N° d'ordre Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

et préparée en cotutelle avec

L'UNIVERSITE DE MONTREAL

L'ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE-SANTE

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006 / arrêté du 6 janvier 2005)

Discipline : Physiologie

Domaine : Biologie, médecine, santé

Soutenue publiquement le 03 Juillet 2012

Par

Harmel Elodie

Rôle et régulation de la protéine kinase AMPK au niveau intestinal

Directeur de thèse : **Pr Emile Levy**

Co-directeur de thèse : **Pr Martine Laville**

- **Dr Hubert Vidal,** Université de Lyon	**Président**
- **Pr Fabrizio Andreelli,** Université de Paris	**Rapporteur**
- **Dr Yannick Le Marchand-Brustel,** Université de Nice	**Rapporteur**
- **Pr Rémi Rabasa-Lhoret,** Université de Montréal	**Rapporteur**
- **Pr Dominique Garrel,** Université de Montréal	**Membre du jury**
- **Pr Martine Laville,** Université de Lyon	**Co-directeur de thèse**
- **Pr Emile Levy,** Université de Montréal,	**Directeur de thèse**

Résumé

La physiopathologie du diabète de type II se caractérise par de sévères anomalies métaboliques telles que l'hyperglycémie et les dyslipidémies contribuant au développement des maladies cardiovasculaires. Une altération de l'activité de l'AMPK dans les tissus tels que le muscle squelettique et le foie est associée à ces désordres métaboliques alors que son activation pharmacologique permet de les rétablir. Toutefois, le complexe hétérotrimérique αβγ tissu-spécifique de l'AMPK confère une régulation et des rôles distincts qui demeurent inexplorés dans l'intestin, un organe favorisant pourtant l'augmentation de l'absorption des nutriments en situation de diabète de type II. La présente étude démontre une prépondérance du complexe α1β2γ1 de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2 dont l'un des rôles de la sous-unité α1 est de réguler l'ACC, l'enzyme de synthèse des acides gras. Contrairement à l'AMPK exprimée dans le foie, elle ne régule pas l'HMG-CoA Réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol. L'activation de l'AMPK mime l'effet de l'insuline en réduisant l'absorption intestinale du glucose et des lipides alors que son altération en situation d'insulino-résistance (e.g : induite par le 4-HHE dans un modèle cellulaire Caco-2 ou induite par la diète dans le modèle animal *Psammomys obesus*) favorise l'absorption du glucose et des lipides, ce qui exacerberait l'hyperglycémie et la dyslipidémie postprandiale associées au diabète de type II. L'AMPK au niveau intestinal constitue donc une cible thérapeutique potentielle complémentaire pour la prévention et le traitement du diabète de type II.

Mots-clés : AMPK, intestin, diabète de type II, résistance à l'insuline, 4-hydroxy-héxénal (4-HHE), lipides, glucose, cellules Caco-2, *Psammomys obesus.*

Abstract

Physiopathology of type II Diabetes is characterized by severe metabolic abnormalities such as hyperglycemia and dyslipidemia also implicated in development of cardiovascular diseases. Impaired AMPK activity in tissues such as skeletal muscle and liver is associated with these metabolic disorders whereas its pharmacologic activation is able to restore such abnormalities. Nevertheless, tissue-specific heterotrimeric αβγ AMPK likely confers distinct roles and regulation that remain unexplored in intestine, an organ promoting enhanced nutrients absorption in type II diabetes situation. This study demonstrates α1β2γ1 AMPK complex preponderance in intestinal Caco-2 cells whose α1 subunit role is to regulate ACC enzyme responsible of fatty acid synthesis. Unlike in the liver, AMPK doesn't regulate HMG-CoA reductase enzyme implicated in cholesterol synthesis. AMPK activation mimics insulin effect by reducing intestinal glucose and lipids absorption whereas its alteration in insulin-resistance situation (e.g.: induced by 4-HHE in Caco-2 cell model or in *Psammomys obesus* animal model) enhances glucose and lipids absorption which could exacerbate postprandial hyperglycemia and dyslipidemia associated to type II diabetes. Thus, AMPK at the intestinal level could be a potential therapeutic target in prevention and treatment of type II diabetes.

Key words: AMPK, intestine, type II Diabetes, insulin-resistance, 4-hydroxy-hexenal (4-HHE), lipids, glucose, Caco-2 cells, *Psammomys obesus.*

Préface

Cette thèse de doctorat a été réalisée en cotutelle entre l'Université de Montréal et l'Université Claude Bernard Lyon 1 et s'est déroulée au sein de l'unité dirigée par le Pr Emile Levy :

Laboratoire de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition
Centre de Recherche CHU Ste Justine
3175, chemin de la côte-Sainte-Catherine
Montréal, Québec, CANADA

Et au sein du Laboratoire CarMeN (Laboratoire de Recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition) dirigé par le Dr Hubert Vidal et sous la direction du Pr Martine Laville, directrice du Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes

INSA, Bâtiment IMBL, La Doua
11 Avenue Jean Capelle
69621 VILLEURBANNE

CRNH Rhône-Alpes
Centre Hospitalier Lyon Sud - Bât. 3D
165 chemin du Grand Revoyet
69310 PIERRE BENITE

FRANCE

Ce travail a donné lieu à la rédaction des articles suivants :

- Emile Levy, **Elodie Harmel**, Martine Laville, Rocio Sanchez, Léa Emonnot, Daniel Sinnett, Ehud Ziv, Edgard Delvin, Patrick Couture, Valérie Marcil and Alain T. Sane. Expression of Sar1b Enhances Chylomicron Assembly and Key Components the Coat Protein Complex II System Driving Vesicle Budding. **Publié dans Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 31:2692-2699, 2011.**

- **E. Harmel,** É. Grenier, A. BenDjoudi Ouadda, M. El Chebly, E. Ziv, I. Raz, A.Sané, S. Spahis, M. Laville, E. Levy. AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions. **Soumis**.

- **Harmel, Elodie**; Awada, Manar; Peretti, Noël; Vidal, Hubert; Michalski Marie-Caroline; Levy Emile; Laville, Martine. Crosstalk between the AMPK and insulin

signaling pathways is able to reduce glucose uptake by intestinal Caco-2 cells but not in HHE induced insulin-resistant state. **Soumis.**

Et à la présentation des communications suivantes:

1. **Harmel E**, Ravid Z, Laville M, Mailhot G, Delvin E, Lambert M, Rabasa Lhoret R, Levy E. **Influence of blood pathway versus enteral feeding pathway on intestinal cholesterol absorption and its transporters expression levels.** 10e réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition, 29/04-02/05/2009, Québec.
2. **Harmel E**, Ravid Z, Laville M, Mailhot G, Delvin E, Lambert M, Rabasa Lhoret R, Levy E. **Does glycemia play a role in intestinal absorption of lipids?** XXIVème congrès annuel des étudiants gradués et post-gradués du Centre de recherche du CHU Ste Justine.02/06/2009, Montréal.
3. **Harmel E,** Laville M, Garofalo C, Grenier E, Ouadda AB, Précourt LP, Levy E. **Function and regulation of protein kinase AMPK in intestine, a potential target for dyslipidemias treatment in Type II Diabetes.** 11e réunion annuelle de la Société Québécoise de Lipidologie, Métabolisme et Nutrition, 29/04-01/05/2010, Québec.
4. **Harmel E**, Laville M, Garofalo C, Grenier E, Ouadda AB, Précourt LP, Levy E. **Characterization of protein kinase AMPK in intestine, a potential target for dyslipidemias treatment in Type II Diabetes ?** XXVème congrès annuel des étudiants gradués et post-gradués du Centre de recherche du CHU Ste Justine. 26/05/2010, Montréal.
5. **Harmel E,** Viollet B, Garofalo C, Emonnot L, Laville M, Levy E. **Localization, structure and regulation of AMPK in the small intestine**. DDW (Digestive Disease Week), 07-10/05/2011, Chicago.
6. **Harmel E,** Bendjoudi A, Elchebly M, Viollet B, Ziv E, Delvin E, Laville M, Levy E. **Disorders in AMPK and insulin signaling pathways in the intestine of insulin-resistant and diabetic *Psammomys obesus***. DDW (Digestive Disease Week), 07-10/05/2011, Chicago.
7. **Harmel E,** Awada M, Peretti N, Vidal H, Michalski MC, Levy E, Laville M. **Crosstalk between the AMPK and insulin signaling pathways is able to reduce glucose uptake by intestinal Caco-2 cells but not in HHE induced insulin-resistant state.** EGIR (European Group for the study of Insulin Resistance) Annual Metting 2012, 08-09/05/2012, Lyon.

Table des matières

INTRODUCTION **18**
CHAPITRE 1 ..... **20**
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **20**
1.1 Physiologie intestinale 20
1.1.1 La digestion 20
1.1.2 Anatomie et physiologie de l'intestin grêle et du côlon 20
1.1.2.1 Paroi intestinale 22
1.1.2.2 Les cellules intestinales 23
1.1.2.3 Fonction des entérocytes 25
1.1.2.3.1 Absorption intestinale des lipides 25
1.1.2.3.2 Absorption intestinale du glucose 34
1.2 L'insuline 43
1.2.1 Sécrétion 43
1.2.2 Effets biologiques 43
1.2.3 La voie intracellulaire de signalisation de l'insuline 44
1.3 La résistance à l'insuline intestinale 50
1.3.1 Le diabète de type II 50
1.3.2 Perturbation de la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes 51
1.3.3 Augmentation de la lipogenèse *de novo* intestinale 52
1.3.4 Augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol 52
1.3.5 Augmentation de l'absorption des lipides 53
1.3.6 Augmentation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons 54
1.3.7 Augmentation de l'absorption intestinale du glucose 55
1.4 L'AMPK : Actions et fonctions dans plusieurs organes (autres que l'intestin) 60
1.4.1 Généralités 60
1.4.2 Structure 60
1.4.3 Rôles principaux de l'AMPK dans les tissus 63
1.4.4 Régulation de l'AMPK 68
1.5 Activation de l'AMPK : une cible thérapeutique potentielle ? 70
1.5.1 Activateurs physiologiques 71
1.5.1.1 Le jeûne 72
1.5.1.2 L'exercice physique 72
1.5.1.3 Les hormones 72
1.5.2 Activateurs pharmacologiques 74
1.5.2.1 Les biguanides 75
1.5.2.2 Les thiazolidinediones (TZDs) 75
1.5.2.3 L'AICAR 76
1.5.2.4 Le composé C (inhibiteur) 76
1.6 Rôles de l'AMPK dans les maladies métaboliques 78
1.6.1 Etudes chez l'humain 78
1.6.2 Modèles animaux 78
1.6.2.1 Diète induisant IR/DT2 78

1.6.2.2 Animaux génétiquement modifiés 79
1.6.3 Modèles cellulaires (*in vitro*) 80
1.6.4 Le « crosstalk » entre les voies de signalisation AMPK/insuline 81
1.6.5 Rôles émergeants de l'AMPK dans l'intestin 84
1.7 Les acides gras polyinsaturés 85
1.8 La peroxydation lipidique 87
1.9 Les 4-hydroxyalkénals 89
1.9.1 Formation 89
1.9.2 Structure 90
1.9.3 Réactivité 90
1.9.4 Métabolisme 91
1.9.5 Dosages plasmatiques et cellulaires 92
1.9.6 Cytotoxicité 93
1.9.7 Signalisation cellulaire 93
1.9.8 Le 4-HHE et l'alimentation 94
1.10 Implication des 4-hydroxyalkénals dans les maladies métaboliques 95
1.10.1 Stress oxydatif et inflammation 95
1.10.2 Obésité, insulino-résistance et diabète de type II 96
1.10.3 L'AMPK et les 4-hydroxyalkénals 99
CHAPITRE 2 100
PROBLEMATIQUE 100
CHAPITRE 3 102
OBJECTIFS 102
CHAPITRE 4 103
MATERIELS ET METHODES 103
4.1 Les lignées cellulaires intestinales Caco-2 103
4.2 La culture cellulaire 105
4.2.1 Cellules intestinales Caco-2/15 105
4.2.2 Cellules intestinales Caco-2/TC7 106
4.3 Traitements des cellules 107
4.4 Mesure de l'intégrité cellulaire 108
4.5 Mesure de la viabilité 109
4.6 Mesure de la nécrose 110
4.7 Invalidation génique de la sous-unité alpha1 de l'AMPK 111
4.8 Extraction d'ARN et analyse de l'expression génique par RT-PCR 112
4.9 Immunoprécipitation et immunodétection 115
4.9.1 Extraction des protéines totales 115
4.9.2 Dosage des protéines et préparations des échantillons 115
4.9.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) 116
4.9.4 Electro-transfert sur membrane de nitrocellulose/PVDF 117
4.9.5 Immunodétection et révélation 117
4.9.6 Immunoprécipitation 118
4.10 Capture du glucose 120
4.11 Statistiques 120
CHAPITRE 5 121
RESULTATS 121

5.1 Caractérisation de l'AMPK dans les cellules intestinales 121
5.1.1 Structure de l'AMPK 121
5.1.2 Régulation pharmacologique de l'AMPK 127
5.1.3 Régulation physiologique de l'AMPK *in vitro* 136
5.1.4 Conclusions 138
5.2 Rôles de l'AMPK dans la lipogenèse 139
5.2.1 Validation du modèle d'invalidation de l'AMPKα1 (knock-down) 139
5.2.2 Impact de l'invalidation de l'AMPKα1 sur les enzymes de la lipogenèse 140
5.2.3 Conclusions 145
5.3 ARTICLE 1 : AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions . 146
5.4 Rôle de l'AMPK dans la sensibilité à l'insuline 149
5.4.1 Approche pharmacologique 150
5.4.1.1 Courbe « dose-réponse » de l'insuline dans les cellules entérocytaires 150
5.4.1.2 Effet de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline (Akt et mTORC1) 151
5.4.1.2.1 Régulation de l'AKT 151
5.4.1.2.2 Régulation de mTORC1 152
5.4.1.3 Mécanisme d'action de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline 154
5.4.2 Approche d'invalidation génique de l'AMPKα1 158
5.4.3 Conclusions 160
5.5 Effets du 4-HHE sur les voieS de signalisation AMPK/insuline 161
5.5.1 Effets à court terme du 4-HHE : stimulation de la voie de signalisation de l'insuline 162
5.5.2 Effets du 4-HHE à plus long terme (24h) : induction d'une insulino-résistance 165
5.5.3 Conclusions 170
5.6 ARTICLE 2 : Crosstalk between AMPK and insulin signaling pathways is able to reduce glucose uptake by intestinal Caco-2 cells but not in HHE induced insulin-resistance state 172
CHAPITRE 6 174
DISCUSSION 174
6.6 Structure et régulation de l'AMPK 176
6.2 Rôle de l'AMPK dans la lipogenèse 177
6.3 Rôle de l'AMPK dans la sensibilite à l'insuline 181
6.4 Effets du 4-hydroxy-héxénal (4-HHE) sur la sensibilité à l'insuline 188
PERSPECTIVES 193
ANNEXE 225

Liste des Figures

Figure 1 : Anatomie du tube digestif humain. 21
Figure 2: Coupes des couches de l'intestin grêle montrant des villosités 23
Figure 3 : Organisation des cellules de l'intestin grêle 24
Figure 4: Schéma d'un entérocyte 25
Figure 5: Les transporteurs du cholestérol dans l'intestin 27
Figure 6 : Structure générale des lipoprotéines (d'après la Fondation Suisse de Cardiologie) 29
Figure 7 : Assemblage et sécrétion du chylomicron par l'entérocyte. 30
Figure 8: Biopsies intestinales de sujets sain et malade (rétention de chylomicrons). 32
Figure 9 : Mécanismes intra-entérocytaires responsables de la rétention de chylomicron. 33
Figure 10 : Modèle du GLUT2 apical dans l'absorption intestinale du glucose avant (A) et après (B) un repas 35
Figure 11: Régulation de l'activité du GLUT2 par le calcium et les récepteurs du goût au niveau de la membrane apicale des entérocytes 37
Figure 12: Régulation endocrine et paracrine de l'absorption intestinale du sucre 40
Figure 13: Voies de signalisation activées par l'insuline 45
Figure 14: Voies de contrôles négatifs sur la signalisation de l'insuline 49
Figure 15: Diabète de type II : évolution à partir des anomalies sous-jacentes 50
Figure 16: Rôles du GLUT2 apical chez les sujets sains ou obèses dans l'absorption intestinale du glucose 56
Figure 17 : Le développement de l'insulino-résistance en réponse à une diète riche en sucre ou en lipides est associé à une localisation apicale permanente du transporteur du glucose GLUT2 57
Figure 18: Structure des domaines des trois sous-unités formant le complexe hétérotrimérique de l'AMPK 61
Figure 19 : Rôles principaux de l'AMPK dans les tissus 64
Figure 20: Comparaison des rôles de l'AMPK entre les différents tissus insulino-sensibles 67
Figure 21: Régulation de l'AMPK 69
Figure 22 : Modèle du mécanisme d'action par lequel la Metformine améliore la glycémie et la lipémie 71
Figure 23 : Régulation hormonale de l'AMPK 74
Figure 24: Schéma proposé pour la régulation du transport du glucose par l'insuline et l'AMPK dans les cardiomyocytes 82
Figure 25: Schéma décrivant le processus de l'oxydation des lipides 88
Figure 26: Les 4-hydroxyalkénals sont des produits secondaires de l'oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 très réactifs. 89
Figure 27 : Structure chimique générale des 4-hydroxyalkénals 90
Figure 28 : Mécanisme d'adduction par les 4-hydroxyalkénals 91
Figure 29: Effets biologiques et voies de signalisation activées par le 4-HNE 95
Figure 30 : Schéma représentant le mécanisme d'action potentiel du 4-HNE dans l'accumulation de lipides. 98
Figure 31: Problématique de l'étude : Quel est le rôle de l'AMPK dans l'intestin ? Son altération est-elle associée à l'insulino-résistance ? Peut-elle contribuer aux désordres métaboliques associés au diabète de type II ? 101
Figure 32 : Microscopie électronique à transmission des lignées cellulaires intestinales Caco-2, RIE-1 et IEC-6 104
Figure 33 : Monocouche de cellules Caco-2 observée au microscope optique inverse. 105
Figure 34 : Schéma expérimental des Caco-2 sur insert. 105
Figure 35: Distribution de l'expression génique des 7 isoformes de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15 (A) non différenciées et (B) différenciées. 122
Figure 36 : Distribution des expressions protéiques des 7 isoformes de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15 (A) non différenciées et (B) différenciées 123

Figure 37: Proportion des isoformes α1 et α2 immunoprécipitées par rapport au lysat total 124
Figure 38: Pureté de l'immunoprécipitation de l'isoforme α2 (IPα2).....125
Figure 39: Identification du complexe hétérotrimérique majoritaire de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2/15 125
Figure 40: La sous-unité catalytique α1 de l'AMPK a plus d'affinité pour la sous-unité β2 126
Figure 41: Inhibition de la phosphorylation de l'AMPK par le composé C dans les cellules Caco-2/15. 128
Figure 42 : Le composé C (40µM) ne modifie pas l'expression génique de (A) l'AMPKα1, (B) AMPKα2 ni de (C) l'HMG-CoA Réductase après 24h d'incubation.....129
Figure 43 : L'AICAR (8mM, 3 heures) n'affecte pas la viabilité cellulaire 131
Figure 44: L'activation via la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) par l'AICAR inhibe la phosphorylation (Ser79) de l'ACC mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation (Ser872) de l'HMG-CoA Réductase.....132
Figure 45: Le composé A-769662 ne permet pas l'activation par phosphorylation de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15.....133
Figure 46 : L'activation via la phosphorylation (Thr172) de l'AMPK par la Metformine inhibe par phosphorylation (Ser79) l'activité de l'ACC mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation (Ser872) de l'HMG-CoA Réductase.....135
Figure 47 : Régulation de l'activité par phosphorylation de l'AMPK (Thr172) et des enzymes clés de la lipogenèse, l'HMG-CoA Réductase (Ser872) et l'ACC (Ser79) par différentes concentrations de glucose (0-5-25mM).....137
Figure 48 : Expression de l'AMPKα1 dans les cellules Caco-2/15 infectées avec des shRNA 139
Figure 49: Impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur les enzymes clés de la lipogenèse (ACC et HMG-CoA Réductase) en présence ou non d'un activateur de l'AMPK, l'AICAR.....142
Figure 50: Impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur les enzymes clés de la lipogenèse (ACC et HMG-CoA Réductase) en présence ou non d'un inhibiteur de l'AMPK, le composé C 144
Figure 51: Interactions entre les voies de signalisation de l'AMPK et de l'insuline dans le muscle squelettique 150
Figure 52: Courbe « dose-réponse » de l'insuline pour induire la phosphorylation de l'Akt (Ser473) 151
Figure 53: L'AMPK sous forme active est capable de stimuler l'Akt (Ser473) 2 fois plus que l'insuline seule 151
Figure 54 : L'insuline n'a pas d'effet sur la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC.....152
Figure 55: L'inhibition via la déphosphorylation de l'AMPK par le composé C induit la phosphorylation de mTORC1 (Ser2448) ; inversement, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK par la Metformine déphosphoryle et inhibe mTORC1 153
Figure 56 : Courbe « dose-réponse » de l'inhibiteur de PI3K, le composé LY294002, pour abolir l'effet stimulateur de l'insuline sur la phosphorylation de l'Akt (Ser473).....154
Figure 57: L'activation de l'Akt par l'AMPK est PI3K-dépendante et réciproquement, l'inhibition de la PI3K altère l'axe AMPK/ACC. 155
Figure 58: L'insuline et l'AICAR inhibent l'absorption entérocytaire du glucose par un mécanisme PI3K et AMPK-dépendant respectivement.....157
Figure 59: L'invalidation de la sous-unité α1 de l'AMPK n'a pas d'effet sur l'activité de l'Akt et mTORC1.....159
Figure 60 : A court terme, le 4-HHE n'induit pas de nécrose dans les cellules intestinales Caco-2/TC7 162
Figure 61 : Le 4-HHE stimule la phosphorylation de l'AKT et de l'AMPK de manière dose-dépendante 163
Figure 62 : L'insuline ne potentialise pas l'effet du 4-HHE sur la phosphorylation de l'Akt (Ser473). Le 4-HHE stimule la phosphorylation de l'AKT de manière dose-dépendante 164
Figure 63 : A court terme, le 4-HHE et l'insuline réduisent l'absorption du glucose dans les cellules caco-2/TC7.....165

Figure 64 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE n'induit pas de nécrose dans les cellules intestinales Caco-2/TC7 166
Figure 65 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE réduit la réponse de l'Akt (Ser473) à l'insuline de manière dose-dépendante.....167
Figure 66 : Après 24h d'incubation, le 4-HHE stimule l'absorption de glucose à travers la membrane apicale des entérocytes ainsi que sa libération dans le milieu basolatéral assimilé à la circulation sanguine 168
Figure 67 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE réduit les niveaux de phosphorylations de l'AMPK (Thr172) et de l'ACC (Ser79) de manière dose-dépendante dans les cellules entérocytaires 169
Figure 68: Schéma de synthèse décrivant les effets PI3K-dépendants de l'insuline et de l'AMPK...187
Figure 69 : Synthèse de l'étude : hypothèses, résultats et expériences validées au cours de ce travail et par d'autres équipes.....194

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau de synthèse des anomalies métaboliques reliées à la résistance à l'insuline intestinale 58
Tableau 2 : Composition des complexes hétérotrimériques majoritaires dans les tissus insulino-sensibles. 63
Tableau 3: Impact de l'activation de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline. 83
Tableau 4: Apports nutritionnels conseillés en AGPI pour un adulte (*ANSES*, 2011) 86
Tableau 5: Etendue des valeurs acceptables pour les macronutriments (EVA) selon les ANREF de *Santé Canada.* 86
Tableau 6: Concentration plasmatique du 4-HNE libre 92
Tableau 7 : Préparation des échantillons pour la RT-PCR et la PCR 113
Tableau 8: Liste des séquences d'amorces utilisées pour l'amplification des gènes 114
Tableau 9 : Préparation des gels pour la migration en SDS-PAGE 116
Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés pour les immunobuvardages et des IP 119
Tableau 11: Identification du complexe hétérotrimérique majoritaire de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2/15 126
Tableau 12 : Comparaison des différents complexes hétérotrimériques de l'AMPK dans les tissus insulino-sensibles 127

Liste des abréviations

ABC: ATP-binding cassette (ABC) transporters

ACAT : Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

ACC : Acetyl-CoA Carboxylase

AE : Apport énergétique

AGL: Acides gras libres

AGPI : Acide gras poly-insaturés

AICAR: 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside

ALA : Alpha-linoleic acid

AMP: Adénosine monophosphate

AMPK : Protéine kinase dépendante de l'AMP

ANC : Apport Nutritionnel Conseillé

ANREF : Apport Nutritionnel de Référence

Apo-B48 : Apolipoprotéine B48

AS160: Akt Substrate of 160 kDa

ATP: Adénosine triphosphate

CaMKKβ: Calmodulin-dependent protein kinase kinase

CE : Cholestérol estérifié

ChREBP: Carbohydrate responsive element-binding protein

CL : Cholestérol libre

CM: Chylomicron

CPT1: Carnitine palmitoyltransferase I

DAG: Diacylglycérol

DGAT : Diacylglycérol-acyltransférase

DHA : Docosahexaenoic acid

DT2 : Diabète de type II

EPA : Eicosapentaenoic acid

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

FAS : Fatty Acid Synthase

FAT/CD36: Fatty Acid Translocase / Cluster of Differentiation 36

FoxO1: Forkhead box O1

GCMS : Gas chromatography–mass spectrometry

GIP: Gastric inhibitory polypeptide

GLP: Glucagon-like peptide

GLUT: Glucose Transporteur

G6Pase: Glucose-6-Phosphatase

GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase

GSK3β: Glycogen Synthase Kinase 3β

GSH : Glutathion

HDL: High Density Lipoprotein

HHE : Hydroxyhéxénal

HMG-CoA Réductase : 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase

HNE : Hydroxynonénal

HSL: Hormone-Sensitive Lipase

iNOS: inductible Nictric Oxide Synthase

IR: Insulin Receptor

IRS: Insulin Receptor Substrate

LA : Linoleic acid

JNK: c-Jun-N-Terminal Kinases

LCMS : Liquid chromatography-mass spectrometry

LKB1: Liver Kinase B1

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCD: Malonyl-CoA Decarboxylase

MDA : Malondialdéhyde

MGAT : Monoacylglycérol-acyltransférase

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

MTP : Microsomal Triglyceride Transfer Protein

NF-κB : Nuclear Factor-kappa B

NPC1L1: Niemann-Pick C1 Like 1

PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PI3K: Phosphatidyl-inositol-3-kinase

PKB/Akt: Protéine Kinase B / Akt

PKC: Protéine Kinase C

PL : Phospholipides

PLC: Phospholipase C

PP2A: Protein Phosphatase 2A

PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PTP1B: Protéine Tyrosine Phosphatase 1B

PTEN: Phosphatase and Tensin homologue

RE: Réticulum endoplasmique

ROS : Reactive Oxygen Species

Sar1b: Sar1 homologue B GTPase

SGLT1: Sodium-Glucose coTransporter 1

SR-BI: Scavenger Receptor-BI

SREBP1c: Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

TG: Triglycérides

T1R: Taste 1 Receptor

TZDs: Thiazolidinediones

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

Un grand merci à

Emile Levy et Martine Laville, mes directeurs de recherche, pour leur encadrement, leur confiance et leur disponibilité qu'ils m'ont accordée. Je les remercie chaleureusement pour leur générosité, leurs encouragements et de m'avoir permis de mener à bien mon projet de thèse.

Carole Garofalo, pour m'avoir appris de nombreuses techniques de laboratoire. Je lui suis très reconnaissante pour ses qualités professionnelles et humaines hors pair.

Alain Sané, pour sa collaboration sur la partie biologie moléculaire du projet, notamment la mise au point des « knock-down ». Je le remercie également pour sa gentillesse et sa bonne humeur très appréciées.

Hubert Vidal, Marie-Caroline Michalski et Noël Peretti pour m'avoir intégrée au sein de leur équipe travaillant sur les hydroxyalkénals. Je les remercie beaucoup pour leurs précieux conseils, leur gentillesse et leur soutien.

Michel Dominguez, pour les discussions animées et fructueuses que nous avons partagées. Je le remercie pour ses encouragements et son amitié.

Zola, **Danielle**, **Geneviève**, **Louis-Philipe**, **Ali**, **Maurice**, **Thierry, Alain, Sabrina, Emilie, Marie-Claude, Léa, Manar, Zohra, Sylvie, Laure et Valérie** pour leur accueil au laboratoire, pour avoir participé de près ou de loin au projet, pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour tous les bons moments partagés ensemble qui adoucissaient la vie de doctorante. Merci pour votre amitié.

Tous les autres membres des laboratoires du CHU Sainte Justine à Montréal, du CRNH et de l'IMBL de Lyon pour leur accueil et leur sympathie.

Ma famille et mes amis pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de ce doctorat malgré les 6000 kilomètres qui nous séparaient.

INTRODUCTION

Le style de vie sédentaire et l'apport alimentaire excédentaire favorisent la progression alarmante des maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type II (DT2) et le syndrome métabolique y compris dans les pays émergeants (**Minehira et Tappy, 2002**). Le stress oxydant et l'inflammation semblent être impliqués dans le développement de la résistance périphérique à l'insuline conduisant au DT2 (**Dandona et al., 2010**; **Hopps et al., 2010**). Ces maladies s'accompagnent de complications sévères telles que l'hyperglycémie et les dyslipidémies, augmentant le risque d'athérosclérose et de maladies cardiovasculaires (**Gami et al., 2007**). Pour ces raisons, de nombreuses études ont été menées afin de mieux cerner les mécanismes responsables de l'hyperglycémie et des dyslipidémies associées à l'obésité et au DT2.

La protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK), joue un rôle de senseur métabolique en réponse à des influences environnementales nutritionnelles telles que la nutrition et l'exercice, la plaçant ainsi au cœur des recherches sur l'obésité, le DT2 et le syndrome métabolique (**Andersson et al., 2004**). En situation d'activation, l'AMPK réprime les voies anaboliques consommatrices d'énergie (lipogenèse, néoglucogenèse, synthèse protéique) et active les voies cataboliques productrices d'énergie (oxydation des acides gras, glycolyse, protéolyse) (**Foretz et al., 2006**). Cette protéine est ubiquitaire mais son rôle tissu-spécifique a bien été montré dans le foie, le muscle et le tissu adipeux (**Ruderman et al., 2003**). Cependant, la fonction de l'AMPK dans l'intestin n'a pas encore été explorée.

De nombreux travaux démontrent qu'en situation de résistance à l'insuline et de DT2, l'intestin peut significativement contribuer à l'hyperglycémie et aux dyslipidémies, en augmentant l'absorption du glucose, la lipogenèse et la production de lipoprotéines riches en triglycérides (**Zoltowska et al., 2003**). Par ailleurs, le stress oxydatif généré par la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (AGPI) surtout d'origine alimentaire semble favoriser le développement de l'insulino-résistance (**Pillon et al., 2012**; **Shearn et al., 2011**). Cependant les mécanismes demeurent obscurs.

Devant ces problèmes interpellants, nous avons voulu poursuivre les travaux en proposant les hypothèses suivantes :

(i) l'intestin développe une résistance à l'insuline, qui le classe parmi les organes métaboliques de choix ;

(ii) les produits d'oxydation des AGPI, par leurs effets toxiques, induisent une résistance à l'insuline intestinale ;

(iii) le dérèglement de l'AMPK est à l'origine des désordres énergétiques favorisant l'absorption intestinale du glucose, l'activation de la lipogenèse et de la synthèse des lipoprotéines intestinales, tout en inhibant les voies cataboliques (β-oxydation).

Au préalable, il est essentiel de démontrer la présence de l'AMPK au niveau de l'intestin, tout en caractérisant sa signature hétérotrimérique spécifique et en clarifiant son rôle.

CHAPITRE 1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 PHYSIOLOGIE INTESTINALE

1.1.1 La digestion

Pour assurer les besoins métaboliques et énergétiques de l'organisme, les aliments subissent un ensemble de transformations tout au long du tube digestif. Le tube digestif est composé d'un ensemble d'organes et de glandes agissant simultanément afin de permettre la digestion et l'absorption des nutriments. Les aliments sont déglutis, mixés, fragmentés puis absorbés à travers la muqueuse intestinale. Ce processus s'appelle la digestion. Il débute dans la zone oro-pharyngée sous l'action de la mastication et des enzymes salivaires. L'œsophage transporte rapidement le bol alimentaire dans l'estomac après ouverture du cardia, un sphincter qui empêche le reflux vers l'œsophage. L'estomac proximal sert principalement de site de stockage de la nourriture consommée. Son action mécanique la fait progresser dans l'estomac distal à laquelle s'ajoute son action enzymatique afin de réduire les particules alimentaires en une solution appelée le chyme. Les protéines sont dénaturées par le suc gastrique, des gouttelettes lipidiques se forment et la présence de polysaccharides ne permet pas à ce stade l'absorption des macromolécules à travers la paroi gastrique. C'est au niveau de l'intestin grêle que la majorité des nutriments sont absorbés (**Levy E, 2000**).

1.1.2 Anatomie et physiologie de l'intestin grêle et du côlon

L'intestin grêle s'étend du sphincter pylorique à la valvule iléo-caecale. Il mesure environ 6 mètres de long et comprend trois segments successifs : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (**Figure 1**). Le petit intestin a pour fonction essentielle de compléter la digestion des aliments et d'absorber les produits de dégradation, ainsi que l'eau, les électrolytes et les vitamines.

Le duodénum mesure environ 25 cm et son rôle physiologique est fondamental. Il mélange le chyme alimentaire avec les sécrétions biliaires issues du canal cholédoque et avec les sécrétions pancréatiques issues du canal de Wirsung. Ces sécrétions contiennent des

enzymes qui permettent de neutraliser l'acidité du bol gastrique et qui scindent les constituants alimentaires en particules absorbables : monosaccharides, acides aminés, dipeptides, monoglycérides et acides gras libres (**Levy E, 2000**). Le jéjunum représente environ 40% de la longueur totale de l'intestin grêle humain. Il est le siège principal de l'absorption intestinale des nutriments (**Levy E, 2000**). Puis l'iléon fait suite au jéjunum pour déboucher sur le gros intestin au niveau de la valvule iléo-caecale. L'iléon représente une réserve fonctionnelle en cas de malabsorption jéjunale. En situation normale, à la fin de l'iléon, la majorité des substances se trouve absorbée (**Levy E, 2000**). Le côlon ou le gros intestin s'étend sur environ 1,5 mètre. Il est le dernier site de réabsorption de l'eau et des ions permettant la régulation de l'hydratation des selles. Le gros intestin est colonisé par des bactéries qui permettent de fermenter les aliments non digérés. On parle de fermentation bactérienne par la flore intestinale. Cette action permet la synthèse d'acides gras à courtes chaînes et de certaines vitamines telles que les vitamines B12, K, B1 et B2 (**Madara JL, 1994**).

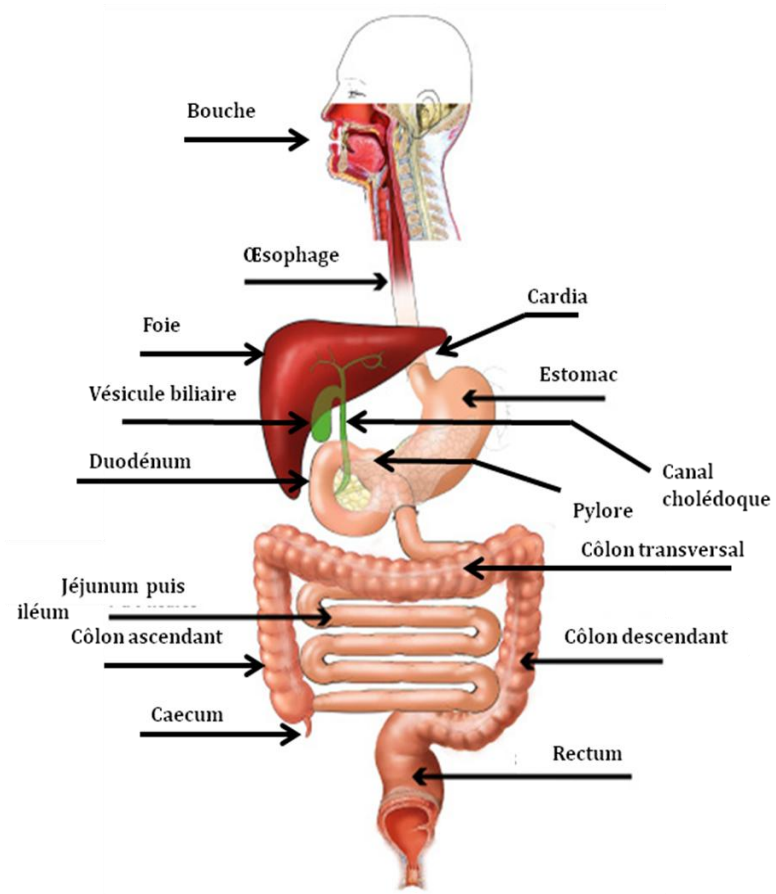


Figure 1 : Anatomie du tube digestif humain.

1.1.2.1 Paroi intestinale

L'intestin grêle est recouvert extérieurement par le péritoine, une séreuse caractérisée par une mince couche de cellules et de tissu conjonctif. Au-dessous se trouve la musculeuse, une couche musculaire en deux plans, longitudinale et circulaire dont la contraction assure les mouvements péristaltiques de l'intestin grêle. Puis, la sous-muqueuse est composée de tissu conjonctif et renferme des vaisseaux sanguins et lymphatiques, de nombreuses fibres élastiques et un réseau de neurones appelé le plexus sous-muqueux. Enfin, la muqueuse est recouverte de villosités qui se projettent dans la lumière. Elles permettent d'augmenter considérablement la surface d'absorption (**Figure 2**).

Ce simple épithélium intestinal est en fait un gigantesque filtre de 0,025mm d'épaisseur dont la surface d'absorption varie entre 250 et 400m^2 grâce aux nombreux replis transversaux, les valvules conniventes, qui multiplient par 6 à 10 fois la surface d'absorption de la muqueuse. Elles sont d'ailleurs plus nombreuses au niveau du duodénum et du jéjunum, les sites préférentiels de l'absorption des nutriments. Ces valvules sont elles-mêmes tapissées d'une dizaine de millions de villosités. La villosité intestinale est une invagination de la muqueuse intestinale du côté luminal, ce qui accroît également la surface d'absorption de 40 à 60 fois. La villosité intestinale est l'unité essentielle de l'absorption. Son quart inférieur est appelé crypte de Lieberkhün, qui s'ouvre à la base de celle-ci et qui assure le renouvellement de l'épithélium. Chaque villosité intestinale contient un vaisseau lymphatique accompagné d'un réseau sanguin qui se compose d'artérioles subdivisées en capillaires (**Figure 2**). Ces capillaires sont ensuite drainés vers les veinules descendantes des villosités (**Klippert et al., 1982**). La majeure partie des lipides absorbés pénètre ensuite dans les vaisseaux lymphatiques alors que les autres nutriments se rendent directement dans les capillaires sanguins (**Tang et Goodenough, 2003**). Notons qu'une petite quantité d'acides gras peut être directement absorbée par la voie portale (**Mansbach CM et al., 1991**).

