nous avons utilisé le kit « IQ Ser/Thr Kinase assay » (Pierce) pour doser l'activité de la PKCλ. Brièvement, le principe de ce test est de mettre la PKCλ immunoprécipitée en présence d'ATP et d'un substrat peptidique qui comporte un motif de phosphorylation reconnu par la PKCλ et qui est couplé à une sonde fluorescente. Si la PKCλ est active, le peptide est phosphorylé. Un « réactif IQ » (fourni dans le kit) est ensuite ajouté. Ce réactif se fixe sur les peptides phosphorylés, dont il éteint la fluorescence par une réaction de *quenching*. Donc, les intensités de fluorescence mesurées seront inversément proportionnelles à l'activité kinase de la PKCλ dans les échantillons.

Le dosage a été réalisé après une incubation de 48 h des 3T3-L1 en présence d'antimycine A (10 nM) ou après 15 min d'incubation en présence d'insuline (100 nM ou 865 nM). L'insuline est utilisée comme contrôle positif, étant donné qu'elle active la PKCλ dans les 3T3-L1 (Kotani et al., 1998). Au terme des incubations, la PKCλ est immunoprécipitée à partir de lysats cellulaires clairs à l'aide d'un anticorps spécifique anti-PKCλ, puis mise en présence d'ATP et du peptide fluorescent pendant 30 min ou 90 min, avant d'ajouter le réactif IQ et de lire la fluorescence au spectroflurimètre. Un Western blotting pour la PKCλ est

A



B



Figure III.13 : (A) Dosage de l' activité de la PKCλ *in vitro* après immunoprécipitations réalisées à partir de lysats clairs de 3T3-L1, traitées ou non (contrôles, CTL) pendant 48 h avec de l' antimycine A (AA) à 10 nM ou pendant 15 min en présence d' insuline (100 nM ou 865 nM). L' immunoprécipitation est effectuée pendant 2 h avec ou sans (CTL-Ac) 5 µg d' anticorps anti-PKCλ. La réaction est réalisée pendant 30 ou 90 min à 30 °C en présence de 65 µM d' un peptide fluorescent phosphorylable par la PKCλ et de 200 µM en ATP. Le produit de réaction est ensuite mis en présence du réactif IQ (Pierce) et les intensités de fluorescence sont déterminées sur des aliquots de 30 µl au spectrofluorimètre (Ex : 585 nm-Em : 612 nm). La condition substrat est réalisée dans les mêmes conditions mais sans matériel biologique. **(B)** Analyse de l' abondance de la PKCλ immunoprécipitée dans les différentes conditions par Western blotting.

également réalisé sur un aliquot de chaque échantillon afin de vérifier la quantité d'enzyme immunoprécipitée (figure III.13).

On constate que l'abondance de la PKCλ immunoprécipitée est plus ou moins équivalente dans les différentes conditions. Comme attendu, elle est absente du contrôle d'immunoprécipitation réalisé sans anticorps. Le contrôle « substrat », quant à lui, ne contient que le substrat peptidique sans enzyme ni ATP : il représente la fluorescence maximale du peptide lorsqu'il n'est pas phosphorylé. Il est donc attendu que toutes les valeurs soient inférieures à ce blanc « substrat », même dans le contrôle (CTL) où une petite activité PKCλ basale est détectée. Par rapport à ce contrôle, nous ne mesurons aucun effet de l'antimycine A, alors que l'insuline (865 nM) augmente légèrement l'activité de la PKCλ. Ces résultats dont l'interprétation est à prendre avec prudence (n=1) suggèrent que l'activité de la PKCλ n'est pas modifiée dans les cellules 3T3-L1 incubées pendant 48 h avec l'antimycine A à 10 nM et suggère que la PKCλ n'intervient pas dans l'augmentation de l'incorporation du glucose induite par l'antimycine A. Cependant, l'activité de la PKCλ dans les contrôles positifs est plus faible qu'attendue (respectivement 6 % et 18 % de baisse avec 100 nM et 865 nM d'insuline). En réalisant des dosages d'activité kinase en présence d'ATP radioactif, Standaert *et al.* ont mesuré une augmentation de l'activité PKCλ (3 fois) en présence d'insuline dans les 3T3-L1 (Standaert et al., 1999). Dès lors, les conditions du dosage d'activité PKCλ en fluorescence devront être optimalisées avant de pouvoir conclure définitivement que la PKCλ n'est pas activée dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. Une droite de calibration en présence de PKCλ recombinante devrait également être établie pour pouvoir quantifier l'importance des diminutions d'intensité de fluorescence observées dans les contrôles positifs. Par la suite, nous pourrions également réaliser des dosages d'activité PKCλ à des temps inférieurs à 48 h d'incubation, car l'activation de la PKCλ par l'antimycine A pourrait n'être que transitoire. Enfin, afin de s'assurer que la PKCλ ne joue aucun rôle dans l'augmentation de l'incorporation du glucose induite par l'antimycine A, il serait intéressant de tester l'effet de dominants négatifs ou d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme (comme des peptides myristoylés disponibles commercialement) sur l'incorporation de 2-DG par les cellules incubées en présence d'antimycine A.

III.6 Etude de l'importance de l'actine dans la réponse des cellules 3T3-L1 à une inhibition de l'activité mitochondriale

Comme nous l'avons déjà signalé, l'insuline stimule la translocation de GLUT 4 (et dans une moindre mesure de GLUT 1) en membrane plasmique des adipocytes par un mécanisme dépendant de la PI-3 K (Egert et al., 1999; Watson and Pessin, 2001). Cette hormone est également responsable d'une réorganisation des filaments d'actine, qui « dirigent » les vésicules contenant les GLUTs vers la membrane plasmique. La cytochalasine D, une drogue qui inhibe la polymérisation de l'actine globulaire (G) en actine filamenteuse (F), diminue également la translocation de GLUT 1 et GLUT 4 en membrane plasmique et le transport du glucose stimulés par l'insuline. Ceci suggère donc que l'existence d'un réseau de filaments d'actine organisé est nécessaire à un recrutement maximal des transporteurs de glucose par l'insuline (Tsakiridis et al., 1999; Wang et al., 1999). Afin de rechercher l'importance éventuelle du réseau d'actine dans l'augmentation de l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A, nous avons donc recherché les effets de l'antimycine A et de la cytochalasine D sur l'état de polymérisation des filaments d'actine et déterminé l'effet de la

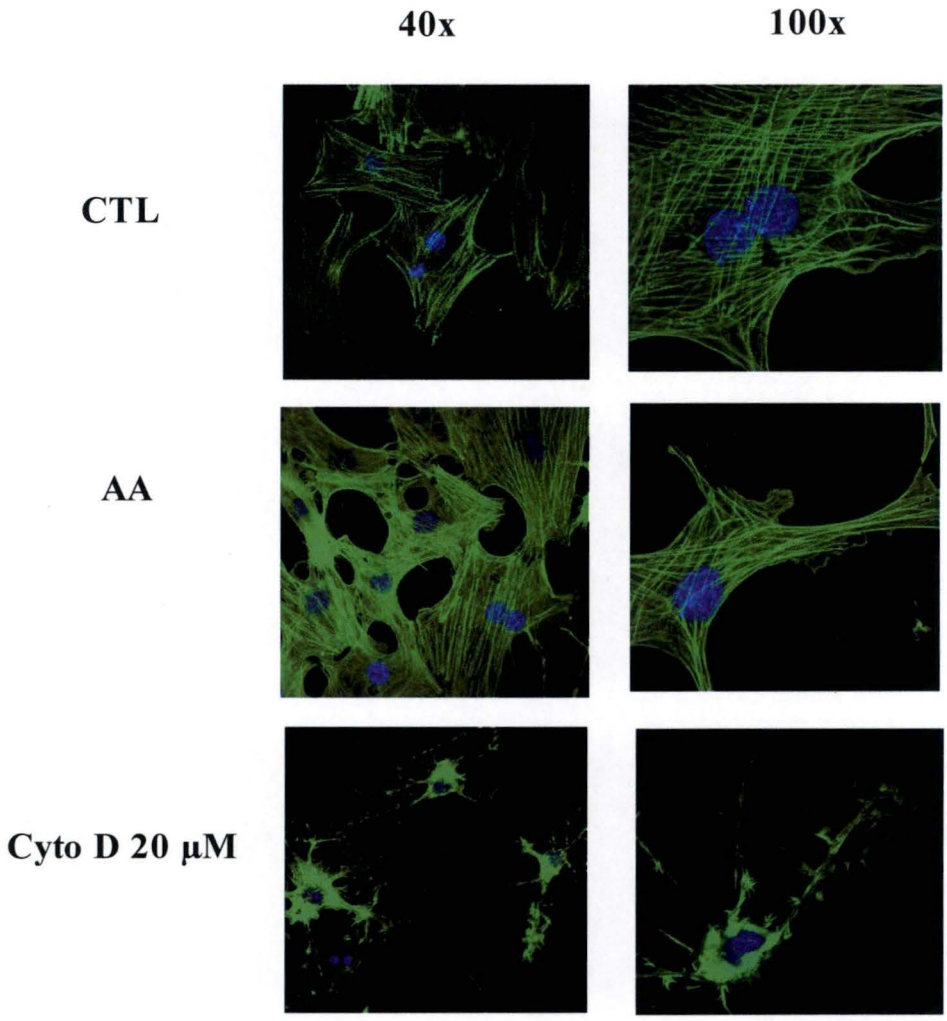


Figure III.14 : Effet de l' antimycine A et de la cytochalasine D sur le réseau de filaments d'actine. Des marquages et des observations en microscopie confocale des filaments d'actine ont été réalisés dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 48 h en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM. Les cellules contrôles sont pré-incubées ou non en présence de cytochalasine D (Cyto D 20 µM) pendant 3 h avant le marquage. Les cellules, fixées avec 3,7 % de PFA puis perméabilisées avec 1 % de Triton X-100, sont incubées pendant 2 h à 37 °C en présence d' α-phalloïdine. Un marquage au TO-PRO-3 permet également de visualiser le noyau des cellules.

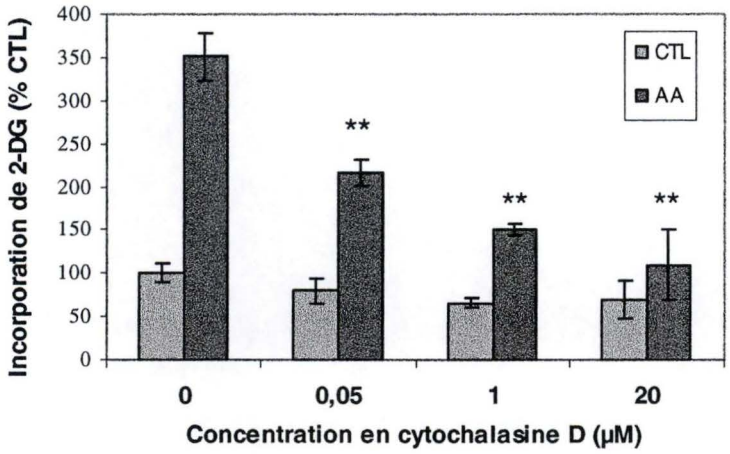


Figure III.15 : Effet de la cytochalasine D sur l'incorporation de déoxy-D-[1,2-^{3}H]glucose (2-DG) par des 3T3-L1 incubées ou non (CTL) pendant 48 h en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM puis pré-incubées ou non (0) pendant 2 h en présence de cytochalasine D (0,05 µM, 1 µM, 20 µM) et finalement incubées pendant 30 min en présence de 2-DG (1 µCi/ml) dilué dans du HBSS contenant ou non de la cytochalasine D aux mêmes concentrations. Les cellules sont ensuite rincées, lysées, la radioactivité est comptée sur un aliquot de 300 µl et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford. Les résultats sont calculés en coups par minute (cpm) rapportés aux quantités de protéines (cpm/µg de protéines) et exprimés arbitrairement en pourcentages des contrôles (CTL0) comme la moyenne ± un écart-type pour 3 valeurs (n=3). (**) : différence significative par rapport au contrôle correspondant avec $p<0,01$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

cytochalasine D sur le transport du glucose dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non en présence d'antimycine A.

Premièrement, nous avons visualisé l'état de polymérisation de l'actine dans des 3T3-L1 incubées ou non pendant 48 h en présence d'antimycine A par un marquage de l'actine avec de l'α-phalloïdine, une sonde fluorescente qui reconnaît l'actine polymérisée, et des observations au microscope confocal. Nous avons également vérifié l'effet de la cytochalasine D sur l'organisation du réseau de microfilaments d'actine (figure III.14).

On constate que le réseau d'actine présente un aspect filamenteux caractéristique dans l'ensemble de la cellule, quelle que soit la condition (CTL, AA). L'antimycine A n'induit donc pas de changements visibles dans l'organisation du réseau de filaments d'actine. La cytochalasine D à 20 µM, quant à elle, provoque bien de fortes perturbations du réseau d'actine dans les cellules. Nous allons donc maintenant tester son effet sur l'incorporation de glucose par des cellules incubées ou non pendant 48 h avec de l'antimycine A à 10 nM (figure III.15).

Nous remarquons que la cytochalasine D ne provoque qu'une légère diminution du transport basal de glucose et ce, pour les 3 concentrations testées. Ceci suggère que le transport basal du glucose dans les 3T3-L1, principalement médié par GLUT 1, dépend très partiellement de l'état d'un réseau d'actine organisé. Par contre et de manière intéressante, la cytochalasine D provoque une diminution hautement significative de l'incorporation de glucose stimulée par l'antimycine A qui est fonction de la concentration. En effet, pour une concentration de 20 µM en cytochalasine D, le transport de glucose diminue d'environ 95 % par rapport à l'incorporation mesurée dans des cellules incubées avec l'antimycine A. Ces résultats permettent donc de penser que l'antimycine A induit le transport de glucose par un mécanisme comparable à celui de l'insuline. En effet, l'incorporation de glucose insulino-dépendante nécessite, elle aussi, un réseau d'actine intact afin de guider les vésicules contenant GLUT 4 vers la membrane plasmique (Tsakiridis et al., 1999).

III.7 Recherche de l'origine métabolique des triglycérides dans des cellules 3T3-L1 dont l'activité mitochondriale est inhibée par l'antimycine A

Au terme de cette première partie, nous avons donc identifié certains des effecteurs moléculaires intervenant dans l'incorporation du glucose par des pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à une inhibition des phosphorylations oxydatives par l'antimycine A. Ce glucose massivement incorporé permet à la cellule de subvenir à ses besoins énergétiques grâce à la glycolyse et à la fermentation lactique, mais pourrait également jouer d'autres rôles dans la cellule. En effet, la métabolisation du glucose génère notamment de l'acétyl-CoA (exporté de la mitochondrie sous forme de citrate) et du malonyl-CoA (Farfari et al., 2000), deux précurseurs de la synthèse des acides gras. De plus, les nutriments caloriques tel que le glucose peuvent induire, dans certains tissus, l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse comme la L-PK et la PFK (phosphofructokinase) ou de la lipogenèse comme l'ACC et la FAS (Troiano and Flegal, 1999; Uyeda et al., 2002). En effet, certains dérivés du glucose comme le xylulose-5-phosphate régulent l'activité du facteur de transcription ChREBP, qui contrôle la transcription et l'expression de ces gènes glycolytiques et lipogéniques (Kabashima et al., 2003). Sur base de ces considérations, nous émettons l'hypothèse que le glucose importé dans les 3T3-L1 incubées avec l'antimycine A contribue à

	24 h	48 h
CTL	1,00 ± 0,1	1,00 ± 0,28
AA	2,63 ± 0,35 (**)	1,67 ± 0,23 (*)

Figure III.16 : Mise en évidence de l'activité transcriptionnelle dépendante de ChREBP dans des 3T3-L1 par la technique du gène rapporteur. Les cellules sont co-transfectées avec 0,75 µg d'un plasmide contenant le gène de la luciférase contrôlé par le promoteur de la L-pyruvate kinase et avec 0,25 µg d'un plasmide codant pour la β-galactosidase. Après 6 h de transfection au superfect, les cellules sont incubées ou non (contrôles, CTL) pendant 24 h ou 48 h en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM avant de doser les activités luciférases et β-galactosidase. Les résultats sont calculés en RLU normalisés par l'activité β-galactosidase (RLU/D.O. β-Gal) et sont exprimés en pourcentages des cellules contrôles correspondantes. Ces résultats représentent la moyenne ± un écart-type pour n=4. (**, *) : significativement différent du CTL correspondant avec respectivement $p< 0,01$ et $p< 0,05$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

l'accumulation de triglycérides induite par cet inhibiteur mitochondrial, en étant partiellement métabolisé en acides gras par lipogenèse et/ou en induisant l'expression ChREBP-dépendante d'enzymes glycolytiques et lipogéniques. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à savoir, dans un premier temps, si le facteur de transcription ChREBP est activé dans les cellules 3T3-L1 soumises à un stress énergétique. Ensuite nous avons tenté de mettre en évidence une éventuelle conversion du glucose en triglycérides dans les cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A.