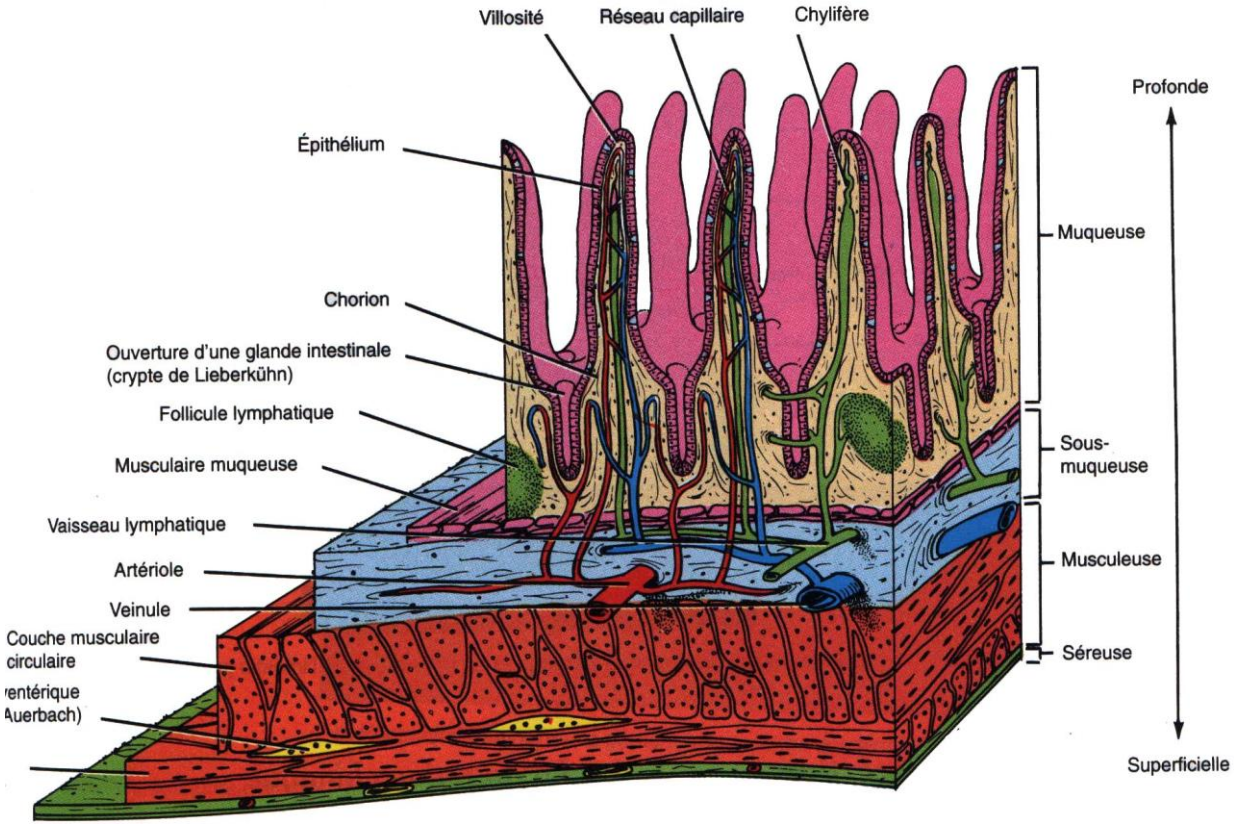


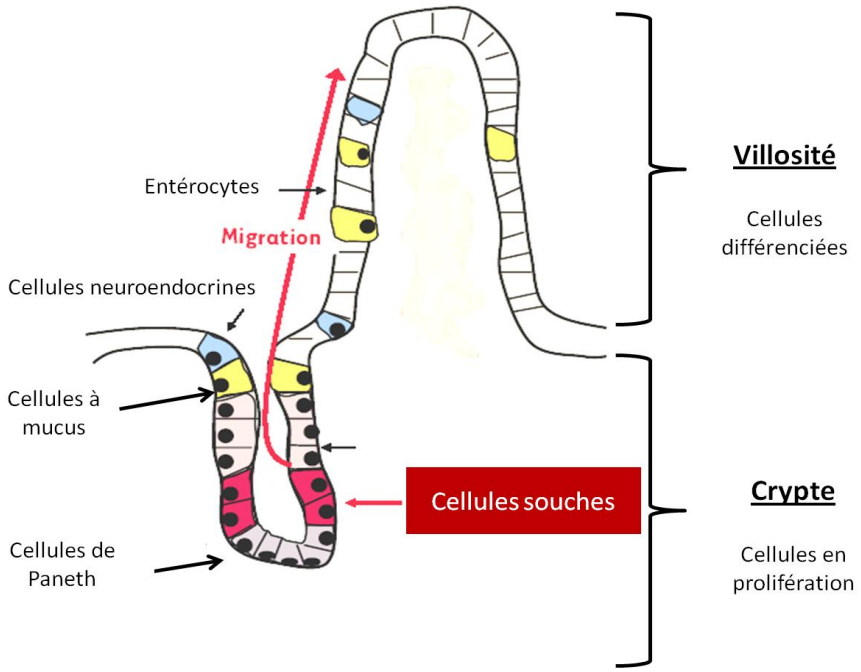
Figure 2: Coupes des couches de l'intestin grêle montrant des villosités

1.1.2.2 Les cellules intestinales

Les villosités intestinales contiennent un ensemble de cellules épithéliales assurant différentes fonctions sécrétoires, endocrines ou absorbantes (**Figure 3**). Les entérocytes ont pour rôle d'absorber les nutriments. Les cellules caliciformes sécrètent du mucus à la surface de l'épithélium afin de le protéger contre les agressions des sucs digestifs. Il existe également de nombreuses cellules endocrines qui sécrètent des hormones vers le milieu intérieur. Par exemple, la sécrétine informe l'estomac de réduire la production d'acide chlorhydrique lorsque le liquide gastrique est trop acide. A l'heure actuelle, une vingtaine d'hormones ont été identifiées et permettent une adaptation aux besoins de la digestion mais d'autres restent à découvrir.

A la base des villosités, dans les cryptes de Lieberkühn, on trouve des cellules indifférenciées et mitotiques, des cellules à mucus, des cellules endocrines et paracrines qui sont informées de la composition du chyme par des cellules chémosensorielles voisines, et enfin les cellules de Paneth qui sécrètent des enzymes à activité anti-microbienne (ex: lysozymes) afin de contribuer à la défense immunitaire. Les cellules épithéliales sont reliées

entre elles par des jonctions serrées et forment une monocouche étanche, réfractaire au passage des nutriments, des agents infectieux et des différents produits contenus dans la lumière intestinale (**FARQUHAR et PALADE, 1963**).



(**Andreu et al., 2006**)

Figure 3 : Organisation des cellules de l'intestin grêle

- Les entérocytes

Les entérocytes sont les cellules les plus nombreuses de l'épithélium intestinal sans doute parce qu'elles permettent de transporter les nutriments de la lumière vers les vaisseaux sanguins ou la lymphe (**Figure 4**). Les entérocytes prennent naissance dans les cryptes, puis migrent vers le sommet de la villosité tout en se différenciant (**Figure 3**). Les cellules les plus anciennes situées au sommet des villosités se desquament et sont remplacées par de nouveaux entérocytes matures, hautement polarisés et fonctionnels. Ainsi, l'ensemble de l'épithélium de l'intestin grêle est renouvelé en 3 à 6 jours. Le pôle apical des entérocytes différenciés se projette dans la lumière de l'intestin. Celui-ci est constitué de nombreuses microvillosités qui accroissent d'avantage la surface d'absorption (10 à 20 fois). Elles forment la bordure en brosse à travers laquelle les nutriments pénètrent. En outre, ces microvillosités sont recouvertes d'une chevelure appelée « fuzzy coat » constituée de différentes enzymes assurant

la dégradation des derniers nutriments en molécules directement assimilables. Le pôle basolatéral des cellules absorbantes est orienté vers le réseau capillaire. Les entérocytes expriment de nombreux gènes codant pour des protéines spécifiques impliquées dans les mécanismes de digestion et d'absorption (**Goda, 2000**).

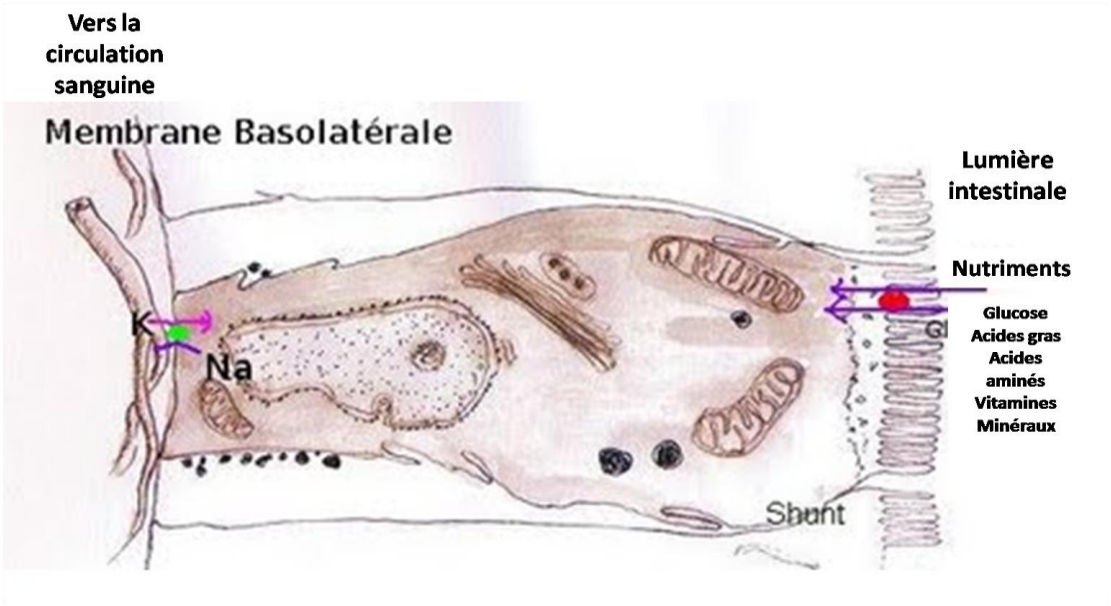


Figure 4: Schéma d'un entérocyte. Au pôle apical se trouvent les microvillosités par lesquelles sont absorbés les nutriments. Le pôle basolatéral des entérocytes est au contact de la circulation sanguine.

- Les colonocytes

Les colonocytes ont pour fonction principale la régulation des niveaux d'eau et d'électrolytes dans les selles. L'absorption de glucose et d'acides aminés est très restreinte par rapport aux entérocytes.

1.1.2.3 Fonction des entérocytes

1.1.2.3.1 Absorption intestinale des lipides

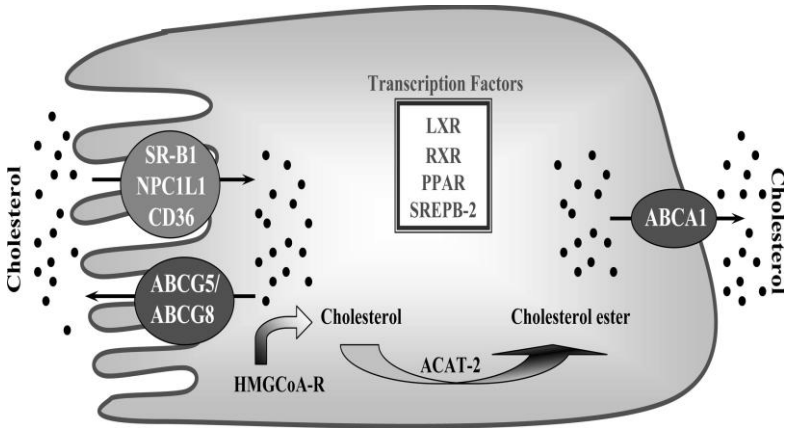
- Absorption

Les lipides sont peu hydrosolubles. Leur digestion et leur absorption dans le milieu aqueux du tube digestif et des entérocytes font appel à des mécanismes particuliers. Les triglycérides doivent subir une dégradation enzymatique par la lipase gastrique. Pour faciliter ce processus, une émulsification au préalable des lipides est nécessaire. Au niveau du duodénum, la sécrétion d'acides biliaires par le canal cholédoque permet de solubiliser les

lipides sous forme de micelles. Au niveau du jéjunum, les acides gras sont séparés des sels biliaires afin d'être protonés puis absorbés par les cellules intestinales. Cette séparation est facilitée par l'environnement acide au niveau de la bordure en brosse des entérocytes créé par les échanges Na^+/H^+ de la membrane (**Thomson et al., 1993**). Les monoacylglycérols (MG) comprenant des acides gras en position sn-2, les lyso-phosphatidylcholines (lyso-PC) et le cholestérol sont également absorbés à travers les microvillosités intestinales alors que les acides biliaires sont réabsorbés au niveau de l'iléum terminal, puis transportés par la veine porte jusqu'au foie (cycle entéro-hépatique) (**Levy E, 2000**).

L'absorption des lipides s'effectue par deux mécanismes distincts mais complémentaires : la diffusion simple et le transport actif impliquant des transporteurs membranaires (**Hamilton et Kamp, 1999**). Ainsi, les acides gras non chargés et le cholestérol libre diffusent à travers la membrane plasmique selon le gradient de concentration créé par une forte teneur de lipides dans la lumière intestinale versus une faible concentration intra-entérocytaire (**Veerkamp et al., 1993**).

Outre ce mécanisme non énergie-dépendant, il existe des transporteurs membranaires spécifiques aux produits lipidiques (**Glatz et van der Vusse, 1990**) tels que la « Fatty Acid Binding Protein » (FABPm), une protéine ayant une grande affinité pour les acides gras à chaîne longue (AGCL), les lyso-PC, les MG et le cholestérol. La « Fatty Acid-Transport Protein » (FATP) favorise également le transport des AGCL. Le Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) est un transporteur majeur du cholestérol au niveau intestinal (**Betters et Yu, 2010**). Présent au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales, il favorise l'entrée du cholestérol dans l'entérocyte. Le Scavenger Receptor Class B type 1 (SR-B1) et le Cluster of Differentiation 36 (CD36) contribuent également à l'absorption intestinale du cholestérol mais dans une moindre mesure que NPC1L1 (**Levy et al., 2004**). Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 forment un hétérodimère au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales et favorisent l'excrétion du cholestérol vers la lumière intestinale. A l'opposé, au pôle basolatéral, le transporteur ABCA1 permet un efflux du cholestérol vers la circulation sanguine (**Repa et al., 2000**). La coordination de ces transporteurs permet de maintenir l'homéostasie intestinale du cholestérol (**Figure 5**).



(**Ravid et al., 2008**)

Figure 5: Les transporteurs du cholestérol dans l'intestin. Les acteurs principaux influençant le transport intestinal du cholestérol. L'absorption intestinale du cholestérol d'origine alimentaire ou biliaire est induite par les transporteurs des stérols tels que NPC1L1, SR-BI et FAT/CD36. L'excès de cholestérol est excrété dans la lumière intestinale par l'hétérodimère ABCG5/G8 localisé au niveau de la membrane apicale des entérocytes. De même, ABCA1 favorise l'efflux de cholestérol (au travers de la membrane basolatérale) vers la circulation sanguine. Les enzymes clés telles que l'HMG-CoA Réductase et l'ACAT contribuent à l'homéostasie du cholestérol en synthétisant et en estérifiant, respectivement, le cholestérol intracellulaire. Ces processus impliqués dans le métabolisme du cholestérol sont contrôlés par les facteurs de transcritpion (RXR, LXR, SREBP-2 et PPAR).

- Transport cytosolique

Les lipides sont transférés depuis la bordure en brosse des entérocytes jusqu'au réticulum endosplasmique. Cette action nécessite des transporteurs protéiques. Deux « Fatty Acid Binding Protein » cytosoliques (FABPc) sont impliquées dans le transport des acides gras, des MG et des lyso-PL à travers le cytosol : I-FABP et L-FABP. La protéine I-FABP est exclusivement exprimée dans l'intestin grêle (Intestinal-FABP) tandis que la L-FABP est exprimée à la fois dans le foie, dans l'intestin et dans les reins (**Woolf et Tychko, 1998**). D'autres transporteurs cytosoliques des lipides existent également, mais leurs rôles sont moins connus. Il semblerait que la « Phospholipid Transfer Protein » (PLTP) permettrait de transférer les phospholipides entre les interfaces membranaires (**Kaikaus et al., 1990**). La protéine « Sterol Carrier Protein-2 » (SCP-2) semble être impliquée dans le transport du cholestérol ainsi que dans son estérification (**Murphy, 1998**). Enfin, la protéine « Acyl-CoA Binding Protein » facilite le transport des esters acyl-CoA à chaînes moyennes et longues (**Veerkamp, 1995**).

- Réestérification des lipides

Les lipides hydrolysés sont absorbés puis transférés sous forme libre jusqu'à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) pour y être réestérifiés en triglycérides (TG), phospholipides (PL) et cholestérol ester (CE). L'estérification des acides gras en TG fait intervenir deux enzymes majeures : la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) permettant la formation de diacylglycérol (DG) à partir du monoacylglycérol (MG), puis la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) qui complète la synthèse des TG (**Buhman et al., 2002**). Les molécules de lyso-PC sont réacétylées pour former la PC grâce à l'enzyme lyso-PC acyltransférase (**Parthasarathy et al., 1974**). Deux enzymes sont impliquées dans la réestérification du cholestérol : la « cholestérol estérase » et l' « Acyl-CoA Cholesterol Acyl Transferase 2 » (ACAT2). La première facilite la captation du cholestérol au niveau de la bordure en brosse ainsi que son transfert vers le site fonctionnel intracellulaire. La seconde catalyse la synthèse de CE à partir du cholestérol libre (CL) et de l'acyl CoA (**Buhman et al., 2000**). Environ 75% du cholestérol absorbé est retrouvé dans les chylomicrons sous forme estérifiée (**Dawson et Rudel, 1999**) .

- Assemblage des principales lipoprotéines intestinales : les chylomicrons

Après réestérification des lipides au niveau du RE, ces derniers sont incorporés dans les lipoprotéines qui les achemineront dans la circulation puis dans les tissus. L'intestin grêle a la capacité de sécréter différentes lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL et les HDL. Cependant, les chylomicrons demeurent majoritairement sécrétées par les entérocytes, constituant ainsi les principaux véhicules des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles (**Levy et al., 1996**).

Les chylomicrons sont principalement composés de TG (~87%), de phospholipides (PL) (~8%) et de cholestérol (~5%) (**Figure 6**). Les apoliprotéines qui les constituent sont les apos B-48, A-I, A-IV et C-III. Toutefois, l'apo B-48 est l'apolipopotéine de structure des chylomicrons indispensables à leur assemblage et à leur exocytose dans la circulation du côté basolatéral des entérocytes (**Levy et al., 1987b**).

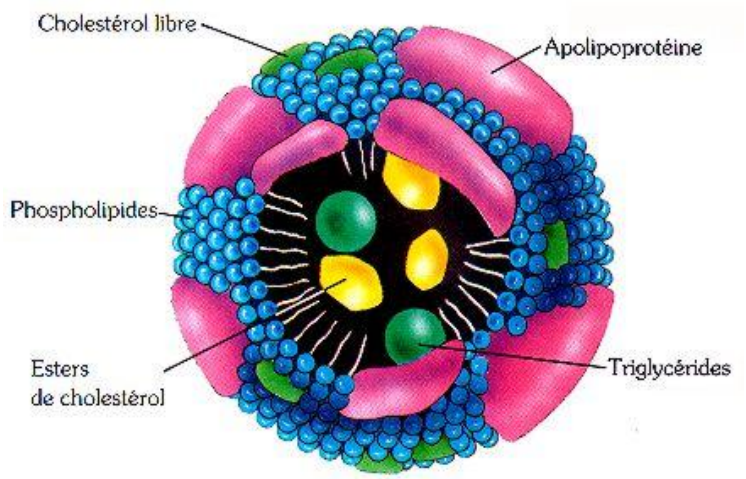


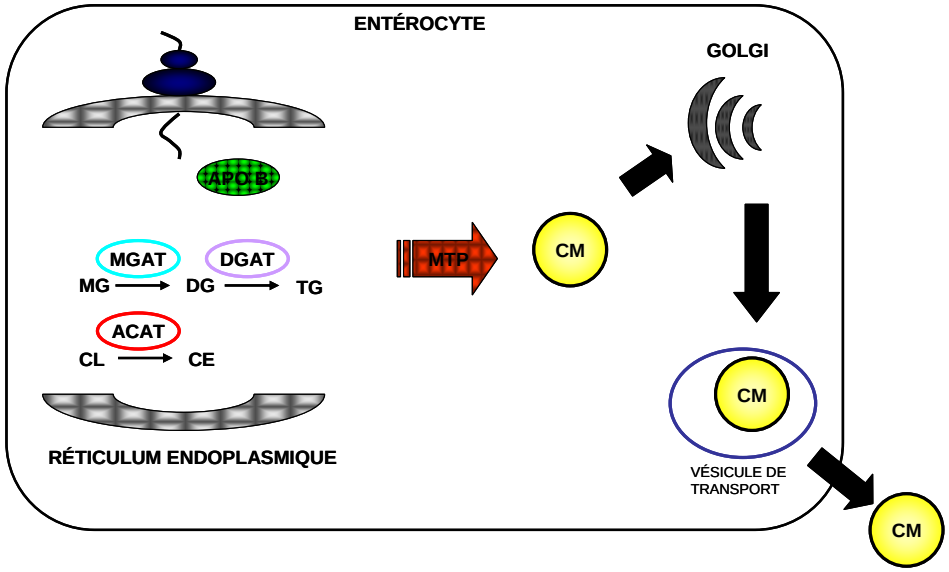
Figure 6 : Structure générale des lipoprotéines (d'après la Fondation Suisse de Cardiologie)

Deux étapes clés interviennent dans l'assemblage des chylomicrons : l' « Editing » de l'apo B et sa lipidation.

L'apo B est une glycoprotéine essentielle à la formation et à la sécrétion des lipoprotéines dans le foie et l'intestin. Deux formes d'apo B existent chez les mammifères : l'apo B-100 principalement synthétisée dans le foie et l'apo B-48 synthétisée exclusivement dans l'intestin grêle. L'apo B-48 est le résultat d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm qui se déroule dans l'intestin des mammifères et que l'on caractérise d' « editing » de l'apo B (**Davidson et Shelness, 2000**).

Lors de la formation des chylomicrons, une étape de lipidation de l'apo B est requise (**Figure 7**). En somme, les TG, les PL et le CE sont transférés à l'apo B-48 grâce à l'action de la « Microsomal Triglyceride Transfer Protein » (MTP). Cette protéine joue un rôle essentiel dans l'assemblage des chylomicrons car sa contribution à la « lipidation » de l'apo B est requise afin d'éviter sa dégradation par le protéasome (**Hussain et al., 1996**). La MTP assure donc ce rôle de lipidation de l'apo B en transférant les lipides de la membrane du RE jusqu'à l'apo B en cours de synthèse. Après cette étape de lipidation, d'autres apos et lipides sont transférés à la surface des pré-chylomicrons jusqu'à l'appareil de Golgi. Au niveau golgien, des modifications importantes sont apportées aux pré-chylomicrons, notamment une glycosylation des apos, débutée dans le RE, y est achevée, conférant aux chylomicrons leur maturité et permettant leur exocytose (**Levy E, 2000**). Les chylomicrons sont ensuite acheminés vers la membrane basolatérale au moyen de vésicules golgiennes. Après fusion des

vésicules avec la membrane plasmique, les lipoprotéines sont libérées dans la lymphe rejoignant ensuite la circulation sanguine. La lipoprotéine lipase intervient pour hydrolyser les TG des chylomicrons. Cette lipolyse libère des acides gras qui sont utilisés comme source d'énergie par les tissus périphériques ou sont mis en réserve dans le tissu adipeux (**Levy E, 2000**).



(**Marcil et al., 2004**)

Figure 7 : Assemblage et sécrétion du chylomicron par l'entérocyte. Le cholestérol libre (CL) et les monoacylglycérols (MG) sont transportés jusqu'au réticulum endoplasmique où ils sont réestérifiés en cholestérol ester (CE) par l'ACAT, en diacylglycérol (DG) puis en triglycérides (TG) par la MGAT et la DGAT respectivement. Les lipides sont ensuite transférés à l'apolipoprotéine B (Apo B) sous l'action de la MTP pour former le chylomicron naissant qui deviendra mature au niveau du Golgi. Des vésicules golgiennes acheminent les chylomicrons vers la membrane basolatérale où ils seront libérés dans la lymphe puis la circulation sanguine.

- Autres lipoprotéines intestinales (VLDL, LDL et HDLs)

En période de jeûne, l'entérocyte peut synthétiser des VLDL permettant le transport des lipides endogènes provenant de la bile, de la dégradation des cellules de la lumière intestinale et des acides gras dérivés du plasma. Ces VLDL d'origine intestinale sont constituées des mêmes apos que les chylomicrons. Par conséquent, ces lipoprotéines ont une composition chimique et un catabolisme se rapprochant plus des chylomicrons que des VLDL d'origine hépatique (**Hussain et al., 1996**).

Outre la production de lipoprotéines riches en TG, l'intestin est capable de synthétiser de petites lipoprotéines de haute densité similaires aux HDL naissants, principalement composées de PL, de CE et d'apos A-I et A-IV (**Magun et al., 1985**). Enfin, il est possible d'observer la synthèse de lipoprotéines de basse densité telles que les LDL par des explants d'intestins humains ou encore par certaines lignées de cellules intestinales (**Levy et al., 1995**).

- Pathologies de l'intestin associées à une malabsorption des lipides.

L'investigation de trois pathologies génétiques rares associées à une malabsorption intestinale a permis de mieux cerner les mécanismes impliqués dans l'absorption et le transport entérocytaire des lipides. Ces trois pathologies sont connues sous les noms suivants : l'abêtalipoprotéinémie, l'hypobêtalipoprotéinémie et la rétention des chylomicrons.

L'abêtalipoprotéinémie est une maladie autosomique récessive rare qui provoque une malabsorption sévère des lipides alimentaires. Elle se caractérise par un défaut d'absorption et de transport des lipides liés à une incapacité incomplète de synthèse des lipoprotéines riches en TG par le foie et l'intestin. Cette maladie est causée par des mutations du gène de la MTP laissant place à des aberrations moléculaires telles qu'une protéine tronquée non fonctionnelle au niveau des cellules hépatiques et intestinales (**Berriot-Varoqueaux et al., 2000**).

Les apos B-100 et B-48 ne peuvent donc plus être « lipidées » entraînant alors leur dégradation et une absence de synthèse des lipoprotéines riches en TG telles que les CM et les VLDL (**Gordon et Jamil, 2000**). Les lipides s'accumulent dans les entérocytes sous forme de gouttelettes cytoplasmiques puis une stéatose de la muqueuse intestinale s'installe. Au niveau plasmatique, il en résulte une hypocholestérolémie et une hypotriglycéridémie majeures liées à l'absence totale d'apo B, de CM, VLDL et LDL.

Outre cette dyslipidémie, les patients sont déficients en vitamines liposolubles (A, D, E, K). Les carences en vitamines et acides gras essentiels entraînent de graves symptômes neurologiques et rétiniens tels que des troubles neuro-musculaires, une rétinite pigmentaire et une acanthocytose.

Un régime pauvre en graisses et une supplémentation en vitamines liposolubles sont administrés à ces patients. La prévention des symptômes neurologiques est facilitée par

l'administration d'acides gras à chaînes moyennes qui sont directement absorbés au niveau de l'estomac, ou bien par le biais de perfusions d'émulsions lipidiques (**Levy, 1996**).

L'hypobêtalipoprotéinémie est une maladie génétique rare caractérisée par une absence totale d'apo B plasmatique. La plupart des cas s'expliquent par une mutation du gène codant pour l'apo B. Il en résulte des anomalies lipidiques identiques à l'abêtalipoprotéinémie telles qu'une stéatose intestinale, une absence de lipoprotéines riches en TG et une hypocholestérolémie (**Ohashi et al., 1998**).

La rétention des chylomicrons (maladie d'Anderson) se caractérise par un défaut de sécrétion des chylomicrons par l'intestin. De grosses gouttelettes lipidiques s'accumulent dans les entérocytes si bien que la lipémie postprandiale n'augmente pas (**Figure 8**). La synthèse d'apo B est normale mais leur glycosylation est déficiente (**Levy et al., 1987a**). Les chercheurs ont identifié chez ces patients des mutations du gène SARA2 codant pour la protéine Sar1b GTPase, impliquée dans un complexe COPII de transport intra-entérocytaire entre le RE et l'appareil de Golgi (**Jones et al., 2003**). Les mutations touchant le gène SARA2 entraînent toutes une moindre affinité de Sar1b pour son substrat, le GTP, ce qui ne permet plus la formation de vésicules pour le transport et la sécrétion des protéines notamment celles nécessaires à l'assemblage et l'exocytose des lipoprotéines telles que les chylomicrons (**Figure 9**).

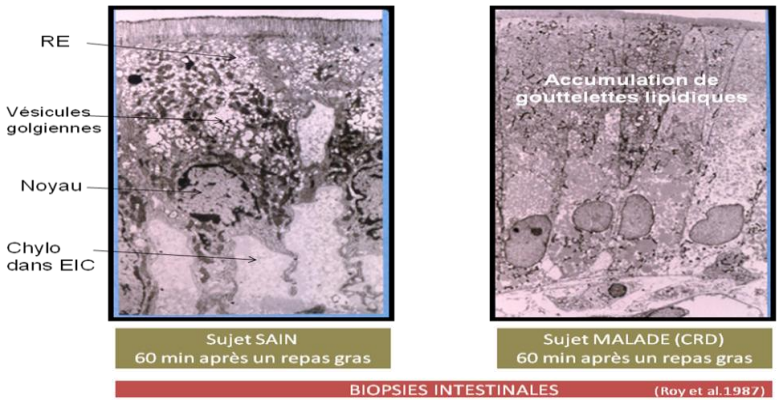
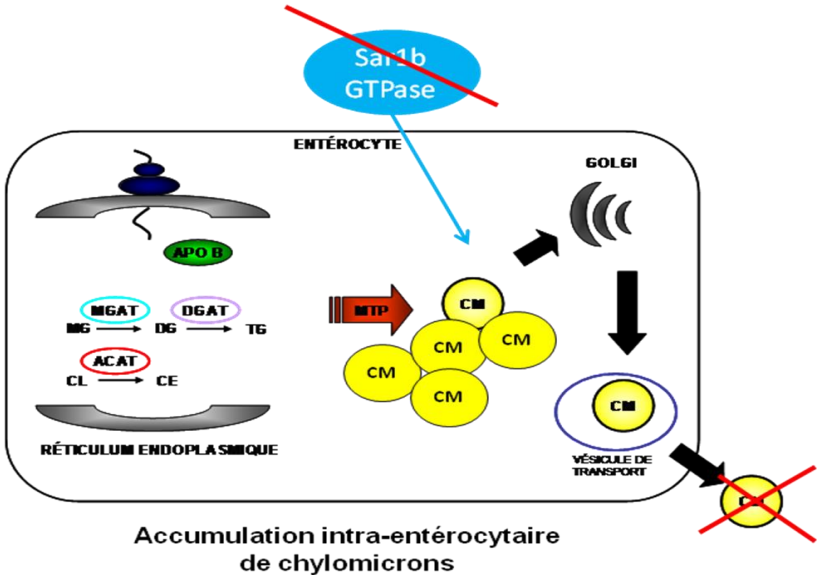


Figure 8: Biopsies intestinales de sujets sain et malade (rétention de chylomicrons). Chez les sujets malades, les biopsies intestinales montrent l'accumulation de goutelettes lipidiques dans les entérocytes 1 heure après un repas gras (**Roy et al., 1987**).



Adapté de **Marcil et al.2004**

Figure 9 : Mécanismes intra-entérocytaires responsables de la rétention de chylomicron. Cette accumulation de chylomicrons est liée à une mutation du gène SARA2 codant pour la protéine Sar1b GTPase intervenant dans le transport du pré-chylomicron entre le RE et le Golgi.

Conclusion : L'avancée de la recherche sur les maladies de malabsorption intestinale des lipides, a permis d'identifier des acteurs clés dans le transport entérocytaire des graisses alimentaires : l'ApoB, la MTP ou encore la Sar1b GTPase. Cependant, dans le contexte des maladies métaboliques telles que l'insulino-résistance et les dyslipidémies associées au diabète de type II, ces protéines pourraient jouer un rôle inverse, c'est à dire une surproduction de chylomicrons par l'intestin, corrélée à une hyperlipidémie postprandiale. Des travaux sont nécessaires pour explorer cette possibilité.

1.1.2.3.2 Absorption intestinale du glucose

L'absorption intestinale du glucose s'effectue au niveau des entérocytes par le biais d'un transporteur actif sodium-dépendant, le SGLT1 (Sodium Glucose coTransporter 1) (**CRANE, 1962**). Il existe également un mécanisme de diffusion passive du glucose. Pendant longtemps, ce mécanisme était attribué à un flux paracellulaire de glucose à travers les jonctions serrées (**Pappenheimer et Reiss, 1987**). Toutefois, l'avancée des recherches a permis d'identifier un transporteur assurant la diffusion passive du glucose, le « Glucose Transporter Type 2 » (GLUT2) qui pourrait être inséré transitoirement en quelques minutes au niveau de la membrane apicale des entérocytes du jéjunum, en réponse à de fortes concentrations de glucose (**Kellett, 2001**). Ce transporteur GLUT2 était initialement connu pour être présent uniquement au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes afin d'assurer le passage transcellulaire du glucose vers la circulation sanguine.

Transport actif : le SGLT1

Le transport actif du glucose à travers la membrane apicale des entérocytes par SGLT1 s'effectue grâce au gradient de concentration de Na^+ maintenu par la pompe Na^+/K^+-ATPase située dans la membrane basolatérale (**CRANE, 1962**). Lorsque la concentration en glucose de la lumière intestinale est plus basse que la glycémie, SGLT1 transporte le glucose contre son gradient de concentration grâce à celui du Na^+. Puis, dans l'entérocyte, le glucose suit un passage transcellulaire jusqu'à la membrane basolatérale où il sera libéré dans la circulation via le transporteur GLUT2.

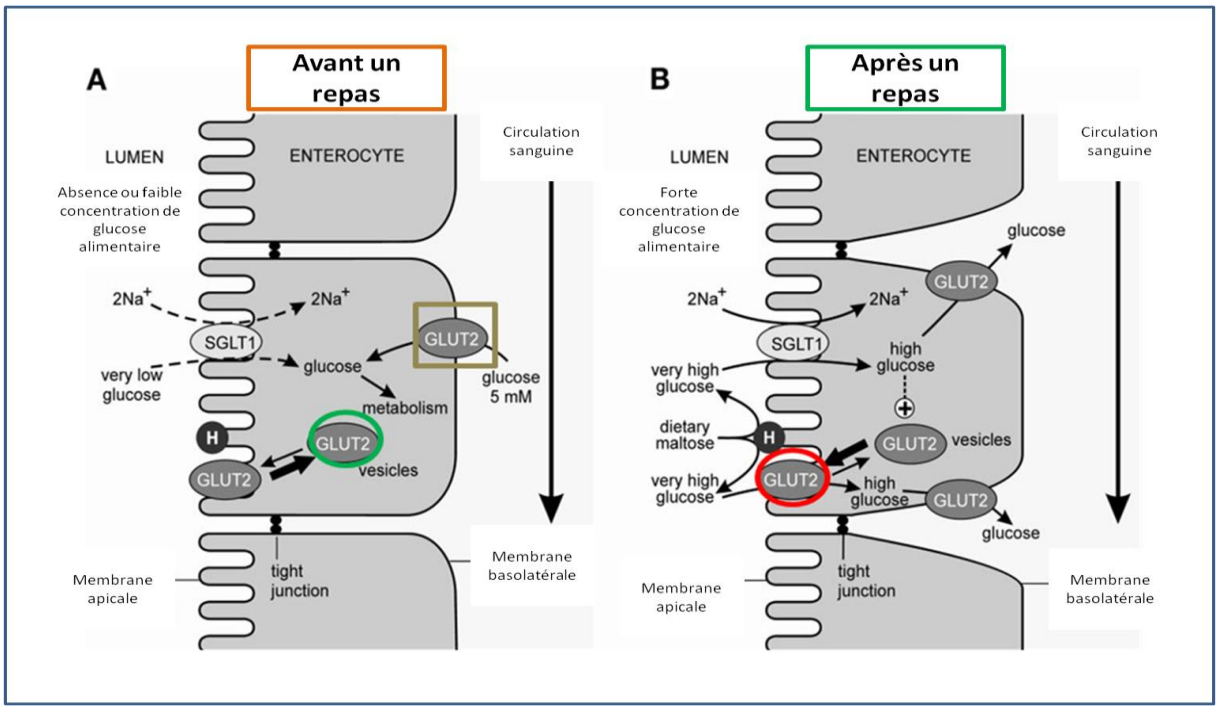
Transport passif : le GLUT2

Le transport passif du glucose est 3 à 5 fois plus important que le transport actif qui coûte de l'énergie à la cellule. Madara & Pappenheimer ont montré que 75% de l'absorption totale du glucose s'effectuait par le biais de la diffusion passive (**Madara et Pappenheimer, 1987**). Pappenheimer & Reiss ont observé que le transport du glucose via SGLT1 induisait un réarrangement du cytosquelette de l'entérocyte par le biais de la contraction de l'actomyosine (**Pappenheimer et Reiss, 1987**). Dans cette situation, il se pourrait que les jonctions

cellulaires perdent leur étanchéité, ce qui favoriserait une diffusion paracellulaire de glucose. Cette théorie a suscité beaucoup de débats, notamment avec Ferraris et ses collègues qui postulent pour un unique passage transcellulaire du glucose par le SGLT1 (**Ferraris et al., 1990**).

Régulation de la distribution du GLUT2

Helliwell & Kellett ont découvert pour la première fois en 2000, la présence de GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes chez des rats à l'état nourri (**Helliwell et al., 2000**; **Kellett, 2001**). Cette découverte confirme l'existence d'un transport non actif du glucose tout en écartant l'hypothèse d'un passage paracellulaire (**Figure 10**). Les études ont montré que l'absorption du glucose se déroulait en coopération entre SGLT1 et GLUT2 à des concentrations supérieures à 20mM (**Kellett et Helliwell, 2000**). Les mécanismes régulant son insertion transitoire au niveau apicale sont variés. Le calcium, les récepteurs du goût sucré ainsi que les hormones endocrines et paracrines jouent un rôle dans cette régulation.



Kellett et al. 2005

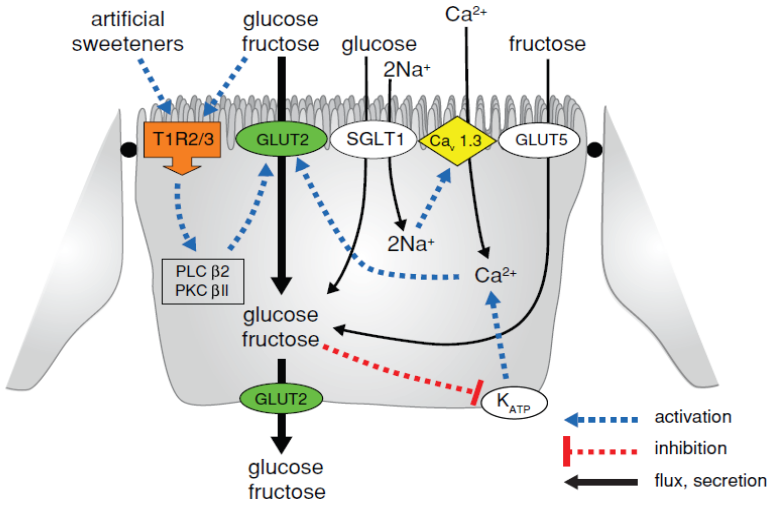
Figure 10 : Modèle du GLUT2 apical dans l'absorption intestinale du glucose avant (A) et après (B) un repas. Avant un repas, le transporteur SGLT1 favorise l'entrée du glucose à très faible concentration. Après un repas, les fortes concentrations de glucose induisent l'insertion apicale du GLUT2 afin de faciliter l'absorption intestinale du glucose.

- Le calcium

L'insertion transitoire de GLUT2 en apicale est liée à l'activation de la protéine kinase C (PKC) βII (**Helliwell et al., 2003**) et du réarrangement du cytosquelette des entérocytes sous le contrôle de SGLT1 (**Pappenheimer et Reiss, 1987**). Ces deux processus sont activés par une augmentation intracellulaire du Ca^{2+} (**Morgan et al., 2007**) grâce à la présence de canaux calciques voltage dépendant de type L (VDCC) dans la membrane apicale appelés Cav1.3. La présence de Cav1.3 est observée principalement dans les entérocytes au niveau du jéjunum distal et de l'iléon proximal, les sites préférentiels d'absorption des nutriments. Cav1.3 est activé par dépolarisation membranaire à de faibles seuils de voltage comme ceux générés habituellement par l'absorption intestinale des nutriments (**Koschak et al., 2001**). Un large gradient de concentration de Ca^{2+} se crée puisque son taux plasmatique n'est que de 1,25mM alors que dans la lumière intestinale, le niveau de Ca^{2+} libre après un repas atteint ~10mM (**Bronner, 2003**). En résumé, l'absorption intestinale de glucose par SGLT1 induit un réarrangement du cytosquelette suite à l'activation de PKC βII permettant l'insertion du GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes. Dans cette situation, l'absorption du glucose alimentaire est maximale (**Mace et al., 2009**).