II.7.1 Etude de l'activité transcriptionnelle de ChREBP par transfection des cellules 3T3-L1 avec un système rapporteur luciférase

Nous avons transfecté transitoirement des cellules 3T3-L1 avec un système rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de la L-PK. Ce promoteur contient notamment un site de liaison ChRE (5'-CACGTG-3') qui permet ainsi de mesurer l'activité de ce promoteur et l'action transactivatrice du facteur de transcription ChREBP. Les cellules sont également transfectées avec un plasmide qui code pour le gène de la β-galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur viral fort de type CMV (CytoMégaloVirus) permettant de normaliser l'activité de la luciférase de chaque échantillon en tenant compte de l'efficience de la transfection. Après 6 h de transfection au Superfect, les cellules sont incubées en présence d'antimycine A à 10 nM. L'activité luciférase mesurée après 24 h ou 48 h d'incubation est donc proportionnelle à l'activité du facteur de transcription ChREBP (figure III.16).

On constate que l'antimycine A induit une augmentation (environ 2,5 fois) de l'activité transcriptionnelle de ChREBP après 24 h. Cette activation semble transitoire car son niveau diminue après 48 h d'incubation. Ces résultats sont en accord avec le fait que l'antimycine A induit une forte augmentation du transport de glucose qui pourrait alors activer ChREBP dans la cellule. Cependant, cette expérience n'est que préliminaire et d'autres tests devront être réalisés pour mettre en évidence un rôle éventuel de ChREBP dans la régulation de l'expression d'enzymes comme l'ACC et la FAS dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A, notamment en déterminant pour ces deux gènes l'abondance des transcrits (par RealTime-PCR ou par damier à ADN) et des protéines (par Western blotting ou marquages en immunofluorescence) dans des cellules 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Les résultats préliminaires obtenus par l'analyse des profils d'expression génique au cours du traitement des 3T3-L1 avec cet inhibiteur mitochondrial, réalisée à l'aide d'un damier à ADN (« adipochip ») développé au laboratoire et portant 89 sondes qui correspondent à des gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire et le métabolisme lipidique (mémoire d'A. De Pauw, 2004), ne montrent pas d'augmentation d'expression (au niveau transcriptionnel) du gène de la FAS dans les cellules incubées en présence d'antimycine A. Par contre, une augmentation d'expression de la L-PK, un gène dont la transcription est contrôlée par ChREBP, est observée dans ces conditions (+ 2,13 après 8 jours).

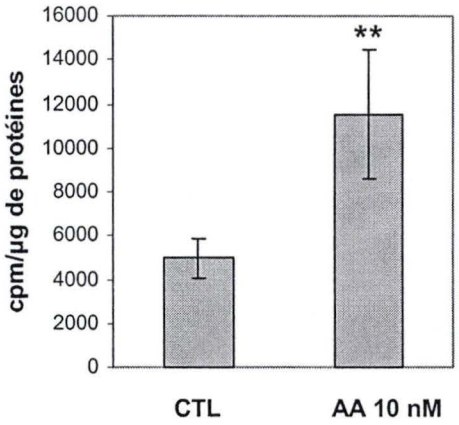


Figure III.17 : Mesure de la radioactivité associée aux triglycérides après incorporation de [^{14}C]-glucose dans des cellules 3T3-L1 incubées ou non (CTL) pendant 8 jours en présence d'antimycine A (AA) à 10 nM. Les cellules sont ensuite incubées pendant 90 min à 37 °C avec 5 µM de [^{14}C]-glucose (1,5 µCi/ml). Les triglycérides sont extraits et un comptage de la radioactivité est réalisé sur des aliquots de 200 µl. Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) rapportés à la quantité de protéines (cpm/µg de protéines) comme les moyennes ± un écart-type pour 3 valeurs (n = 3). (**) : différence significative par rapport aux cellules contrôles (CTL) avec $p < 0,01$ comme déterminé par une ANOVA 1 et des contrastes de Scheffé.

III.7.2 Mise en évidence de la conversion du glucose en triglycérides dans les cellules 3T3-L1

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le glucose peut être métabolisé en triglycérides. La synthèse des triglycérides consiste à estérifier successivement 3 chaînes d'acides gras au glycérol, activé sous forme de glycérol-3-phosphate. Cette molécule peut être directement produite grâce à la GPD (glycérol-3-phosphate deshydrogénase) par réduction de la DHAP (dihydroxyacétone-phosphate), un intermédiaire de la glycolyse. D'autre part, l'acétyl-CoA issu du pyruvate peut-être pris en charge par les enzymes de la lipogenèse (ACC, FAS) pour synthétiser des acides gras. Le glucose peut donc générer tous les métabolites nécessaires à la synthèse des triglycérides. Pour terminer ce travail et afin de déterminer si une partie du glucose incorporé par les 3T3-L1 incubées avec l'antimycine A est converti en triglycérides, nous avons réalisé une extraction de triglycérides sur des cellules 3T3-L1 ayant préalablement subi une inhibition de l'activité mitochondriale pendant 8 jours et une pré-incubation de 90 min en présence de glucose marqué par du ^{14}C. Ensuite, le comptage de la radioactivité associée aux triglycérides extraits permet de déterminer une conversion éventuelle du glucose en lipides (Figure III.17).

On constate que l'antimycine A induit une augmentation significative de l'incorporation de ^{14}C dans les triglycérides, ce qui suggère qu'une partie du glucose est bien convertie en triglycérides au cours du traitement des 3T3-L1 avec cet inhibiteur mitochondrial. La migration des triglycérides extraits dans ces conditions sur plaque de chromatographie (*thin layer chromatography*, TLC) permettra de confirmer par autoradiographie la présence de radioactivité associée aux triglycérides, ainsi que de déterminer la longueur des chaînes d'acides gras présents dans ces triglycérides grâce à la migration parallèle de standards connus. Nous ne savons cependant pas si la radioactivité mesurée dans les extraits de triglycérides est associée au glycérol ou aux acides gras, ou les deux. L'analyse des profils d'expression génique sur l'adipochip (mémoire d'A. De Pauw, 2004) a montré une augmentation de l'abondance des transcrits de la GPD, l'enzyme qui fournit le glycérol-3-phosphate nécessaire à la synthèse de triglycérides à partir de DHAP. Cette augmentation d'abondance, mesurée aux jours 2, 4, 6 et 8 du traitement des 3T3-L1 avec l'antimycine A, est relativement faible (entre +1,5 et +2) mais très reproductible, et pourrait contribuer à la conversion d'une partie du glucose en glycérol-3-phosphate. D'autre part, même si nous n'avons pas encore de données concernant l'effet de l'antimycine A sur l'expression et l'activité des enzymes de la synthèse des acides gras (ACC, FAS), le rôle de l'ACC dans l'accumulation de triglycérides induite par l'antimycine A est soutenu par le fait qu'un inhibiteur de cette enzyme, l'EGCG (épigallocatéchine-gallate), réduit très fortement la quantité de triglycérides accumulée dans les cellules 3T3-L1 après 8 jours de traitement avec l'antimycine A (S. Vankoningsloo, thèse en cours).

IV. Conclusion et perspectives

IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De nombreuses pathologies mitochondriales sont causées, entre autres, par des mutations ou des délétions dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) qui affectent les capacités cellulaires à produire de l'ATP par les phosphorylations oxydatives (Graeber and Muller, 1998). Certaines formes de pathologies mitochondriales s'accompagnent également de perturbations du métabolisme lipidique qui peuvent avoir des conséquences comme l'apparition de certaines formes de diabète de types 2 caractérisées notamment par une résistance à l'insuline. Certains auteurs ont effectivement observé ce phénomène chez des patients diabétiques âgés qui présentent une activité mitochondriale plus faible (Petersen et al., 2003).

Au niveau cellulaire, la perturbation de l'activité mitochondriale modifie donc probablement le métabolisme du glucose et des lipides mais les voies de signalisation activées en réponse à une inhibition de l'activité mitochondriale sont encore peu connues. Au laboratoire, nous nous intéressons, dans plusieurs modèles cellulaires, à la communication moléculaire rétrograde entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau et à la compréhension des mécanismes cellulaires adaptatifs induits par une inhibition des phosphorylations oxydatives.

Dans le cadre de ce travail, nous avons contribué à étudier la réponse de pré-adipocytes 3T3-L1 à l'antimycine A, un inhibiteur métabolique de l'activité bioénergétique de la mitochondrie agissant au niveau du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cet inhibiteur est responsable de la production de ROS capables de jouer un rôle de messager secondaire et de modifier, dans les pré-adipocytes, l'expression de gènes comme CHOP 10, un inhibiteur de la différenciation adipocytaire (Carriere et al., 2003). Au début de ce travail, par les travaux de S. Vankoningsloo (thèse en cours), nous savions que les pré-adipocytes répondent également à une inhibition de la chaîne respiratoire par une augmentation de l'incorporation de glucose médiée par le transporteur GLUT4 et l'accumulation de triglycérides dans le cytosol. Sur base de données préliminaires obtenues avec des molécules pharmacologiques, nous avions également des informations sur le fait que ces processus pourraient être causés par des modifications de la concentration en calcium dans les cellules et impliquer une voie dépendante de la PI-3 kinase. Cependant, les voies de signalisation conduisant à l'incorporation du glucose et à la translocation des GLUTs en membrane sont nombreuses et impliquent plusieurs kinases dont la contribution à ces phénomènes est fonction du type cellulaire considéré (Okada et al., 1994). De plus, la question de savoir si le glucose participe ou non à l'accumulation de triglycérides dans les 3T3-L1 en réponse à l'inhibition de l'activité mitochondriale était sans réponse tout comme les mécanismes éventuellement responsables.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à caractériser l'état d'activation de plusieurs kinases (AMPK, PI3-K, Akt1, GSK3β, PKCλ) connues ou suspectées pour participer à la translocation des transporteurs de glucose comme GLUT4, par des tests d'activité kinase *in vitro* sur les enzymes immunoprécipitées et par des marquages en immunofluorescence sur des résidus phosphorylés considérés comme des marqueurs de leur activation.

L'AMPK, bien qu'activée rapidement et transitoirement dans les 3T3-L1 en réponse à l'antimycine A, ne semble pas jouer de rôle important dans l'augmentation d'incorporation de glucose par les pré-adipocytes induite par l'antimycine A puisque la surexpression d'un dominant négatif (α1 DN-AMPK) de cette enzyme est sans effet. L'absence d'effet de l'AICAR, un activateur de l'AMPK, sur le transport du glucose est également un argument permettant d'exclure une contribution de l'enzyme. Pour la PKCλ, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence entre les activités dosées pour des cellules contrôles et des

cellules pré-incubées en présence d'antimycine A. Par contre, nous avons maintenant plusieurs arguments qui montrent que la voie PI-3 K/Akt1/GSK-3β est activée par l'antimycine A, nécessite la présence de calcium et contribue à l'augmentation d'incorporation de glucose induite par cet inhibiteur mitochondrial.

En effet, le rôle de la PI-3 K dans l'augmentation de l'incorporation du glucose et l'accumulation de triglycérides induits par l'antimycine A dans les cellules 3T3-L1 était suggéré par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette kinase (LY294002), qui inhibe ces deux processus d'une manière dépendante de la concentration. Ce rôle est maintenant renforcé par la mise en évidence de la forte surexpression de la sous-unité catalytique de la PI-3 K (p110α) observée dans les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A. Ce résultat suggère que cette enzyme joue bien un rôle important dans la réponse adaptative des pré-adipocytes soumis à un stress énergétique mitochondrial. La régulation de l'expression de p110α n'est pas encore connue, mais une analyse, par des outils bioinformatiques, de la séquence du promoteur du gène de p110α révèle deux sites de liaison potentiels (CRE) pour le facteur de transcription CREB. Ce facteur est également activé précocement par l'antimycine A dans les 3T3-L1 (S. Vankoningsloo, thèse en cours) dans différents modèles cellulaires utilisés pour étudier le dysfonctionnement mitochondrial (Arnould et al., 2002). Le rôle potentiel de CREB dans l'induction de l'expression de p110α par l'antimycine A pourrait être recherché en analysant l'abondance de p110α dans des 3T3-L1 transfectés avec des siRNA (small-interferentRNA) pour éteindre l'expression du facteur de transcription ou dans des cellules qui surexpriment des dominants négatifs pour ce facteur (K-CREB et M1-CREB).

Plusieurs données de ce travail renforcent la mise en évidence de l'activation de la voie PI-3 kinase dans l'augmentation d'incorporation de glucose dans les cellules en réponse à l'inhibition mitochondriale. En effet, nous avons également montré que l'antimycine A induit l'activation d'Akt1 et l'inhibition de la GSK-3β, deux marqueurs de l'activation de la voie de la PI-3 K couramment décrits dans le cas d'une stimulation insulinique (Andjelkovic et al., 1997). En effet, le traitement des cellules avec l'antimycine A augmente la phosphorylation d'Akt1 sur la Ser473 et surtout sur la Thr308, deux événements nécessaires à l'activation maximale de l'enzyme. De manière intéressante, la phosphorylation de la Thr308 est totalement inhibée en présence de BAPTA-AM, ce qui suggère que l'activité de la kinase qui phosphoryle Akt1 sur ce résidu est régulée par le calcium. L'utilisation d'un inhibiteur des CaMK (KN-93) ou de dominants négatifs de la CaMKII ou de la CaMKKα permettrait de rechercher l'implication potentielle de ces kinases dans la phosphorylation d'Akt1 sur la Thr308, révélée par marquage en immunofluorescence. D'autre part, l'inhibition de la GSK-3β induite par l'antimycine A est en accord avec l'activation d'Akt1, qui inhibe directement la GSK-3β par phosphorylation sur la Ser9. La GSK-3β est une enzyme importante dans la régulation du métabolisme du glucose, mais aussi dans le contrôle de son incorporation par la cellule. En effet, nous avons montré que le SB216763, un inhibiteur spécifique de cette kinase, induit une augmentation concentration-dépendante de l'incorporation de glucose dans les 3T3-L1, ce qui souligne le rôle important joué par la GSK-3β dans ce processus. Le mécanisme par lequel la GSK-3β contrôle l'entrée du glucose dans la cellule n'est pas encore clair, mais cette enzyme semble exercer un *feedback* négatif sur la voie de la PI 3-K en phosphorylant IRS-1 sur des sérines, ce qui empêche l'association d'IRS-1 avec la sous-unité régulatrice de la PI-3 K (p85). L'inhibition de la GSK-3β induite par l'antimycine A contribuerait donc à une réduction du taux de phosphorylation d'IRS-1 sur des sérines et favoriserait ainsi l'activité de la PI 3-K et l'incorporation de glucose par la cellule. La recherche en Western blotting ou par immunomarquage de motifs de phosphorylation sur des résidus sérines d'IRS-1 dans nos conditions expérimentales permettrait de supporter ou d'invalider cette hypothèse.

Rappelons également que l'incorporation de glucose induite par l'antimycine A requiert un réseau de filaments d'actine intègre comme l'attestent les marquages en immunofluorescence et l'effet de la perturbation du réseau d'actine induit par la cytochalasine D. Ces résultats renforcent l'idée que GLUT4 est transloqué en membrane plasmique suite à l'inhibition mitochondriale et permet l'entrée de glucose dans la cellule par des mécanismes qui semblent similaires à ceux mis en place suite à une stimulation par l'insuline (Tsakiridis et al., 1994).

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché le rôle joué par le glucose dans la formation de vésicules de triglycérides observée dans les pré-adipocytes 3T3-L1 incubés plusieurs jours en présence d'antimycine A. D'une part, nous avons mis en évidence l'activation du facteur de transcription ChREBP dans les pré-adipocytes 3T3-L1 traités avec l'antimycine A. Ce facteur de transcription, activé par des dérivés du glucose, est connu pour contrôler l'expression d'enzymes glycolytiques (L-PK) et lipogéniques (ACC, FAS). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire par analyse sur damier à ADN des profils d'expression génique de 3T3-L1 montrent que la L-PK est effectivement surexprimée au niveau transcriptionnel en présence d'antimycine A. Des études ultérieures mettant en jeu des siRNA pour ChREBP pourraient permettre de rechercher la participation de ce facteur à la surexpression de ces gènes induite par l'antimycine A, ce qui constituerait une première voie par laquelle le glucose pourrait contribuer à la synthèse d'acides gras et à leur accumulation sous forme de triglycérides dans les 3T3-L1 soumises à une inhibition de leur activité mitochondriale. Les mécanismes impliqués dans l'activation de ChREBP devraient également être recherchés par la caractérisation de l'activité de la PKA et de la PP2A (deux enzymes qui régulent l'activité du facteur) dans ces conditions.