- Les récepteurs intestinaux du goût sucré

La découverte de récepteurs du goût « Taste 1 Receptor » (T1Rs) tout au long du tractus digestif, comme ceux présents au niveau de la langue, suggère que l'intestin pourrait induire une réponse spécifique (**Dockray, 2003**; **Dyer et al., 2003**). Ces derniers sont activés lorsque la concentration du glucose atteint 30mM. Dans cette situation, l'entrée du calcium devient massive et favorise l'activation de la phospholipase C (PLC) βII puis le réarrangement du cytosquelette pour faciliter l'insertion du GLUT2 dans la membrane apicale (**Mace et al., 2009**; **Margolskee, 2002**).



Kellett et al. 2008

Figure 11: Régulation de l'activité du GLUT2 par le calcium et les récepteurs du goût au niveau de la membrane apicale des entérocytes. GLUT : Glucose Transporter, PKC : Protein Kinase C, PLC : Phospholipase C, SGLT : Sodium-dependent Glucose Transporter.

La **Figure 11** résume le contrôle de l'insertion du GLUT2 au niveau de la membrane apical des entérocytes du jéjunum après un repas riche en sucres. La dépolarisation membranaire induite par SGLT1 permet l'entrée massive de Ca2+ à travers le canal Cav1.3, laquelle induit l'activation de PKC βII puis le réarrangement du cytosquelette permettant le transit de GLUT2 en basal et en apical. Plus précisément, les fortes concentrations de glucose et fructose dans la lumière intestinale permettent d'activer les récepteurs sensoriels du goût sucré T1R2/3 de la membrane apicale des entérocytes. Dans cette situation, la PLC β2 et la PKC β II transitent vers la membrane apicale où PLC β2 génère du DG pour finaliser l'activation de PKC β II et induire l'insertion apicale de GLUT2.

- Régulation endocrine : l'insuline et la leptine

L'insuline : Elle est sécrétée par les cellules β du pancréas en réponse à un repas riche en sucre. Cette hormone permet de réduire la glycémie en quelques minutes en augmentant l'absorption du glucose par les tissus insulino-sensibles tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux via la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique (**Huang et Czech, 2007**). (Cf. chapitre 2.3 pour un détail de la voie de signalisation de l'insuline). Pendant de nombreuses années, l'intestin était considéré comme un organe non insulino-sensible mais la

découverte de récepteurs à l'insuline dans la membrane basolatérale des entérocytes semble indiquer le contraire (**Fernandez-Moreno et al., 1987**; **Forgue-Lafitte et al., 1980**). Toutefois, les études concernant l'effet de l'insuline sur l'absorption intestinale du sucre ont généré des résultats contradictoires depuis plusieurs décennies. Certains démontrent un effet stimulateur de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose comme le muscle et le tissu adipeux (**Serhan et Kreydiyyeh, 2010**; **Stumpel et al., 1996**; **Westergaard, 1989**), alors que d'autres démontrent une réduction du transport intestinal du glucose par cette hormone (**Kellett et al., 1984**; **Pennington et al., 1994**; **Tobin et al., 2008**; **Wollen et Kellett, 1988**). Selon Tobin et al., l'insuline permettrait d'internaliser le GLUT2 en l'éloignant des membranes apicales et basolatérales des entérocytes (**Figure 12**) (**Tobin et al., 2008**). Ces données ont été observées *in vivo* chez la souris consciente après deux heures de perfusion d'insuline, et in vitro dans les cellules intestinales Caco-2/TC7 au bout de 15 à 30 minutes. Ainsi, l'insuline atténuerait l'absorption intestinale du glucose afin de réduire les excursions glycémiques postprandiales, un facteur de risque connu pour les maladies cardio-vasculaires chez les sujets diabétiques (**Bornfeldt et Tabas, 2011**). Il semble donc que la régulation de l'absorption intestinale du glucose par l'insuline soit l'inverse de celle décrite dans les cellules musculaires et adipocytaires. Cependant, de gros progrès restent à accomplir afin d'élucider le mécanisme d'internalisation du GLUT2.

La leptine : Cette hormone, sécrétée par le tissu adipeux et l'estomac en réponse à la prise alimentaire, est libérée dans la circulation et dans la lumière intestinale. Sa principale fonction est d'induire la satiété afin d'arrêter la prise alimentaire (**Blundell et al., 2001**). Les récepteurs de la leptine sont exprimés du côté apical et basolatéral des membranes entérocytaires (**Barrenetxe et al., 2002**). La leptine inhibe le transport actif du sucre en réduisant la quantité de SGLT1 sans modifier les niveaux et l'activité de GLUT2 (**Figure 12**) (**Inigo et al., 2007**).

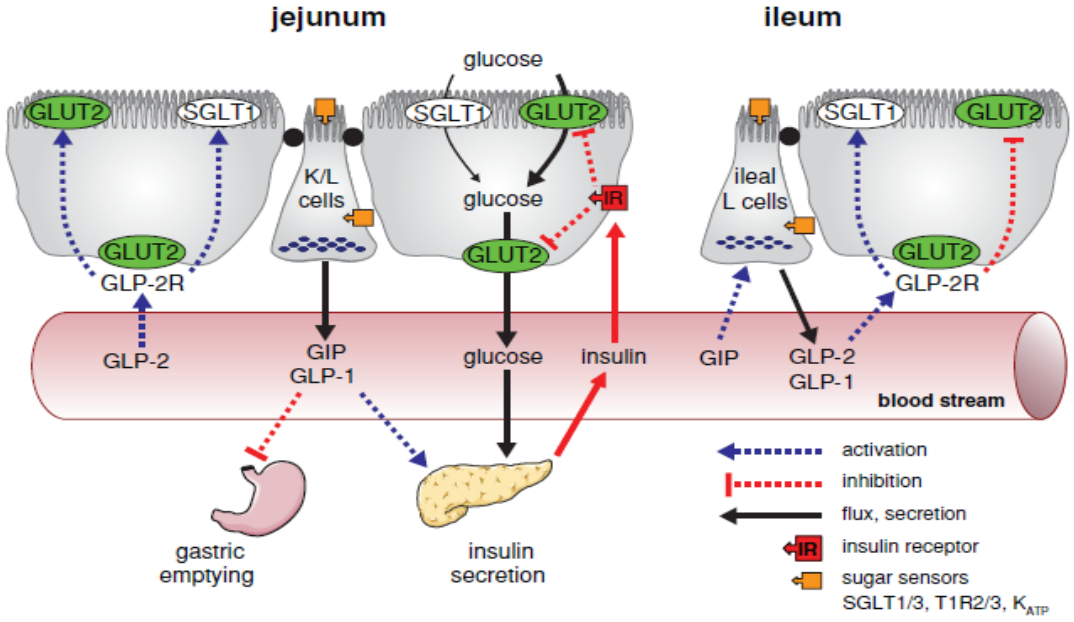
- Régulation paracrine : le GIP, le GLP-1 et le GLP-2

De nombreux travaux ont montré l'effet régulateur des hormones paracrines telles que le GIP (Glucose dependant insulinotropic polypeptide), le GLP-1 et le GLP-2 (Glucagon like-peptide) sur l'absorption intestinale des sucres (**Figure 12**). Ces peptides sont détectés par des

senseurs luminaux tels que les récepteurs du goût T1Rs (**Jang et al., 2007**). Le GIP est sécrété par les cellules K au niveau du duodénum puis le GLP-1 et le GLP-2 sont sécrétés simultanément par les cellules L du petit intestin en réponse au GIP (**Baggio et Drucker, 2007**).

Le GIP et le GLP-1 ont pour fonction de stimuler la sécrétion d'insuline lorsque la glycémie est trop élevée. Ce qui aurait pour conséquence l'internalisation du GLUT2 (**Tobin et al., 2008**). L'ensemble de ces actions coordonnées favorisent ainsi la réduction de l'absorption intestinale du sucre. Le GIP et le GLP-1 ralentissent également la vidange gastrique afin de réduire l'absorption intestinale des nutriments. Le GLP-1, en outre, inhibe la sécrétion du glucagon, une hormone hyperglycémiante. En revanche, le GLP-2 favorise l'absorption du glucose en stimulant rapidement l'insertion membranaire du GLUT2 du côté apical des entérocytes du jéjunum (**Au et al., 2002**), ainsi que l'activité de SGLT1 (**Cheeseman, 1997**). Cependant, il a été montré que le glucose luminal, indépendamment du GLP-2, pouvait avoir un effet direct sur les entérocytes en induisant l'insertion transitoire de GLUT2 dans la membrane apicale (**Au et al., 2002**). Le GLP-2 peut également stimuler le transport basolatéral du sucre en augmentant le niveau et l'activité intrinsèque de GLUT2 (**Cheeseman et Tsang, 1996**).

Les effets antagonistes du GIP/GLP-1 et du GLP-2 s'expliqueraient par la nécessité de maintenir l'homéostasie du glucose au cours d'un repas riche en sucre. De plus, une telle action permettrait d'éviter le passage de sucre au niveau du côlon, où ils provoqueraient une surcroissance bactérienne et une diarrhée osmotique. Ces données soulignent les rôles importants des hormones endocrines et paracrines dans la régulation de l'absorption intestinale du sucre.



Kellett et al. 2008

Figure 12: Régulation endocrine et paracrine de l'absorption intestinale du sucre. GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide, GLP : Glucagon-Like-Peptide GLUT : Glucose Transporter, SGLT : Sodium-dependent Glucose Transporter. L'insuline se fixe sur son récepteur entérocytaire, ce qui induit une internalisation du GLUT2 présent dans les membranes apicales et basolatérales afin de limiter l'absorption intestinale du glucose (**Tobin et al., 2008**). Un complément d'explication est requis pour cette Figure. Le GIP est sécrété par les cellules K présentes principalement dans le duodénum alors que le GLP-1 et le GLP-2 sont sécrétés simultanément par les cellules L de l'iléum en réponse au GIP. Le GIP et le GLP-1 stimulent la sécrétion d'insuline pour induire l'internalisation du GLUT2. Le GIP et le GLP-1 ralentissent la vidange gastrique pour réduire l'absorption intestinale des nutriments. Par contre, le GLP-2 favorise l'absorption du glucose en stimulant l'insertion apicale du GLUT2, l'activité de SGLT1 ainsi que le niveau et l'activité du GLUT2 basolatéral.

Néoglucogenèse intestinale

Outre son rôle digestif et endocrinien, l'intestin participe à la production endogène de glucose, une fonction qui était à l'origine connue pour être spécifique uniquement au foie et aux reins.

Par sa capacité à absorber et à utiliser le glucose d'origine alimentaire grâce à son activité glycolytique, le rôle de l'intestin dans la régulation de l'homéostasie du glucose est connu depuis de nombreuses années (**Rosensweig, 1972**). Plus récemment, il a été montré que le gène de la Glucose-6-phosphatase (G6Pase), une enzyme impliquée dans la

néoglucogenèse hépatique et rénale, était présent également dans l'intestin grêle de rongeurs et humain (**Rajas et al., 1999**). Puis les études ont révélé que le petit intestin était capable de néoglucogenèse et pouvait contribuer à la production endogène du glucose au même titre que le foie et les reins (**Croset et al., 2001**). Plus précisément, l'expression des gènes de la G6Pase et de la phosphoenopyruvate carboxykinase (PEPCK) dans les entérocytes était contrôlée par l'insuline comme dans le foie (**Mithieux, 2001**; **Rajas et al., 1999**; **Rajas et al., 2000**). En outre, ces gènes néoglucogéniques sont plus exprimés à l'état nourri (**Cui et al., 2004**). D'autre part, les études *in vivo* utilisant des traceurs métaboliques dans des conditions de néoglucogenèse hépatique abolie (souris *Liver Specific*-PEPCK$^{-/-}$ (**She et al., 2003**) ou G6Pase$^{-/-}$ (**Mutel et al., 2011**)) ont soulevé l'importance de la néoglucogenèse extra-hépatique. En effet, les souris dont le foie était dépourvu de l'enzyme PEPCK ou G6Pase s'adaptaient très bien en situation de jeûne puisque ni leur glycémie ni la production endogène de glucose n'étaient modifiées. De plus, il n'y avait pas de différence entre la concentration de glucose du sang artériel et celle du sang portal suggérant une compensation de l'influx de glucose depuis le sang vers les entérocytes par l'efflux de glucose depuis les entérocytes vers le sang, autrement dit une néoglucogenèse intestinale (**Battezzati et al., 2004**).

Export du glucose vers la circulation sanguine

Les avancées dans la recherche sur le mécanisme d'absorption intestinale du glucose indiquent que le transporteur GLUT2 présent dans les membranes apicales et basolatérales des entérocytes facilite l'entrée du glucose depuis la lumière intestinale vers les entérocytes ainsi que l'export du glucose depuis les entérocytes vers la circulation sanguine (**Kellett, 2001**). Une alternative a été proposée concernant le passage GLUT2-dépendant du glucose des entérocytes vers la circulation : ce passage serait plutôt dépendant de la phosphorylation du glucose par des hexokinases puis de sa déphosphorylation par la G6Pase (**Stumpel et al., 2001**). En effet, des patients atteints de la maladie de Fanconi-Beckel (inactivation des allèles du gène codant pour GLUT2 (**Santer et al., 1997**)) ne présentaient pas de malabsorption intestinale du glucose (**Manz et al., 1987**). Cette observation a été vérifiée chez la souris comportant une délétion du gène codant pour GLUT2 (**Stumpel et al., 2001**). En outre, les souris GLUT2$^{-/-}$ n'étaient pas capables de transporter le 3-O-methylglucose, un substrat potentiel de SGLT-1 et d'autres transporteurs du glucose, mais en aucun cas un substrat des

hexokinases (**Stumpel et al., 2001**). Cette observation suggère qu'en absence de GLUT2, la phosphorylation du glucose est requise pour son transport entérocytaire. D'autre part, le transport du glucose était inhibé par un inhibiteur spécifique de la G6Pase impliquant une étape de déphosphorylation du glucose-6-phosphate dans ce transport intestinal du glucose (**Stumpel et al., 2001**). L'étape finale de l'export intestinal du glucose semble impliquer un trafic vésiculaire mais des progrès dans la compréhension de ce mécanisme restent à accomplir (**Stumpel et al., 2001**). Il se pourrait que cette voie de transport du glucose soit utilisée chez la souris, en particulier en absence du GLUT2. De même, chez les patients atteints d'une déficience congénitale en GLUT2, aucune augmentation d'hydrogène expiré n'était détectée après une charge de glucose, un test révélant une absorption intestinale du glucose normale (**Santer et al., 2003**). Au contraire, les patients atteints d'une déficience congénitale en G6Pase présentaient une augmentation de l'hydrogène expiré reflétant une malabsorption intestinale du glucose (**Santer et al., 2003**). Ces études chez l'humain renforcent l'hypothèse d'une voie alternative au GLUT2 pour compenser sa déficience chez l'humain.

Conclusions : Ces dernières années, de nombreux progrès ont été accomplis pour élucider le mécanisme d'absorption intestinale du glucose, notamment grâce aux travaux de Kellett, Tobin & Brot-Laroche sur le transporteur GLUT2. En outre, les travaux de Mithieux indiquent que l'intestin est un organe capable d'utiliser le glucose mais aussi de le synthétiser lui conférant un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Néanmoins, le mécanisme d'export du glucose faisant intervenir la G6Pase indépendamment du GLUT2 de la membrane basolatérale des entérocytes n'est pas encore élucidé. Par ailleurs, de nombreuses controverses subsistent quant à la régulation des transporteurs du glucose, ce qui nécessiterait des recherches approfondies à ce sujet.

1.2 L'INSULINE

1.2.1 Sécrétion

L'insuline, hormone hypoglycémiante, est sécrétée dans la circulation sanguine par les cellules β-pancréatiques en réponse à une augmentation de la glycémie (**Hales, 1971**). Dans le plasma, elle sera rapidement acheminée vers les tissus insulino-sensibles tels que le foie, le muscle, le tissu adipeux, et l'intestin où elle pourra exercer ses effets biologiques.

1.2.2 Effets biologiques

L'insuline présente des effets pléiotropiques puisqu'elle agit sur le métabolisme des lipides, des glucides et des protéines. Principalement, cette hormone favorise l'anabolisme et peut également exercer des effets trophiques sur certains tissus. Alors qu'il existe plusieurs hormones hyperglycémiantes (glucagon, cortisol, catécholamines), l'insuline est la seule hormone hypoglycémiante de l'organisme.

Métabolisme du glucose : Dans le muscle et le tissu adipeux, la principale action de l'insuline est de permettre l'entrée du glucose en recrutant à la membrane plasmique le transporteur du glucose GLUT4 (**Hales, 1971**). Dans les myocytes, l'insuline favorise également le stockage du glucose sous forme de glycogène (**Saltiel et Kahn, 2001**). Dans les entérocytes, l'insuline semble réduire l'absorption intestinale du glucose, quoique cette action reste controversée à l'heure actuelle (**Tobin et al., 2008**). Dans les cellules hépatiques, l'insuline inhibe la production hépatique de glucose par trois mécanismes (**Saltiel et Kahn, 2001**) :

- ✓ Inhibition de la glycogénolyse et stimulation de la glycogénogenèse favorisant le stockage du glucose sous forme de glycogène.

- ✓ Augmentation de l'utilisation du glucose par stimulation de son oxydation ou de la glycolyse.

- ✓ Inhibition de la néoglucogenèse.

Métabolisme des lipides : L'insuline inhibe la lipolyse du tissu adipeux. Ainsi la libération d'acides gras libres et de glycérol par les adipocytes est réduite sous l'action de l'insuline. Parallèlement, elle favorise la capture des acides gras libres et l'estérification des triglycérides. Enfin, elle permet de réguler les niveaux plasmatiques des corps cétoniques en réduisant leur synthèse hépatique sous l'effet d'une diminution de la libération des acides gras par les adipocytes et d'une augmentation de leur consommation par les myocytes (**Saltiel et Kahn, 2001**).

Métabolisme des protéines : L'insuline est connue pour exercer son effet anabolique au niveau musculaire et hépatique en stimulant la synthèse protéique et en inhibant le catabolisme protéique et la néoglucogenèse qui puise dans les acides aminés glucoformateurs (**Pereira et al., 2008**).

1.2.3 La voie intracellulaire de signalisation de l'insuline

Le récepteur à l'insuline (insulin receptor : IR) : Il appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ce récepteur est constitué de 4 peptides glycosylés reliés par des ponts disulfures formant ainsi une glycoprotéine (**Figure 13**). On distingue deux paires de sous-unités : les sous-unités β, transmembranaires, détiennent l'activité enzymatique du récepteur, tandis que les sous-unités α sont à la surface de la membrane cellulaire et assurent la fixation de l'insuline. La liaison insuline-récepteur est à l'origine des effets biologiques de l'hormone modulés par l'activité tyrosine-kinase du récepteur (**Kido et al., 2001**). Ces récepteurs sont synthétisés par les cellules insulino-sensibles (myocytes, adipocytes, hépatocytes, cellules β-pancréatiques, entérocytes…).

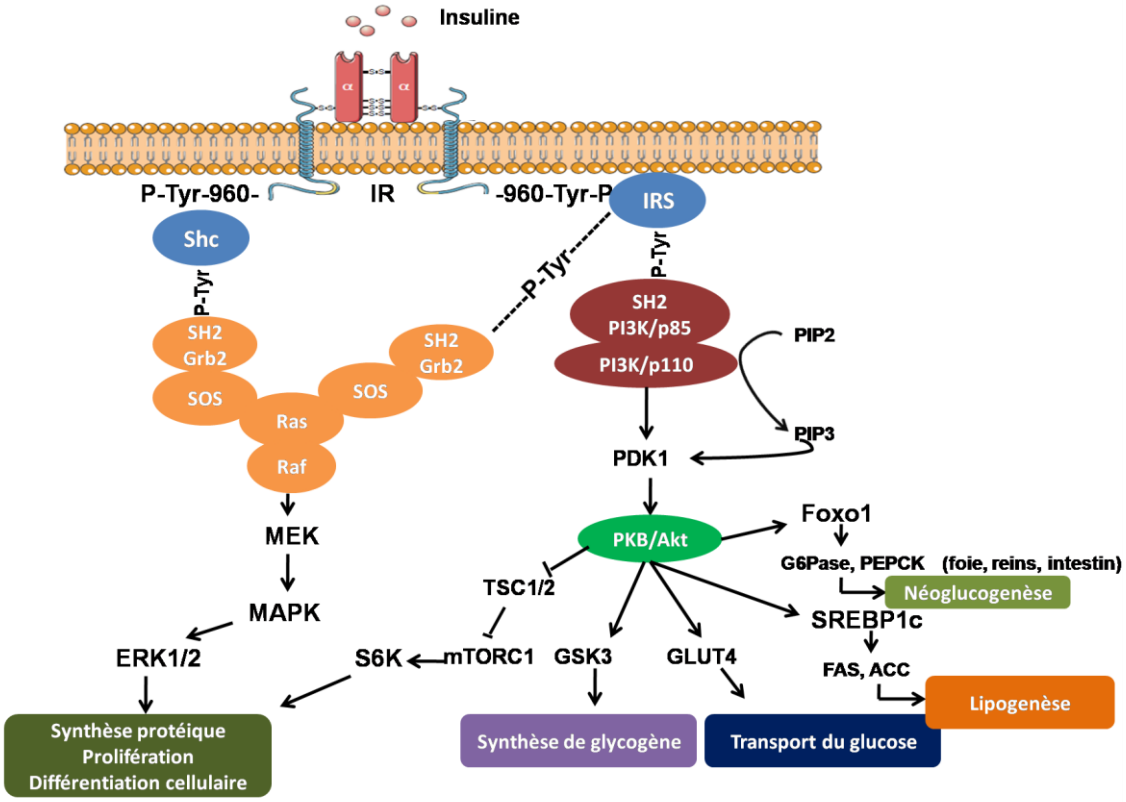


Figure 13: Voies de signalisation activées par l'insuline. L'insuline exerce son effet anabolique en activant les voies de synthèse des protéines, du glycogène, des acides gras et du glucose. La cascade de signalisation activée par le récepteur à l'insuline (IR) déclenche la phosphorylation sur les résidus tyrosine des IRS (Insulin Receptor Substrate). Ceci permet le recrutement de la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) qui phosphoryle le PIP2 (phosphatidyl-inositol biphosphate) en PIP3 (phosphatidyl-inositol triphosphate). Ce dernier active à son tour PKB/AKT (protein kinase B) via PDK1 (Phosphatidyl-inositol Dependant Kinase) qui régule plusieurs fonctions telles que la translocation du GLUT4 (Glucose Transporter 4) vers la membrane pour le transport du glucose, l'activation de mTORC1 (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) en inhibant TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex1/2) pour la synthèse protéique, l'activation de GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) pour la synthèse du glycogène et l'activation de SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) pour la lipogenèse. Parallèlement, l'activation de l'IR déclenche l'activation des voies MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) dont ERK (Extracellular signal Regulating Kinases 1 and 2) qui favorise la prolifération et la différentiation cellulaire.

Transduction du signal : En l'absence de l'insuline, les sous-unités α exercent une contrainte inhibitrice sur les sous-unités β, laissant le récepteur en configuration inactive. La fixation de l'insuline sur son récepteur modifie la conformation de la chaîne α, ce qui lève l'inhibition qu'elle exerce sur les sous-unités β. Ainsi, le récepteur devient actif où ses sous-unités β se phosphorylent mutuellement au niveau de résidus tyrosine. Cette phosphorylation permet au

récepteur de phosphoryler les résidus tyrosines d'autres substrats dont les protéines de la famille des IRS (Insulin Receptor Substrate) (**Kido et al., 2001**). En somme, il s'agit d'une cascade de phosphorylations.

Les substrats du récepteur à l'insuline (IRS) : ils sont à la base de la voie de signalisation intracellulaire de l'insuline (**Figure 13**). Il existe 4 isoformes des IRS (IRS1/2/3/4). Elles contiennent un domaine de liaison à la phosphotyrosine, permettant leur fixation sur la tyrosine 960 de la sous-unité β, et un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH). Les isoformes diffèrent par leur extrémité C-terminale qui présente plusieurs résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés. Ces résidus permettent la fixation de différentes protéines contenant des domaines de type SH2 (Src Homology 2, domaine de fixation des résidus phospho-tyrosine), comme la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K) (**Bashan et al., 2009**; **Saltiel et Kahn, 2001**).

La phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K) : Cette kinase possède une sous-unité régulatrice (p85) et une sous-unité catalytique (p110). La phosphorylation des tyrosines au niveau des IRS va permettre d'activer la PI3K (**Figure 13**). La sous-unité régulatrice p85 se fixe sur les tyrosines phosphorylées des IRS, ce qui permet le recrutement de la sous-unité catalytique p110 à la membrane où se trouve son substrat, le PIP2 (phosphatidyl inositol biphosphate). La p110-PI3K phosphoryle alors le PIP2 (phosphatidyl inositol-4,5-inositol) en PIP3 (phosphatidyl inositol-3,4,5-phosphate). Le PIP3 active ensuite les protéines kinases PDK1 (phosphatidyl inositol-dependant kinase) et Akt/PKB (protéine kinase B ou Akt) par leur domaine PH (**Bashan et al., 2009**).

La protéine kinase B (PKB) ou Akt : Une des actions principales qui découle de l'activation de l'Akt et de son substrat, l'AS160, est la translocation des vésicules intracellulaires contenant les transporteurs de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique. Cette action favorise le transport facilité du glucose à l'intérieur des cellules. L'Akt va à son tour activer en phosphorylant d'autres relais intracellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'insuline (**Kim et Novak, 2007**; **Saltiel et Kahn, 2001**) (Figure 13):

- ✓ L'inhibition par phosphorylation de la glycogène synthase 3 kinase (GSK3) permet d'induire la synthèse du glycogène.

- ✓ L'inhibition par phosphorylation du facteur de transcription Foxo1 (Forkhead box O1), qui contrôle PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) et G6Pase (Glucose-6-phosphatase), permet de restreindre la néoglucogenèse dans les organes tels que le foie, les reins et l'intestin (**Figure 13**).
- ✓ L'activation par phosphorylation de SREBP1c (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c) permet l'activation des enzymes lipogéniques FAS (Fatty Acid synthase) et ACC (Acetyl-CoA Carboxylase).
- ✓ L'inhibition par phosphorylation du complexe TSC1/2 (Tuberous sclerosis complex 1/2) permet l'activation du complexe mTORC1/C2 (mamalian target of rapamycin complex 1 & 2) puis l'activation de S6K1 (ribosomal protein S6 kinase) pour induire la synthèse protéique, la prolifération et la survie cellulaire (**Kim et Novak, 2007**) (**Figure 13**).

La voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) : Les MAPK se divisent en trois familles : ERK1/2 (Extracellular signal Regulating Kinases 1 and 2), JNK (c-Jun N terminal Kinase) et p38. Les facteurs mitogènes et les facteurs de croissance telle que l'insuline, activent plutôt ERK1/2 qui jouent un rôle dans la croissance cellulaire. Tandis que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNFα) et les facteurs de stress cellulaires (choc thermique, osmotique etc…) activent plutôt JNK et p38. Deux voies aboutissent à l'activation des MAPK/ERK en impliquant la liaison de Shc (Sarc Homologous and Collagen protein) avec l'IR ou les IRS. Dans cette situation, Shc devient actif et initie une cascade de phosphorylations impliquant les kinases suivantes: Shc-Grb2-SOS-Ras-MAPK (**Bashan et al., 2009**) (**Figure 13**).

- ✓ L'activation des IRS par l'insuline permet d'initier la cascade de phosphorylation en activant le facteur SOS (Son Of Sevenless) qui active la protéine G Ras en échangeant le GDP contre du GTP. Ras active ensuite la kinase Raf qui active la MAPK kinase (MEK) responsable de la phosphorylation de ERK1 et 2 (extracellular signal-regulated kinase). Ces dernières sont impliquées dans la synthèse protéique, la prolifération et la différentiation cellulaire (**Avruch, 1998**).
- ✓ L'activation du récepteur à l'insuline (IR) permet de recruter sur la tyrosine 960 les protéines adaptatrices de la famille Shc, ce qui induit la cascade de phosphorylation Grb2-SOS-Ras-MAPK (**Avruch, 1998**).

Les MAPK sont impliquées dans le développement de la résistance à l'insuline car elles exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie de signalisation de l'insuline (**Bashan et al., 2009**; **Hemi et al., 2011**; **White, 2002**).

Les contrôles négatifs du signal de l'insuline : Ils s'effectuent à plusieurs niveaux et sont impliqués dans l'apparition de la résistance à l'insuline (**Figure 14**). Tout d'abord, le signal de l'insuline peut être inhibé au niveau des IRS lorsque les résidus sérine de ces protéines sont phosphorylés. Plusieurs protéines sont susceptibles de phosphoryler ces résidus sérine, à savoir : les MAPK (ERK, JNK et p38) (**Bashan et al., 2009**; **Hemi et al., 2011**; **White, 2002**), GSK3β, mTORC1 (**Schultze et al., 2012**) et S6K1 (**Zhang et al., 2008**). Outre ces protéines entraînant un rétrocontrôle négatif sur les IRS, le signal de l'insuline s'arrête lorsque le complexe « ligand-récepteur » est internalisé puis dégradé. Toutefois, la majorité des récepteurs est recyclée au niveau de la membrane. Par ailleurs, il existe des phosphatases spécifiques assurant la déphosphorylation de différents acteurs impliqués dans la signalisation de l'insuline. Parmi celles-ci, la protéine phosphatase 1B (PTP1B) joue un rôle majeur (**Schultze et al., 2012**). Elle est activée par le récepteur de l'insuline IR pour déphosphoryler progressivement les résidus tyrosines de l'IR et de l'IRS conduisant à une inactivation de ces derniers. En outre, la « phosphatase and tensin homologue » (PTEN) et la protéine phosphatase 2A (PP2A) déphosphorylent PIP3 et Akt respectivement (**Brazil et Hemmings, 2001**). Un retour à la situation basale s'impose, ce qui limite l'entrée du glucose dans les cellules.

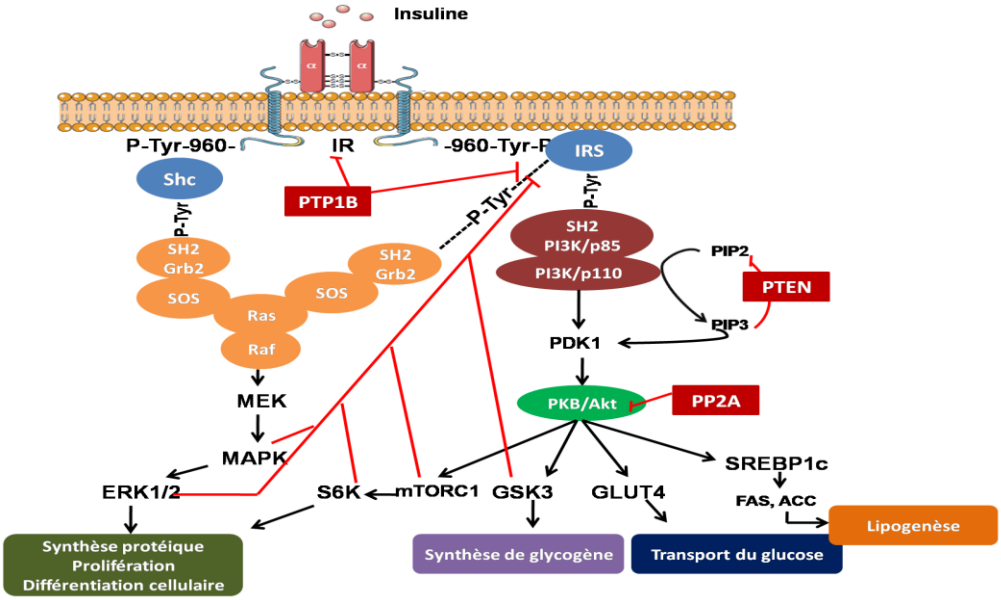


Figure 14: Voies de contrôles négatifs sur la signalisation de l'insuline. Ces voies peuvent être suractivées en situation d'insulino-résistance. Les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) dont JNK (c-Jun N terminal Kinase), ERK (Extracellular signal Regulating Kinases 1 and 2) et p38, ainsi que mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) phosphorylent les IRS (Insulin Receptor Substrate) sur des résidus Sérine, ce qui abolit leur activité. Les phosphatases PTP1B (Protein Phosphatase 1B) déphosphorylent les résidus tyrosine de l'IR (Insulin receptor) et des IRS tandis que PTEN (Phosphatase and Tensin homologue) et PP2A (Protein Phosphatase 2A) déphosphorylent PIP3 et Akt respectivement. Il en résulte un arrêt du signal de l'insuline.

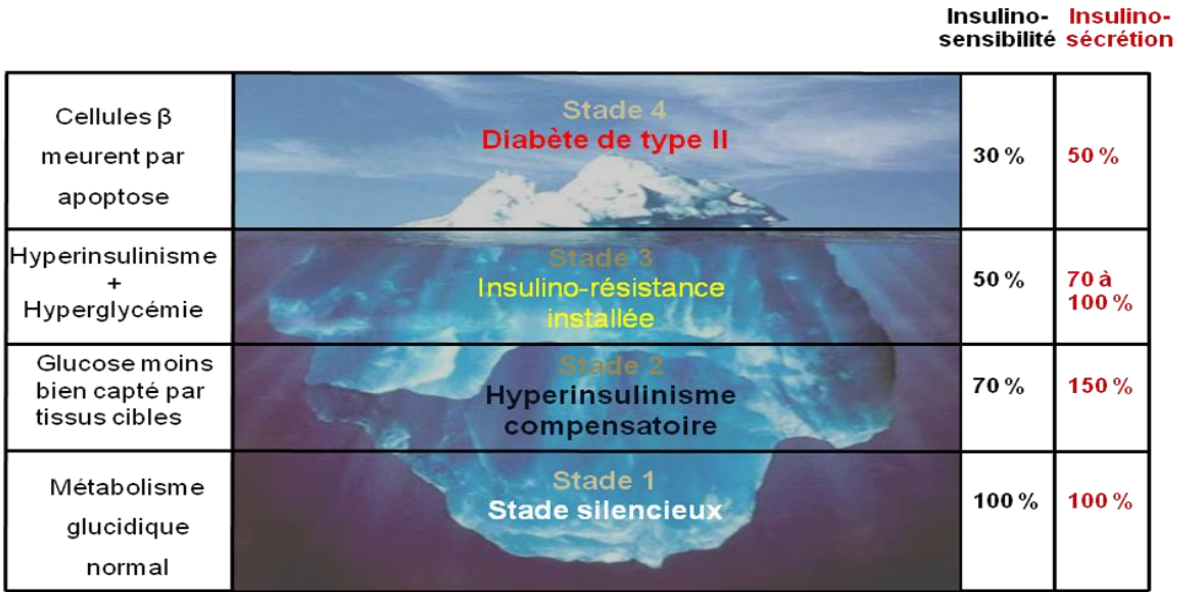
Les contrôles positifs du signal de l'insuline : Le complexe mTORC2, lorsqu'il est activé, stimule à son tour l'Akt (**Schultze et al., 2012**). En outre, sous l'effet de l'exercice physique ou encore du jeûne (déplétion énergétique), la protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) stimule la voie de signalisation de l'insuline IR/IRS/PI3K/Akt en phosphorylant l'IR sur des résidus sérine aboutissant à son autophosphorylation sur des résidus tyrosine (**Chopra et al., 2012**) et en inhibant directement mTORC1 ou indirectement par activation de TSC2. Cette inhibition de mTORC1, et par conséquent de S6K, empêche leur rétrocontrôle négatif sur l'IRS1. En outre, l'AMPK phosphoryle l'AS160, le substrat de l'Akt, afin d'induire la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique (**Hardie, 2008**; **Hardie et Carling, 1997**). L'ensemble de ces actions induites par l'AMPK aide à améliorer la sensibilité à l'insuline et à contrecarrer l'insulino-résistance. Ainsi, l'AMPK semble être une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du diabète, un aspect qui sera développé dans le chapitre 2.4

1.3 LA RÉSISTANCE À L'INSULINE INTESTINALE

1.3.1 Le diabète de type II

L'insulino-résistance est un stade préliminaire du diabète de type II (DT2) et une conséquence importante de l'obésité. Cet état pathologique favorise le développement de dyslipidémies et de maladies cardio-vasculaires (**Bloomgarden, 2007**). Comme décrit précédemment, l'insuline, joue un rôle majeur dans le contrôle de la glycémie.

En situation d'insulino-résistance, l'utilisation du glucose par les tissus est diminuée. Cela favorise l'hyperglycémie. Le pancréas augmente la sécrétion de l'insuline (hyperinsulinémie) pour rétablir la glycémie mais ses récepteurs cellulaires sont moins sensibles. Après un certain temps, le pancréas s'épuise et le DT2 apparaît (**Figure 15**).



Adapté de **Groop, 1999**

Figure 15: Diabète de type II : évolution à partir des anomalies sous-jacentes

Il est bien admis que les sujets présentant une obésité et un DT2 ont un risque beaucoup plus élevé de maladies cardiovasculaires que la population non diabétique (**Cherian et al., 2009**). En effet, des anomalies lipidiques apparaissent comme une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie, une diminution des niveaux de HDL (High Density Lipoprotein) et une élévation des LDL (Low Density Lipoprotein) chez les sujets obèses et diabétiques (**Ginsberg et MacCallum, 2009**). De plus en plus d'études démontrent

qu'il existerait un lien entre la sécrétion intestinale des lipoprotéines et les profils lipidiques anormaux des sujets résistants à l'insuline ou diabétiques de type 2 (**Hsieh et al., 2008**). Cette condition est appelée la dyslipidémie diabétique.

Des anomalies de l'absorption des nutriments participeraient au développement de l'hyperglycémie et des dyslipidémies associées au diabète (**Debnam et Chowrimootoo, 1992**; **Thomson et Rajotte, 1983**). En effet, l'absorption intestinale du glucose et des lipides est augmentée chez le rat diabétique. Le traitement de ces rats par injection d'insuline ou par une diète riche en acides gras polyinsaturés permet de réduire et normaliser l'absorption des nutriments (**Thomson et al., 1987**; **Thomson et al., 1990**; **Tobin et al., 2008**). Les auteurs suggèrent donc que l'intestin serait un organe pouvant développer une résistance à l'insuline et ainsi contribuer à l'établissement de l'hyperglycémie et la dyslipidémie diabétique chez les sujets obèses et/ou diabétiques (**Hsieh et al., 2008**; **Phillips et al., 2002**; **Tomkin, 2008**).

Dans les entérocytes insulino-résistants, des altérations des voies de signalisation et leurs conséquences métaboliques ont été décrites : 1) une dérégulation de la voie de signalisation de l'insuline ; 2) une augmentation de la lipogenèse *de novo* intestinale ; 3) une élévation de la synthèse *de novo* du cholestérol ; 4) une modification des niveaux d'absorption des lipides par les entérocytes et 5) une hausse de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons 6) une modification des niveaux d'absorption du glucose par les entérocytes.

1.3.2 Perturbation de la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes

Les modifications du métabolisme intestinal du glucose et des lipides seraient étroitement liées à une perturbation de la voie de signalisation de l'insuline et de celle des MAPK (Mitogen-Activated protein kinase) comme l'indiquent les études chez les animaux ou chez les sujets diabétiques. Federico et al. ont analysé le tissu intestinal d'hamsters diabétiques (**Federico et al., 2006**). Ils ont noté une réduction de la protéine totale et de la phosphorylation du résidu tyrosine de l'IRS1. Le niveau de la protéine totale Akt était également diminué. Au contraire, les phosphorylations des protéines PTP1-B et ERK, connues pour leurs effets négatifs sur la sensibilité à l'insuline, étaient augmentées. Qin et al. ont également remarqué chez des hamsters diabétiques une altération des niveaux de phosphorylation des résidus tyrosine du récepteur à l'insuline IR, de son substrat IRS1, ainsi

que de la protéine Akt. Parallèlement, l'insulino-résistance s'accompagnait d'une augmentation des niveaux de phosphorylations des MAPK telles que les protéines ERK1/2, JNK et p38MAPK (**Qin et al., 2007**).

1.3.3 Augmentation de la lipogenèse *de novo* intestinale

La lipogenèse caractérise l'ensemble des réactions biochimiques conduisant à la synthèse des lipides. Cette lipogenèse est activée sous l'action de l'insuline. Haidari et al. ont observé chez des hamsters résistants à l'insuline, une augmentation de la biosynthèse intestinale de lipides (triglycérides, cholestérol ester et cholestérol libre) et une élévation de la synthèse d'acides gras dans les entérocytes isolés des hamsters (**Haidari et al., 2002**). Zoltowska et al. ont également noté une stimulation de la lipogenèse *de novo* chez le rat du désert, le *Psammomys obesus*, un modèle animal d'insulino-résistance et de DT2 (**Zoltowska et al., 2003**). De plus, le facteur de transcription SREBP-1c est connu pour son implication dans la différentiation des adipocytes et dans l'activation de la lipogenèse *de novo* sous l'effet de l'insuline (**Federico et al., 2006**). Federico et al. ont observé une augmentation de SREBP-1c dans les intestins d'hamsters résistants à l'insuline (**Federico et al., 2006**).

1.3.4 Augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol

Plusieurs modèles animaux montrent que le métabolisme intestinal du cholestérol est perturbé en présence d'un DT2. En particulier, l'activité des enzymes *3*-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA réductase) et acylcoenzyme A cholestérol : acyltransferase (ACAT) est augmentée. L'HMG-CoA réductase est l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol. L'ACAT est l'enzyme responsable de l'estérification du cholestérol libre en cholestérol ester. Gleeson et al. ont constaté chez le rat diabétique une élévation des niveaux de TG et de cholestérol plasmatiques qui était corrélée à une augmentation significative de la synthèse intestinale du cholestérol (**Gleeson et al., 2000**). Zoltowska et al. ont également noté une augmentation de la synthèse *de novo* du cholestérol dans l'intestin du *Psammomys obesus* en situation d'insulino-résistance et de DT2 (**Zoltowska et al., 2003**). Feingold et al. ont remarqué une augmentation significative de l'expression génique et protéique de l'HMG-CoA réductase au niveau de l'intestin chez des rats diabétiques (**Feingold et al., 1994**). Lally et al. ont aussi constaté chez des rats Zucker diabétiques une expression plus grande de l'HMG-CoA réductase intestinale (**Lally et al., 2007**). Hori et al.

ont, quant à eux, observé une stimulation de l'ACAT chez des animaux diabétiques (**Hori et al., 2004**).

1.3.5 Augmentation de l'absorption des lipides

La **Figure 5** page 27 permet de rappeler les différents transporteurs du cholestérol et leurs rôles respectifs. Au niveau de la membrane apicale des entérocytes, les transporteurs NPC1L1, SR-BI, CD36 permettent l'entrée du cholestérol tandis que les transporteurs ABCG5/G8 favorisent l'excrétion du cholestérol dans la lumière intestinale.

Des rats rendus diabétiques de type I par administration de streptozotocine (insulinopénie), présentaient une diminution de l'expression intestinale d'ABCG5 et ABCG8, ce qui reflète une diminution de l'efflux de cholestérol vers la lumière intestinale (**Bloks et al., 2004**). Lally et al. ont également observé des niveaux plus bas de ABCG5/G8, ainsi qu'une augmentation de l'expression génique de NPC1L1 au niveau intestinal chez des rats Zucker diabétiques de type II (**Lally et al., 2006**). Une augmentation de l'expression génique de SR-BI a également été observée chez l'hamster et la souris rendus insulino-résistants par la diète (**Hayashi et al., 2011**). Ces résultats suggèrent une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol. Ravid et al. ont étudié les effets de hautes concentrations de glucose dans des cellules intestinales Caco-2. Ces fortes concentrations de glucose ont induit une augmentation de l'absorption du cholestérol via NPC1L1 et CD36 (**Ravid et al., 2008**). Qin et al. ont confirmé l'implication de CD36 dans la surproduction de chylomicrons puisque l'expression génique de ce transporteur était positivement corrélée à la sécrétion des chylomicrons par les entérocytes insulino-résistants d'hamsters Syrian Golden (**Qin et al., 2010**). Enfin, les études ont prouvé qu'une augmentation de NPC1L1 était associée à une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol dans les entérocytes. Une corrélation positive a d'ailleurs été établie entre le niveau de cholestérol des chylomicrons et le niveau d'expression génique de NPC1L1 (**Lally et al., 2006**) et de SR-BI (**Hayashi et al., 2011**). En situation d'insulino-résistance, une augmentation de l'expression et de l'activité des transporteurs du cholestérol favorisent son absorption intestinale et son empaquetage dans les chylomicrons véhiculés jusque dans la circulation sanguine contribuant ainsi à l'augmentation de la cholestérolémie. Par conséquent, la composition lipidique anormale des chylomicrons

suite à une résistance à l'insuline joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose (**Zilversmit, 1995**).

1.3.6 Augmentation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons

Plusieurs études ont observé une augmentation de la production de chylomicrons par les entérocytes lors du DT2. Chez les modèles animaux et chez l'humain, la production d'Apo B48 est augmentée. Elle est associée à une élévation des enzymes MTP, MGAT et DGAT. Zoltowska et al. ont démontré une surproduction de chylomicrons et d'apo B-48 chez des animaux résistants à l'insuline ou diabétiques. Ces animaux présentaient également une augmentation de l'activité des enzymes MGAT et DGAT ainsi qu'une élévation de la synthèse de TG au niveau intestinal (**Zoltowska et al., 2003**). Sasase et al. ont étudié l'hypertriglycéridémie chez des rats Torii diabétiques de type II. Ces rats diabétiques avaient des expressions géniques augmentées pour les enzymes MTP, DGAT1 et MGAT2 au niveau intestinal (**Sasase et al., 2007**). Qin et al. ont également remarqué une expression génique et protéique accrue de la MTP dans les entérocytes insulino-résistants d'hamsters (**Qin et al., 2010**). Lewis et al. ont étudié l'impact des AG sur la production intestinale de lipoprotéines. Ils ont remarqué une élévation de la production à jeun de lipoprotéines chez des hamsters résistants à l'insuline, qui présentent un taux plasmatiques plus élevé d'acides gras libres (AGL) (**Lewis et al., 2004**).

Chez l'humain, Kinoshita et al. ont observé une élévation des concentrations plasmatiques d'Apo B48 chez des sujets avec un syndrome métabolique (**Kinoshita et al., 2009**). Phillips et al. ont analysé des biopsies de duodénum humain et l'expression génique du MTP est augmentée chez les sujets diabétiques contrairement aux sujets sains (**Phillips et al., 2006**). Lally et al. ont confirmé ces résultats mais aussi, ils ont observé une augmentation du transporteur NPC1L1 et une réduction de ABCG5/G8 (**Lally et al., 2006**). Hogue et al. ont étudié les profils lipidiques de sujets diabétiques présentant une hypertriglycéridémie sévère comparativement à des sujets non diabétiques et ayant un profil lipidique normal. Ils ont observé que les sujets diabétiques avaient une glycémie et une insulinémie plus élevées, des taux plus hauts de TG plasmatiques et des niveaux de HDL plus bas que les sujets contrôles. Ces sujets diabétiques ont également des concentrations plus grandes de chylomicrons, de

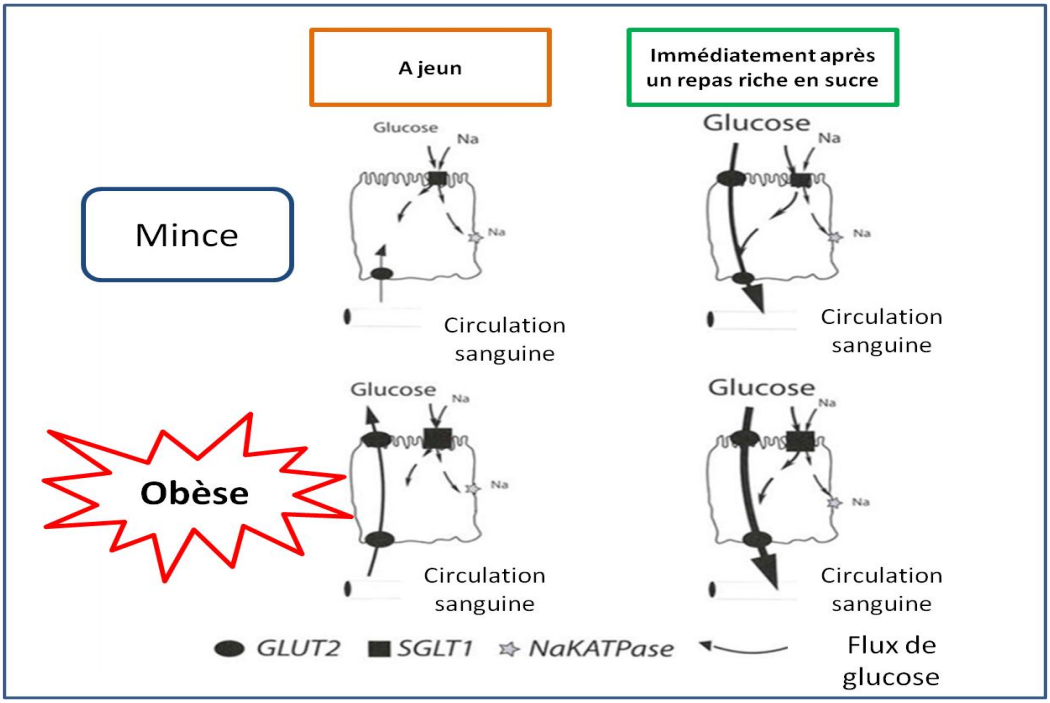
VLDL et d'IDL (**Hogue et al., 2007**). Etant donné l'effet inhibiteur de l'insuline sur la lipolyse en situation normale, il est bien admis que les sujets diabétiques ont des taux plasmatiques d'AGL plus élevés du fait de l'insulino-résistance (**Ginsberg, 1996**). L'effet stimulateur des AGL sur la production de chylomicrons a été confirmé par Duez et al. (**Duez et al., 2008**). L'insuline est également connue pour son effet inhibiteur sur la production de lipoprotéines riches en triglycérides (**Steiner et Lewis, 1996**). Nogueira et al. ont montré pour la première fois l'absence de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de chylomicrons chez des sujets diabétiques à l'aide d'une méthodologie utilisant un isotope stable (**Nogueira et al., 2012**). En effet, il n'y avait aucune différence de production et de clairance des chylomicrons entre les clamps « hypersinsulinémique/euglycémique », « hypersinulinémique-hyperglycémique » et le groupe contrôle.

1.3.7 Augmentation de l'absorption intestinale du glucose

Une augmentation de l'absorption intestinale du glucose alimentaire favorise l'hyperglycémie chez les sujets diabétiques (**Madsen et al., 1996**). Ce changement serait lié à une modification des expressions géniques et protéiques des transporteurs du glucose. Après hydrolyse des glucides alimentaires en monosaccharides, ces derniers sont absorbés par l'épithélium intestinal au moyen de transporteurs énergie-dépendants (SGLT1) ou indépendants (GLUT2). Le SGLT1 assure une partie du transport du glucose depuis la membrane apicale. Le transporteur facilitateur GLUT2 se situe dans la membrane apicale et basolatérale assurant le passage transcellulaire du glucose.

Burant et al. ont remarqué une augmentation de l'expression génique et protéique des transporteurs SGLT-1 et GLUT2 dans les entérocytes de rats diabétiques de type I. Le traitement de ces rats par l'insuline permettait de réduire l'expression protéique de ces deux transporteurs (**Burant et al., 1994**). Dyer et al. ont analysé l'expression des transporteurs du glucose chez des sujets sains et diabétiques à partir de biopsies duodénales. Ils ont observé une élévation de l'ARNm et du contenu protéique de SGLT1, de GLUT2 et de GLUT5 au niveau des membranes apicales des entérocytes des sujets diabétiques (**Dyer et al., 2002**). Plus récemment, Ait-Omar et al. ont montré une accumulation de GLUT2 au niveau des membranes apicales des entérocytes issus de chirurgie bariatrique chez des sujets obèses et

insulino-résistants (**Ait-Omar et al., 2011**). Cette accumulation au niveau des membranes apicales serait liée à un défaut d'internalisation du GLUT2 par l'insuline (**Tobin et al., 2008**). Il s'agirait d'une réponse adaptative de l'organisme face à une diète riche en nutriments. Ces changements pourraient induire une exacerbation de l'hyperglycémie chez le sujet diabétique non traité (**Figure 16**). Une corrélation positive pourrait être alors établie entre le nombre de transporteurs GLUT2 à la membrane apicale et le niveau d'hyperglycémie (**Ait-Omar et al., 2011**).

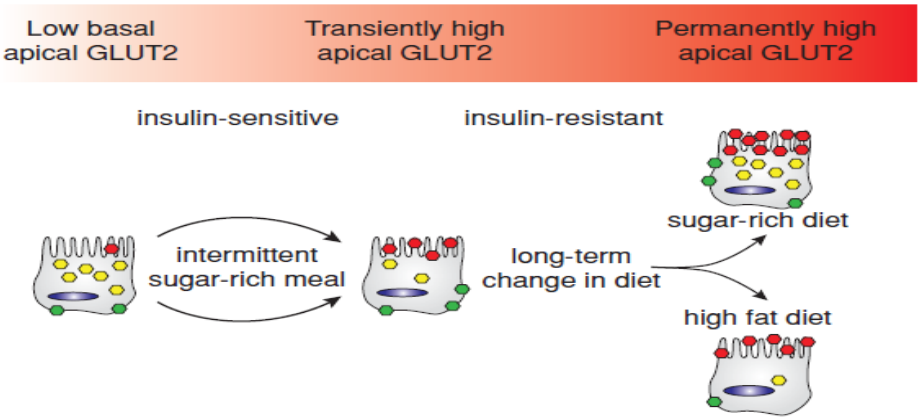


Ait-Omar et al.2011

Figure 16: Rôles du GLUT2 apical chez les sujets sains ou obèses dans l'absorption intestinale du glucose en fonction de sa localisation et dépendamment de la différence de concentrations de glucose entre la lumière et le sang. Chez les sujets sains et à jeun, les flux de glucose à travers les entérocytes s'effectuent via SGLT1 dans la membrane apicale et sortent via le GLUT2 basolatéral. Immédiatement après un repas riche en sucre, le GLUT2 s'insère rapidement et transitoirement dans les membranes apicales pour accroître l'absorption du glucose, permettant ainsi de compléter l'action de SGLT1. Les sujets obèses sont caractérisés par une présence permanente du GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes. L'hyperglycémie à jeun entraîne alors un flux de glucose depuis le sang vers la lumière intestinale via les entérocytes. Au contraire, après un repas riche en sucre, le GLUT2 présent en permanence dans la membrane apicale des entérocytes favorise l'entrée massive du glucose qui est ensuite libéré du côté basolatéral dans la circulation sanguine.

D'après l'étude de **Tobin et al. 2008**, il est important de noter que l'insulino-résistance intestinale chez les souris peut être induite par un régime riche en fructose pendant

30 jours ou bien par un régime riche en acides gras saturés pendant 12 semaines. Il en résulte une localisation permanente du récepteur GLUT2 au niveau de la membrane apicale. Néanmoins, la présence de GLUT2 en apical n'est pas reliée à son abondance globale dans l'entérocyte diabétique. En effet, les souris diabétiques sous diète riche en fructose expriment environ 3 fois plus de GLUT2 que les souris diabétiques sous diète riche en acides gras saturés (**Figure 17**). Cependant, la perfusion d'insuline, dans les deux catégories de souris diabétiques, n'est pas capable d'internaliser le GLUT2. En ce sens, un régime riche en sucre ou en gras ne semble pas induire tout à fait les mêmes adaptations métaboliques. Néanmoins, dans les deux situations, la présence du GLUT2 apical favorise l'absorption intestinale du glucose et pourrait exacerber l'hyperglycémie.



Kellett et al.2008

Figure 17 : Le développement de l'insulino-résistance en réponse à une diète riche en sucre ou en lipides est associé à une localisation apicale permanente du transporteur du glucose GLUT2. Jaune : GLUT2 internalisé, Rouge : GLUT2 dans la membrane apicale, Vert : GLUT2 dans la membrane basolatérale. Les souris normales expriment transitoirement le GLUT2 apical après une diète riche en sucre. Une insulino-résistance peut être induite par une diète riche en fructose pendant 30 jours ou riche en acides gras saturés pendant 12 semaines. Il en résulte une insertion permanente du GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes et une redistribution cellulaire. L'adaptation métabolique en réponse à une modification de la diète est différente selon le type de diète (riche en lipides ou en sucre). Les souris nourries avec une diète riche en fructose expriment 3 fois plus de GLUT2 que celles nourries avec une diète riche en acides gras saturés. Quelque soit le type de diète, la présence permanente de GLUT2 apical favorise l'absorption intestinale du glucose et pourrait exacerber l'hyperglycémie en situation de diabète de type II.

Dans le jéjunum de rats normaux, Helliwell et al. ont montré que l'inhibition de la PI3-kinase par la wortmannine résulte en une localisation permanente des transporteurs GLUT2 et GLUT5 au niveau de la membrane apicale (**Helliwell et al., 2000**). Ainsi

l'internalisation des transporteurs du sucre par l'insuline semble PI3-Kinase dépendante. Etant donné l'implication des MAPK dans le développement de la résistance à l'insuline, une altération des voies de signalisation ERK, p38 et JNK pourrait être reliée à une modification des niveaux de transporteurs du glucose et par conséquent de l'absorption intestinale du glucose. En effet, l'inhibition et l'activation simultanée des voies de signalisation ERK et p38 respectivement, induisent une augmentation de l'absorption du fructose associée à un phénotype diabétique. El-Zein et al. ont confirmé que l'absorption intestinale du glucose était PI3-Kinase dépendante dans les cellules Caco-2 (**El-Zein et Kreydiyyeh, 2011**). En revanche, les résultats concernant le contrôle de l'absorption du glucose par la voie des MAPK sont divergents. Pour Helliwell et al., la p38MAPK semble augmenter l'absorption intestinale du glucose, alors que pour El-Zein et al. elle la diminuerait. Ainsi, une meilleure compréhension des voies de régulation affectant le nombre et l'activité des transporteurs de la membrane apicale des entérocytes permettrait de mieux appréhender les perturbations d'absorption du glucose reliées au DT2.

Altération des voies de signalisation	Conséquences métaboliques	Modèles	Références
↘ IRS1 et AKT ↗ PTP-1B, ERK1/2, JNK, p38 MAPK	Altération de la sensibilité à l'insuline	Fructose-fed hamster DT2 TNFα Syrian Golden hamster IR	Federico et al. 2006 Qin et al. 2007
↘ ABCG5/G8 ↗ NPC1L1, CD36, SR-BI	Augmentation de l'absorption du cholestérol	Streptozotocin- rats DT1 Humains DT2 Fructose-fed hamster DT2 High fat diet souris DT2 Cellules Caco-2	Blocks et al. 2004 Lally et al.2006 Hayashi et al. 2011 Ravid et al. 2008
↗ HMGCR et ACAT	Augmentation de la synthèse et de l'estérification du cholestérol	Streptozotocin- rats DT1 Humains DT2	Feingold et al.1994 Gleeson et al. 2000 Hori et al. 2004 Lally et al. 2007
↗ SREBP1c	Augmentation de la lipogenèse de novo (AG, TG)	Fructose-fed rats DT2 Fructose-fed hamster DT2 Psammomys obesus DT2	Haidari et al. 2002 Federico et al. 2006 Zoltowska et al.2003
↗ MGAT/DGAT, MTP et apoB48	Augmentation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons	Psammomys obesus DT2 Biopsies de duodénum humain TNFα Syrian Golden hamster IR	Zoltowska et al. 2003 Phillips et al. 2006 Qin et al.2010
↗ SGLT1, GLUT2 et GLUT5 Accumulation de GLUT2 dans le cytosol et/ou dans la membrane apicale	Augmentation de l'absorption du glucose/fructose	Streptozotocin- rats DT1 Humains DT2 High fat diet souris DT2 Souris ob/ob DT2 Cellules Caco-2	Burant et al. 1994 Dyer et al. 2002 Tobin et al.2008 Ait-Omar et al.2011

Tableau 1 : Tableau de synthèse des anomalies métaboliques reliées à la résistance à l'insuline intestinale

En résumé, de plus en plus d'évidences scientifiques ont identifié des marqueurs qui laissent croire que l'intestin développerait une résistance à l'insuline, tout comme le tissu adipeux, le muscle et le foie (**Tableau 1**). Toutefois, il existe encore plusieurs controverses et les mécanismes impliqués dans cette résistance à l'insuline intestinale doivent être davantage approfondis et confirmés. En outre, contrairement au foie où la signalisation de l'insuline est bien décrite, beaucoup de travaux restent à accomplir en ce qui concerne l'intestin.

1.4 L'AMPK : ACTIONS ET FONCTIONS DANS PLUSIEURS ORGANES (AUTRES QUE L'INTESTIN)

1.4.1 Généralités

Chez les mammifères, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une enzyme clé dans la régulation de la balance énergétique à l'échelle cellulaire et de l'organisme entier, la plaçant ainsi au centre des études sur l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique. En effet, le développement inquiétant des maladies métaboliques dans les pays industrialisés encourage à explorer davantage les mécanismes moléculaires de régulation métabolique afin d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques. Pour ces raisons, de nombreuses études sur le système AMPK ont été réalisées durant ces trois dernières décennies.

L'AMPK a été caractérisée pour la première fois en 1975 dans le foie de rat, comme une kinase phosphorylant et inhibant l'HMG-CoA réductase, l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Puis en 1980, une autre kinase dépendante de l'AMP, phosphorylant et inhibant l'ACC, enzyme contrôlant la synthèse des acides gras, a été découverte (**Carling et al., 1989**). Ce n'est qu'en 1987, que l'AMPK est identifiée comme l'unique enzyme responsable de l'inhibition de la synthèse du cholestérol et des acides gras (**Carling et al., 1987**).

Grâce à son clonage en 1994, les rôles de l'AMPK ont pu être mieux établis. L'AMPK est alors définie comme un senseur métabolique majeur permettant l'ajustement précis des besoins et des disponibilités énergétiques cellulaires (**Beri et al., 1994**; **Kahn et al., 2005**).

1.4.2 Structure

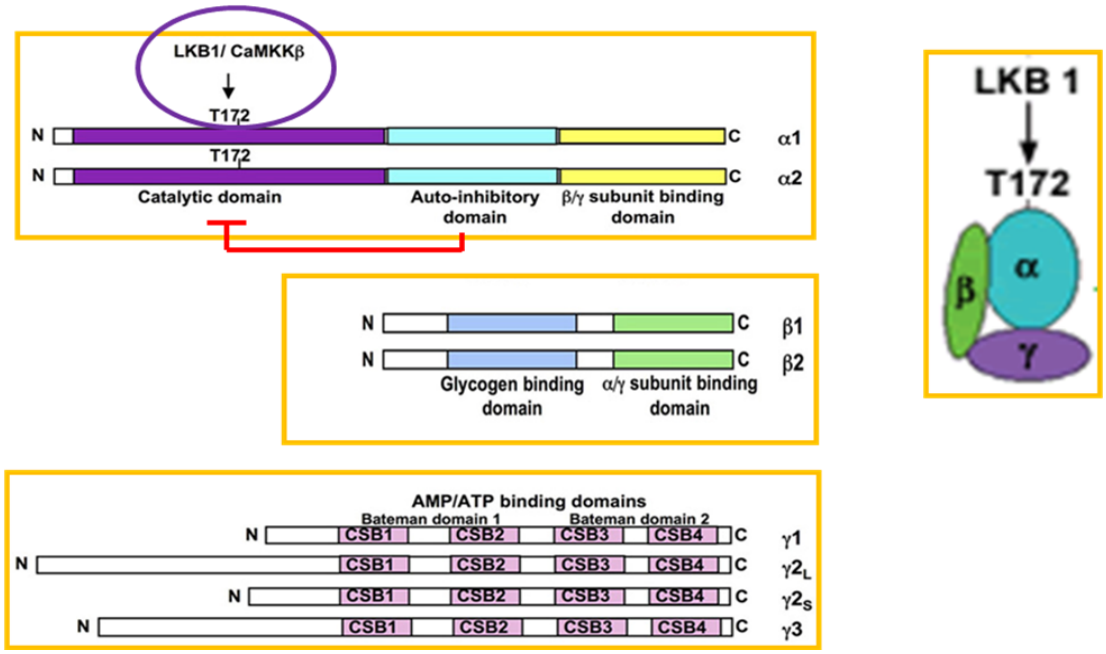
L'AMPK est une sérine/thréonine kinase très conservée au cours de l'évolution. Il s'agit d'un complexe hétérotrimérique formé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ. Les sous-unités β et γ sont liées par la sous-unité α (**Figure 18**) (**Wong et Lodish, 2006**). Ce système est très conservé puisque des homologues de toutes les sous-unités de l'AMPK ont été trouvés chez toutes les espèces dont le génome a été séquencé (**Hardie et al., 2003**).

- La sous-unité α contient le domaine catalytique dans sa région N-terminale, suivi d'un domaine d'auto-inhibition actif uniquement en absence d'AMP et d'un domaine d'interaction avec la sous-unité β dans la région C-terminale (**Crute et al., 1998**).

- La sous-unité β détient un domaine de liaison au glycogène (ou CBM : carbohydrate-binding module) dont la fonction physiologique n'est pas encore connue (**Hudson et al., 2003**) et un domaine d'interaction avec les sous-unités α et γ.

- L'effet activateur de l'AMP ou inhibiteur de l'ATP sur le complexe AMPK se produirait via la sous-unité γ qui lierait sur les domaines Bateman deux molécules d'AMP ou d'ATP d'une façon simultanée, mutuelle et fortement coopérative (**Xiao et al., 2007**). Ces domaines Bateman possèdent une répétition de quatre motifs CBS (cystathionine-β-synthase) permettant la liaison de l'AMP et de l'ATP pour l'activation allostérique de l'AMPK.

A **B**



Hardie, 2007

Figure 18: Structure des domaines des trois sous-unités formant le complexe hétérotrimérique de l'AMPK. (A) Les régions colorées sont très conservées entre les différentes espèces eucaryotes (**Hardie et al., 2003**). (B) Formation du complexe hétérotrimérique αβγ : la sous-unité α sert de jonction entre β et γ (**Wong et Lodish, 2006**). CSB, cystathionine β-synthase.

Ces sous-unités sont présentes sous plusieurs isoformes (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2, et γ3) codées par sept gènes différents dont certains subissent des épissages alternatifs donnant ainsi une diversité importante d'hétérotrimères (**Stapleton et al., 1996**). En fait, les différentes isoformes permettent la formation de 12 complexes possibles (αβγ).

La prépondérance de chacun de ces complexes est tissulaire-dépendante. A cela s'ajoute la localisation subcellulaire et la sensibilité à l'AMP qui apportent une complexité supplémentaire dans la compréhension des fonctions physiologiques de l'AMPK. Notons que les complexes contenant la sous-unité α1 sont présents surtout dans le cytosol et la membrane plasmique alors que ceux contenant la sous-unité α2 sont localisés à la fois dans le cytosol et le noyau permettant ainsi la régulation directe des transcriptions géniques (**Cheung et al., 2000**; **Salt et al., 1998**).

Dans le foie de rongeur, les deux sous-unités catalytiques α1 et α2 sont présentes et délivrent chacune d'elle la moitié de l'activité totale de l'AMPK, alors que les sous-unités régulatrices prédominantes seraient β1 et γ1 (**Cheung et al., 2000**).

Trois complexes majoritaires ont été mis en évidence dans le muscle vaste externe chez l'humain : α2β2γ1 >> α2β2γ3 >= α1β2γ1 (**Wojtaszewski et al., 2005**) dont la sous-unité catalytique délivrant la majorité de l'activité de l'AMPK est α2. Les complexes hétérotrimériques sont non seulement tissu-spécifiques mais aussi ils dépendent du type de fibre musculaire (**Wojtaszewski et al., 2000**). A l'heure actuelle, les complexes hétérotrimériques dans le muscle squelettique de rongeurs n'ont pas été complètement définis. Néanmoins, l'hétérotrimère majoritaire chez le rat est α2β2γ1 (**Chen et al., 1999**).

Lihn et al. ont montré pour la première fois que la sous-unité catalytique prédominante dans le tissu adipeux était α1 (**Lihn et al., 2004**). Actuellement, il n'existe pas plus de données sur les expressions relatives des autres sous-unités de l'AMPK dans le tissu adipeux. Mais c'est surtout au niveau de l'intestin que le plus grand mystère règne quant à la composition optimale hétérotrimérique de l'AMPK, un objectif que nous voulons poursuivre (**Tableau 2**).

	Foie (**Cheung et al., 2000**)	Muscle (**Wojtaszewski et al., 2000**; **Wojtaszewski et al., 2005**)	Tissu adipeux (**Lihn et al., 2004**)	Intestin
Rats	**α2β1γ1=α1β1γ1**	?	?	?
Humains	?	**α2β2γ1**>>α2β2γ3≥α1β2γ1	**α1**	?

Tableau 2 : Composition des complexes hétérotrimériques majoritaires dans les tissus insulino-sensibles.

1.4.3 Rôles principaux de l'AMPK dans les tissus

Chaque tissu possède sa propre signature du complexe hétérotrimérique αβγ de l'AMPK. Par conséquent, il est tout à fait logique d'observer des actions spécifiques de l'AMPK pour un tissu donné. Toutefois, le rôle principal de l'AMPK dans toutes les cellules demeure celui de maintenir les réserves énergétiques des cellules en activant les voies cataboliques productrices d'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommant l'ATP. Le rôle de l'AMPK a été principalement étudié dans les organes impliqués dans la production et dans l'utilisation de l'énergie tels que le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux, le cœur, le pancréas et le système nerveux central (**Figure 19**).

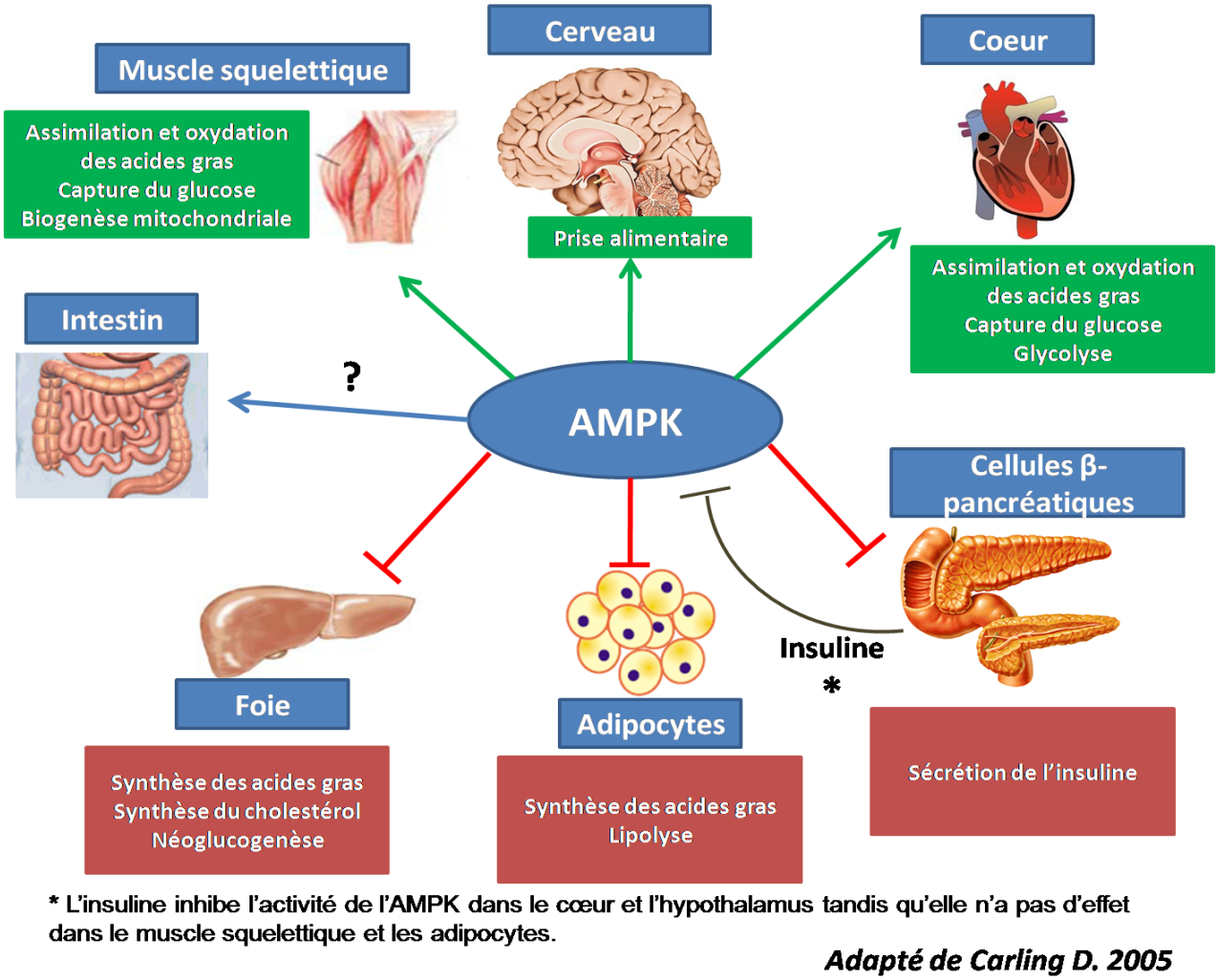


Figure 19 : Rôles principaux de l'AMPK dans les tissus. L'AMPK conserve et génère de l'ATP essentiel au fonctionnement de la machinerie cellulaire.

Dans le foie, les effets majeurs de l'activation de l'AMPK comprennent l'inhibition de la synthèse des acides gras (ACC, Fatty Acid Synthase : FAS), du cholestérol (HMG-CoA Réductase), du glycogène, de la néoglucogenèse, et l'activation de la β-oxydation des acides gras (carnitine palmytoyltransferase 1 : CPT-1) (**Carling et Hardie, 1989**; **Hardie et al., 2003**).

Au niveau musculaire, son activation induite par l'exercice physique favorise la capture des acides gras libres et leur β-oxydation (**Merrill et al., 1997**). Elle permet également d'induire la biogenèse mitochondriale (**Zong et al., 2002**), d'augmenter la capture du glucose (**Merrill et al., 1997**) et d'inhiber la synthèse du glycogène (**Carling et Hardie, 1989**).

L'AMPK du tissu adipeux, lorsqu'elle est activée, inhibe la lipogenèse, la différentiation adipocytaire et la lipolyse (**Daval et al., 2006**).

Dans le cœur, l'AMPK stimule la capture du glucose et augmente sa dégradation par la glycolyse. De même, les acides gras libres sont assimilés puis dégradés par la β-oxydation (**Webster et al., 2010**).

Dans le cerveau, plus précisément l'hypothalamus, l'activation de l'AMPK semble avoir des effets sur la régulation de l'appétit : elle stimulerait la prise alimentaire tandis que son inhibition la réduirait (**Andersson et al., 2004**).

Au niveau du pancréas, l'AMPK inhibe la synthèse et la sécrétion de l'insuline par répression du gène codant pour cette hormone mais aussi par destruction des cellules β-pancréatiques (**Richards et al., 2005**).

Alors que son activation dans les autres tissus semble protectrice du DT2, elle ne l'est pas dans le pancréas soulignant la complexité de la régulation tissu-spécifique de cette protéine.

Fonctions principales de l'AMPK dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux (Figure 20):

Régulation du métabolisme lipidique : La régulation de la lipogenèse s'effectue à deux niveaux, à court terme et à long terme.

Effets à court terme : l'AMPK phosphoryle rapidement et directement ses substrats. L'AMPK contrôle le devenir des acides gras en réduisant le taux de malonyl-CoA intracellulaire qui est à la fois un précurseur essentiel à la synthèse des acides gras et aussi un inhibiteur de l'oxydation mitochondriale des acides gras. En effet, elle participe à la régulation allostérique de la CPT1 qui catalyse l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. L'AMPK phosphoryle et inactive l'ACC, l'enzyme clé de synthèse des acides gras (**Corton et al., 1994**) et augmente l'activité de la MCD (Malonyl-CoA Décarboxylase), ce qui a pour conséquence une diminution des niveaux de malonyl-CoA, d'où l'augmentation de la β-oxydation mitochondriale et la suppression de la synthèse des acides gras (**Velasco et al., 1997**). L'AMPK inactive également la glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), qui catalyse la synthèse des triglycérides (**Muoio et al., 1999**). Enfin, l'AMPK régule finement la synthèse du cholestérol en phosphorylant et inhibant l'HMG-CoA Réductase (**Carling et**

Hardie, 1989). Il est à noter que l'action de l'AMPK sur l'ACC et la GPAT est commune aux 3 tissus insulino-sensibles. Par contre, le contrôle de l'HMG-CoA Réductase par l'AMPK a seulement été étudié dans le foie.

Effets à long terme : l'AMPK régule l'expression de certains gènes lipogéniques en contrôlant l'activité de facteurs de transcription. Elle phosphoryle le facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein), réduisant ainsi sa translocation dans le noyau et sa capacité à se lier à l'ADN. Ainsi l'expression des gènes cibles de ChREBP, soit l'ACC et la FAS (Fatty Acid Synthase), est réprimée (**Uyeda et al., 2002**). L'AMPK réduit également l'expression et la stabilité de SREBP1c, ce qui a pour conséquence l'inhibition des gènes lipogéniques cibles ACC, FAS et SCD (Stearoyl CoA Desaturase) (**Foretz et al., 2005**).

En résumé, l'activation de l'AMPK permet de réduire la lipogenèse à court terme et à long terme.

Régulation de la néoglucogenèse (principalement dans le foie) : L'AMPK contrôle l'homéostasie du glucose principalement via l'inhibition de l'expression des gènes néoglucogéniques (PEPCK et G6Pase) et de la production hépatique de glucose (**Lochhead et al., 2000**). Plusieurs facteurs de transcription régulés par l'AMPK sont susceptibles de contrôler l'expression de PEPCK et G6Pase : FOXO1 (**Barthel et al., 2002**), HNF4α (**Leclerc et al., 2001**), SHP (**Kim et al., 2008**) et TORC2 (**Shaw et al., 2005**). (cf. revue de Viollet et al. 2009 (**Viollet et al., 2009**))

Régulation de la synthèse protéique : La synthèse protéique est régulée dans tous les tissus par la voie de signalisation de l'insuline PI3K/AKT/mTOR/S6K1. La protéine kinase S6K1 induit la synthèse protéique ainsi que la croissance cellulaire (**Holz et Blenis, 2005**). Il a été montré que l'AMPK réprimait la synthèse protéique par l'inhibition de la voie mTOR/S6K1 via la phosphorylation de TSC2 en amont de mTOR et via la phosphorylation du complexe 1 (raptor) de mTOR (mTORC1) (**van et al., 2011**).

Régulation de la biogenèse mitochondriale : L'AMPK phosphoryle et active PGC-1α (PPARγ-Coactivateur-1α), qui contrôle l'expression de nombreux facteurs de transcription

pour induire la biogenèse mitochondriale. Il en résulte une plus grande capacité oxydative mitochondriale (**Canto et Auwerx, 2010**).

Capture du glucose (principalement dans le muscle squelettique et le tissu adipeux) : L'AMPK favorise la capture du glucose en augmentant l'expression et la translocation de GLUT4 à la membrane, probablement par un mécanisme commun à l'insuline : la phosphorylation du substrat de l'AKT, l'AS160. L'AMPK contribue donc à améliorer la sensibilité à l'insuline (**Treebak et al., 2006**).

Inhibition de la lipolyse : L'AMPK est capable d'inactiver la lipase hormono-sensible (HSL) afin d'inhiber la lipolyse dans le tissu adipeux (**Daval et al., 2005**).