D'autre part, nous avons montré en utilisant du glucose marqué radioactivement qu'une partie du glucose incorporé par les 3T3-L1 incubées en présence d'antimycine A est convertie en triglycérides. En cas de stress énergétique, la cellule pré-adipocytaire utilise donc le glucose non seulement pour ses besoins glycolytiques, mais également pour synthétiser des triglycérides et les stocker dans des vésicules cytosoliques. Pour montrer une réelle conversion du glucose en triglycérides, des analyses en chromatographie sur couche mince (TLC) seront réalisées prochainement pour rechercher qualitativement et quantitativement les dérivés lipidiques formés à partir du glucose. La formation de vésicules de triglycérides dans des tissus non adipeux tels que le muscle squelettique est également observée dans certaines pathologies d'origine mitochondriale comme le syndrome MERRF (Shoffner et al., 1990) ou la LSM (Naumann et al., 1997), et pourrait donc constituer un phénomène pathologique lié à l'inhibition de l'activité mitochondriale.

Les lipides cytosoliques en concentration élevée sont responsables de nombreuses perturbations cellulaires référées sous le terme de « lipotoxicité », dont la plus étudiée est la résistance à l'insuline. Ce phénomène est particulièrement étudié chez les personnes obèses, dont la lipidémie élevée induit également l'accumulation de triglycérides dans le muscle, ainsi qu'une désensibilisation de ce tissu pour l'insuline. Afin de déterminer si les triglycérides accumulés dans les pré-adipocytes 3T3-L1 traités avec l'antimycine A induisent aussi des effets lipotoxiques comme la résistance à l'insuline, nous testerons l'effet d'un pré-traitement des cellules avec cet inhibiteur mitochondrial sur l'incorporation de glucose stimulée par l'insuline. Nous rechercherons également l'effet éventuel des triglycérides accumulés au cours du traitement avec l'antimycine A sur la voie activée par les récepteurs β3-adrénergiques, qui contrôle notamment le taux de dégradation des triglycérides (lipolyse) catalysée par la HSL (hormone sensitive lipase). L'emploi d'un agoniste de ces récepteurs comme l'isoprotérénol permettra de comparer le taux de lipolyse (estimé par un dosage du glycérol libéré par la cellule) dans nos différentes conditions expérimentales, et de déterminer si une perturbation de la voie qui contrôle la dégradation des triglycérides favorise également

leur accumulation cytosolique dans les pré-adipocytes 3T3-L1 soumis à un stress énergétique mitochondrial.

V. Bibliographie

V BIBLIOGRAPHIE

Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. and Hemmings, B.A. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J*, **15**, 6541-6551.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. and Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, **7**, 261-269.

Amuthan, G., Biswas, G., Ananadatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Shephard, H.M. and Avadhani, N.G. (2002) Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene*, **21**, 7839-7849.

Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M. and Hemmings, B.A. (1997) Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, **272**, 31515-31524.

Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J. and Raes, M. (2002) CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J*, **21**, 53-63.

Aruoma, O.I., Whiteman, M., England, T.G. and Halliwell, B. (1997) Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun*, **231**, 389-391.

Babcock, D.F. and Hille, B. (1998) Mitochondrial oversight of cellular Ca2+ signaling. *Curr Opin Neurobiol*, **8**, 398-404.

Bandyopadhyay, G., Standaert, M.L., Zhao, L., Yu, B., Avignon, A., Galloway, L., Karnam, P., Moscat, J. and Farese, R.V. (1997) Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. Transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem*, **272**, 2551-2558.

Barnes, K., Ingram, J.C., Porras, O.H., Barros, L.F., Hudson, E.R., Fryer, L.G., Foufelle, F., Carling, D., Hardie, D.G. and Baldwin, S.A. (2002) Activation of GLUT1 by metabolic and osmotic stress: potential involvement of AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Cell Sci*, **115**, 2433-2442.

Benzeroual, K., Pandey, S.K., Srivastava, A.K., van de Werve, G. and Haddad, P.S. (2000) Insulin-induced Ca(2+) entry in hepatocytes is important for PI 3-kinase activation, but not for insulin receptor and IRS-1 tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, **1495**, 14-23.

Bergeron, R., Russell, R.R., 3rd, Young, L.H., Ren, J.M., Marcucci, M., Lee, A. and Shulman, G.I. (1999) Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats. *Am J Physiol*, **276**, E938-944.

Biswas, G., Adebanjo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M. and Avadhani, N.G. (1999) Retrograde Ca2+ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J*, **18**, 522-533.

Blaak, E.E. (2003) Fatty acid metabolism in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Proc Nutr Soc*, **62**, 753-760.

Blanchard, H., Li, Y., Cygler, M., Kay, C.M., Simon, J., Arthur, C., Davies, P.L. and Elce, J.S. (1996) Ca(2+)-binding domain VI of rat calpain is a homodimer in solution: hydrodynamic, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies. *Protein Sci*, **5**, 535-537.

Bonen, A., Luiken, J.J., Arumugam, Y., Glatz, J.F. and Tandon, N.N. (2000) Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem*, **275**, 14501-14508.

Brinkman, K., Smeitink, J.A., Romijn, J.A. and Reiss, P. (1999) Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet*, **354**, 1112-1115.

Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340.

Bruning, J.C., Winnay, J., Cheatham, B. and Kahn, C.R. (1997) Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol*, **17**, 1513-1521.

Bryant, N.J., Govers, R. and James, D.E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 267-277.

Burgering, B.M. and Coffer, P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602.

Burnett, P.E., Barrow, R.K., Cohen, N.A., Snyder, S.H. and Sabatini, D.M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1432-1437.

Butow, R.A. and Avadhani, N.G. (2004) Mitochondrial signaling; the retrograde response. *Mol Cell*, **14**, 1-15.

Calderhead, D.M., Kitagawa, K., Tanner, L.I., Holman, G.D. and Lienhard, G.E. (1990) Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **265**, 13801-13808.

Carafoli, E. (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, **56**, 395-433.

Carling, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*, **29**, 18-24.

Carriere, A., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Penicaud, L. and Casteilla, L. (2003) Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett*, **550**, 163-167.

Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C.R., Wang, L., Rhodes, C.J. and Klip, A. (1996) Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15169-15173.

Chen, Z.P., McConell, G.K., Michell, B.J., Snow, R.J., Canny, B.J. and Kemp, B.E. (2000) AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **279**, E1202-1206.

Cheng, J.Q., Godwin, A.K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T.F., Hamilton, T.C., Tsichlis, P.N. and Testa, J.R. (1992) AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9267-9271.

Cohen, P. (1999) The Croonian Lecture 1998. Identification of a protein kinase cascade of major importance in insulin signal transduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 485-495.

Colbran, R.J., Fong, Y.L., Schworer, C.M. and Soderling, T.R. (1988) Regulatory interactions of the calmodulin-binding, inhibitory, and autophosphorylation domains of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*, **263**, 18145-18151.

Colbran, R.J., Smith, M.K., Schworer, C.M., Fong, Y.L. and Soderling, T.R. (1989) Regulatory domain of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Mechanism of inhibition and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem*, **264**, 4800-4804.

Coleman, R.A., Lewin, T.M. and Muoio, D.M. (2000) Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr*, **20**, 77-103.

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

Czech, M.P., Chawla, A., Woon, C.W., Buxton, J., Armoni, M., Tang, W., Joly, M. and Corvera, S. (1993) Exofacial epitope-tagged glucose transporter chimeras reveal COOH-terminal sequences governing cellular localization. *J Cell Biol*, **123**, 127-135.

Czech, M.P. and Corvera, S. (1999) Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*, **274**, 1865-1868.

Davies, S.P., Carling, D. and Hardie, D.G. (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem*, **186**, 123-128.

De Fea, K. and Roth, R.A. (1997) Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 31400-31406.