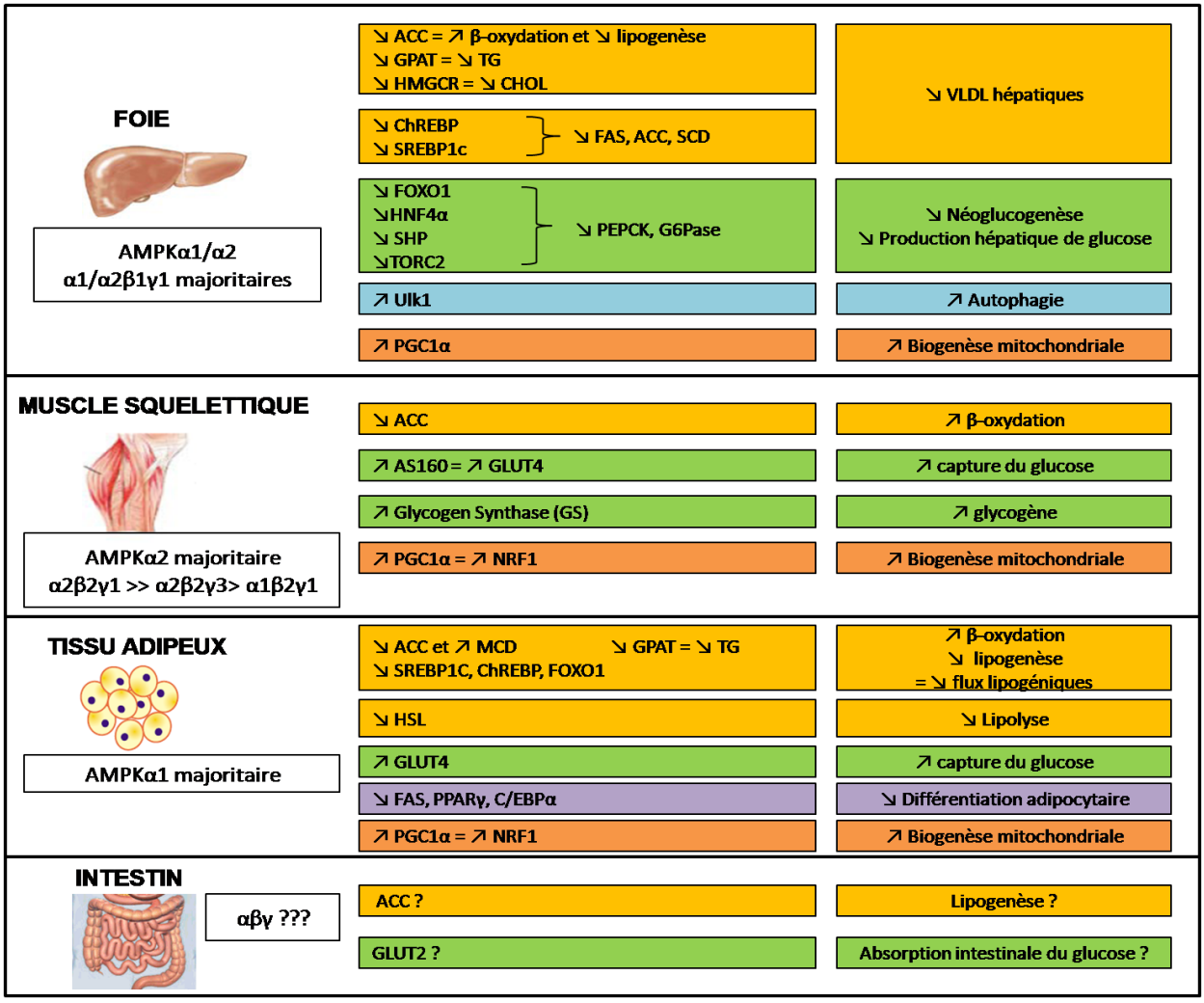


Figure 20: Comparaison des rôles de l'AMPK entre les différents tissus insulino-sensibles

1.4.4 Régulation de l'AMPK

L'activité de l'AMPK est finement régulée en réponse à de faibles variations des nucléotides intracellulaires ATP et surtout AMP. L'épuisement de l'ATP cellulaire conduit à l'abondance du 5'-AMP donc à l'augmentation du ratio AMP/ATP. L'AMPK a pour rôle de rétablir l'équilibre énergétique de la cellule en maintenant constante la concentration en ATP. Une fois activée, elle stimule les voies cataboliques générant de l'ATP (oxydation lipidique, capture du glucose par les tissus…) et inhibe les voies anaboliques consommant de l'ATP (synthèses lipidique et protéique...) (

Figure 21).

La régulation de cette activité est complexe car différents niveaux de régulation interviennent. En effet, l'activation de l'AMPK requiert :

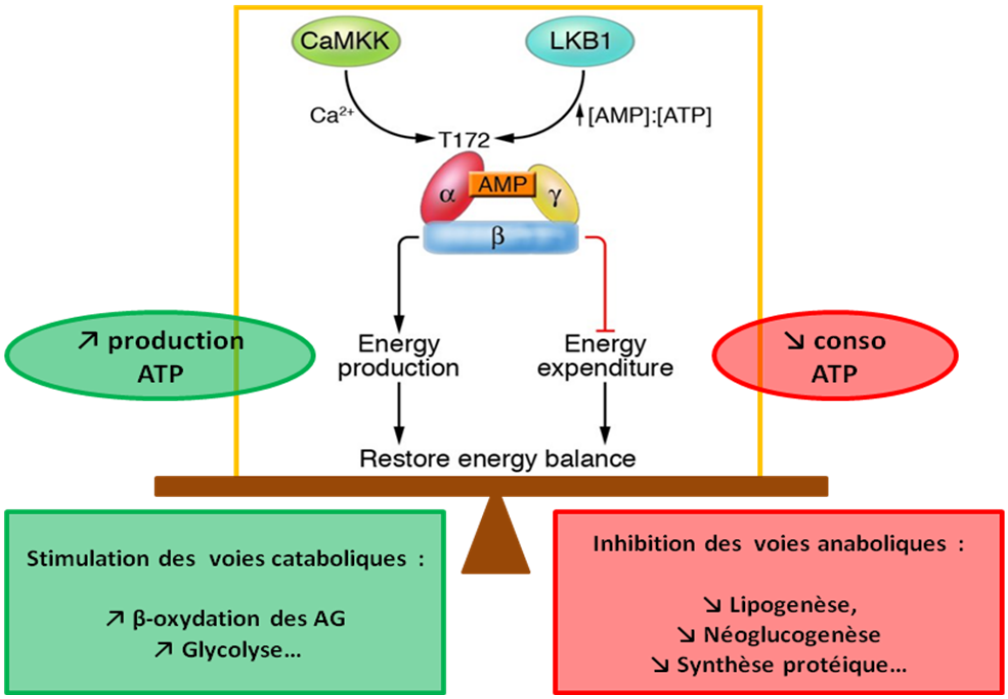
- **La liaison de l'AMP sur la sous-unité régulatrice γ permettant son activation allostérique** (**Foretz et al., 2006**). Il est important de signaler que son activité est antagonisée par la fixation de l'ATP, qui lie les domaines Bateman avec une affinité moindre que l'AMP mais d'une manière aussi exclusive (**Scott et al., 2004**).
- **La phosphorylation de la thréonine 172 de la sous-unité α catalytique par une kinase en amont**. A date, trois AMPK kinases ont été identifiées :

- Le suppresseur de tumeur **LKB1**, qui forme un complexe avec deux protéines régulatrices STRAD et MO2, nécessaires à la phosphorylation de l'AMPK suite à l'élévation du ratio AMP/ATP (**Hawley et al., 2003**). Ce complexe LKB1/STRAD/MO25 a été identifié comme étant le principal complexe kinasique responsable de la phosphorylation de l'AMPK dans la majorité des cellules de mammifères.

- La **CaMKKβ** (Ca^{2+}/Calmodulin-dependant protein kinase kinase) phosphoryle et active également l'AMPK en réponse à des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} élevées (**Woods et al., 2005**).

- Puis la **TAK1** (Transforming growth factor-β-Activated Kinase 1) a été récemment impliquée dans la régulation de l'activité de l'AMPK mais son mécanisme d'action reste peu connu (**Momcilovic et al., 2006**).

- **L'inhibition de la déphosphorylation de la Thr-172 par les protéines phosphatases** (**Hardie et Carling, 1997**). Les protéines phosphatases 2A et 2C (PP2A et PP2C) inactivent l'AMPK en déphosphorylant la Thr172. L'activité de ces enzymes est négativement régulée par l'AMP (**Sanders et al., 2007**) et positivement régulée par les acides gras libres (**Wu et al., 2007**).



Adapté de (**Long et Zierath, 2006**)

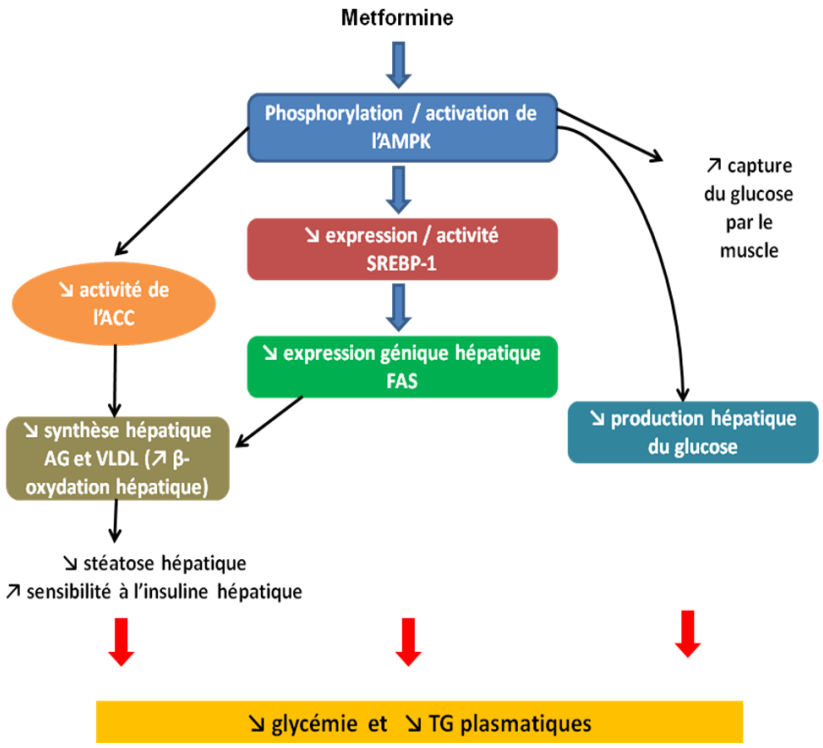
Figure 21: Régulation de l'AMPK. Deux principales kinases en amont de l'AMPK phosphorylent le résidu Thr-172 en réponse à une augmentation du ratio AMP/ATP (effet catalysé par LKB1) ou en réponse d'une augmentation du Ca2+ intracellulaire (effet catalysé par CaMKK). L'AMPK activée permet de restaurer l'équilibre énergétique de la cellule en stimulant les voies cataboliques productrices d'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommatrices d'ATP.

1.5 ACTIVATION DE L'AMPK : UNE CIBLE THÉRAPEUTIQUE POTENTIELLE ?

De nombreux stimuli sont susceptibles d'activer l'AMPK**.** Certaines situations physiologiques comme l'exercice, le jeûne ou encore l'ischémie nécessitent une restauration de l'équilibre énergétique qui s'exprime d'abord par une élévation du ratio AMP/ATP, puis l'activation de l'AMPK. Les hormones régulent également le niveau de phosphorylation de l'AMPK. Enfin, de nombreux activateurs pharmacologiques plus ou moins spécifiques de l'AMPK se sont développés ces dernières années, grâce à la découverte de Zhou sur le mécanisme d'action de la Metformine.

La Metformine, l'agent anti-diabétique le plus utilisé, réduit la glycémie et améliore les paramètres lipidiques sanguins sans affecter la sécrétion d'insuline (**Wu et al., 1990**). L'effet hypoglycémique de la Metformine s'explique par l'augmentation de la capture du glucose par le muscle (**Hundal et al., 1992**) et par la diminution de la production de glucose hépatique (**Hundal et al., 2000**). Ce composé pharmacologique favorise également l'oxydation des acides gras dans le foie tout en réduisant leur synthèse (**Zang et al., 2004**).

Zhou et al. ont démontré pour la première fois que les effets anti-hyperglycémiques et anti-hyperlipidémiques de la Metformine résultaient de l'activation de l'AMPK dans les tissus (**Zhou et al., 2001**). Il existe donc un lien irréfutable entre l'activation de l'AMPK et l'amélioration de l'insulino-résistance (**Figure 22**).



D'après **Zhou et al., 2001**

Figure 22 : Modèle du mécanisme d'action par lequel la Metformine améliore la glycémie et la lipémie.

A partir de ces découvertes, le développement d'activateurs directs de l'AMPK comme cible thérapeutique de l'insulino-résistance a suscité un intérêt général dans le domaine de l'obésité et du DT2.

1.5.1 Activateurs physiologiques

Les premiers facteurs identifiés comme activateurs de la voie de l'AMPK sont ceux reliés au stress métabolique induisant une diminution de l'ATP intracellulaire (**Moore et al., 1991**). L'AMPK est physiologiquement activée au cours de l'**hypoxie** ou de l'**ischémie** dans le muscle cardiaque et les myocytes. L'hypoxie liée à un manque d'oxygène, survient notamment lors de l'exercice physique. Les traitements causant un stress métabolique tels que le **choc thermique**, activent l'AMPK dans des cellules intactes (**Corton et al., 1994**).

1.5.1.1 Le jeûne

La privation de glucose induit l'activation de l'AMPK dans des cellules isolées. Ainsi, l'AMPK exerce un rôle de senseur énergétique et nutritionnel *in vivo*. Notons que l'AMPK est activée dans le foie de rat après un jeûne (**Witters et al., 1994**) tandis que dans une autre étude, le jeûne n'a pas modifié son activité dans le muscle squelettique (**Kaushik et al., 2001**). Bien que cela soit probablement lié à des conditions expérimentales différentes, cela suggère aussi que la réponse de l'AMPK à un jeûne serait tissu-spécifique.

1.5.1.2 L'exercice physique

La contraction musculaire accroît rapidement le métabolisme énergétique en augmentant les besoins en substrats métaboliques. Par conséquent, le muscle augmente la captation du glucose et l'oxydation des acides gras lors de sa contraction. L'AMPK est apparue comme un acteur clé dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique lors de la contraction musculaire (**Hayashi et al., 1998**; **Park et al., 2002**). Chez l'humain, un exercice de courte durée active l'AMPK selon l'intensité de l'effort et le type d'isoformes. Lors d'un accroissement modéré de l'intensité de l'exercice, les complexes du muscle squelettique contenant AMPKα2 mais pas α1, ont une activité augmentée (**Wojtaszewski et al., 2000**). Plus récemment, il a été montré que l'exercice physique permettait d'activer l'AMPK du tissu adipeux chez les rongeurs et l'humain, mais aussi l'AMPK du foie, du pancréas et probablement celle dans d'autres organes (**Calegari et al., 2011**; **Koh et al., 2007**; **Takekoshi et al., 2006**).

1.5.1.3 Les hormones

- *Insuline*

L'insuline sécrétée par les cellules β-pancréatiques, est une hormone anabolique et hypoglycémiante connue pour inhiber l'activité de l'AMPK du myocarde. C'est en activant le complexe PKB/Akt que l'insuline inhiberait l'AMPK puisque ce complexe est capable de phosphoryler l'AMPK sur les résidus Ser485/491, ce qui réduit considérablement la phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172 (**Horman et al., 2006**; **Kovacic et al., 2003**). En revanche, l'insuline n'aurait aucun effet sur l'activité de l'AMPK du muscle squelettique et du tissu adipeux (**Kahn et al., 2005**).

Au niveau central, Minokoshi et al. ont montré que l'insuline pouvait inhiber l'activité de l'AMPK dans l'hypothalamus. Cela a pour conséquence une diminution de la prise alimentaire (**Namkoong et al., 2005**).

- *Leptine*

La leptine, hormone sécrétée par le tissu adipeux, régule le métabolisme énergétique en favorisant la satiété. Cette hormone est capable d'activer l'AMPK dans le muscle squelettique alors qu'elle l'inhibe dans l'hypothalamus. Ces effets tissus-spécifiques sont reliés à une régulation globale du métabolisme énergétique dans l'organisme : l'activation de l'AMPK dans le muscle potentialise le transport du glucose et l'oxydation des acides gras, tandis que dans l'hypothalamus, l'inhibition de l'AMPK par la leptine réduit l'appétit et la prise alimentaire (**Tanaka et al., 2005**). Le mécanisme moléculaire mis en jeu est encore peu connu.

- *Ghréline*

La ghréline exerce un effet opposé à la leptine. Elle est sécrétée par la muqueuse gastrique et stimule l'appétit. Plusieurs études ont trouvé que la ghréline active l'AMPK dans l'hypothalamus et le cœur alors qu'elle l'inhibe dans le foie et le tissu adipeux (**Andersson et al., 2004**). Il semble qu'il n'y ait pas d'effet sur l'AMPK du muscle squelettique (**Vestergaard et al., 2008**). La cible intermédiaire entre la ghréline et l'AMPK n'a pas encore été identifiée.

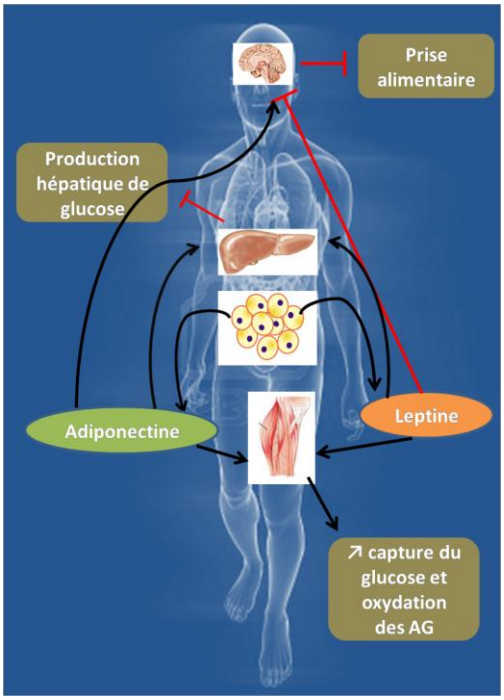
- *Adiponectine*

L'adiponectine est sécrétée par le tissu adipeux. Elle augmente l'oxydation des acides gras et la captation du glucose tout en inhibant la néoglucogenèse. Ces effets se produisent via l'activation de l'AMPK dans le foie et le muscle squelettique qui expriment les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (**Yamauchi et al., 2002**). Au niveau de l'hypothalamus, elle stimule la prise alimentaire en activant l'AMPK (**Kadowaki et al., 2008**).

- *Résistine (inhibiteur)*

La résistine est une adipokine sécrétée par le tissu adipeux, qui jouerait un rôle négatif sur l'activation de l'AMPK. En effet, dans le foie des souris résistine $^{-/-}$, la phosphorylation de

l'AMPK sur la Thr172 est élevée, suggérant une inhibition de l'AMPK dans le foie par la résistine (**Banerjee et al., 2004**). Dans le muscle squelettique, la résistine induit une diminution de la captation et de l'oxydation des acides gras dans le muscle via une réduction du transporteur CD36 membranaire, un mécanisme possiblement AMPK-dépendant (**Palanivel et Sweeney, 2005**). Au niveau de l'hypothalamus, elle semble stimuler l'activité de l'AMPK (**Vazquez et al., 2008**). A la périphérie, la résistine aurait donc des effets opposés à ceux de l'adiponectine.



Régulation Activité de l'AMPK	Foie	Muscle	T.Adipeux	Hypoth.	Références
Insuline	?	-	-	↘	Kovacic et al. 2003 Namkoong et al.2005 Kahn et al.2005
Résistine	↘	↘	?	↗	Banerjee et al.2004 Vazquez et al. 2008 Palanivel et al.2005
Adiponectine	↗	↗	↗	↗	Yamauchi et al.2002 Kadowaki et al.2008
Leptine	↗	↗	↗	↘	Tanaka et al.2005
Ghréline	↘	-	↘	↗	Vestergaard et al.2008

Figure 23 : Régulation hormonale de l'AMPK

1.5.2 Activateurs pharmacologiques

L'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs pharmacologiques a rendu possible l'identification des cibles en aval de l'AMPK. Il y a encore quelques années, ces composés pharmacologiques étaient peu nombreux. Puis, les scientifiques ont démontré que les agents anti-diabétiques de la classe des biguanides et des thiazolidinediones exerçaient leurs effets anti-hyperglycémiques et anti-hyperlipidémiques en activant l'AMPK (**Fryer et al., 2002**; **Zhou et al., 2001**). Cette découverte a suscité un vif intérêt dans le développement de nouveaux activateurs de l'AMPK. Ainsi, ces dernières années, un nombre grandissant de composés modulant la phosphorylation de l'AMPK ont été identifiés.

1.5.2.1 Les biguanides

Les biguanides (Metformine, Phenformine, Galegine) stimulent la capture du glucose par les muscles tout en inhibant la néoglucogenèse et la lipogenèse hépatiques, ce qui permet l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (**Zhou et al., 2001**). La Metformine est l'agent-antidiabétique le plus utilisé. Elle réduit la glycémie sans stimuler la sécrétion d'insuline. Bien qu'elle soit administrée depuis 1957, les mécanismes par lesquels la Metformine abaisse le glucose et les lipides ne sont pas encore tout à fait clairs. Zhou et al. ont montré que les effets bénéfiques de la Metformine étaient AMPK-dépendants (**Zhou et al., 2001**). Par ailleurs, il semble que la Metformine n'active pas directement l'AMPK, mais elle agirait en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, suggérant une activation indirecte de l'AMPK en augmentant le ratio AMP/ATP intracellulaire (**Owen et al., 2000**). Hawley et al. ont montré que le mécanisme d'action de la Metformine semble également impliquer la protéine kinase PKCζ qui phosphoryle LKB1 sur la Ser428. Cette action favorise l'export nucléaire de LKB1 puis l'activation de l'AMPK par ce dernier (**Xie et al., 2008**). Par contre, certains effets de la Metformine comme l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique, semblent à la fois LKB1 et AMPK-indépendants, suggérant donc l'activation d'autres voies de signalisation par cet agent anti-diabétique (**Foretz et al., 2010**).

1.5.2.2 Les thiazolidinediones (TZDs)

Les thiazolidinediones (Troglitazone, Pioglitazone, Rosiglitazone) augmentent l'utilisation du glucose par le muscle squelettique et diminuent la production hépatique du glucose. Le mécanisme d'action n'est pas encore bien élucidé. Ces agents insulino-sensibilisateurs ont la faculté de se fixer sur le facteur de transcription PPARγ (principalement présent dans le tissu adipeux) afin de stimuler la différentiation adipocytaire, la synthèse et le transport des acides gras ainsi que la synthèse des hormones dérivées du tissu adipeux (leptine, adiponectine) (**Lehmann et al., 1995**). En somme, les effets des TZDs concourent à remodeler la répartition des lipides depuis la circulation, le foie et le muscle vers le tissu adipeux. En parallèle, la libération des acides gras libres et les hormones pro-inflammatoires (TNFα et résistine) est inhibée, ce qui réduit l'insulino-résistance (**Yamauchi et al., 2001**). Il a été proposé que les TZDs activaient l'AMPK grâce à la libération d'adiponectine par le tissu adipeux en activant PPARγ (**Kudoh et al., 2011**; **Merrill et al., 1997**). Toutefois, de

nombreuses études ont observé une amélioration de la sensibilité à l'insuline indépendamment de PPARγ et de leurs effets sur les adipocytes. En effet, dans des cellules musculaires isolées, l'AMPK était activée par les TZDs favorisant le transport du glucose tandis que l'inhibition de l'ACC stimulait l'oxydation des acides gras. *In vivo* chez le rat, les TZDs activaient l'AMPK dans le muscle, le tissu adipeux et le foie (**LeBrasseur et al., 2006**). Les effets des TZDs sont donc probablement AMPK-dépendants. Concernant leur mécanisme d'action, ils pourraient agir comme les biguanides, en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Brunmair et al., 2004**).

1.5.2.3 L'AICAR

Le 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR) est un activateur souvent utilisé lors des expérimentations *in vitro* car il pénètre facilement dans la cellule (**Corton et al., 1995**). Il peut également être utilisé *in vivo* mais dans une moindre mesure que la Metformine (**Pencek et al., 2005**). L'AICAR est rapidement phosphorylé en analogue de l'AMP, le ZMP. L'accumulation de ZMP aboutit à l'activation de l'AMPK en mimant les effets de l'AMP: l'activation allostérique de l'AMPK, la phosphorylation du résidu Thr172 et l'inhibition de sa déphosphorylation. Ainsi, l'utilisation d'AICAR a permis de caractériser les effets inhibiteurs de l'AMPK sur l'ACC et sur l'HMGCoA réductase dans les hépatocytes du rat et dans les adipocytes (**Sullivan et al., 1994**). Dans le muscle de rat, l'AICAR stimule la capture du glucose et l'oxydation des acides gras, alors que dans le foie, ce composé inhibe la néoglucogenèse (PEPCK et G6Pase) en dégradant le facteur de transcription FOXO1(**Barthel et al., 2002**; **Lochhead et al., 2000**; **Merrill et al., 1997**). Ces effets sont AMPK-dépendants.

Cependant, les résultats obtenus par l'utilisation de cet activateur devraient être validés par d'autres techniques, car l'action du ZMP n'est pas complètement spécifique à l'AMPK et pourrait réguler d'autres enzymes indépendamment de l'AMPK, comme par exemple la glycogène phosphorylase participant à la glycogénolyse (**Longnus et al., 2003**), et la fructose-1,6-biphosphatase (**Vincent et al., 1991**) intervenant dans la glycolyse et la néoglucogenèse.

1.5.2.4 Le composé C (inhibiteur)

Le composé C est un inhibiteur de l'AMPK, réversible et compétitif de l'ATP. Lorsque les cellules sont soumises à différents stimuli AMPK-dépendants (activateurs pharmacologiques ou physiologiques), le composé C n'est plus capable d'inhiber

complètement l'AMPK. Ainsi, l'addition simultanée de composé C avec l'AICAR ou la Metformine, permet de limiter l'activation de l'AMPK par ces activateurs. Par contre, l'activation de l'AMPK par le dinitrophénol persiste en présence du composé C (**Zhou et al., 2001**). D'autre part, le niveau d'inhibition du composé C diffère d'un tissu à l'autre : par exemple, l'inhibition de l'AMPK est moins importante dans le muscle squelettique que dans les hépatocytes (**Funai et Cartee, 2009**; **Zhou et al., 2001**). Cela pourrait être lié à une spécificité des sous-unités de l'AMPK puisqu'elles sont tissu-spécifique. Les effets du composé C sont contraires à ceux induits par les activateurs de l'AMPK. Cet inhibiteur de l'AMPK réduit efficacement l'oxydation des acides gras et le transport du glucose dans le muscle ainsi que la néoglucogenèse hépatique (**Merrill et al., 1997**; **Zhou et al., 2001**). Cependant, quelques études ont montré que le composé C inhibe également d'autres protéines kinases, tel que, ERK1/2 et PHK (**Bain et al., 2007**). Ainsi, les effets cellulaires induits par le composé C devraient être étudiés et évalués avec soin.

D'autres alternatives comme les techniques de biologie moléculaire (e.g. suppression de l'expression de l'AMPK en utilisant des ARNs d'interférence ou l'utilisation des mutants dominants négatifs) permettraient de résoudre ce problème de spécificité.

En résumé, l'activation de l'AMPK, soit physiologique (en particulier par l'exercice physique) soit pharmacologique, permet d'atténuer les anomalies métaboliques comme le DT2, le syndrome métabolique et peut-être l'obésité.

1.6 RÔLES DE L'AMPK DANS LES MALADIES MÉTABOLIQUES

De nombreuses études effectuées chez l'homme et les modèles animaux ont mis en évidence une altération de la voie de signalisation de l'AMPK associée au diabète de type II, à l'insulino-résistance et à l'obésité. Néanmoins, le rôle de cette protéine kinase dans les maladies métaboliques demeure obscur.

1.6.1 Etudes chez l'humain

Gauthier et al. ont observé une altération de l'activité de l'AMPK dans le tissu adipeux viscéral associée à une inflammation et une insulino-résistance chez les sujets obèses (**Gauthier et al., 2011**). Les données concernant l'activité de l'AMPK dans le muscle squelettique de sujets obèses et DT2 sont contradictoires. Une réduction de l'activité de l'AMPK dans le muscle squelettique de sujets obèses et DT2 a été observée (**Bandyopadhyay et al., 2006**). Elle était associée à une augmentation de la lipogenèse et une réduction de l'oxydation des acides gras se traduisant par une activité accrue de l'ACC et des concentrations élevées en malonyl-CoA. De même, l'activité de la sous-unité α2 de l'AMPK était diminuée dans le muscle chez le sujet obèse (**Bruce et al., 2005**), et l'activation de l'AMPK par l'adiponectine est abrogée dans les myocytes en culture provenant de sujets obèses et diabétiques (**Chen et al., 2005**). En contraste avec ces observations, d'autres scientifiques suggèrent un fonctionnement normal de l'AMPK chez les sujets obèses et DT2. En effet, les niveaux d'expression génique et protéique des sous-unités de l'AMPK α1 et α2 étaient similaires dans le muscle squelettique de sujets minces et obèses (**Steinberg et al., 2004**), et chez des sujets sains et DT2 (**Musi et al., 2001**). A ce jour, les raisons de ces résultats contradictoires demeurent énigmatiques. De futures études sont nécessaires pour clarifier les données.

1.6.2 Modèles animaux

1.6.2.1 Diète induisant IR/DT2

Ouadda et al. ont observé une augmentation de l'activité de l'AMPK hépatique parallèlement au développement de l'insulino-résistance et du DT2 chez le modèle animal *Psammomys obesus* (**Ouadda et al., 2009**). De même, l'infusion intraportale de fructose chez

des souris a induit une insulino-résistance hépatique et une augmentation de l'activité de l'AMPK (**Winnick et al., 2011**). Bonnard et al. ont, quant à eux, observé que l'induction du DT2 chez les souris par une diète riche en gras et en sucrose serait capable de réduire l'activité de l'AMPK dans le muscle squelettique et de l'augmenter dans le foie (**Bonnard et al., 2008**). Enfin, Saha et al. ont observé chez des rats « Dahl-Salt Sensitive » (Dahl-S) présentant une hypertriglycéridémie et des niveaux élevés de malonyl-CoA, une diminution de l'activité de l'AMPK dans le tissu adipeux (**Saha et al., 2004**). Donc ces résultats suggèrent que la régulation de l'activité de l'AMPK serait tissu-dépendante afin de contrer le développement des altérations métaboliques associées à la résistance à l'insuline et au DT2.

Au niveau cellulaire, la réduction de l'activité de l'AMPK est généralement associée à une levée de l'inhibition de l'ACC et une accumulation de malonyl-CoA. Il en résulte une lipogenèse accrue et une β-oxydation réduite. C'est le cas dans l'étude menée par Kraegen et al. où l'induction de la résistance à l'insuline chez le rat par l'infusion de glucose a pour conséquence l'élévation des concentrations du DAG et du malonyl-CoA dans le foie et les muscles squelettiques et une diminution de l'activité de l'AMPK (**Kraegen et al., 2006**).

1.6.2.2 Animaux génétiquement modifiés

Dans le modèle animal JCR:LA-cp/cp de rats résistants à l'insuline, l'activité de l'AMPK dans le foie semble augmenter parallèlement au développement de la résistance à l'insuline, probablement pour compenser l'augmentation de l'activité de son substrat, l'ACC (**Atkinson et al., 2002**).

Au contraire, chez les animaux ayant une déficience en leptine (souris déficientes en leptine ob/ob) ou en ses récepteurs (rats déficients en récepteur de la leptine fa/fa (non diabétique), l'activité de l'AMPK est réduite dans le foie et dans les muscles. Le traitement de ces animaux par l'AICAR réduit les anomalies associées à la résistance à l'insuline et au DT2, à savoir l'élévation des triglycérides et l'hyperglycémie (**Yu et al., 2004**).

Afin de mieux cerner la fonction de l'AMPK dans les tissus, les gènes codant pour les isoformes α1 et α2 de la sous-unité catalytique de l'AMPK ont été invalidés ou surexprimés dans des modèles murins. Aucun phénotype particulier n'a été observé chez les souris AMPKα1$^{-/-}$ (**Viollet et al., 2003a**). En revanche, une hyperglycémie apparaissait chez les souris AMPKα2$^{-/-}$ reflétant une sévère résistance à l'insuline. Curieusement, le muscle

squelettique n'était pas affecté par ces changements puisque la capture du glucose et la synthèse du glycogène étaient normales. Ainsi, la sous-unité AMPKα2 extra-musculaire semble réguler la sensibilité à l'insuline de l'organisme entier in vivo (**Jorgensen et al., 2004**; **Viollet et al., 2003b**).

Dans le foie de souris *ob/ob* diabétiques, la surexpression d'une forme constitutivement active de l'AMPKα2 (AMPKα2-CA) améliore la glycémie en réduisant la néoglucogenèse hépatique. Chez les souris normales, la surexpression de l'AMPKα2-CA réprime les gènes impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse, ainsi que leurs facteurs de transcription SREBP-1 et ChREBP. De ce fait, le stock de glycogène est augmenté tandis que la lipémie est réduite (**Foretz et al., 2005**).

Notons que la surexpression à long terme de la forme constitutive de l'AMPKα1 dans le foie réduit l'expression des gènes lipogéniques et l'adiposité chez les souris (**Yang et al., 2008**). De même, la surexpression de l'adénovirus Ad-AMPKα1 par injection intraveineuse chez des rats Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF), un modèle de diabète de type II, permet de réduire la glycémie et les triglycérides au niveau hépatiques et plasmatiques. La répression des gènes lipogéniques reflète l'amélioration du métabolisme lipidique et de la stéatose hépatique (**Seo et al., 2009**).

1.6.3 Modèles cellulaires (*in vitro*)

Afin de mieux comprendre les mécanismes expliquant les effets hypoglycémiques et hypolipidémiques des agents anti-diabétiques, différents types cellulaires ont été employés.

Des cellules hépatiques HepG2 rendues insulino-résistantes par de fortes concentrations de glucose, présentaient une accumulation intracellulaire de lipides. Les niveaux de phosphorylation de l'AKT, de la GSK3β, de l'AMPK et de l'ACC étaient réduits. L'ajout de Metformine ou la surexpression d'une forme constitutivement active de l'AMPK prévenait ces altérations, alors que l'expression d'une forme inactive de l'AMPK empêchait l'action hypolipidémique de la Metformine (**Zang et al., 2004**).

La résistine permettait d'induire une insulino-résistance dans les cellules HepG2 en stimulant l'expression des gènes de la néoglucogenèse tels que la G6Pase, PEPCK et SOCS-3 par un mécanisme AMPK-dépendant (**Luo et al., 2009**).

Le Ginsénoside, une molécule de la classe des stéroïdes extraite des racines de Ginseng, est connu pour ses propriétés anti-diabétiques. Des études ont montré qu'il favorisait

l'absorption du glucose dans les cellules musculaires C2C12 (**Lee et al., 2011**) alors qu'il réduit la néoglucogenèse par l'induction du récepteur nucléaire SHP dans les cellules hépatiques HepG2 (**Quan et al., 2012**). Il inhibe également la lipogenèse en supprimant SREBP-1c et ses gènes cibles FAS et SCD1. Tous ces effets sont liés à l'activation de l'AMPK par le Ginsenoside. Le traitement par l'AICAR de myotubes issus de sujets sains ou obèses prévenait l'insulino-résistance induite par de fortes concentrations de lipides (**Bikman et al., 2010**).

En conclusion, le développement de l'insulino-résistance est corrélé à une altération de la voie de signalisation de l'AMPK, notamment dans les tissus clés de la résistance à l'insuline, tels que le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux. Cependant, il pourrait se produire une adaptation métabolique dans certains tissus afin de contrer la maladie.

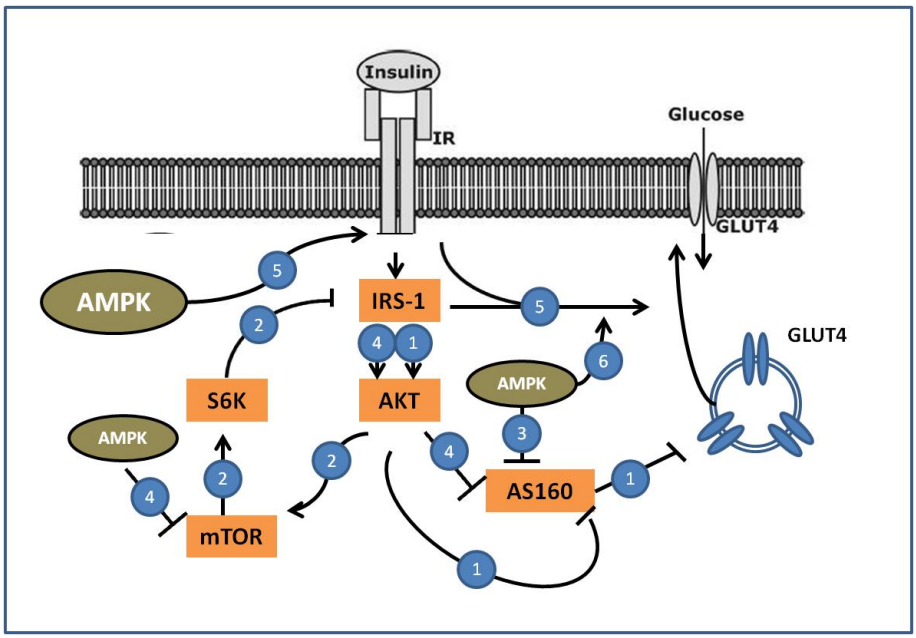
1.6.4 Le « crosstalk » entre les voies de signalisation AMPK/insuline

L'insulino-résistance est caractérisée principalement par l'incapacité de l'insuline à augmenter la capture du glucose par le muscle squelettique et à réprimer la néoglucogenèse hépatique. Cela conduit à l'hyperglycémie. Dans ces conditions, l'AMPK joue un rôle majeur pour contrecarrer les effets de l'insulino-résistance. Elle stimule les voies cataboliques et inhibe les voies anaboliques alors que l'insuline favorise la synthèse des lipides, des protéines et du glycogène. Cependant, ces deux voies métaboliques ont une même finalité qui est d'augmenter le transport du glucose dans le muscle squelettique en stimulant la transcription et la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique.

Plusieurs études ont tenté d'élucider par quel(s) mécanisme(s) respectivement l'insuline et l'AMPK contribuent à augmenter le transport du glucose (**Figure 24**). La protéine AS160, le substrat de l'Akt, a été identifiée comme une cible commune de l'insuline et de l'AMPK. La phosphorylation de l'AS160 aboutit à la translocation de GLUT4 dans la membrane plasmique. Cette action homéostatique joue un rôle majeur dans la régulation de la glycémie puisqu'elle favorise la capture du glucose par les tissus périphériques.

Par ailleurs, l'AMPK améliore la sensibilité à l'insuline (IRS/PI3K/Akt) par au moins 3 autres mécanismes connus à ce jour (**Figure 24**) :

- ✓ Une activation de l'IR en le phosphorylant sur des résidus sérine catalysant l'autophosphorylation des sous-unités β sur des résidus tyrosine (**Chopra et al., 2012**),
- ✓ Une inhibition directe de mTORC1 et par conséquent de S6K, ce qui empêche le rétrocontrôle négatif sur l'IRS1,
- ✓ Une activation de TSC2 pour renforcer l'inhibition de mTORC1 (**Hardie, 2008**; **Hardie et Carling, 1997**).



Adapté de (**Ginion et al., 2011**)

Figure 24: Schéma proposé pour la régulation du transport du glucose par l'insuline et l'AMPK dans les cardiomyocytes. En aval de l'insuline fixé sur son récepteur (IR), la phosphorylation de l'IRS1 sur des résidus tyrosine conduit à la phosphorylation et à l'activation de PKB/Akt, laquelle phosphoryle ensuite et inhibe l'AS160 permettant la translocation des vésicules de stockage du transporteur du glucose GLUT4 vers la membrane plasmique *(1)*. Par ailleurs, PKB/Akt induit la phosphorylation et l'activation de la voie mTOR/p70S6K, laquelle phosphoryle ensuite l'IRS1 sur des résidus sérine aboutissant à l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline *(2)*. L'AMPK phosphoryle et inhibe l'AS160 permettant de stimuler la capture du glucose indépendamment de l'insuline *(3)*. L'AMPK inhibe également le rétrocontrôle négatif dépendant de mTOR/p70S6K permettant la surphosphorylation de l'axe PKB/Akt/AS160 *(4)*. Une partie de l'action de l'insuline sur la capture du glucose est indépendante de PKB/Akt/AS160 *(5)*. L'effet insulino-sensibilisateur de l'AMPK sur la capture du glucose pourrait être dû à l'action de l'AMPK sur ces différents évènements *(6)*.

De nombreuses recherches *in vitro* étudient le « crosstalk » des voies de signalisation de l'AMPK et de l'insuline afin d'expliquer plus clairement comment l'activation de l'AMPK pourrait restaurer la sensibilité à l'insuline. Toutefois, la disparité des résultats en fonction de l'activateur de l'AMPK et du type cellulaire employé montre une fois de plus l'action tissu-spécifique de l'AMPK (**Tableau 3**).

Activateurs AMPK	AKT-P	mTORC1-P	Effets notables	Tissus/ lignées cellulaires	Références
Exercice	?	↘	↘ synthèse protéique	Muscle humain	Dreyer et al.2008
AICAR	?	↘	↘ synthèse protéique	Muscle souris	Deshmukh et al.2008
Adiponectine	?	↘	Amélioration sensibilité à l'insuline (↗IRS1)	C2C12 myotubes	Wang et al.2007
AICAR	↘	↘	↘ T246-PRAS40 = ↘ AKT = ↗TSC2 = ↘ mTORC1	Muscle rat	Pruznak et al.2008
Berbérine	↗	?	↗ p-IRS1 (Tyr) ↗ GLUT4 = Glucose uptake	L6 myotubes	Liu et al.2009
Metformine	↗	↗	La Metformine inhibe PTEN impliqué dans la résistance à l'insuline	3T3-L1 adipo	Lee et al.2011
Berbérine	↗	↘		3T3-L1 adipo	Chen et al.2010
Metformine	-	-	Effets synergiques avec insuline sur GLUT4	Adipocytes humains	Grisouard et al.2010
Metformine	↗	↘	Effet synergiques avec insuline et ↗IRS1	HepG2 (foie)	Tzatsos et al.2006

Tableau 3: Impact de l'activation de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline.

En outre, la régulation du métabolisme intestinal du glucose et des lipides est différente de celle des autres tissus tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux. En effet, l'intestin peut être assimilé à un gigantesque « filtre » pour les nutriments qui perd ses capacités en situation d'insulino-résistance. Une augmentation de l'absorption intestinale des lipides et du glucose explique l'apparition de désordres métaboliques tels que les dyslipidémies et l'hyperglycémie associées au diabète de type II. Dans cette optique, les recherches devraient cibler plus particulièrement le rôle de l'AMPK dans l'intestin qui demeure énigmatique.

1.6.5 Rôles émergeants de l'AMPK dans l'intestin

Très peu d'études ont exploré le rôle de l'AMPK dans l'intestin. A ce jour, les scientifiques ont investigué l'effet d'activateurs de l'AMPK sur l'absorption intestinale du glucose.

Des contradictions subsistent puisque certains auteurs ont démontré une réduction de l'absorption intestinale du glucose par des activateurs de l'AMPK tels que les biguanides (**Bolufer et Lasheras, 1975**; **Ikeda et al., 2000**; **Wilcock et Bailey, 1991**). D'autres suggèrent plutôt une augmentation de l'absorption du glucose et de son utilisation par les entérocytes en présence de ces agents anti-diabétiques (**Ait-Omar et al., 2011**; **Bailey et al., 1994**; **Walker et al., 2005**).

Des études plus récentes suggèrent que les activateurs AICAR et Metformine stimulent l'absorption intestinale du glucose par un mécanisme AMPK-dépendant permettant une redistribution des transporteurs du glucose dans la bordure en brosse des entérocytes ; soit une augmentation du GLUT2 et une diminution de SGLT1 (**Walker et al., 2005**). Krimi et al. ont également observé ces résultats chez des rats diabétiques (**Krimi et al., 2009**). Ait-Omar et al. ont noté que chez des souris *ob/ob* insulino-résistantes, la Metformine maintenait la présence de GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes tout en réduisant la glycémie (**Ait-Omar et al., 2011**). Ces résultats suggèrent que la Metformine pourrait augmenter l'utilisation du glucose par les entérocytes.

Actuellement, les données concernant le rôle de l'AMPK intestinale dans la régulation du métabolisme du glucose sont pauvres. Aucune étude n'a investigué son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique intestinal dans des conditions d'insulino-résistance alors que l'intestin contribue aux dyslipidémies diabétiques.

1.7 LES ACIDES GRAS POLYINSATURES

Les lipides alimentaires sont constitués d'une grande variété d'acides gras, notamment des acides gras polyinsaturés (AGPI) dits « essentiels » de la famille des omégas-3 et des omégas-6. En effet, l'organisme est incapable de synthétiser ces acides gras qui doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation. Depuis les années 1970, les AGPI suscitent beaucoup d'intérêt car les études montrent qu'ils sont associés à des effets bénéfiques dans certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II, le cancer, les troubles inflammatoires et les maladies neuro-dégénératives.

Cependant, les études observationnelles montrent que dans les régimes occidentaux, le ratio oméga-6 : oméga-3 est très élevé (15 :1). Il est associé à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires et inflammatoires. Une diminution de l'apport en oméga-6 en faveur des oméga-3 réduirait ces risques. En effet, les omégas-6 sont des précurseurs de l'acide arachidonique impliqué dans la synthèse de médiateurs inflammatoires, les prostaglandines. Au contraire, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) de la classe des omégas-3 par son action compétitive avec l'acide arachidonique, détient des propriétés anti-inflammatoires. Les omégas-3 sont également connus pour leurs effets anti-lipogéniques et insulino-sensibilisateurs (**Jelenik et al., 2010**). Etant donné leurs rôles bénéfiques sur la santé, la consommation d'oméga-3 est encouragée.

En France, les recommandations nutritionnelles de l'*ANSES* (*Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'environnement et du travail*) visent donc à accroître l'apport en omégas-3. Pour l'acide linoléique (LA) de la famille des omégas 6, l'apport nutritionnel conseillé (ANC) est de 4% de l'apport énergétique (AE) tandis que celui de l'acide α-linolénique (ALA) est de 1%. Ainsi l'*ANSES* recommande un apport alimentaire en AGPI n-6 / n-3 inférieur à 5 (**Tableau 4**)

Lipides totaux (% AET)		35-40 **%**
AG indispensables	Acide linoléique C18 : 2 n-6	4 **%**
	Acide α-linolénique C18 : 3 n-3	1 **%**
	Acide docosahexaénoïque **DHA**, C22 : 6 n-3	250 mg
AG non indispensable	Acide eicosapentaénoïque **EPA**, C20 : 5 n-3	250 mg

Tableau 4: Apports nutritionnels conseillés en AGPI pour un adulte (*ANSES*, 2011)

En Amérique du Nord, *Santé Canada* a établi les « Apports Nutritionnels de Référence » (ANREF) des AGPI pour lesquels la part des omégas-6 devrait être de 5 à 10% de l'énergie totale, tandis que celle des omégas-3 devrait être comprise entre 0,6 et 1,2%. *Santé Canada* recommande donc également un apport en AGPI dont le ratio n-6 / n-3 soit égale à 5 (**Tableau 5**).

Étendue des valeurs acceptables pour les macronutriments (ÉVA)

Hommes et femmes[34]	Glucides totaux	Protéines totales	Lipides totaux	Acides gras polyinsaturés n-6 (acide linoléique)	Acides gras polyinsaturés n-3 (acide a-linolénique)
	% de l'énergie	% de l'énergie	% de l'énergie	% de l'énergie	% de l'énergie[35]
1-3 ans	45 – 65 %	5 – 20 %	30 – 40 %	5 – 10 %	0,6 – 1,2 %
4-18 ans	45 – 65 %	10 – 30 %	25 – 35 %	5 – 10 %	0,6 – 1,2 %
19 ans et plus	45 – 65 %	10 – 35 %	20 – 35 %	5 – 10 %	0,6 – 1,2 %

[34] Y compris la grossesse et l'allaitement.
[35] On peut consommer jusqu'à 10 % de l'ÉVA sous forme d'acide eicosapentaénoïque (EPA) et /ou d'acide docosahexaénoïque (DHA).

Tableau 5: Etendue des valeurs acceptables pour les macronutriments (EVA) selon les ANREF de *Santé Canada.*

Ces apports doivent comprendre non seulement de l'ALA (C18 :3 n-3), mais aussi des AGPI à très longue chaîne tels que l'acide eicosapentaénoïque EPA (C20 :5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque DHA (C22 :6 n-3).

Aujourd'hui, les recommandations nutritionnelles préconisent toutes d'augmenter l'apport en AGPI, et plus particulièrement ceux de la famille des omégas-3. Toutefois, le risque d'oxydation des AGPI augmente d'autant plus que l'aliment en contient, ce qui

favorise l'apport en acides gras oxydés potentiellement toxiques, compte tenu de la réactivité des AGPI aux réactions d'oxydation. Il est vrai que l'odeur de rance dégagée par les lipides oxydés permet au consommateur de limiter leur ingestion. Néanmoins, les risques liés à une consommation en quantité faible mais régulière d'AGPI peroxydés, dans des aliments où l'odeur serait masquée, ou via des compléments alimentaires, sont encore très peu étudiés.

1.8 LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

Définition : La peroxydation lipidique est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes. La peroxydation lipidique est responsable du rancissement des aliments.

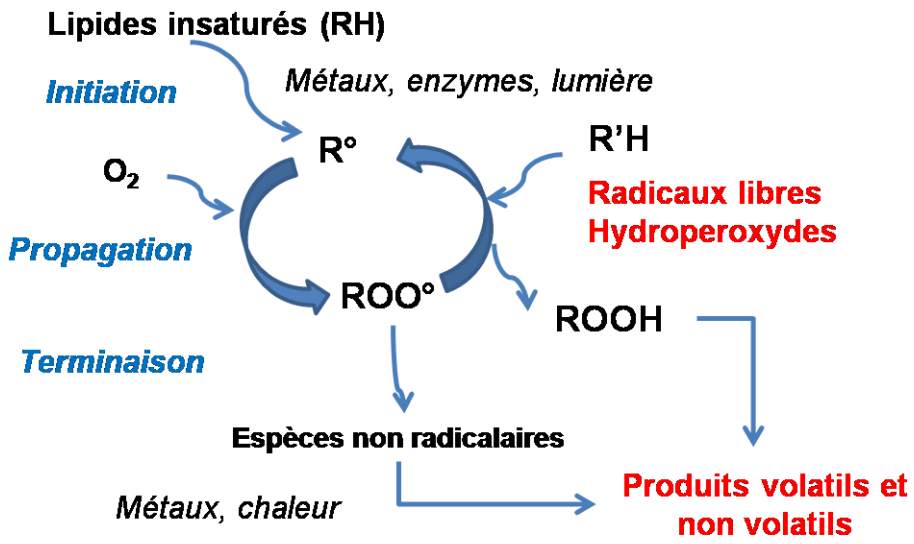
Il est bien admis que les acides gras les plus sensibles aux attaques radicalaires sont les AGPI. La peroxydation de ces AGPI est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est élevé (**Cosgrove et al., 1987**).

Le rancissement des lipides alimentaires est un réel problème car il est susceptible de se produire à tous les stades de l'industrialisation des aliments (transformation, conservation et utilisation des produits alimentaires) dès lors que les AGPI sont exposés à la lumière, en présence d'oxygène ou à des élévations de la température. Ce rancissement est responsable de la perte en vitamines et de la formation des produits toxiques issus de la peroxydation lipidique (peroxydes, aldéhydes etc.).

La peroxydation lipidique peut également avoir lieu *in vivo* où elle entraîne des dommages tissulaires et cellulaires liés à la formation de radicaux libres et de produits d'oxydation plus réactifs. Cette situation favorise le développement de nombreuses pathologies (cancer, diabète, maladies cardiovasculaires, Alzheimer et autres maladies inflammatoires).

L'oxydation des lipides est une réaction auto-catalytique. Les AGPI sont des cibles privilégiées des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) en raison de la présence de doubles liaisons non conjuguées et d'hydrogènes particulièrement labiles. L'oxydation est aussi favorisée par une élévation de la température, par la présence d'ions métalliques (Fe^{2+}, Fe^{3+} et Cu^{+}), d'hydroperoxydes préexistants, de systèmes enzymatiques produisant les ROS ou de catalyseurs enzymatiques (lipoxygénase) (**Cosgrove et al., 1987**).

Le mécanisme de péroxydation lipidique consiste en une réaction radicalaire en chaîne qui se déroule en 3 phases : initiation, propagation et terminaison (**Catala, 2009**; **Pre, 1991**) (**Figure 25**).



(**Genot et Michalski, 2010**)

Figure 25: Schéma décrivant le processus de l'oxydation des lipides

<u>Les produits d'oxydation des AGPI</u> :

Les hyperperoxydes formés dans l'étape de propagation sont instables. Ils peuvent se décomposer en de nouveaux radicaux libres provoquant des oxydations donnant naissance à des aldéhydes réactifs. Les principaux aldéhydes stables néoformés sont :

Le malondialdéhyde (**MDA**) qui est connu comme un biomarqueur de la peroxydation lipidique (**Mateos et al., 2005**).

Les 4-hydroxyalkénals :

- ✓ Le 4-hydroxynonénal (**4-HNE**) issu de la peroxydation des omégas-6 tels que l'acide arachidonique (AA) et l'acide linoléique (LA) et leurs métabolites issus de l'action de la 15-lipoxygenase : Acide 15-hydroperoxyeicosatétraénoïque (**15-HpETE**) et l'acide 13-hydroperoxyoctadecadiénoïque (**HpODE**), respectivement (**Porter et al., 1995**).

- ✓ Puis, le 4-hydroxyhéxénal (**4-HHE**) provenant de l'oxydation des omégas-3 : ALA, EPA et DHA(**van Kuijk et al., 1995**).
- ✓ Enfin, la 12-lipoxygénase de l'acide arachidonique participe à la formation du 12-hydroperoxyeicosatetraenoic (12-HpETE), puis du 4-hydroxy-2*E*, *6Z*, dodecadenial (**4-HDDE**).

1.9 LES 4-HYDROXYALKÉNALS

1.9.1 Formation

Les hydroperoxydes formés chimiquement ou enzymatiquement lors de la peroxydation lipidique *in vivo* sont normalement réduits en acides gras monohydroxylés par les glutathion peroxydases. En situation de stress oxydant, l'activité de ces enzymes est diminuée. Par conséquent, la durée de vie des hydroperoxydes augmente. Ces molécules instables se dégradent et donnent naissance à divers composés dont les aldéhydes. Ils peuvent franchir les membranes et gagner d'autres compartiments en agissant comme des « seconds messagers toxiques » de la peroxydation lipidique (**Esterbauer et al., 1991**; **Esterbauer et Zollner, 1989**; **Uchida et al., 1999**).

La peroxydation lipidique des AGPI de la série n-3 aboutissent à la formation du 4-HHE, tandis que celle des AGPI de la série n-6 aboutissent à la formation du 4-HNE (**Figure 26)**.

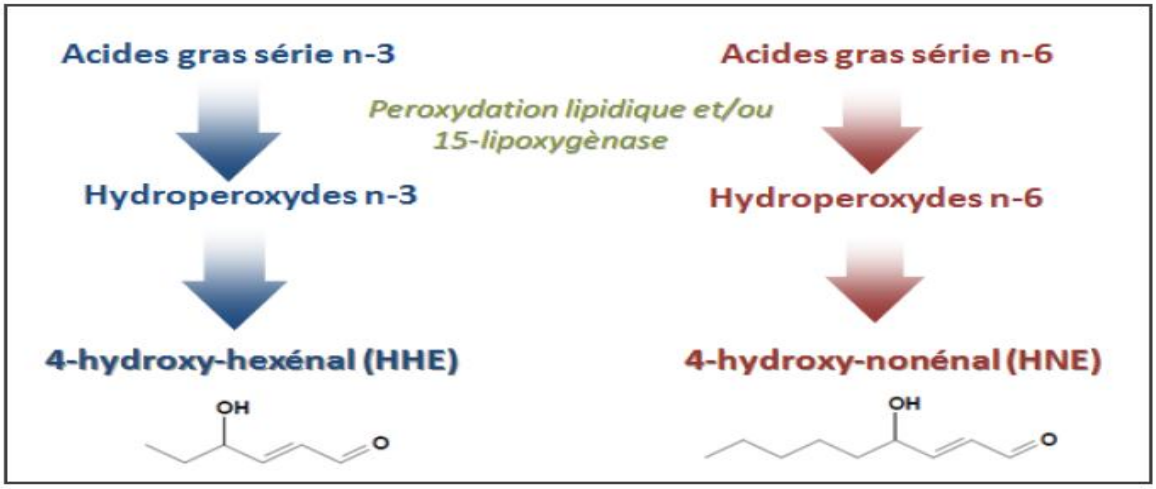


Figure 26: Les 4-hydroxyalkénals sont des produits secondaires de l'oxydation des acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 très réactifs.

1.9.2 Structure

Les 4-hydroxyalkénals ont en commun une chaîne carbonée de longueur variable comportant une double liaison entre les carbones 2 et 3. Ils sont caractérisés par la présence d'un groupement aldéhydique porté sur le carbone 1 et par un groupement hydroxyle présent sur le carbone 4.

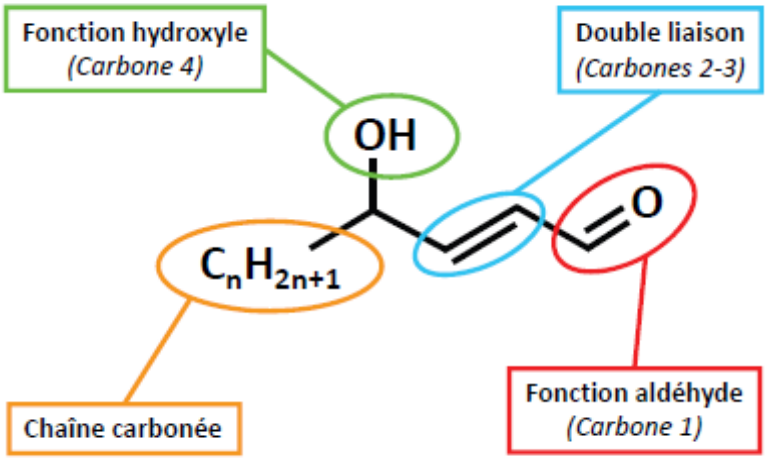


Figure 27 : Structure chimique générale des 4-hydroxyalkénals

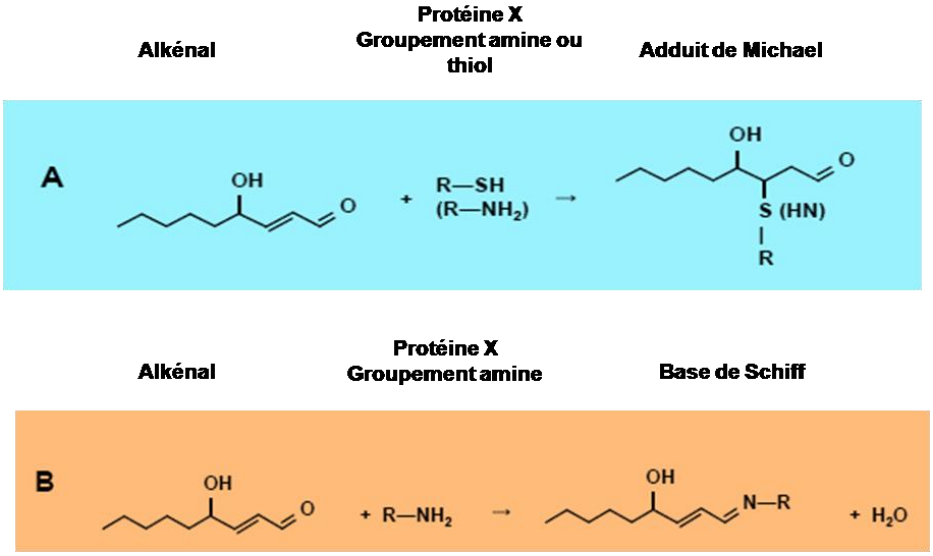
Ils diffèrent entre eux uniquement par la longueur de leur chaîne carbonée. Le 4-HHE possède une chaîne carbonée comportant 6 carbones tandis que celle du 4-HNE en possède 9 (**Figure 27)**. Cette structure particulière confère aux 4-hydroxyalkénals une grande réactivité chimique envers de nombreuses molécules biologiques (ADN, protéines, glutathion, phospholipides).

1.9.3 Réactivité

Les 4-hydroxyalkénals sont des molécules très réactives qui sont capables de former des adduits covalents sur les molécules biologiques, exerçant de cette façon leurs effets biologiques et toxiques (**Petersen et Doorn, 2004**; **Sayre et al., 2006**).

Interaction avec les groupements thiols : Le glutathion réduit (GSH) est une cible majeure des 4-hydroxyalkénals du fait de son groupement thiol (**Esterbauer et al., 1991**; **Long et al., 2010**). En réagissant avec le GSH, le 4-HNE et le 4-HHE forment un adduit de Michael par attaque de son groupement nucléophile au niveau de la double liaison des aldéhydes (**Figure**

28A). Cette réaction d'addition contribue ainsi à la détoxification du 4-HNE et du 4-HHE lorsque les concentrations en GSH sont suffisamment importantes (**Bacot et al., 2007**; **Guichardant et al., 1998**; **Long et al., 2010**).



D'après **Poli et al. 2008**

Figure 28 : Mécanisme d'adduction par les 4-hydroxyalkénals. A. Addition de Michael entre la double liaison 2-3 du HNE et le groupement amine ou thiol d'une molécule. B. Formation d'une base de Schiff entre la fonction carbonyle du HNE et le groupement amine d'une molécule.

Interactions avec les groupements amines primaires : Les aldéhydes réagissent avec les groupements amines présents dans les protéines, les acides nucléiques et les phospholipides aminés. La réaction entre un groupement amine et le groupement carbonyle de l'aldéhyde aboutit à la formation de bases de Schiff (**Figure 28B**) (**Schaur, 2003**).

1.9.4 Métabolisme

Il a été montré que les composés peroxydés apportés par le bol alimentaire peuvent s'accumuler dans la lumière intestinale et contribuer au développement des désordres intestinaux chroniques (**Kanazawa et Ashida, 1998b**). En outre, ces composés toxiques peuvent traverser la barrière intestinale et être acheminés par les chylomicrons dans la circulation sanguine (**Wilson et al., 2002**). De même, chez le rat, la consommation d'aldéhydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique aboutit à une lente absorption intestinale et à l'accumulation hépatique de ces différents produits d'oxydation dont le 4-HNE

(**Kanazawa et Ashida, 1998a**). Les 4-hydroxyalkénals sont métabolisés au niveau du foie en différents métabolites. Chez l'homme, ils sont convertis en acides carboxyliques sécrétés dans les urines. Les principales enzymes impliquées dans le métabolisme du 4-HNE sont les glutathion (GSH) transférases, les aldéhydes déshydrogénases et les alcools déshydrogénases. Dans les hépatocytes et la mitochondrie, les métabolites principaux du 4-HNE seraient le GSH conjugué, l'acide carboxylique correspondant, l'acide 4-hydroxy-2-nonénoïque et l'alcool correspondant, le 1,4-dihydroxynonène (DHN). Le 4-HHE est également métabolisé par la GSH transférase en un acide moins réactif, l'acide 4-hydroxy-héxénoique (4-HHA) ou par l'aldéhyde déshydrogénase. Ces acides urinaires peuvent être mesurés par GC-MS sous forme de dérivés pentafuorobenzyl et heptafluorobenzyl esters (**Guichardant et al., 2006**).

1.9.5 Dosages plasmatiques et cellulaires

En situation normale, la concentration plasmatique du 4-HNE varie entre 0,2nM et 10µM (**Tableau 6**). Ces différences de concentration d'un auteur à l'autre s'expliquent probablement par la méthode de dosage utilisée (GCMS, LCMS…) et par la difficulté à mesurer ces composés très réactifs. Cependant, en situations pathologiques (Alzheimer, dépression…), cette concentration est multipliée par 2 ou 3 (**Tableau 6**). Concernant le niveau plasmatique du 4-HHE, il est 2 à 3 fois plus élevé que celui du 4-HNE (**Guichardant et al., 2006**).

Sujets sains	Concentrations normales	Pathologies	Concentration pathologique	Références
Volontaires sains	0,5 à 3 µM	-	-	Strohmaier et al.1995
	0,2 nM	Syndrome de détresse respiratoire	0,5 nM	Quinlan et al.1996
	65 nM	Lupus érythémateux systémique	162 nM	Grune et al.1997
	0,57 µM	Dépression majeure	0,86 µM	Selley et al.2004
	7,8 µM	Maladie d'Alzheimer	20,7 µM	McGrath et al.2001
	11 µM	Asbetoses/Silicoses	13 µM	Syslova et al.2009

Tableau 6: Concentration plasmatique du 4-HNE libre

Le 4-HNE peut s'accumuler également dans les membranes cellulaires à des concentrations comprises entre 10 et 20uM en réponse à des dommages oxydatifs (**Esterbauer et al., 1991**; **Esterbauer et Zollner, 1989**; **Uchida et al., 1999**). Par exemple, les LDL oxydées peuvent présenter des concentrations de 4-HNE de l'ordre de 1,48mM et celle de 4-HHE autour de

0,19mM (**Esterbauer et al., 1987**). A l'heure actuelle, les concentrations physiopathologiques du 4-HHE ne sont pas connues.

1.9.6 Cytotoxicité

Les 4-hydroxyalkénals, molécules extrêmement réactives, ont une durée de vie plus longue que les radicaux libres, ce qui les rend beaucoup plus toxiques. Cette toxicité réside surtout par leur capacité à former des adduits protéiques avec d'autres molécules (cf. chapitre 1.9.3 Réactivité). Cependant, le 4-HHE est considéré comme une molécule physiologiquement moins active et moins toxique que le 4-HNE du fait de son faible caractère lipophile et de sa moindre réactivité chimique. Les études ont montré que sur certains types cellulaires (neurones (**Ishimura et al., 2008**), cellules épithéliales du cristallin, cellules vasculaires endothéliales (**Choudhary et al., 2002**), chondrocytes (**Vaillancourt et al., 2008**), le 4-HNE et le 4-HHE peuvent réduire la viabilité cellulaire dès 20 µM pour les cellules les plus sensibles. En effet, ces molécules sont capables d'activer les voies des caspases favorisant l'entrée en apoptose des cellules (**Vaillancourt et al., 2008**).

1.9.7 Signalisation cellulaire

Les 4-hydroxyalkénals ne sont pas toujours considérés comme des composés cytotoxiques. De nombreux chercheurs ont montré que le 4-HNE était plutôt un second messager dans la signalisation cellulaire plutôt qu'un produit toxique de la peroxydation lipidique. En effet, le 4-HNE semble moduler les voies de signalisation cellulaire et l'expression de certains gènes (**Awasthi et al., 2005**). A faibles concentrations, le 4-HNE est capable de stimuler la prolifération des lignées de cellules musculaires en activant la voie de signalisation ERK (**Awasthi et al., 2003**). En revanche, le 4-HNE semble exercer une activité anti-carcinogénique sur les cellules intestinales Caco-2 en inhibant l'activité de la télomérase (**Pizzimenti et al., 2010**). D'autres chercheurs rapportent des effets protecteurs contre le stress oxydant en réponse au 4-HNE puisqu'il active le facteur de transcription Nrf2 aboutissant à la synthèse d'ARNm de certaines enzymes anti-oxydantes (**Niki, 2009**). A ce jour, les effets des AGPI oxydés et de leurs produits d'oxydation sur les cellules intestinales *in vitro* ont très peu été étudiés jusqu'à présent. Il semblerait que les huiles oxydées créent un stress oxydant dans les cellules intestinales Caco-2, réduisant ainsi la viabilité cellulaire et induisant l'apoptose (**Alghazeer et al., 2008**).

1.9.8 Le 4-HHE et l'alimentation

Les industries agro-alimentaires sont concernées par ce risque de peroxydation lipidique de leurs produits, notamment des AGPI de la classe des omégas-3. En effet, les recommandations nutritionnelles encouragent la consommation d'omégas-3, ce qui pousse les industries à supplémenter avec de l'EPA ou du DHA les produits alimentaires tels que les œufs, les formules infantiles ou même les poissons naturellement riches en omégas-3.

Calzada et ses collègues utilisent les niveaux plasmatiques de 4-HHE comme un indicateur du taux d'oxydation du DHA supplémenté lors d'une étude clinique. Les résultats indiquent que le niveau plasmatique de 4-HHE est élevé après une supplémentation de DHA de 800mg/jour ou de 1600mg/jour. De plus, le niveau de 4-HHE comprend 0,01% de DHA plasmatique (**Calzada et al., 2010**). Les études de Michalski et de ses collègues indiquent que le ratio 4-HHE : AGPI n-3 est plus bas dans le lait maternel que dans les formules de lait commerciales (**Michalski et al., 2008**). Cependant, le ratio HHE : AGPI n-3 était plus élevé que le ratio HNE : AGPI n-6 à la fois dans le lait maternel et dans les formules de lait. Surh et al. ont également montré la présence de 4-HNE et de 4-HHE dans les formules de lait pour enfant (**Surh et al., 2007**). Grune et al. ont enrichi en omégas-3 des œufs de poule en supplémentant l'alimentation de ces poules avec du DHA (**Grune et al., 2001**). Cet enrichissement conduit malheureusement à une augmentation du 4-HHE dans les œufs. Une supplémentation en vitamine E antioxydante permet de prévenir l'apparition de 4-HHE issu de la peroxydation du DHA.

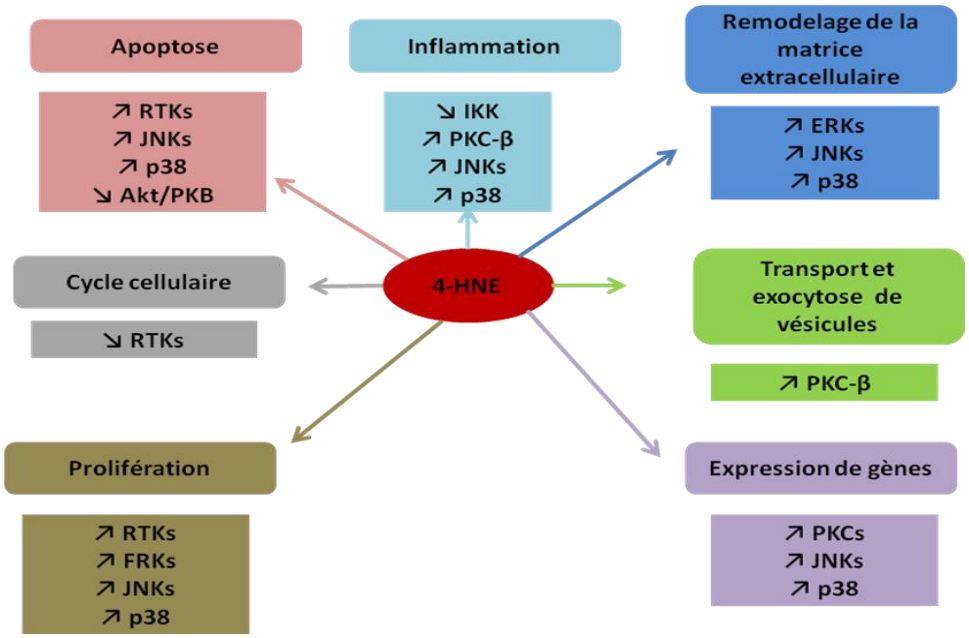
Ces études prouvent donc que l'oxydation des AGPI n-3 est présente dans les aliments que nous consommons et leur métabolisation entraîne une élévation du taux plasmatique de 4-HHE potentiellement toxique. Néanmoins, il n'existe pas assez de données aujourd'hui pour déterminer l'étendue de l'oxydation des AGPI n-3 plasmatiques modifiée par une consommation élevée en AGPI n-3, et si ces changements sont associés à des effets positifs ou négatifs sur la santé. Il est donc indispensable d'approfondir les études pour une meilleure compréhension des mécanismes de prévention d'oxydation des AGPI n-3 dans les produits alimentaires qui en sont enrichis, ainsi que les mécanismes responsables de la peroxydation lipidique *in vivo* des AGPI n-3 suivant leur consommation.

1.10 IMPLICATION DES 4-HYDROXYALKÉNALS DANS LES MALADIES MÉTABOLIQUES

Le 4-HNE et le 4-HHE sont reconnus comme des marqueurs du stress oxydant *in vivo* et *in vitro* (**Esterbauer et al., 1991**). Ils témoignent ainsi d'une peroxydation lipidique spécifique des AGPI des séries n-6 ou n-3 (**Yamada et al., 2004**). De plus en plus d'études montrent l'implication des 4-hydroxyalkénals dans le développement des maladies métaboliques telles que l'obésité, l'insulino-résistance et le diabète de type II, des pathologies intimement liées au stress oxydatif et à l'inflammation (**Bondia-Pons et al., 2012**).

1.10.1 Stress oxydatif et inflammation

Le 4-HNE : De nombreuses études ont montré que le 4-HNE induit une activation des voies de stress p38, JNK et ERK (**Uchida et al., 1999**) et des voies inflammatoires NF-κB et cyclo-oxygénases (**Ruef et al., 2001**; **Uchida et al., 1999**). Le 4-HNE possède alors d'importants effets sur les mécanismes d'apoptose/survie/prolifération cellulaire ainsi que sur les mécanismes inflammatoires, le transport vésiculaire (PKCβ) et l'expression de certains gènes (PKC, JNK, p38) (**Leonarduzzi et al., 2004**) (**Figure 29**).



Adapté de **Leonarduzzi et al.2004**

Figure 29: Effets biologiques et voies de signalisation activées par le 4-HNE

Le 4-HHE : Du fait de son caractère moins toxique que le 4-HNE, les effets du 4-HHE sur la signalisation cellulaire ont beaucoup moins été investigués à ce jour. Comme le 4-HNE, le 4-HHE serait impliqué dans le développement de l'inflammation des cellules endothéliales en activant le facteur de transcription NF-κB (**Lee et al., 2004b**) et iNOS (inductible nitric oxide synthase) (**Lee et al., 2004a**). Cette inflammation serait associée à la formation de ROS (espèces réactives d'oxygène) et RNS (espèces réactives du nitrogène) par le 4-HHE. Je et al. ont constaté une activation des voies de stress ERK et p38 MAPK (**Je et al., 2004**) tandis que d'autres ont observé une activation de la phospholipase C (PLC) par le 4-HHE (**Rossi et al., 1990**), la PLC étant connue pour activer de nombreuses autres voies dont la PKC. D'autres chercheurs ont montré l'implication du 4-HHE dans l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Il en résulte des perturbations de l'homéostasie calcique qui aboutissent à l'apoptose (**Kristal et al., 1996**).

Les 4-hydroxyalkénals seraient aussi impliqués dans la progression de la maladie d'Alzheimer probablement du fait de leur propriété inflammatoire (**Wyss-Coray et Rogers, 2012**). En effet, il a été montré que le 4-HNE pouvait former des adduits avec les protéines de l'hippocampe et d'autres régions du cerveau (**Bradley et al., 2010**).

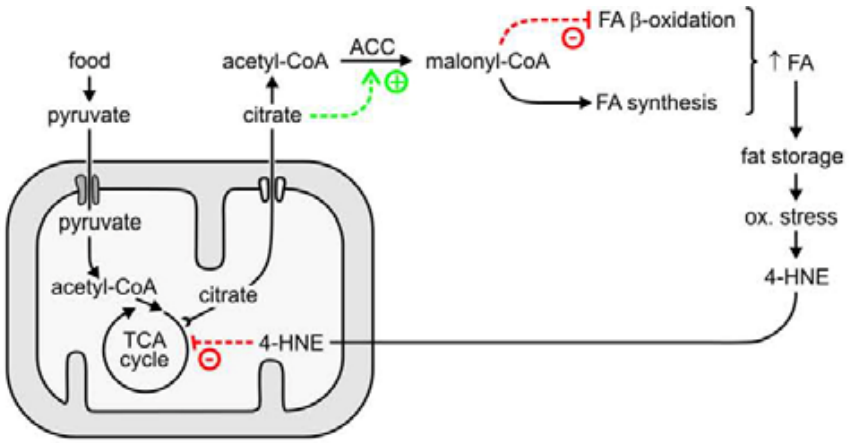
1.10.2 Obésité, insulino-résistance et diabète de type II

Il est connu que le stress oxydatif et l'inflammation dite « de bas grade » sont associés à l'obésité et au diabète de type II (**Bondia-Pons et al., 2012**). En effet, l'accumulation excessive de graisses conduit à une inflammation chronique caractérisée par le recrutement de macrophages au niveau du tissu adipeux. En ce sens, les chercheurs se sont intéressés aux effets des 4-hydroxyalkénals sur le métabolisme lipidique et glucidique en situation normale ou physiopathologique.

Tout d'abord, le niveau plasmatique du 4-HNE ainsi que dans les cellules musculaires et adipeuses est plus élevé chez les sujets obèses que chez les sujets sains. Cela s'expliquerait par une réduction de l'activité de l'enzyme antioxydante glutathione S-transferase A4 (GSTA4) (**Grimsrud et al., 2007**). Chez des souris transgéniques, l'invalidation génique de la GSTA4 est responsable d'une accumulation de 4-HNE dans les tissus parallèlement au développement de l'obésité précédant l'insulino-résistance (**Singh et al., 2008**). De plus, des

souris obèses présentaient 2 à 3 fois plus de protéines carbonylées que les souris saines (**Grimsrud et al., 2007**). Il se pourrait donc que le 4-HNE puisse altérer d'importantes protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et la réponse inflammatoire (**Grimsrud et al., 2007**; **Russell et al., 2003**; **Soares et al., 2005**). En effet, dans les cellules adipocytaires 3T3-L1, le 4-HNE est capable d'induire la phosphorylation de la p38 MAPK ainsi que l'expression génique et protéique de la cyclooxygénase 2 (COX2) impliquée dans la réponse inflammatoire (**Soares et al., 2005**). En outre, l'augmentation de la phosphorylation de la p38 MAPK est connue pour être un marqueur de l'insulino-résistance (**Liu et Cao, 2009**). De même, l'accumulation de triglycérides intra-musculaires est un marqueur de résistance à l'insuline (**Shaw et al., 2010**). Russel et al. ont établi une association positive entre le niveau de peroxydation des triglycérides intra-musculaires et l'obésité (**Russell et al., 2003**). En ce sens, il est possible que la peroxydation lipidique dans le muscle favorise le développement de l'IR. Enfin, la FABP (Fatty Acid Binding Protein) du tissu adipeux, une protéine jouant un rôle majeur dans la régulation de l'insulino-résistance, était carbonylée, réduisant ainsi l'affinité pour les lipides et probablement responsable de la lipotoxicité (**Grimsrud et al., 2007**; **Krusinova et Pelikanova, 2008**).

Chez les souris invalidées pour l'enzyme GSTA4 de détoxification du 4-HNE, l'expression génique de l'ACC, l'enzyme de synthèse des acides gras, était fortement augmentée ayant pour conséquence une élévation du niveau de malonyl-CoA dans le tissu adipeux (**Singh et al., 2008**). De même, chez le nématode C. *elegans*, la présence de 4-HNE induisait l'accumulation de lipides probablement à cause de la formation d'adduits protéiques (**Singh et al., 2009**). Le mécanisme met en jeu l'augmentation de l'activité de l'ACC et par conséquent des niveaux de malonyl-CoA. Cela induit une augmentation de la synthèse des acides gras et/ou une réduction de la β-oxydation. Cette induction de lipogenèse serait liée au blocage du cycle de Krebs par le 4-HNE puisque l'activité de l'aconitase était réduite (**Singh et al., 2009**). Il en résulte une accumulation du citrate qui stimule la voie de l'ACC et la formation de malonyl-CoA. Un rétrocontrôle positif par le 4-HNE pourrait avoir lieu étant donné la corrélation positive entre l'accumulation d'acides gras et la peroxydation lipidique générant les 4-hydroxyalkénals (**Figure 30**). Cette hypothèse placerait alors le 4-HNE non seulement en amont mais aussi en aval de l'accumulation lipidique du fait de ce feed-back positif.



(**Singh et al. 2008**)

Figure 30 : Schéma représentant le mécanisme d'action potentiel du 4-HNE dans l'accumulation de lipides. Le 4-HNE pourrait bloquer le cycle de Krebs (TCA cycle), ce qui entraîne une accumulation de citrate qui stimule la voie de l'ACC et la production de malonyl-CoA. La synthèse d'acides gras augmente tandis que leur oxydation diminue. Ceci favorise le stockage des acides gras susceptible d'être oxydés et former du 4-HHE qui exacerbe le processus.

Enfin, l'association entre les 4-hydroxyalkénals et l'apparition du syndrome métabolique s'est renforcée par des études *in vitro* montrant leurs effets délétères sur la voie de signalisation de l'insuline. De part leur effet pro-oxydant et la formation d'adduits protéiques, les 4-hydroxyalkénals réduisent la sensibilité à l'insuline et la capture du glucose de manière dose-dépendante (**Pillon et al., 2009**; **Pillon et al., 2010**; **Pillon et al., 2012**). En effet, la phosphorylation de la sérine 473 de la protéine kinase B (Akt) était altérée. Cette insulino-résistance est probablement liée à l'activation des voies de stress des MAPK, à savoir ERK, JNK et p38 MAPK qui induisent un feed-back négatif sur l'IRS1 (réduction de la p-Tyr IRS1). Quoique Liu et ses collègues aient montré une activation de la protéine phosphatase 2A (PP2A) par le 4-HNE, protéine impliquée dans l'arrêt du signal de l'insuline en déphosphorylant la sérine 473 de l'Akt (**Liu et al., 2003**), d'autres investigateurs ont souligné la capacité du 4-HNE à réduire substantiellement (87%) l'activité de l'Akt2 (**Shearn et al., 2011**). Cette inhibition serait liée à la carbonylation de l'isoforme 2 de l'Akt par le 4-HNE. L'ajout d'antioxydant permet de neutraliser les effets du 4-HNE (**Pillon et al., 2012**).

1.10.3 L'AMPK et les 4-hydroxyalkénals

Plusieurs études indiquent que l'obésité et la résistance à l'insuline sont associées à la suppression de l'activité de l'AMPK dans certains tissus (cf. chapitre 1.6). La réactivation de l'AMPK pourrait contrecarrer les effets négatifs du stress oxydatif relié à ces maladies métaboliques (**Ceolotto et al., 2007**). L'équipe de Chang et al. a montré que le resvératrol, un polyphénol retrouvé dans certains fruits tels que le raisin rouge, amoindrit le stress oxydatif (↓ anion superoxyde et protéines carbonylées) chez des souris diabétiques de type II par un mécanisme AMPK-dépendant (**Chang et al., 2011**).

Il a été montré que le 4-HNE pouvait inhiber l'activité de l'AMPK (**Dolinsky et al., 2009**) et de l'AKT (**Liu et al., 2003**) altérant ainsi le « crosstalk » LKB1/AMPK- Akt/mTOR. Le suppresseur de tumeur LKB1 est aussi connu pour activer PTEN (**Mehenni et al., 2005**) qui, lui-même, supprime l'activité de l'Akt afin de restreindre mTOR impliqué dans la stimulation de la prolifération cellulaire. Dolinski et al. ont montré la formation d'adduits covalents 4-HNE-LKB1 (**Ma et al., 2011**). Cette adduction expliquerait l'altération de l'activité de LKB1 avec les répercussions sur PTEN (**Ma et al., 2011**), AMPK et Akt. Par contre, le resvératrol est capable d'inverser les effets du 4-HNE par un mécanisme AMPK-dépendant. En résumé, le 4-HNE pourrait donc avoir un potentiel effet délétère au niveau du « crosstalk » LKB1/AMPK/mTOR et AKT/mTOR.

Conclusion : Explorer d'avantage les effets délétères des AGPI oxydés sur la santé semble indispensable aujourd'hui pour en comprendre les mécanismes sous-jacents, trouver les agents neutralisants et sensibiliser les autorités et les industries pour prendre les mesures nécessaires. Le plus important serait de réduire le risque d'oxydation des AGPI dans les produits et les compléments alimentaires.

CHAPITRE 2
PROBLEMATIQUE

Le rôle de l'AMPK comme cible thérapeutique de l'insulino-résistance et du DT2 a été largement étudié au niveau du foie, du muscle squelettique et du tissu adipeux. Cependant, aucune recherche n'a exploré la fonction de l'AMPK dans l'intestin grêle, un organe pourtant intimement lié aux désordres métaboliques tels que l'hyperglycémie et les dyslipidémies diabétiques (**Zoltowska et al., 2003**).

A la lumière des connaissances actuelles, nous pouvons postuler que :

- ✓ L'intestin serait doté d'un complexe AMPK pourvu d'une signature hétérotrimérique spécifique, et dont l'activité est soumise à une fine régulation.

- ✓ L'insulino-résistance (IR) et le DT2 pourraient altérer significativement l'expression de l'AMPK ; sa phosphorylation/son activité, sa fonction physiologique et sa régulation dans le petit intestin.

- ✓ Réciproquement, le dysfonctionnement de l'AMPK affecterait la signalisation de l'insuline dans l'entérocyte.

- ✓ La perturbation de l'AMPK pourrait induire une incapacité de l'épithélium intestinal à réguler la β-oxydation des acides gras et la synthèse lipidique, conduisant ainsi à l'augmentation du contenu lipidique des tissus, à la surproduction de lipoprotéines grâce à l'induction de protéines clés comme le Sar1b GTPase, et à l'hyperlipidémie en cas d'IR et de DT2.

- ✓ L'AMPK pourrait représenter une cible potentielle dans l'intestin pour le traitement du diabète.

Par ailleurs, de nombreuses études ont impliqué les 4-hydroxyalkénals tels que le 4-HHE, issus de l'oxydation des omégas 3, dans l'apparition de désordres métaboliques. Face

aux recommandations nutritionnelles visant à augmenter l'apport en oméga 3 se posent les problèmes de conservation et d'oxydation de ces acides gras polyinsaturés. Il semble indispensable d'évaluer le potentiel néfaste du 4-HHE sur la santé, en l'occurrence sur la sensibilité à l'insuline.

- ✓ Nous émettons l'hypothèse que le 4-HHE pourrait induire une insulino-résistance (IR) dans les cellules intestinales.

- ✓ Cette induction d'IR par le 4-HHE entraînerait une altération de l'AMPK associée à une augmentation de l'absorption intestinale du glucose et une stimulation de la lipogenèse *de novo*.

- ✓ Une activation pharmacologique de l'AMPK pourrait restaurer la sensibilité à l'insuline.

La **Figure 31** résume les hypothèses de notre étude.

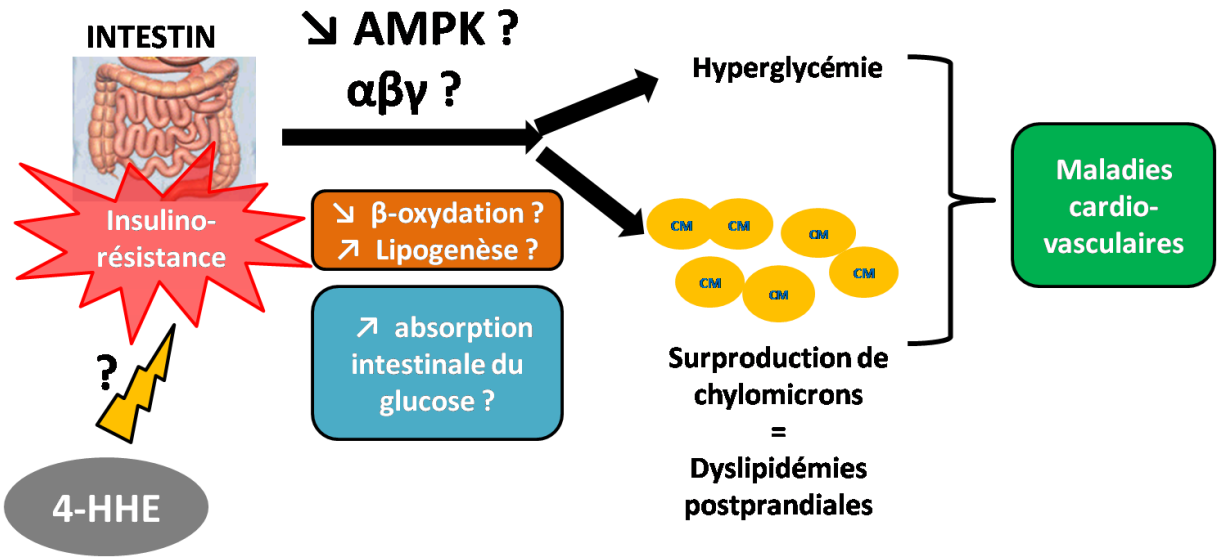


Figure 31: Problématique de l'étude : Quel est le rôle de l'AMPK dans l'intestin ? Son altération est-elle associée à l'insulino-résistance ? Peut-elle contribuer aux désordres métaboliques associés au diabète de type II ?

CHAPITRE 3
OBJECTIFS

Pour tenter de répondre à certaines des hypothèses mentionnées précédemment, et pour avoir une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du métabolisme énergétique dans l'entérocyte, les aspects suivants seront évalués :

1. La structure du complexe hétérotrimérique (α, β, γ), la régulation de l'AMPK intestinale et son rôle dans la régulation de la lipogenèse ;

2. L'interaction des voies de signalisation de l'insuline et de l'AMPK sur la régulation de l'absorption intestinale du glucose et la lipogenèse;

3. L'effet du 4-HHE sur la sensibilité à l'insuline intestinale et l'impact d'une résistance à l'insuline sur l'activité de l'AMPK en association avec l'absorption intestinale du glucose et la lipogenèse.

CHAPITRE 4
MATERIELS ET METHODES

4.1 LES LIGNÉES CELLULAIRES INTESTINALES CACO-2

Afin de travailler *in vitro* sur la problématique du rôle de l'AMPK dans l'absorption intestinale du glucose et des 4-hydroxyalkénals, il est important de choisir un modèle d'épithélium cellulaire fiable et similaire à celui de l'intestin humain.

Les cellules Caco-2 sont des cellules épithéliales humaines dérivées d'un adénocarcinome colorectal (**Fogh et al., 1977**). Elles représentent un excellent modèle intestinal puisqu'elles ont la particularité de former des jonctions serrées, de présenter une bordure en brosse, de se différencier et d'acquérir les propriétés physiologiques de l'intestin grêle (**Figure 32)**. Elles ont également la capacité d'absorber des xénobiotiques, de produire et de sécréter des apolipoprotéines et des lipoprotéines (**Levy et al., 1995**).

Les cellules Caco-2 sont ensemencées sur un support poreux où elles forment une monocouche polarisée qui délimite le compartiment apical mimant la lumière intestinale in vivo et le compartiment basal qui mime la circulation sanguine (**Figure 34**). Après confluence, ces cellules se différencient spontanément pendant environ 21 jours jusqu'à acquérir toutes les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes (**Jumarie et Malo, 1991**).

En outre, les cellules Caco-2 expriment à leur surface de nombreuses protéines impliquées dans l'absorption et le transport des nutriments comme celles retrouvées dans les entérocytes humains différenciés. En effet, elles présentent des systèmes de transport du glucose dépendant du Na^+ ou non : SGLT et GLUT (**Blais et al., 1987**; **Zheng et al., 2012**) ainsi que le récepteur du goût sucré T1R2/3 (**Le et al., 2007**), qui joue un rôle dans le mécanisme de régulation de l'absorption intestinale du glucose.

Elles expriment aussi des systèmes de transport couplés au H+ pour les peptides, les acides aminés, les acides biliaires et les protéines d'efflux (**Inui et al., 1992**; **Thwaites et al., 1993**). Des peptidases, des enzymes anti-oxydantes (glutathion peroxydase, glutathion réductase, catalase, superoxyde dismutase etc.) et des cytochromes P450 sont également exprimés dans les cellules Caco-2. Toutefois, leur activité augmente seulement lorsque les

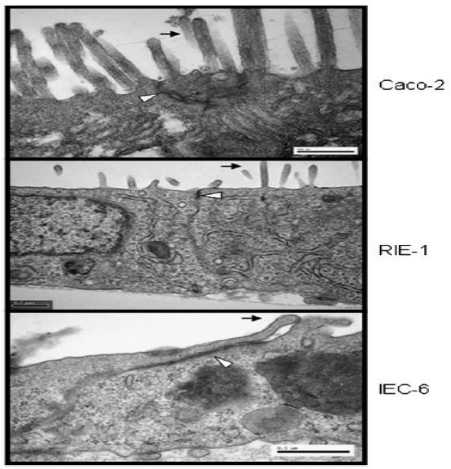
cellules sont confluentes. Ce qui explique la capacité des cellules différenciées à lutter contre un éventuel stress oxydant.

Pour ces raisons, les cellules Caco-2 apparaissent comme un modèle cellulaire fiable pour réaliser des études sur l'absorption intestinale de nutriments, leur métabolisation et la sécrétion des lipides sous forme de chylomicrons.

Cependant, les cellules Caco-2 constituent une population hétérogène de cellules, instables et plurinucléées, hautement dépendante des conditions de culture. Leurs phénotypes peuvent varier quant à l'expression de certaines enzymes (sucrase-isomaltase, phosphatase alcaline etc.) et de certains transporteurs membranaires (P-gp, permeability glycoprotein), modifiant ainsi les capacités d'absorption de ce modèle.

Afin de réduire cette variabilité, des clones ont été isolés à partir de la lignée parentale de cellules Caco-2. Cette sélection permet d'obtenir des lignées cellulaires homogènes possédant des propriétés bien précises et reproductibles : Caco-2/15, Caco-2/TC7, Caco-2/AQ, Caco-2/ATCC.

Au final, toutes ces caractéristiques morphologiques et biochimiques permettent de qualifier les Caco-2/15 et Caco-2/TC7 comme des clones hautement différenciés constituant un matériel issu d'intestin humain pour les études prédictives d'absorption et de métabolisation intestinale *in vitro* (**Sambuy et al., 2005**).



D'après **Zheng et al.2012**

Figure 32 : Microscopie électronique à transmission des lignées cellulaires intestinales Caco-2, RIE-1 et IEC-6. Les cellules ont été amenées à différentiation pendant 15 jours (Caco-2) ou 10 jours (RIE-1 et IEC-6) sur une membrane Aclar® après confluence. Les cellules comportent des jonctions serrées (flèches blanches) et des microvillosités (flèches noires) à leur surface apicale, témoignant alors d'une différentiation complète des cellules comme les entérocytes. (Bar = 0,5µm). La lignée cellulaire Caco-2 se rapproche le mieux des entérocytes puisqu'elle forme de nombreuses microvillosités par rapport aux lignées RIE-1 et IEC-6 (**Zheng et al., 2012**).

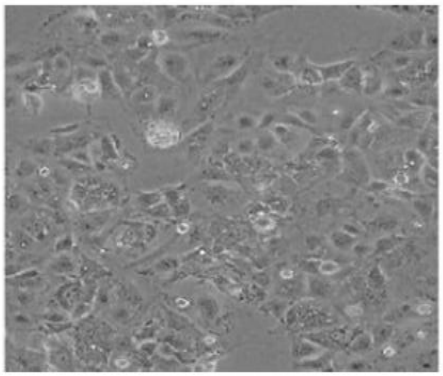


Figure 33 : Monocouche de cellules Caco-2 observée au microscope optique inverse.

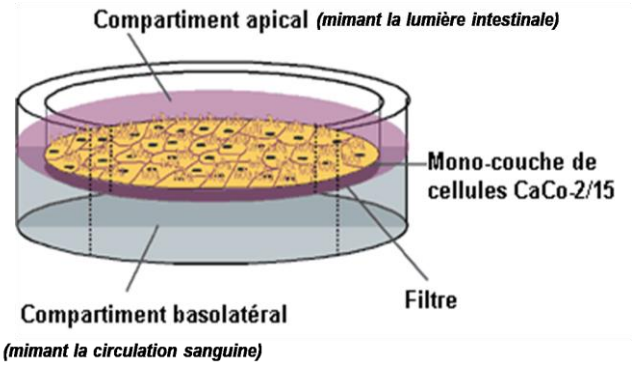


Figure 34 : Schéma expérimental des Caco-2 sur insert.

4.2 LA CULTURE CELLULAIRE

Pour s'assurer que les résultats soient spécifiques aux entérocytes et qu'ils soient reproductibles d'un clone cellulaire à un autre, les cellules Caco-2/15 et Caco-2/TC7 ont été utilisées. Le clone cellulaire utilisé pour les différentes expériences est indiqué dans la légende des figures.

4.2.1 Cellules intestinales Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 (*American Type Culture Collection, Rockville, MD*) est un clone de la lignée cellulaire parentale Caco-2 (*HTB37; American Type Culture Collection, Manassas, VA*). Ce clone a été hautement caractérisé et à l'origine, il a été sélectionné pour son niveau élevé d'expression de la sucrase-isomaltase parmi 16 clones obtenus par clonage randomisé. Les cellules Caco-2/15 sont cultivées en présence de 5% de CO2 dans du milieu essentiel minimum MEM (*GIBCO-BRL, Grand Island, NY*) à 5mM de glucose contenant 1% de pénicilline/streptomycine (concentration finale : 100U/100µg/ml) et 1% d'acides aminés non essentiels (*GIBCO-BRL*) (concentration finale : 0,1mM) et supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (*Flow, McLean, VA*). Les cellules (passages 22-24) sont ensemencées dans une flasque en plastique de 75cm^2 (*Corning Glass Works, Croning, NY*) à une densité de 1×10^6 cellules / flasque. Elles sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 5% de CO_2. Les cellules sont décollées à l'aide d'une solution

de trypsine 0,05% - 0,5mM EDTA (*GIBCO-BRL*) puis repiquées deux fois par semaine lorsqu'elles atteignent 80% de confluence.

Pour les expériences de caractérisation et de régulation de l'AMPK, les cellules Caco-2/15 sont ensemencées sur des supports en plastiques à une densité de 1×10^6 cellules par 2ml de MEM par puits d'une plaque de 6 puits (*Costar, Cambridge, MA*). Le milieu MEM est supplémenté de la même manière que décrite précédemment mais avec seulement 5% de SVF. Les cellules sont cultivées pendant 21 jours jusqu'à ce qu'elles soient hautement différentiées et appropriées pour le métabolisme lipidique et glucidique, notamment pour la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines.

Pour les expériences de l'invalidation de l'AMPKα1, 1×10^6 cellules / puits sont déposées sur des plaques 6 puits sans filtre et infectées immédiatement avec des lentivirus alors qu'elles n'ont pas encore adhérées à la plaque. Les expériences sont réalisées 10 jours après l'atteinte de la confluence, un moment où les cellules expriment de nombreux marqueurs de différentiation. Le milieu de culture est changé tous les 2 à 3 jours.

4.2.2 Cellules intestinales Caco-2/TC7

Les cellules intestinales Caco-2/TC7, issues du clone sélectionné à partir de la lignée parentale Caco-2 par Monique Rousset (**Chantret et al., 1994**), sont maintenues et cultivées dans du milieu DMEM (*Dubelcco's Modified eagle's Medium, GIBCO*) à 25mM de glucose et supplémenté de 20% (Vol/Vol) de sérum de veau fœtal décomplémenté (30min à 56°C), de 1% de pénicilline/streptomycine (concentration finale : 100U/100µg/ml) et de 1% d'acides aminés non essentiels (concentration finale : 0,1mM). Les cellules (passages 43-46) sont ensemencées dans une flasque en plastique de $75cm^2$ à une densité de 1×10^6 cellules / flasque. Elles sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humide contrôlée à 10% de CO2. Les cellules sont trypsinisées de la même façon décrite précédemment.

Pour les expériences de capture du glucose après 24h de traitement en présence du 4-HHE, les cellules sont ensemencées à une densité de 1×10^6 cellules par puits sur des plaques 6 puits contenant des insertions avec filtres de polyester poreux (12mm de diamètre et 0,4µm de porosité (Corning Glass Works, Corning, NY)). La culture des cellules Caco-2/15 sur ces insertions avec filtres permet leur différentiation et polarisation apicale et basolatérale (**Figure 34**). Les cellules sont cultivées sur filtre durant 21 jours afin d'assurer une pleine différentiation. Le milieu de culture est changé tous les 2 ou 3 jours.

4.3 TRAITEMENTS DES CELLULES

Trypsinisation : Lorsque les cellules arrivent à confluence, l'inhibition de contact provoque l'arrêt de la division cellulaire. Dans cette situation, la différentiation spontanée des cellules débute. Lors du repiquage des cellules, l'arrivée à confluence et la différentiation ne sont pas souhaitées. Pour ces raisons, aux alentours de 70-90% de confluence, le milieu de culture est aspiré, les cellules sont lavées avec du PBS, puis décollées par 3ml de trypsine/EDTA (environ 5min à 37°C). La réaction est arrêtée en ajoutant 7 ml de milieu complet puisque le SVF permet d'inactiver la trypsine. Les cellules sont alors resuspendues puis réensemencées.

Comptage : Après trypsinisation, les cellules sont centrifugées à 2000 rpm pendant 5minutes, ce qui permet d'éliminer la trypsine. Le surnageant est aspiré puis le culot est resuspendu dans du milieu DMEM ou MEM. Enfin les cellules sont comptées sur une lame de Malassez au microscope optique. Pour ce faire, 15µl de la suspension cellulaire colorée au bleu de Trypan sont déposés entre la lamelle et la cellule de comptage. Les cellules sont comptées sur 10 carrés puis leur concentration est calculée selon la formule suivante :

(X cellules pour 10 carrés) × 10 000 mm^2 × Y ml (volume de suspension) = $Z.10^6$ cellules
soit $Z/Y.10^6$ cellules / ml

Ensemencement, prolifération et différentiation: Après avoir compté les cellules, ces dernières sont ensemencées dans des plaques 6 puits, avec ou sans filtre selon l'expérience prévue, à raison de 1.10^6 cellules / puits. Les cellules arrivent très rapidement à confluence (2-3 jours) puis se différencient pendant 21 jours.

Traitements : Avant de traiter les cellules, celles-ci sont rincées avec du PBS puis mises à « jeun » en les incubant avec un milieu MEM ou DMEM dépourvu de sérum pendant 18h. Lors du traitement des cellules, un milieu également dépourvu de sérum est utilisé. Ceci permet d'éliminer les effets non contrôlables du SVF.

Les cellules sont stimulées en présence ou non de différents composés ou milieux :

- Pour étudier la régulation physiologique de l'AMPK en fonction de la concentration de glucose, les cellules Caco-2/15 ont été incubées pendant 3 heures en présence de milieu

riche en glucose 25mM (DMEM) ou de milieu physiologique contenant 5mM de glucose (MEM), ou de milieu dépourvu de glucose (MEM de *GIBCO-BRL).*

- Pour étudier l'activation pharmacologique de l'AMPK, différents activateurs ont été utilisés : AICAR (2 à 8mM) de *Cell Signaling*, Metformine (0,1mM à 4mM) de *Sigma-Aldrich*, A769662 (1 à 10µM) (*fourni par Dr McLauchlan de l'université Dundee, Ecosse*),
- L'inhibiteur de l'AMPK, le Composé C (40µM) de *Calbiochem,*
- L'inhibiteur de PI3K : LY294002 (50µM) de *Cell Signaling* est incubé pendant 1 heure avant de stimuler les cellules Caco-2/TC7 avec l'insuline,
- Les cellules Caco-2/TC7 sont stimulées avec de l'insuline humaine (30 à 60 mUI/ml) d'*Actrapid® (100UI/ml)* pendant 15 à 20min.
- Le 4-hydroxyalkénal 4-HHE (10-50-100µM) est incubé avec les cellules Caco-2/TC7 pendant 30min ou 24 heures. Le 4-HHHE a été synthétisé comme décrit précédemment par *Soulère et al. 2007* (**Soulere et al., 2007**).
- L'analogue du glucose radioactif, le (^{3}H)-2-désoxy-D-glucose (0,5µCi/ml) de *Perkin Elmer* est incubé pendant 5min avec les cellules Caco-2/TC7.

4.4 MESURE DE L'INTÉGRITÉ CELLULAIRE

L'intégrité de la monocouche cellulaire est vérifiée en mesurant la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) lorsque les cellules sont cultivées sur filtres. Cette TEER est le reflet fonctionnel du degré de cohésion entre les cellules. Celui-ci est élevé si les cellules sont jointives. Le principe est de mesurer au moyen d'un résistivimètre (*Millicell ERS-2)* la résistance au passage d'un faible courant électrique au travers du filtre microporeux sur lequel poussent les cellules. Le résistivimètre est constitué de deux électrodes :

- Une électrode longue plongeant dans le milieu basal au fond du puits,
- Une électrode plus courte baignant dans le milieu apical.

Le courant passe entre les deux électrodes. C'est la résistance au passage du courant qui est mesurée en ohms/filtre. La résistivité de la monocouche cellulaire est ensuite exprimée en Ohm/cm^2 après soustraction de la résistance intrinsèque du filtre sans cellule ($100 \pm 8\ \Omega.cm^2$). Seuls les puits présentant un TEER $\geq 250\ \Omega.cm^2$ sont utilisés pour réaliser les expériences ultérieures.

4.5 MESURE DE LA VIABILITÉ

Ce test permet une quantification rapide et sensible de la prolifération et de la viabilité cellulaire en mesurant l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes par dosage colorimétrique (**SLATER et al., 1963**). Cette enzyme coupe le cycle tétrazolium du MTT (ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) de couleur jaune, en cristaux de formazan violets.

Ce test MTT est réalisé en ensemençant les cellules dans une plaque 96 puits à une densité de 2×10^4 cellules par puits dans 200µl de milieu MEM ou DMEM selon la lignée cellulaire. Les cellules sont cultivées alors en étuve à 37°C dans une atmosphère humide (90%) avec 5% (Caco-2/15) ou 10% (Caco-2/TC7) de CO^2 pendant 21 jours. Après différentiation, le milieu est éliminé et les cellules sont exposées avec les différents composés à tester (3 puits par condition).

Une fois l'incubation terminée, les cellules sont lavées deux fois au PBS (1ml/puits) puis le test de prolifération est réalisé au moyen de 10µl de la solution MTT (*Sigma*) (5mg/ml en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100µl d'une solution de lyse (10% SDS ; 0,01N HCl) sont ajoutés à chaque puits. La plaque est ensuite à nouveau incubée à 37°C toute la nuit. La solution de lyse permet de rompre la membrane cytoplasmique des cellules afin de libérer dans le milieu de culture les cristaux de formazan formés. La plaque est ensuite agitée quelques secondes pour homogénéiser la coloration. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 550 nm et de 690 nm, au moyen d'un lecteur de plaques ELISA (*Multiskan EX, Labsystems*). Les blancs de lecture correspondent à des puits contenant le réactif MTT, la solution de lyse et le milieu sans cellules. L'intensité de coloration est directement proportionnelle aux nombres de cellules vivantes. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle calculé grâce à l'équation suivante (moyenne ± SEM) : (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules contrôles) × 100.

4.6 MESURE DE LA NÉCROSE

Le test LDH permet d'estimer la cytotoxicité d'un traitement par le dosage de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH). Les cellules dont la membrane a été rompue, libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment la LDH. Sa présence dans le milieu extracellulaire révèle un défaut de perméabilité membranaire dû à une nécrose et une lyse cellulaire.

La cytotoxicité des composés tels que les aldéhydes est étudiée à l'aide du kit LDH « Cytotoxicity Detection Kit » (*Roche Diagnostics*). Ce kit mesure l'activité de la LDH dans le milieu de culture grâce à un dosage enzymatique colorimétrique (**Decker et Lohmann-Matthes, 1988**). La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD en NADH. En présence de NADH, le colorant jaune INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge.

Pour réaliser ce test, les cellules sont ensemencées dans une plaque de 6 puits à une densité de 280 000 cellules par puits pendant 21 jours. Les cellules sont ensuite traitées par les composés dont la toxicité doit être testée pendant la durée indiquée.

A la fin du traitement, 100µl de surnageant sont récupérés et transférés dans une nouvelle plaque de 96 puits. Les cellules sont alors lysées par 1% de Triton X-100 puis 100µl du milieu sont à nouveau transférés dans une autre plaque de 96 puits afin de mesurer l'activité de la LDH totale. Pour ce faire, 100µl de réactif (NAD+, catalyseur, sel de tétrazolium et lactate de sodium) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 490nm et 690nm, à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Le pourcentage de cytotoxicité est calculé en fonction de l'activité de la LDH dans :

- ✓ les surnageants de culture des cellules exposées aux différentes molécules à tester,
- ✓ les cellules non traitées (contrôles)
- ✓ les cellules traitées au Triton (blancs)

et selon l'équation suivante :

% de cytotoxicité = (LDH échantillon – LDH contrôle) / (LDH triton – LDH contrôle) ×100

4.7 INVALIDATION GÉNIQUE DE LA SOUS-UNITÉ ALPHA1 DE L'AMPK

Pour l'invalidation génique de l'isoforme α1 de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15, la méthode du sh(short hairpin) RNA (petit ARN en épingle à cheveux) est utilisée. Ces petits ARN sont des constructions artificielles qui peuvent être insérées dans un génome et être exprimées de manière endogène. Les shRNA sont véhiculés par des lentivirus produits dans les cellules 293FT.

Pour ce faire, les cellules 293FT sont transfectées avec le vecteur pLK0.1TRCN0000000859 (*Open Biosystems*) comportant le shRNA dirigé contre l'isoforme α1 de l'AMPK et le « ViraPower Packaging Mix » (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008) pour générer des lentivirus non réplicatifs. Le stock de lentivirus produit est concentré 5 fois au moyen d'un dispositif de filtre centrifuge de type Amicon Ultra-15 100K (*Millipore*). A partir de cette concentration de lentivirus, 35µl sont utilisés pour infecter 250 000 cellules Caco-2/15 par puits dans une plaque 6 puits. Après 48h d'infection, les cellules sont décollées avec de la trypsine puis transférées dans des flasques et cultivées dans du milieu MEM contenant 1µg/ml de puromycine (*Sigma-Aldrich*, USA) pendant 7 jours supplémentaires afin d'établir une lignée cellulaire Caco-2/15 qui n'exprime plus le gène codant pour l'AMPKα1.

Ensuite, les cellules sont cultivées (1×10^6 / puits) dans des plaques 6 puits pendant 10 jours post-confluence. Elles sont employées pour les expériences subséquentes seulement après confirmation de la suppression du gène codant pour la protéine d'intérêt (PRKAA1 codant pour AMPKα1) par les techniques de RT-PCR et d'immunobuvardage (SDS-PAGE). Les cellules contrôles sont obtenues par infection avec un vecteur pLK0.1 vide mais comportant les mêmes caractéristiques que le vecteur contenant le shRNA.

4.8 EXTRACTION D'ARN ET ANALYSE DE L'EXPRESSION GÉNIQUE PAR RT-PCR

Pour analyser l'expression de différents gènes des isoformes de l'AMPK (AMPKα1, AMPKα2, AMPKβ1, AMPKβ2, AMPKγ1, AMPKγ2, AMPKγ3), l'ARN total est d'abord extrait des cellules Caco-2/15 à l'aide du réactif TRIzol (*Invitrogen*) puis la quantité d'ARN extrait est dosée à l'aide d'un spectrophotomètre. A partir de l'ARNm, de l'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu grâce à l'enzyme « M-MLV-reverse transcriptase » (*Invitrogen*), une ADN polymérase dépendante de l'ARNm. La transcription inverse de 4µg d'ARN en ADNc s'effectue à 37°C pendant ~50 minutes (**Tableau 7)**. Puis, l'ADNc obtenu est amplifié par « Polymerase Chain Reaction » (PCR) à l'aide d'une enzyme Taq polymérase (*Feldan Bio, Québec*) (**Tableau 7**). L'amplification nécessite en général 20 à 40 cycles qui se déroulent de la façon suivante : une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation spécifique pour chaque paire d'amorces (ex : 60°C pour le GAPDH) pendant 30 secondes, puis une élongation à 72°C durant 1 minute. Le dernier cycle est suivi d'une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 minutes.

Les différentes paires d'amorces utilisées, de même que les conditions précises pour chacune d'elles sont détaillées dans le **Tableau 8.** Elles sont conçues de manière à ce qu'elles se fixent sur des régions possédant une homologie minimale et de façon à ce qu'elles s'étendent à au moins un intron pour distinguer les amplicons issus de l'ADNc et ceux d'une éventuelle contamination par de l'ADN génomique. Toutes les amorces sont soumises à une analyse BLAST afin de confirmer leur spécificité pour chaque isoforme de l'AMPK. Au préalable, le nombre de cycle optimal est déterminé pour chaque paire d'amorces afin de s'assurer d'être dans la phase exponentielle de l'amplification et d'éviter la saturation du signal obtenu. En outre, les valeurs obtenues sont corrigées par celle du gène rapporteur codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (GAPDH). Les réactions de PCR sont réalisées au moyen d'un thermocycleur UNO II de Biometra et les signaux obtenus sont visualisés sous UV sur des gels d'agarose de 1% contenant du bromure d'éthidium. La quantification des amplicons est réalisée à l'aide du logiciel UN-SCAN-IT gel 6.1 (*Silk Scientific, Orem, USA*).

RT-PCR		
dNTP **Random Primers (1/10e)** **ARN**	1µl 1µl Xµl pour 4µg	65°C, 5min
0,1M DTT **RNase inhibitor** **5×FS Buffer**	2µl 1µl 4µl	37°C, 2min
Enzyme M-MLV	1µl	25°C, 10min 37°C, 50min 70°C, 15min
Fin RT-PCR		4°C

PCR	**×1**
Taq Buffer	2,5µl
dNTP (10mM)	0,5µl
Amorces (25µM) **F** **R**	0,5µl 0,5µl
Band Sharpener	2,5µl
Taq polymérase	0,125µl
Eau DEPC	18,375µl
Produits RT-PCR	1µl
Total	26µl

Tableau 7 : Préparation des échantillons pour la RT-PCR et la PCR

Isoforms	5'-3'Primer Sequence	Product Size, bp	Annealing temperature	Number of cycles
hAMPKα1 Forward Reverse	GAC AGC CGA GAA GCA GAA AC AGG ATG CCT GAA AAG CTT GA	223	58°C	30
hAMPKα2 Forward Reverse	GAC GGG TTG AAG AGA TGG AA CCT GCA TAC AAT CTG CCT GA	250	58°C	30
hAMPKβ1 Forward Reverse	TCC GAT GTG TCT GAG CTG TC GAG CAC CAT CAC TCC ATC CT	262	58°C	30
hAMPKβ2 Forward Reverse	TTG TGA CCC AGC CTT ACT CC TTG TGA CCC AGC CTT ACT CC	238	58°C	30
hAMPKγ1 Forward Reverse	TCC TAA AGC GAG GAA ACC AA AAC CAA TTT GGA GCT TGT GG	184	58°C	30
hAMPKγ2 Forward Reverse	TGG CAT CAC CGA CAC ACT AT TGA CCT CAT GAA TCG CAT GT	152	58°C	30
hAMPKγ3 Forward Reverse	CAA CCA CCT GGA CAT GAG TG ACC AGT GCC TGA AGG ATG TC	204	58°C	30
hHMGCR Forward Reverse	ACC CTT AGT GGC TGA AAC AGA TAC CC AAC TGT CGG CGA ATA GAT ACA CCA CG	291	60°C	26
hGAPDH Forward Reverse	GTC CAC TGG CGT GTT CAC CA GTG GCA GTG ATG GCA TGG AC	260	60°C	24

Tableau 8: Liste des séquences d'amorces utilisées (obtenues après une analyse BLAST), pour amplifier les gènes humains (AMPKα1, AMPKα2, AMPKβ1, AMPKβ2, AMPKγ1, AMPKγ2, AMPKγ3, HMGCR) et leurs conditions d'utilisation : température d'hybridation et nombre de cycles d'amplification.

4.9 IMMUNOPRÉCIPITATION ET IMMUNODÉTECTION

4.9.1 Extraction des protéines totales

Après le traitement des cellules, la réaction est rapidement arrêtée en mettant les plaques sur de la glace et en enlevant le milieu puis en rinçant les cellules avec du PBS (phosphate-buffered saline) froid (4°C). Les cellules sont lysées dans 300µl de tampon de lyse appelé HNMETG (HEPES/NaOH pH 7,5 (50mM), NaCl (150mM), MgCl2 (1,5mM), EGTA (1mM), Triton X-100 (1%), Glycérol (10%), NaF (50mM)). Des inhibiteurs de protéases (*Complete, Roche*) et de phosphatases (*Sigma-Aldrich*) sont ajoutés au tampon de lyse. Les cellules sont ensuite sonifiées sur glace pendant 15 secondes afin d'obtenir des homogénats. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (15min à 13000rpm). Le surnageant est récupéré. Un dosage de protéine (méthode Bradford) est réalisé sur une fraction aliquote de chaque échantillon.

4.9.2 Dosage des protéines et préparations des échantillons

La méthode Bradford est basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie en présence de protéines (Bradford, 1976). Un réactif Bradford (*Sigma-Aldrich*) est utilisé pour doser les protéines sur une microplaque. Les échantillons à doser sont dilués au 1/10e et déposés en duplicata dans une plaque 96 puits. A ces 10µl de protéines sont ajoutés 250µl de réactif Bradford. Après agitation de la plaque pendant 15 minutes, l'absorbance à 795 nm est lue à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique de plaques multipuits (*powerWave X, BIOTEK INSTRUMENTS*). La concentration est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1 à 20µg de protéines) réalisée dans les mêmes conditions.

Pour les immunobuvardages de type Western, les échantillons de protéines sont dénaturés dans du tampon de Laemmli (**Laemmli, 1970**) (Tris 125mM, pH=6,8, saccharose 10%, SDS 2%, β-mercaptoéthanol 1%, bleu de bromophenol 0,05%) et portées à ébullition pendant 5 minutes.

`

4.9.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Les électrophorèses sont réalisées sur un gel de polyacrylamide dont la concentration dépend de la taille des protéines à séparer grâce à un appareil pour minigels SDS-PAGE (*Biorad*). La préparation des gels décrite dans le **Tableau 9** nécessite de mélanger un certain nombre de solution. Tout d'abord, le gel de séparation est coulé puis immédiatement après, 500µl de butanol sont déposés à la surface pour enlever les bulles et uniformiser la surface. Lorsque le gel de séparation est polymérisé, le gel de concentration est ajouté en déposant immédiatement à la surface les peignes permettant de former les puits.

Après polymérisation, les gels sont placés dans la cuve de migration du système contenant le tampon de migration (Tris 25mM, Glycine 190mM, SDS 0,1%). Les échantillons de protéines dénaturées (30 µg) sont ensuite déposés dans les puits. La migration électrophorétique s'effectue sous une tension de 130V. Son évolution est suivie grâce à la migration d'un marqueur de poids moléculaire coloré (*BioRad* ou *Fermentas*) déposé dans un puits à l'une des extrémités du gel.

Gels de séparation	**6,5% (hauts PM~ 280kDa)**	**7,5% (PM~40-100kDa)**	**12% (faibles PM ~ 20-50kDa)**
Eau déminéralisée	12,8ml	12,2ml	9,2ml
Tris 3M, Ph 8,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml
SDS 10%	200µl	200µl	200µl
Acrylamide Bis 30%	4,32ml	5ml	8ml
Persulfate d'ammonium 10%	100µl	100µl	100µl
Temed	10µl	10µl	10µl

Gels de concentration	**4%**
Eau déminéralisée	9,15ml
Tris 0,5M, pH 6,8	3,75ml
SDS 10%	150µl
Acrylamide Bis 30%	1,95ml
Persulfate d'ammonium 10%	75µl
Temed	15µl

Tableau 9 : Préparation des gels pour la migration en SDS-PAGE

4.9.4 Electro-transfert sur membrane de nitrocellulose/PVDF

Une fois la migration terminée, le transfert est préparé selon le principe du « sandwich ». Une membrane de nitrocellulose ou PVDF est déposée sur le gel et l'ensemble est placé entre deux éponges imprégnées de tampon de transfert. Cette technique permet de transférer les protéines du gel sur la membrane. L'électro-transfert se déroule pendant 1h15 à 100V dans du tampon de transfert (Tris 25mM, Glycine 190mM, 20% de méthanol). La qualité du transfert peut être vérifiée par la présence des marqueurs de poids moléculaire sur la membrane. Une révélation de l'ensemble des protéines avec du rouge Ponceau peut également être réalisée. La membrane est ensuite rincée dans un tampon salin « Tris-Buffered Saline » TBS-tween (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH=7,5, Tween 20 0,1%).

4.9.5 Immunodétection et révélation

Les sites de liaison non spécifiques sont bloqués en incubant la membrane avec de l'albumine bovine sérique pendant 1 heure à température ambiante. Puis un anticorps primaire dirigé vers une protéine d'intérêt est incubé avec la membrane sous agitation pendant une nuit entière à 4°C. La membrane est ensuite lavée 4 fois (1×15 mn et 3×5 min) avec une solution de TBS-tween 0,1%. Elle est incubée avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme « horseradish peroxidase » (HRP), dirigé contre l'animal hôte dans lequel l'anticorps primaire avait été produit. Les différents anticorps employés et leurs conditions d'utilisation sont décrits dans le **Tableau 10**. La β-actine est utilisée pour s'assurer qu'une quantité égale de protéine pour chaque échantillon a été déposée sur les gels. Après l'anticorps secondaire, la membrane est à nouveau soumise à une dernière série de lavages avec du TBS tween avant la révélation spécifique des protéines par chimioluminescence. La révélation peut se faire selon deux méthodes en fonction du laboratoire où l'expérience a été réalisée :

- Soit elle utilise un kit BM Chemiluminescence Blotting Substrate, (*Roche Diagnostics)* puis une révélation sur film est réalisée. Après le développement des films, les signaux sont quantifiés par un densitomètre en utilisant le logiciel UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific, Orem, USA).
- Ou soit elle utilise un kit ECL Plus (*Amersham*). La lecture se fait par caméra VDS et les signaux sont quantifiés par densitométrie en utilisant le logiciel Quantity One (*BioRad*).