Ding, V.W., Chen, R.H. and McCormick, F. (2000) Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem*, **275**, 32475-32481.

Doble, B.W. and Woodgett, J.R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, **116**, 1175-1186.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, **275**, 661-665.

Duplus, E. and Forest, C. (2002) Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochem Pharmacol*, **64**, 893-901.

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

Dupree, P., Parton, R.G., Raposo, G., Kurzchalia, T.V. and Simons, K. (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *Embo J*, **12**, 1597-1605.

Dutta-Roy, A.K. (2000) Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 1360-1372.

Eaton, S. (2002) Control of mitochondrial beta-oxidation flux. *Prog Lipid Res*, **41**, 197-239.

Ebina, Y., Edery, M., Ellis, L., Standring, D., Beaudoin, J., Roth, R.A. and Rutter, W.J. (1985) Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8014-8018.

Egert, S., Nguyen, N. and Schwaiger, M. (1999) Myocardial glucose transporter GLUT1: translocation induced by insulin and ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, **31**, 1337-1344.

Eldar-Finkelman, H. and Krebs, E.G. (1997) Phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by glycogen synthase kinase 3 impairs insulin action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9660-9664.

Elmendorf, J.S. (2002) Signals that regulate GLUT4 translocation. *J Membr Biol*, **190**, 167-174.

Farese, R.V. (2001) Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp Biol Med (Maywood)*, **226**, 283-295.

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

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. and Hemmings, B.A. (2004) Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem*.

Flatt, J.P. (1970) Energy metabolism and the control of lipogenesis in adipose tissue. *Horm Metab Res*, **2**, Suppl 2:93-101.

Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P. and Foufelle, F. (1999) Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12737-12742.

Franke, T.F., Kaplan, D.R., Cantley, L.C. and Toker, A. (1997) Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*, **275**, 665-668.

Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W. and Klip, A. (2002) Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol*, **80**, 569-578.

Gerbitz, K.D., Gempel, K. and Brdiczka, D. (1996) Mitochondria and diabetes. Genetic, biochemical, and clinical implications of the cellular energy circuit. *Diabetes*, **45**, 113-126.

Gibbs, E.M., Calderhead, D.M., Holman, G.D. and Gould, G.W. (1991) Phorbol ester only partially mimics the effects of insulin on glucose transport and glucose-transporter distribution in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, **275 (Pt 1)**, 145-150.

Ginsberg, H.N. (1998) Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **27**, 503-519.

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

Graeber, M.B. and Muller, U. (1998) Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *J Neurol Sci*, **153**, 251-263.

Gunter, T.E. and Pfeiffer, D.R. (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*, **258**, C755-786.

Hajnoczky, G., Csordas, G. and Yi, M. (2002) Old players in a new role: mitochondria-associated membranes, VDAC, and ryanodine receptors as contributors to calcium signal propagation from endoplasmic reticulum to the mitochondria. *Cell Calcium*, **32**, 363-377.

Hajra, A.K., Larkins, L.K., Das, A.K., Hemati, N., Erickson, R.L. and MacDougald, O.A. (2000) Induction of the peroxisomal glycerolipid-synthesizing enzymes during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Role in triacylglycerol synthesis. *J Biol Chem*, **275**, 9441-9446.

Hardie, D.G. (1999) Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem Soc Symp*, **64**, 13-27.

Hardie, D.G. and Carling, D. (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, **246**, 259-273.

Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, **67**, 821-855.

Hartman, Z. and Hartman, P.E. (1987) Interception of some direct-acting mutagens by ergothioneine. *Environ Mol Mutagen*, **10**, 3-15.

Holm, C. (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1120-1124.

Holman, G.D., Kozka, I.J., Clark, A.E., Flower, C.J., Saltis, J., Habberfield, A.D., Simpson, I.A. and Cushman, S.W. (1990) Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. *J Biol Chem*, **265**, 18172-18179.

Holmes, B. and Dohm, G.L. (2004) Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Med Sci Sports Exerc*, **36**, 1202-1206.

Honda, H., Kondo, T., Zhao, Q.L., Feril, L.B., Jr. and Kitagawa, H. (2004) Role of intracellular calcium ions and reactive oxygen species in apoptosis induced by ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, **30**, 683-692.

Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, **109**, 1125-1131.

Horton, J.D. and Shimomura, I. (1999) Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 143-150.

Hrelia, S., Fiorentini, D., Maraldi, T., Angeloni, C., Bordoni, A., Biagi, P.L. and Hakim, G. (2002) Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*, **1567**, 150-156.

Huss, J.M., Levy, F.H. and Kelly, D.P. (2001) Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor alpha/retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes: a mechanism for O2-dependent modulation of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Biol Chem*, **276**, 27605-27612.

Imamura, T., Huang, J., Usui, I., Satoh, H., Bever, J. and Olefsky, J.M. (2003) Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin. *Mol Cell Biol*, **23**, 4892-4900.

Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B.C., Takata, K., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T. (1997) p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem*, **272**, 7873-7882.

Itani, A.A. and Arslanian, M.J. (1985) The short-term regulation of fatty acid synthesis in the rat epididymal adipocytes. *Comp Biochem Physiol B*, **81**, 97-101.

James, D.J., Salaun, C., Brandie, F.M., Connell, J.M. and Chamberlain, L.H. (2004) Neomycin prevents the wortmannin inhibition of insulin-stimulated Glut4 translocation and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **279**, 20567-20570.

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B. and Thomas, G. (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J*, **16**, 3693-3704.

Jones, P.F., Jakubowicz, T. and Hemmings, B.A. (1991) Molecular cloning of a second form of rac protein kinase. *Cell Regul*, **2**, 1001-1009.

Jones, S.M., Alb, J.G., Jr., Phillips, S.E., Bankaitis, V.A. and Howell, K.E. (1998) A phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol transfer protein act synergistically in formation of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *J Biol Chem*, **273**, 10349-10354.

Joost, H.G. and Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*, **18**, 247-256.

Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E. and Uyeda, K. (2003) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 5107-5112.

Kadowaki, T., Koyasu, S., Nishida, E., Sakai, H., Takaku, F., Yahara, I. and Kasuga, M. (1986) Insulin-like growth factors, insulin, and epidermal growth factor cause rapid cytoskeletal reorganization in KB cells. Clarification of the roles of type I insulin-like growth factor receptors and insulin receptors. *J Biol Chem*, **261**, 16141-16147.

Kakuda, T.N. (2000) Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther*, **22**, 685-708.

Kang, J. and Zheng, R. (2004) Dose-dependent regulation of superoxide anion on the proliferation, differentiation, apoptosis and necrosis of human hepatoma cells: the role of intracellular Ca 2+. *Redox Rep*, **9**, 37-48.

Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T.I., Hamasaki, N. and Kang, D. (2004) Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci*, **1011**, 61-68.

Kawaguchi, T., Takenoshita, M., Kabashima, T. and Uyeda, K. (2001) Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13710-13715.

Kennedy, B.P. and Ramachandran, C. (2000) Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol*, **60**, 877-883.

Kim, L., Liu, J. and Kimmel, A.R. (1999) The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell*, **99**, 399-408.

Kim, S.J. (1998) Insulin rapidly induces nuclear translocation of PI3-kinase in HepG2 cells. *Biochem Mol Biol Int*, **46**, 187-196.

Kim, Y.B., Kotani, K., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R. and Kahn, B.B. (2003) Insulin-stimulated protein kinase C lambda/zeta activity is reduced in skeletal muscle of humans with obesity and type 2 diabetes: reversal with weight reduction. *Diabetes*, **52**, 1935-1942.

Klopstock, T., Naumann, M., Seibel, P., Shalke, B., Reiners, K. and Reichmann, H. (1997) Mitochondrial DNA mutations in multiple symmetric lipomatosis. *Mol Cell Biochem*, **174**, 271-275.

Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J. and Roth, R.A. (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*, **271**, 31372-31378.

Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T. and Kikkawa, U. (1995) Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 526-534.

Konrad, D., Bilan, P.J., Nawaz, Z., Sweeney, G., Niu, W., Liu, Z., Antonescu, C.N., Rudich, A. and Klip, A. (2002) Need for GLUT4 activation to reach maximum effect of insulin-mediated glucose uptake in brown adipocytes isolated from GLUT4myc-expressing mice. *Diabetes*, **51**, 2719-2726.

Koopman, R., Schaart, G. and Hesselink, M.K. (2001) Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol*, **116**, 63-68.

Kotani, K., Carozzi, A.J., Sakaue, H., Hara, K., Robinson, L.J., Clark, S.F., Yonezawa, K., James, D.E. and Kasuga, M. (1995) Requirement for phosphoinositide 3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **209**, 343-348.

Kotani, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kitamura, T., Sakaue, H., Hino, Y., Miyake, K., Sano, W., Akimoto, K., Ohno, S. and Kasuga, M. (1998) Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, **18**, 6971-6982.

Krauss, S. (2001) Mitochondria : Structure and Role in Respiration. *encyclopedia of life sciences*.

Kudo, N., Barr, A.J., Barr, R.L., Desai, S. and Lopaschuk, G.D. (1995) High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*, **270**, 17513-17520.

Kusmartsev, S. and Gabrilovich, D.I. (2003) Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol*, **74**, 186-196.

Lam, K., Carpenter, C.L., Ruderman, N.B., Friel, J.C. and Kelly, K.L. (1994) The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1. Stimulation by insulin and inhibition by Wortmannin. *J Biol Chem*, **269**, 20648-20652.

Lavoie, L., Band, C.J., Kong, M., Bergeron, J.J. and Posner, B.I. (1999) Regulation of glycogen synthase in rat hepatocytes. Evidence for multiple signaling pathways. *J Biol Chem*, **274**, 28279-28285.

Lavrovsky, Y., Chatterjee, B., Clark, R.A. and Roy, A.K. (2000) Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. *Exp Gerontol*, **35**, 521-532.

Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Gremeaux, T., Gonzalez, T., Barres, R. and Tanti, J.F. (2003) Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Biochem Soc Trans*, **31**, 1152-1156.

Le Roith, D. and Zick, Y. (2001) Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care*, **24**, 588-597.

Lemieux, K., Konrad, D., Klip, A. and Marette, A. (2003) The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle. *Faseb J*, **17**, 1658-1665.

Lennon, A.M., Ramauge, M., Dessouroux, A. and Pierre, M. (2002) MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenated species. *J Biol Chem*, **277**, 29681-29685.

Lestienne, P., (1999) Mitochondrial Diseases: Models and Methods. Ed. Springer.

Li, J., Hu, X., Selvakumar, P., Russell, I.R., Cushman, S.W., Holman, G.D. and Young, L.H. (2004) Role of the Nitric Oxide Pathway in AMPK-mediated Glucose Uptake and GLUT4 Translocation in Heart Muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Liao, X. and Butow, R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, **72**, 61-71.

MacDougald, O.A. and Lane, M.D. (1995) Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu Rev Biochem*, **64**, 345-373.

Marette, A., Richardson, J.M., Ramlal, T., Balon, T.W., Vranic, M., Pessin, J.E. and Klip, A. (1992) Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *Am J Physiol*, **263**, C443-452.

Mascaro, C., Acosta, E., Ortiz, J.A., Marrero, P.F., Hegardt, F.G. and Haro, D. (1998) Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*, **273**, 8560-8563.

Masucci, J.P., Schon, E.A. and King, M.P. (1997) Point mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: implications for pathogenesis and mechanism. *Mol Cell Biochem*, **174**, 215-219.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G. and Winder, W.W. (1997) AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*, **273**, E1107-1112.

Michalak, M., Robert Parker, J.M. and Opas, M. (2002) Ca2+ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*, **32**, 269-278.

Montagnani, M., Chen, H., Barr, V.A. and Quon, M.J. (2001) Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca2+ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem*, **276**, 30392-30398.

Moore, F., Weekes, J. and Hardie, D.G. (1991) Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem*, **199**, 691-697.

Moustaid, N., Jones, B.H. and Taylor, J.W. (1996) Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr*, **126**, 865-870.

Muller, G., Wied, S. and Frick, W. (2000) Cross talk of pp125(FAK) and pp59(Lyn) non-receptor tyrosine kinases to insulin-mimetic signaling in adipocytes. *Mol Cell Biol*, **20**, 4708-4723.

Munaron, L., Antoniotti, S., Pla, A.F. and Lovisolo, D. (2004) Blocking Ca2+entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem*, **11**, 1533-1543.

Munoz-Malaga, A., Bautista, J., Salazar, J.A., Aguilera, I., Garcia, R., Chinchon, I., Segura, M.D., Campos, Y. and Arenas, J. (2000) Lipomatosis, proximal myopathy, and the mitochondrial 8344 mutation. A lipid storage myopathy? *Muscle Nerve*, **23**, 538-542.

Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A. and Coleman, R.A. (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*, **338 (Pt 3)**, 783-791.

Nakayama, T., Yamada, M., Osawa, T. and Kawakishi, S. (1993) Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol*, **45**, 265-267.

Naumann, M., Kiefer, R., Toyka, K.V., Sommer, C., Seibel, P. and Reichmann, H. (1997) Mitochondrial dysfunction with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers point mutation in nerve, muscle, and adipose tissue of a patient with multiple symmetric lipomatosis. *Muscle Nerve*, **20**, 833-839.

Neri, L.M., Borgatti, P., Capitani, S. and Martelli, A.M. (2002) The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. *Biochim Biophys Acta*, **1584**, 73-80.

Neri, L.M., Milani, D., Bertolaso, L., Stroscio, M., Bertagnolo, V. and Capitani, S. (1994) Nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase in rat pheochromocytoma PC 12 cells after treatment with nerve growth factor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, **40**, 619-626.

Nicolin, V., Sandrucci, M.A., Basa, M., Bareggi, R., Martelli, A.M., Narducci, P. and Grill, V. (2004) Expression of protein kinase C (PKC) alpha, delta, epsilon, zeta in primary chick chondrocyte cultures: immunocytochemical study. *Ital J Anat Embryol*, **109**, 55-65.

Niu, W., Huang, C., Nawaz, Z., Levy, M., Somwar, R., Li, D., Bilan, P.J. and Klip, A. (2003) Maturation of the regulation of GLUT4 activity by p38 MAPK during L6 cell myogenesis. *J Biol Chem*, **278**, 17953-17962.

Noguchi, T., Iritani, N. and Tanaka, T. (1992) Molecular mechanism of induction of key enzymes related to lipogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, **200**, 206-209.

Novotny, E.J., Jr., Singh, G., Wallace, D.C., Dorfman, L.J., Louis, A., Sogg, R.L. and Steinman, L. (1986) Leber's disease and dystonia: a mitochondrial disease. *Neurology*, **36**, 1053-1060.

Okada, T., Kawano, Y., Sakakibara, T., Hazeki, O. and Ui, M. (1994) Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in

rat adipocytes. Studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem*, **269**, 3568-3573.

Okuno, S., Kitani, T., Matsuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U. and Fujisawa, H. (2000) Studies on the phosphorylation of protein kinase B by Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biochem (Tokyo)*, **127**, 965-970.

Olson, A.L., Trumbly, A.R. and Gibson, G.V. (2001) Insulin-mediated GLUT4 translocation is dependent on the microtubule network. *J Biol Chem*, **276**, 10706-10714.

Orena, S.J., Torchia, A.J. and Garofalo, R.S. (2000) Inhibition of glycogen-synthase kinase 3 stimulates glycogen synthase and glucose transport by distinct mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **275**, 15765-15772.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B. and Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 552-565.

Osborne, T.F. (2000) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem*, **275**, 32379-32382.

Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M.J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N. and et al. (1991) Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase. *Cell*, **65**, 91-104.

Partovian, C. and Simons, M. (2004) Regulation of protein kinase B/Akt activity and Ser473 phosphorylation by protein kinase Calpha in endothelial cells. *Cell Signal*, **16**, 951-957.

Perea, A., Clemente, F., Martinell, J., Villanueva-Penacarrillo, M.L. and Valverde, I. (1995) Physiological effect of glucagon in human isolated adipocytes. *Horm Metab Res*, **27**, 372-375.

Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J.T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M.P. and Dedhar, S. (2001) Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J Biol Chem*, **276**, 27462-27469.

Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W. and Shulman, G.I. (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*, **300**, 1140-1142.

Pons, S., Asano, T., Glasheen, E., Miralpeix, M., Zhang, Y., Fisher, T.L., Myers, M.G., Jr., Sun, X.J. and White, M.F. (1995) The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*, **15**, 4453-4465.

Raha, S., McEachern, G.E., Myint, A.T. and Robinson, B.H. (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med*, **29**, 170-180.

Rea, S. and James, D.E. (1997) Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes*, **46**, 1667-1677.