La plupart du temps, il est nécessaire d'incuber la membrane avec un autre anticorps, par un exemple la forme phosphorylée qui a un poids moléculaire identique ou très proche de la protéine d'intérêt. Dans cette situation, la membrane est incubée pendant 20 minutes dans une solution de « stripping » (*Perbio, Thermo Fisher*) puis rincée dans du TBS tween 0,1% contenant 5% de BSA. La membrane peut être alors à nouveau incubée avec un nouvel anticorps.

4.9.6 Immunoprécipitation

Pour déterminer le complexe hétérotrimérique majoritaire (αβγ) de l'AMPK, des immunoprécipitations sont réalisées à partir de 150µg de protéines totales issues de cellules Caco-2/15. Tout d'abord, les échantillons sont clarifiés en mélangeant par inversion 150µg de protéines en présence du tampon HNMETG pendant 1 heure à 4°C. Les débris insolubles sont éliminés par centrifugation (4000g pendant 5 min). Ensuite, les lysats de protéines sont incubés toute la nuit à 4°C avec 30µl de protéine G PLUS/A-agarose (*Calbiochem*) et 2µg d'anticorps anti-AMPKα1 ou α2. Après une série de lavages avec le tampon HNMETG (4×5min à 16000g, 4°C), les immunoprécipités sont chauffés à 100°C pendant 5 min dans un tampon dénaturant contenant du SDS et du β-mercaptoéthanol. Le surnageant est récupéré et utilisé pour l'électrophorèse SDS-PAGE suivie du transfert des protéines sur une membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride, *Millipore*). Contrairement aux membranes de nitrocellulose, les membranes PVDF supportent mieux la solution de stripping permettant de réutiliser la membrane pour révéler d'autres protéines. Ces membranes doivent être activées en les immergeant dans du méthanol puis dans le tampon de transfert. Après le transfert, la membrane est bloquée avec de l'albumine bovine sérique puis incubée en présence des anticorps primaires anti-α, β, γ pour chaque sous-unité de l'AMPK. Pour éliminer les bandes non spécifiques liées à la présence d'immunoglobulines G provenant des anticorps primaires des immunoprécipités (chaîne lourde ~ 50 kDa, chaîne légère ~ 30 kDa), la protéine A couplée à l'enzyme HRP (*Millipore*) est utilisée comme anticorps secondaire.

	Provenance	**Animal hôte**	**Dilution**
1er anticorps utilisés			
β-actine	Sigma Aldrich	Souris	1/1 000 000
AMPKα	Cell Signaling	Lapin	1/5 000
Phospho-AMPKα (Thr172)	Cell Signaling	Lapin	1/5 000
AMPKα1	Bethyl Laboratory	Lapin	1/5 000
AMPKα2	Bethyl Laboratory	Lapin	1/5 000
AMPKβ1	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1/500
AMPKβ2	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1/500
AMPKγ1	Cell Signaling	Lapin	1/1 000
AMPKγ2	MBL	Lapin	1/1 000
AMPKγ3	Santa Cruz Biotechnology	Lapin	1/1 000
HMG-CoA réductase	Upstate	Lapin	1/10 000
Phospho-HMG-CoA réductase (Ser872)	Millipore	Lapin	1/10 000
ACC	Cell Signaling	Lapin	1/1 000
Phospho-ACC (Ser79)	Cell Signaling	Lapin	1/1 000
AKT1	Abcam	Lapin	1/10 000
Phospho-AKT1 (Ser473)	Abcam	Lapin	1/10 000
AKT1,2,3	Cell Signaling	Lapin	1/1 000
Phospho-AKT1,2,3 (Ser473)	Cell signaling	Lapin	1/1 000
mTOR	Abcam	Lapin	1/1 000
Phospho-mTOR (Ser2448)	Abcam	Lapin	1/1 000
2e anticorps utilisés			
Anti-Souris	Jackson ImmunoResearch	Chèvre	1/20 000
Anti-Lapin	Jackson ImmunoResearch	Souris	1/20 000

Tableau 10 : Liste des anticorps utilisés lors des immunobuvardages et des immunoprécipitations. Toutes les dilutions sont effectuées dans du tampon TBS contenant 0,1% (v/v) de Tween 20 et 5% BSA

4.10 CAPTURE DU GLUCOSE

La sensibilité à l'insuline peut être évaluée par la capacité des cellules à faire entrer dans le cytoplasme un analogue du glucose qui est non métabolisable et radioactif. Pour cela, les cellules Caco-2/TC7 sont ensemencées en plaques de 6 puits avec ou sans filtre selon l'expérience réalisée, puis les cellules se différencient pendant 21 jours comme décrit précédemment. Les cellules sont mises à « jeun » pendant 18h en les incubant avec du milieu DMEM sans SVF et sans rouge phénol. Les cellules sont ensuite traitées avec différents composés (LY294002, Aicar, composé C, 4-HHE etc…) dans 2ml de DMEM sans SVF ni rouge phénol pendant une certaine durée. Avant de stimuler les cellules par l'insuline (60mUI/ml pendant 20min), les puits sont lavés avec 1ml de PBS. Dans chaque plaque, un puits est traité par de la cytochalasine B (10µM pendant 20min), un inhibiteur du transport du glucose. Ceci permet de déterminer l'entrée non spécifique du glucose (indépendante de l'insuline) qui sera soustraite aux valeurs obtenues pour les autres conditions correspondants aux autres puits. Une fois le traitement et la stimulation par l'insuline ou la cytochalasine B effectués, une certaine quantité correspondant à 0,5 µCi/ml de 3H-2-désoxy-D-glucose (*Perkin Elmer*), un analogue non métabolisable du glucose, est ajoutée dans chaque puits pendant 5 min. La réaction est arrêtée par 3 lavages successifs avec 1ml de PBS froid (4°C) puis les cellules sont solubilisées par 1,6ml de SDS 1% à température ambiante pendant 10 min sous agitation. Le comptage de la radioactivité s'effectue ensuite sur 300µl de lysat cellulaire dilués dans 5ml de liquide de scintillation grâce à un compteur à scintillation β (*Tri-Corb, Packard*). La concentration de protéines dans les lysats est mesurée par la méthode Bardford adaptée pour les solutions contenant des détergents (*BioRad*).

4.11 STATISTIQUES

Les résultats présentés sont la moyenne± l'erreur standard. Les tests statistiques ont été réalisés avec un test T bilatéral de Student lorsque les valeurs de seulement 2 groupes étaient comparées. Par contre, lorsqu'il s'agit de comparer plus de 2 groupes, un test ANOVA était effectué, suivi d'une analyse post-test de Tukey afin de comparer les différents groupes entre eux. Une différence statistique était considérée comme significative lorsque la probabilité « p » était inférieure à 5% ou 0,05.

CHAPITRE 5
RÉSULTATS

Quatre volets expérimentaux sont présentés dans ce chapitre afin de répondre aux objectifs de l'étude, à savoir : (i) la caractérisation de l'AMPK intestinale (sa structure et sa régulation), (ii) son rôle dans la régulation de la lipogenèse, (iii) son rôle dans la régulation de la sensibilité à l'insuline, (iv) et sa régulation en situation de résistance à l'insuline. Les résultats obtenus devraient permettre d'évaluer si l'AMPK pourrait être une cible potentielle pour le traitement de l'insulino-résistance intestinale.

5.1 CARACTÉRISATION DE L'AMPK DANS LES CELLULES INTESTINALES

Pour caractériser l'AMPK, les cellules intestinales Caco-2 ont été utilisées. Ces cellules dérivées d'un adénocarcinome colorectal humain représentent un excellent modèle intestinal puisqu'elles ont la particularité de former des jonctions serrées, de se différencier et d'acquérir les propriétés physiologiques de l'intestin grêle (**Fogh et al., 1977**; **Jumarie et Malo, 1991**; **Levy et al., 1995**). La caractérisation de l'AMPK comprend deux aspects : la structure du complexe hétérotrimérique de cette protéine et sa régulation. C'est par une approche pharmacologique et physiologique que la régulation de l'AMPK a été étudiée.

5.1.1 Structure de l'AMPK

Avant d'étudier le rôle et la régulation de l'AMPK intestinale, il était important de connaître le complexe hétérotrimérique (αβγ) majoritaire de l'AMPK dans l'intestin puisqu'il est tissu-spécifique et que la composition des sous-unités α, β et γ peut être altérée dans différentes conditions de stress physiologiques (**Cheung et al., 2000**; **Wojtaszewski et al., 2000**). A ce jour, la structure complète de l'AMPK a été déterminée uniquement dans le muscle squelettique humain (**Tableau 2**) (**Wojtaszewski et al., 2000**).

	Foie (**Cheung et al., 2000**)	Muscle (**Wojtaszewski et al., 2000**; **Wojtaszewski et al., 2005**)	Tissu adipeux (**Lihn et al., 2004**)	Intestin
Rats	**α2β1γ1=α1β1γ1**	-	-	-
Humains	?	**α2β2γ1**>>α2β2γ3≥α1β2γ1	**α1**	?

Tableau 2 : Composition des complexes hétérotrimériques majoritaires dans les tissus insulino-sensibles.

Dans un premier temps, nous souhaitions connaître les isoformes majeures présentes dans les cellules intestinales. Pour ce faire, nous avons étudié la distribution des expressions géniques (**Figure 35)** et protéiques (**Figure 36)** des 7 isoformes de l'AMPK dans les cellules Caco-2 non différenciées (**Figure 35A**, **Figure 36A**) et différenciées (**Figure 35B**, **Figure 36B**). Ce travail a permis non seulement de vérifier la présence des isoformes de l'AMPK dans les cellules intestinales humaines, mais aussi d'étudier l'évolution d'expression de chacune d'elles au cours de la différentiation cellulaire.

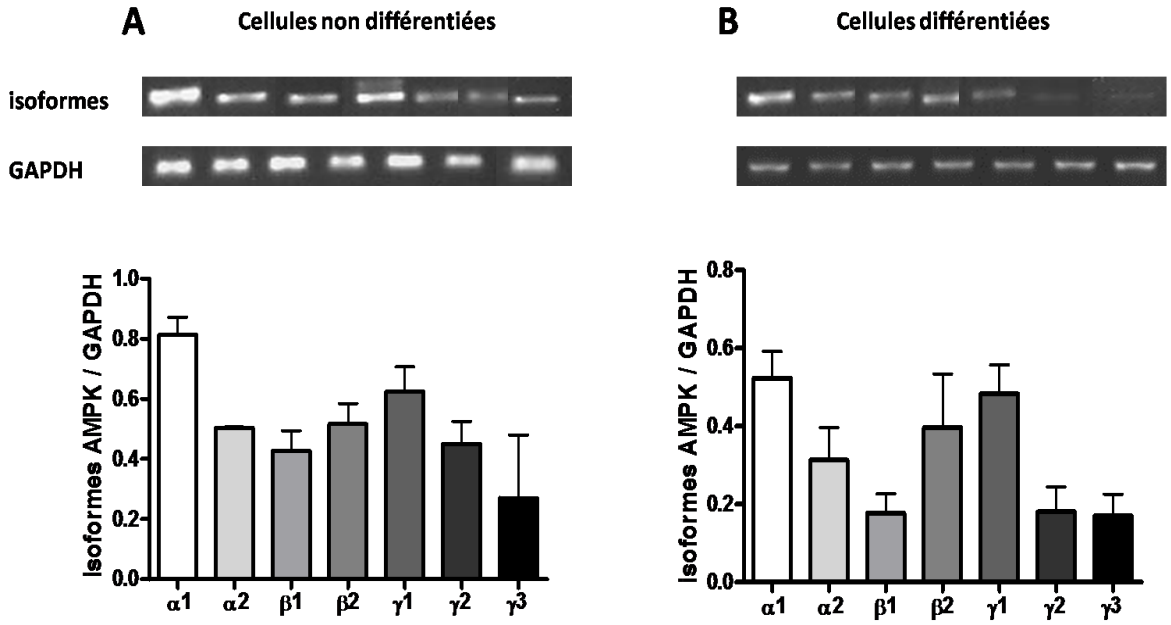


Figure 35: Distribution de l'expression génique des 7 isoformes de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15 (A) non différenciées (3-6 jours) et (B) différenciées (21 jours). L'expression génique a été déterminée par RT-PCR. Les valeurs représentent la moyenne ± ES à partir de 3 expériences distinctes (N=3).

D'après la **Figure 35A**, l'ARN messager des 7 isoformes est présent dans les cellules immatures dont le plus exprimé est celui codant pour la sous-unité catalytique α1. A ce stade de différentiation, il n'est pas possible de distinguer les expressions géniques prédominantes des autres isoformes. En revanche, dans les cellules différenciées (**Figure 35B**), l'ARNm codant pour les isoformes α1, β2 et γ1 est prépondérant par rapport à celui de leur homologue respectif (α1 vs α2, β1 vs β2, γ1 vs γ2 and γ3).

Outre l'expression génique des isoformes de l'AMPK, nous avons analysé leur expression protéique afin de confirmer leur présence dans les cellules Caco-2 (**Figure 36**).

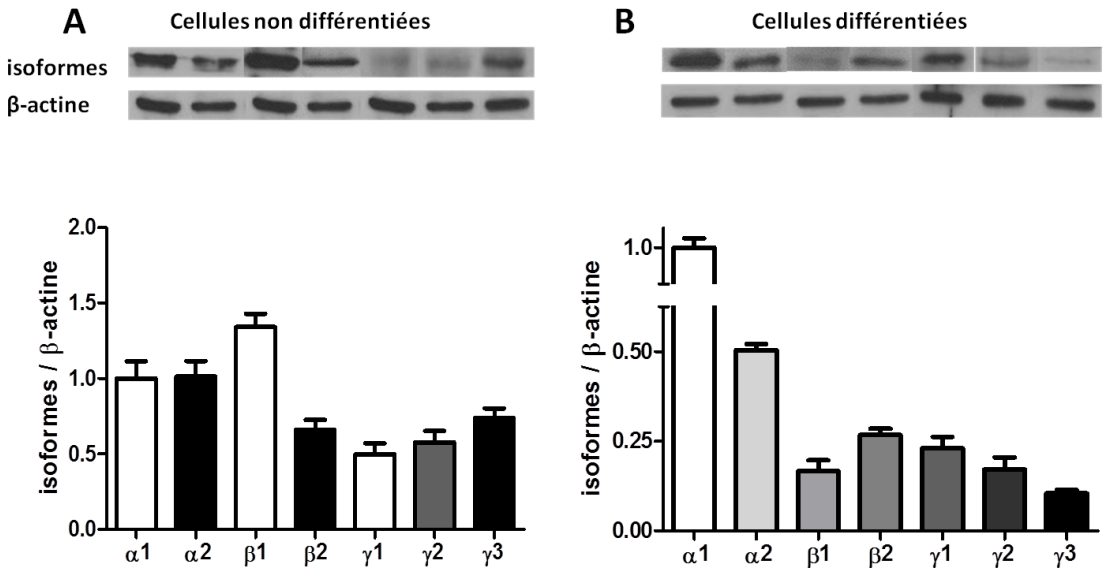


Figure 36 : Distribution des expressions protéiques des 7 isoformes de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15 (A) non différentiées (3-6 jours) et (B) différentiées (21 jours). Les protéines cellulaires extraites sont analysées par immunobuvardage de type Western à l'aide d'anticorps spécifiques pour chaque isoforme (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2 et γ3) de l'AMPK. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine et sont exprimés en % par rapport à la valeur de l'isoforme α1. Les valeurs représentent la moyenne ±SE à partir de 3 expériences réalisées en triplicata (N=3, n=9).

La distribution des expressions protéiques de chaque isoforme de l'AMPK est représentée dans la **Figure 36** dans les cellules Caco-2 non différentiées (**Figure 36A**) et différentiées (**Figure 36B**). Ces résultats confirment la présence des isoformes α1, β2 et γ1 dans les cellules différentiées (**Figure 36B**) alors que dans les cellules immatures (**Figure 36A**), le profil est différent (α1/α2, β1 et γ3) suggérant une régulation de l'AMPK distincte entre les cellules non différentiées de la crypte et celles différentiées au niveau des villosités intestinales.

La prépondérance des isoformes de l'AMPK ne permet pas à elle seule l'identification du complexe hétérotrimérique (αβγ) majoritaire de l'AMPK puisque nous ne connaissons pas l'affinité des sous-unités entre elles, ni l'affinité des anticorps pour la protéine d'intérêt. Pour ces raisons, des immunoprécipitations (IP) des isoformes α1 et α2 ont été effectuées (**Figure 39**) en se basant sur la méthode de Wojtaszewski et al. (**Wojtaszewski et al., 2005**). Le principe de cette méthode consiste à isoler les complexes αβγ de l'AMPK en immunoprécipitant les sous-unités α1 et α2 qui ont une affinité plus ou moins grande pour un β (β1 ou β2) et un γ (γ1, γ2, γ3). Les immunoprécipités IPα1 et IPα2 sont ensuite soumis à un immunobuvardage de type Western en utilisant les anticorps dirigés contre β1, β2, γ1, γ2 et γ3. Après quantification des signaux détectés, les pourcentages d'affinité entre les sous-unités catalytiques α1 et α2 et les sous-unités régulatrices β1, β2, γ1, γ2 et γ3 sont calculés.

Lors des immunoprécipitations, les surnageants sont conservés afin d'estimer la proportion d'α1 et d'α2 qui a été immunoprécipitée par rapport au lysat cellulaire total.



Figure 37: Proportion des isoformes α1 et α2 immunoprécipitées par rapport au lysat total. Les immunoprécipitations de α1 (IPα1) et α2 (IPα2) sont effectuées à partir de 150µg de protéines issues d'un lysat de cellules Caco-2/15 différenciées et sont suivies d'un immunobuvardage de type Western.

Les signaux détectés révèlent qu'environ 60% des complexes contenant l'isoforme α1 ou α2 ont été immunoprécipités (**Figure 37**). Puisque la proportion immunoprécipitée d'α1 et d'α2 est la même, cela nous a permis de comparer les affinités entre chaque sous-unité.

En outre, les complexes hétérotrimériques αβγ sont présents dans des proportions stœchiométriques 1α:1β:1γ. Théoriquement, il n'est donc pas possible de détecter l'isoforme α1 dans l'IPα2 à moins d'une contamination lors de la technique. Ainsi, la pureté de l'IP a été évaluée en vérifiant l'absence d'α1 dans l'IPα2 et sa présence dans le surnageant (S) (**Figure 38**)



Figure 38: Pureté de l'immunoprécipitation de l'isoforme α2 (IPα2) : l'isoforme α1 n'est pas détectée dans l'IPα2 mais seulement dans le surnageant (S). Les immunoprécipitations de α2 (IPα2) sont effectuées à partir de 150µg de protéines issues d'un lysat de cellules Caco-2/15 différenciées et sont suivies d'un immunobuvardage de type Western.

Par ailleurs, les quantités de protéines utilisées pour les IP étaient différentes puisque la détection des isoformes γ2 et γ3 nécessitaient 500µg et 1000µg de protéines respectivement alors que les autres isoformes étaient visibles avec seulement 150µg de protéines. Ces différences ont été prises en compte dans les calculs pour déterminer le complexe αβγ majoritaire dans les cellules Caco-2.

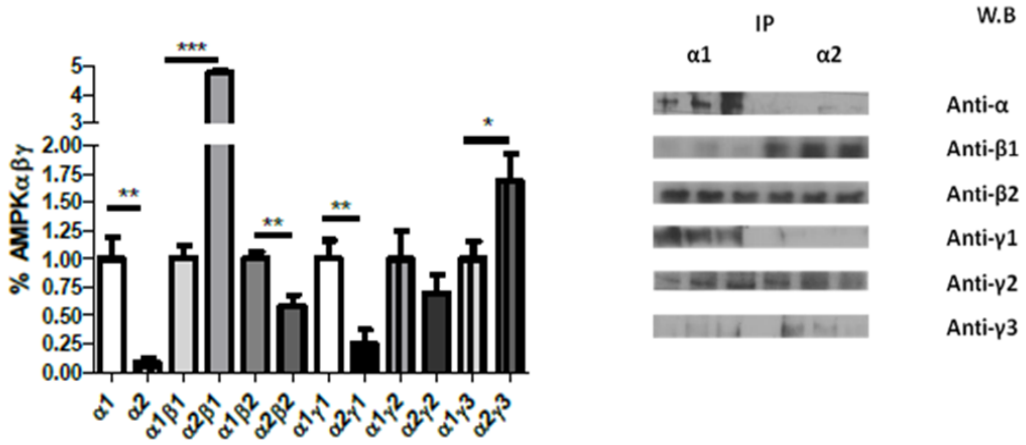


Figure 39: Identification du complexe hétérotrimérique majoritaire de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2/15. L'affinité de chaque isoforme pour les sous-unités α1 et α2 est déterminée par immunoprécipitation de α (IPα1) et α2 (IPα2) suivie d'un immunobuvardage de type Western. Les IP sont réalisés à partir de lysat de protéines totales issues de cellules Caco-2/15 différenciées puis les anticorps spécifiques de chaque isoforme (anti-α, β1, β, γ1, γ2, γ3) sont employés lors du Western Blotting pour déterminer leur affinité avec les sous-unités α1 et α2. Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle (α1 vs. α2 ; α1β1 vs. α2β1 ; α1β2 vs. α2β2 ; α1γ1 vs. α2γ1 ; α1γ2 vs. α2γ2 ; α1γ3 vs. α2γ3) à partir de 3 expériences réalisées en triplicata (N=3, n=9). * P<0,05 ; **P<0,01: ***P<0,001.

Dans la **Figure 39**, les immunobuvardages des IPα1 et IPα2 réalisés avec l'anti-AMPKα qui reconnaît les deux isoformes α1 et α2, confirment qu'il y a beaucoup plus d'α1 (100%) que d'α2 (7,7%). Ils révèlent également que β2 a plus d'affinité pour α1 (100%) que pour α2 (78,2%) ; β1 s'associe préférentiellement avec α2 (100%) plutôt qu'avec α1 (21%) ;

γ1 a plus d'affinité pour α1 (100%) que pour α2 (6,5%) ; γ2 se fixe majoritairement sur α1 (100%) plutôt que sur α2 (69,8%) ; γ3 a plus d'affinité pour α2 (100%) que pour α1 (61,8%).

En outre, une immunoprécipitation de β1 et β2 suivie d'un immunobuvardage pour détecter l'isoforme α1 a permis de valider les résultats précédents quant à l'affinité de β2 pour α1 (**Figure 40**).

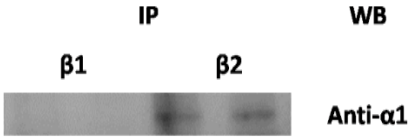


Figure 40: La sous-unité catalytique α1 de l'AMPK a plus d'affinité pour la sous-unité β2.L'immunoprécipitation de β1 (IPβ1) et de β2 (IPβ2) est réalisée à partir de 150µg de protéines issues de lysats cellulaires Caco-2/15 différenciées. Les IP sont soumises à un immunobuvardage de type Western en utilisant l'anticorps dirigé contre l'isoforme α1.

Le **Tableau 11** ci-dessous représente à la fois l'affinité des isoformes avec α1 et α2, mais aussi la quantité relative des complexes identifiés.

	IP α1	IP α2
Alpha	++++	+
α1	++++	-
α2	-	+
β1	-	++++
β2	+++	+++
γ1	++++	-
γ2	++	++
γ3	-	++++

++++	80 à 100%
+++	60 à 80%
++	40 à 60%
+	20 à 40%
-	0 à 20%

α1β2γ1 > α2β1γ3

Tableau 11: Identification du complexe hétérotrimérique majoritaire de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2/15 à partir des affinités entre chaque isoforme (exprimées en % et caractérisées par – si 0 à 20%, + si 20 à 40%, ++ si 40 à 60%, +++ si 60 à 80% et ++++ si 80 à 100%)

Finalement, les résultats de la **Figure 39** révèlent la présence de deux complexes hétérotrimériques principaux dans les cellules Caco-2 : α1β2γ1 et α2β1γ3. Puisque l'isoforme α1 est beaucoup plus abondante que l'isoforme α2, nous pouvons en conclure que le

complexe hétérotrimérique majoritaire dans les cellules intestinales Caco-2 est α1β2γ1 (**Tableau 12**).

	Foie (**Cheung et al., 2000**)	**Muscle** (**Wojtaszewski et al., 2000**; **Wojtaszewski et al., 2005**)	**Tissu adipeux** (**Lihn et al., 2004**)	**Intestin**
Rats	**α2β1γ1=α1β1γ1**	-	-	-
Humains	?	**α2β2γ1**>>α2β2γ3≥α1β2γ1	**α1**	**α1β2γ1**>α2β1γ3

Tableau 12 : Comparaison des différents complexes hétérotrimériques de l'AMPK dans les tissus insulino-sensibles : l'intestin possède sa propre signature du complexe αβγ de l'AMPK

5.1.2 Régulation pharmacologique de l'AMPK

Pour étudier la régulation de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2, un inhibiteur (Composé C) et des activateurs (AICAR, Metformine, A-769662) de l'AMPK ont été utilisés. Il est connu que l'AMPK peut inhiber en phosphorylant les enzymes de synthèse des acides gras (ACC) et du cholestérol (l'HMG-CoA Réductase) dans plusieurs tissus tels que le foie et le muscle squelettique (**Beg et al., 1987**; **Carling et al., 1989**; **Henin et al., 1995**). Néanmoins, à ce jour, aucune étude n'a exploré dans les cellules intestinales humaines l'impact d'une inhibition ou activation de l'AMPK sur les enzymes lipogéniques telles que l'ACC et l'HMG-CoA Réductase.

Il est bien admis que l'activité d'une enzyme est régulée par phosphorylation et déphosphorylation (**Gresser, 1983**). Pour cette raison, tous les résultats de niveau de phosphorylation (forme phosphorylée / forme totale) des protéines de cette étude sont le reflet de leur activité enzymatique.

- **Inhibition de l'activité de l'AMPK par le composé C**

Le composé C est l'inhibiteur de l'AMPK le plus connu et le plus utilisé dans la littérature (**Funai et Cartee, 2009**; **Hardie et Carling, 1997**; **Zhou et al., 2001**). Le composé C agissant comme un inhibiteur compétitif de l'AMP, Zhou et al. ont développé une équation

par régression non linéaire grâce à l'algorithme Marquardt d'un programme écrit par N. Thomberry des Laboratoires Merck Research (**Zhou et al., 2001**). Ils ont déterminé que la gamme optimale de concentrations du composé C pour inhiber la phosphorylation de l'AMPK était de 20 à 40µM et ils l'ont vérifié dans des hépatocytes de rats. Quelque soit le type de cellule *in vitro* (HepG2 hépatocytes, L6 myotubes, 3T3-L1 adipocytes) ou *ex vivo* (hépatocytes, myocytes, adipocytes), le composé C permet d'inhiber efficacement la phosphorylation de l'AMPK à des concentrations de 20 à 40µM (**Funai et Cartee, 2009**; **Hardie et Carling, 1997**; **Zhou et al., 2001**). Pour ces raisons, la concentration de 40µM de composé C a été directement testée sur les cellules Caco-2/15.

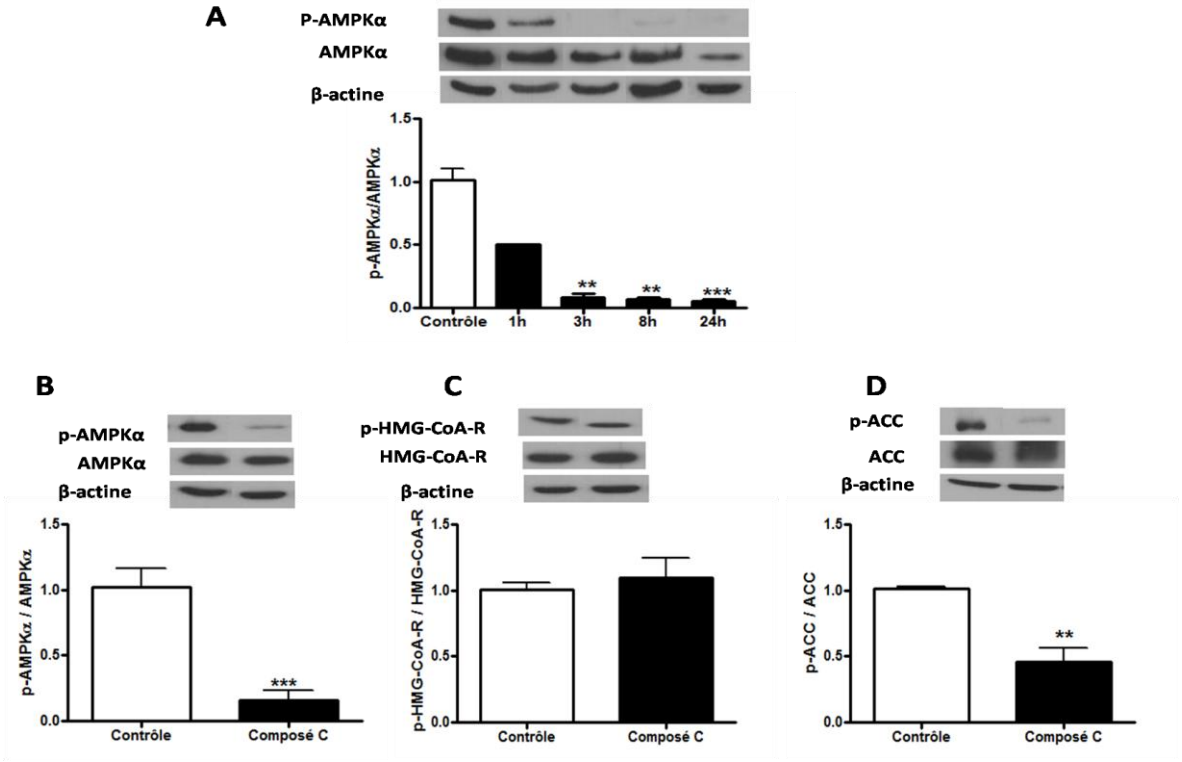


Figure 41: Inhibition de la phosphorylation de l'AMPK par le composé C dans les cellules Caco-2/15. Impact sur ses cibles, l'Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) et 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (HMG-CoA Réductase). Les niveaux de phosphorylation sont examinés par immunobuvardage de type Western. (A) Courbe de cinétique du composé C (40µM pendant 1h-3h-8h-24h) pour inhiber la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15 différentiées après 21 jours lors de 2 expériences distinctes ; Niveaux de phosphorylation de (B) l'AMPK (Thr 172), (C) l'HMG-CoA Réductase (Ser872), (D) l'ACC (Ser79) en présence du composé C (40µM) pendant 24 heures d'incubation. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine et sont exprimés en % par rapport au contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± ES à partir de 3 expériences distinctes réalisées en triplicata (N=3, n=9). **P<0,01 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

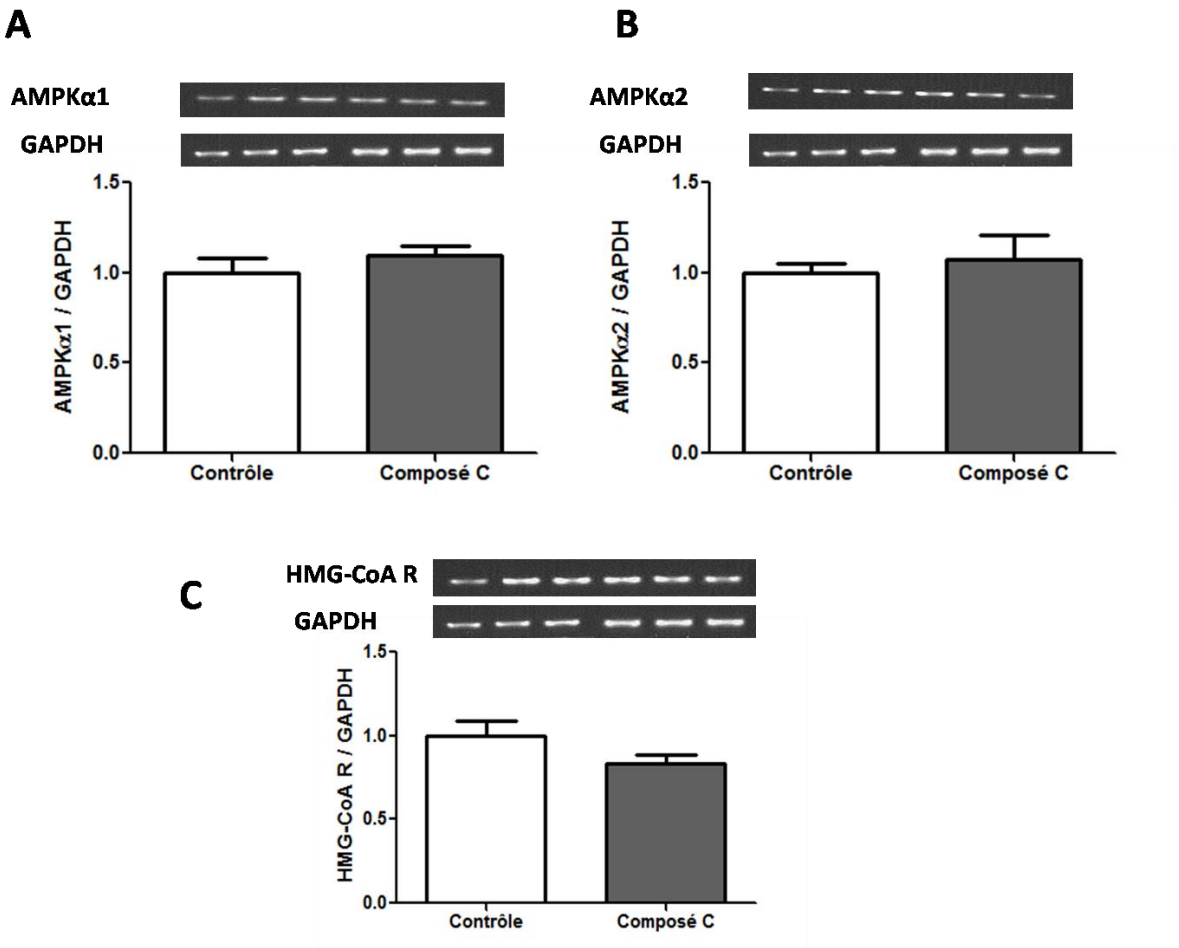


Figure 42 : Le composé C (40µM) ne modifie pas l'expression génique de (A) l'AMPKα1, (B) AMPKα2 ni de (C) l'HMG-CoA Réductase après 24h d'incubation. L'expression génique a été déterminée par RT-PCR. Les résultats sont normalisés par l'expression génique du GAPDH et sont exprimés en % par rapport au contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± ES à partir d'une expérience réalisée en triplicata (n=3).

Une courbe de cinétique d'action du composé C (40µM pendant 1h-3h-8h-24h) a été réalisée (**Figure 41A).** L'effet inhibiteur du composé C sur l'activité de l'AMPK apparaît au bout d'1 heure d'incubation où la phosphorylation de l'AMPK est réduite de 50%. Au bout de 3 heures, elle est diminuée de plus de 80%. Cette inhibition se prolonge et s'accentue jusqu'à 24 heures où elle devient maximale (95%). C'est pourquoi nous avons analysé la régulation de l'AMPK et de ses cibles ACC et HMG-CoA Réductase par le composé C après 24 heures d'incubation (**Figure 41B, C, D**). Par ailleurs, nous avons vérifié que le composé C ne modifiait pas l'expression génique de l'AMPKα1/α2 et ni de l'HMG-CoA Réductase (**Figure**

42). Ce résultat montre que le composé C régule uniquement le niveau de phosphorylation sans altérer l'expression génique de l'AMPK et de ses cibles.

La phosphorylation de l'AMPK étant réduite de 95%, nous pouvons en conclure que son activité est quasiment abolie par le composé C (**Figure 41B**). Dans cette situation, la phosphorylation de l'ACC était diminuée de plus de 50%, ce qui reflète une activation de cette enzyme, suggérant une activation de la synthèse des acides gras (**Figure 41C**). En revanche, aucun effet du composé C n'était observé sur le niveau de phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase (**Figure 41D**) laissant croire que la synthèse du cholestérol échappe au contrôle de l'AMPK dans l'intestin. Ces résultats suggèrent que l'AMPK intestinale pourrait réguler négativement la synthèse des acides gras en inhibant l'enzyme ACC mais pas celle régulant la synthèse du cholestérol. Or, il ne faut pas négliger le fait que le composé C n'est pas complètement spécifique à l'AMPK puisqu'il inhibe également d'autres protéines kinases, telles que, ERK1/2 et PHK (**Ohori, 2008**). Ces résultats devaient donc être confirmés par d'autres moyens techniques tels que des activateurs de l'AMPK.

- **Activation de l'AMPK par AICAR**

L'AICAR produit un analogue de l'AMP, le ZMP qui mime l'activation allostérique de l'AMPK, la phosphorylation de la Thr172 et l'inhibition de sa déphosphorylation (**Sullivan et al., 1994**). Cet activateur de l'AMPK est très utilisé dans les études *in vitro* à des concentrations comprises entre 0,5 et 2mM car il pénètre facilement dans les cellules. Toutefois, à des concentrations élevées (> 4mM) ou à une durée d'incubation longue (> 18h), il peut être cytotoxique et induire la mort cellulaire (**Sengupta et al., 2007**).

Au préalable, des courbes de cinétique et « dose-réponse » ont été réalisées (**Figure 44A et B**). La courbe « dose-réponse » (1 à 8mM pendant 3 heures) montre que contrairement à la plupart des études *in vitro* qui utilisent l'AICAR à une concentration de 0,5 à 1mM, la phosphorylation de l'AMPK n'était pas augmentée dans les cellules Caco-2. Par contre, elle l'était à partir de 2mM et était multipliée par 4 lorsque la concentration de l'AICAR atteint 8mM. Un test de cytotoxicité (MTT) a été réalisé afin de montrer que l'AICAR (8mM) n'affecte pas la viabilité cellulaire après 3 heures d'incubation (**Figure 43**).

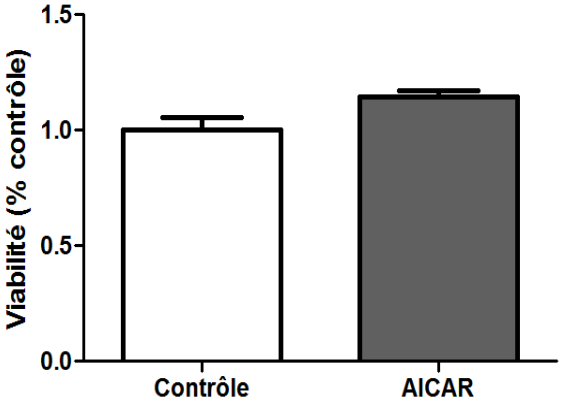


Figure 43 : L'AICAR (8mM, 3 heures) n'affecte pas la viabilité cellulaire. Elle est mesurée au moyen d'un test MTT réalisé dans deux expériences distinctes en duplicatas (N=2, n=4). Les valeurs représentent la moyenne ±ES et sont exprimées en % du contrôle.

Puis une courbe de cinétique (1h-3h-8h) a été réalisée dans le but de cerner l'intervalle de temps pendant lequel la phosphorylation de l'AMPK par le ZMP (produit par l'AICAR) est optimale (**Figure 44B**). Les temps choisis étaient relativement courts puisque l'AMPK phosphoryle et inactive ses cibles ACC et HMG-CoA Réductase à court terme (**Corton et al., 1994**). Comme le montre la **Figure 44B**, une durée de 3 heures d'incubation des cellules en présence d'AICAR permettait une phosphorylation maximale de l'AMPK (plus de 4 fois) alors qu'elle est seulement doublée au bout d'1 heure et perd de l'efficacité au bout de 8h (moins de 2 fois).

Toutes les expériences décrites dans ce chapitre ont donc été réalisées en utilisant 8mM d'AICAR durant 3 heures d'incubation.