Ribon, V., Printen, J.A., Hoffman, N.G., Kay, B.K. and Saltiel, A.R. (1998) A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*, **18**, 872-879.

Ribon, V. and Saltiel, A.R. (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, **324 (Pt 3)**, 839-845.

Ridderstrale, M. and Tornqvist, H. (1996) Effects of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylations and the insulin-like effects in response to human growth hormone in isolated rat adipocytes. *Endocrinology*, **137**, 4650-4656.

Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, **68**, 673-682.

Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1998) Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem*, **273**, 5785-5793.

Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P.D. and Fassler, R. (2003) Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev*, **17**, 926-940.

Sakaue, H., Ogawa, W., Takata, M., Kuroda, S., Kotani, K., Matsumoto, M., Sakaue, M., Nishio, S., Ueno, H. and Kasuga, M. (1997) Phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced but not for growth hormone- or hyperosmolarity-induced glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, **11**, 1552-1562.

Salt, I.P., Connell, J.M. and Gould, G.W. (2000) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, **49**, 1649-1656.

Shearer, J., Fueger, P.T., Vorndick, B., Bracy, D.P., Rottman, J.N., Clanton, J.A. and Wasserman, D.H. (2004) AMP kinase-induced skeletal muscle glucose but not long-chain fatty acid uptake is dependent on nitric oxide. *Diabetes*, **53**, 1429-1435.

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W. and Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, **61**, 931-937.

Slot, J.W., Geuze, H.J., Gigengack, S., Lienhard, G.E. and James, D.E. (1991) Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol*, **113**, 123-135.

Smith, C.J., Rubin, C.S. and Rosen, O.M. (1980) Insulin-treated 3T3-L1 adipocytes and cell-free extracts derived from them incorporate 32P into ribosomal protein S6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 2641-2645.

Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P.E., Rondinone, C.M. and Klip, A. (2002) A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, **277**, 50386-50395.

Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R. and Franke, T.F. (1997) Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11345-11350.

Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Sajan, M.P., Cong, L., Quon, M.J. and Farese, R.V. (1999) Okadaic acid activates atypical protein kinase C (zeta/lambda) in rat and 3T3/L1 adipocytes. An apparent requirement for activation of Glut4 translocation and glucose transport. *J Biol Chem*, **274**, 14074-14078.

Stein, R.C. and Waterfield, M.D. (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today*, **6**, 347-357.

Streicher, R., Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck, M., Avci, H. and Krone, W. (1996) SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem*, **271**, 7128-7133.

Summers, S.A., Yin, V.P., Whiteman, E.L., Garza, L.A., Cho, H., Tuttle, R.L. and Birnbaum, M.J. (1999) Signaling pathways mediating insulin-stimulated glucose transport. *Ann N Y Acad Sci*, **892**, 169-186.

Sweeney, G., Somwar, R., Ramlal, T., Volchuk, A., Ueyama, A. and Klip, A. (1999) An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose

transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem*, **274**, 10071-10078.

Tamas, G., Marre, M., Astorga, R., Dedov, I., Jacobsen, J. and Lindholm, A. (2001) Glycaemic control in type 1 diabetic patients using optimised insulin aspart or human insulin in a randomised multinational study. *Diabetes Res Clin Pract*, **54**, 105-114.

Tanti, J.F., Grillo, S., Gremeaux, T., Coffer, P.J., Van Obberghen, E. and Le Marchand-Brustel, Y. (1997) Potential role of protein kinase B in glucose transporter 4 translocation in adipocytes. *Endocrinology*, **138**, 2005-2010.

Tellam, J.T., Macaulay, S.L., McIntosh, S., Hewish, D.R., Ward, C.W. and James, D.E. (1997) Characterization of Munc-18c and syntaxin-4 in 3T3-L1 adipocytes. Putative role in insulin-dependent movement of GLUT-4. *J Biol Chem*, **272**, 6179-6186.

Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C.N., Leiden, J.M. and Hotamisligil, G.S. (2000) Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*, **290**, 134-138.

Torres, M. and Forman, H.J. (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*, **17**, 287-296.

Towle, H.C., Kaytor, E.N. and Shih, H.M. (1997) Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate. *Annu Rev Nutr*, **17**, 405-433.

Troiano, R.P. and Flegal, K.M. (1999) Overweight prevalence among youth in the United States: why so many different numbers? *Int J Obes Relat Metab Disord*, **23 Suppl 2**, S22-27.

Tsakiridis, T., Tong, P., Matthews, B., Tsiani, E., Bilan, P.J., Klip, A. and Downey, G.P. (1999) Role of the actin cytoskeleton in insulin action. *Microsc Res Tech*, **47**, 79-92.

Tsakiridis, T., Vranic, M. and Klip, A. (1994) Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J Biol Chem*, **269**, 29934-29942.

Tsuru, M., Katagiri, H., Asano, T., Yamada, T., Ohno, S., Ogihara, T. and Oka, Y. (2002) Role of PKC isoforms in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes: insignificance of atypical PKC. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**, E338-345.

Tu, X., Batta, P., Innocent, N., Prisco, M., Casaburi, I., Belletti, B. and Baserga, R. (2002) Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by oncogenes and Igf-I. Effect on ribosomal RNA synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 44357-44365.

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

Unger, R.H. (2002) Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*, **53**, 319-336.

Uyeda, K., Yamashita, H. and Kawaguchi, T. (2002) Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol*, **63**, 2075-2080.

Van den Branden, C. and Vamecq, J. (2003) Metabolic regulation of peroxisomal and mitochondrial fatty acid oxidation. *Adv Exp Med Biol*, **544**, 307-314.

Virkamaki, A., Ueki, K. and Kahn, C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*, **103**, 931-943.

Voet, D., Voet, J., (1995) Biochime. Ed. De Boeck.

Volchuk, A., Wang, Q., Ewart, H.S., Liu, Z., He, L., Bennett, M.K. and Klip, A. (1996) Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes: regulation by insulin and participation in insulin-dependent glucose transport. *Mol Biol Cell*, **7**, 1075-1082.

Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R. and Klip, A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol Cell Biol*, **19**, 4008-4018.

Watson, R.T. and Pessin, J.E. (2001) Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. *Exp Cell Res*, **271**, 75-83.

Wei, Y.H. (1998) Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 53-63.

Werner, E.D., Lee, J., Hansen, L., Yuan, M. and Shoelson, S.E. (2004) Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302. *J Biol Chem*, **279**, 35298-35305.

Whitehead, J.P., Molero, J.C., Clark, S., Martin, S., Meneilly, G. and James, D.E. (2001) The role of Ca2+ in insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, **276**, 27816-27824.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, **79**, 143-180.

Winder, W.W. and Hardie, D.G. (1999) AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol*, **277**, E1-10.

Wood, I.S. and Trayhurn, P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, **89**, 3-9.

Woods, A., Azzout-Marniche, D., Foretz, M., Stein, S.C., Lemarchand, P., Ferre, P., Foufelle, F. and Carling, D. (2000) Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol*, **20**, 6704-6711.

Worrall, D.S. and Olefsky, J.M. (2002) The effects of intracellular calcium depletion on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, **16**, 378-389.

Wymann, M.P. and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 127-150.

Yamauchi, K., Holt, K. and Pessin, J.E. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase functions upstream of Ras and Raf in mediating insulin stimulation of c-fos transcription. *J Biol Chem*, **268**, 14597-14600.

Yamauchi, T., Kaburagi, Y., Ueki, K., Tsuji, Y., Stark, G.R., Kerr, I.M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Komuro, I., Tobe, K., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1998) Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J Biol Chem*, **273**, 15719-15726.

Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y. and Kadowaki, T. (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*, **16**, 3074-3084.

Yang, C., Watson, R.T., Elmendorf, J.S., Sacks, D.B. and Pessin, J.E. (2000) Calmodulin antagonists inhibit insulin-stimulated GLUT4 (glucose transporter 4) translocation by preventing the formation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in 3T3L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*, **14**, 317-326.

Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J. and Ahmad, M. (2003) Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 6-20.

Zancanaro, C., Sbarbati, A., Morroni, M., Carraro, R., Cigolini, M., Enzi, G. and Cinti, S. (1990) Multiple symmetric lipomatosis. Ultrastructural investigation of the tissue and preadipocytes in primary culture. *Lab Invest*, **63**, 253-258.

25 AOUT 2004

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles
B 5000 NAMUR (Be
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / ..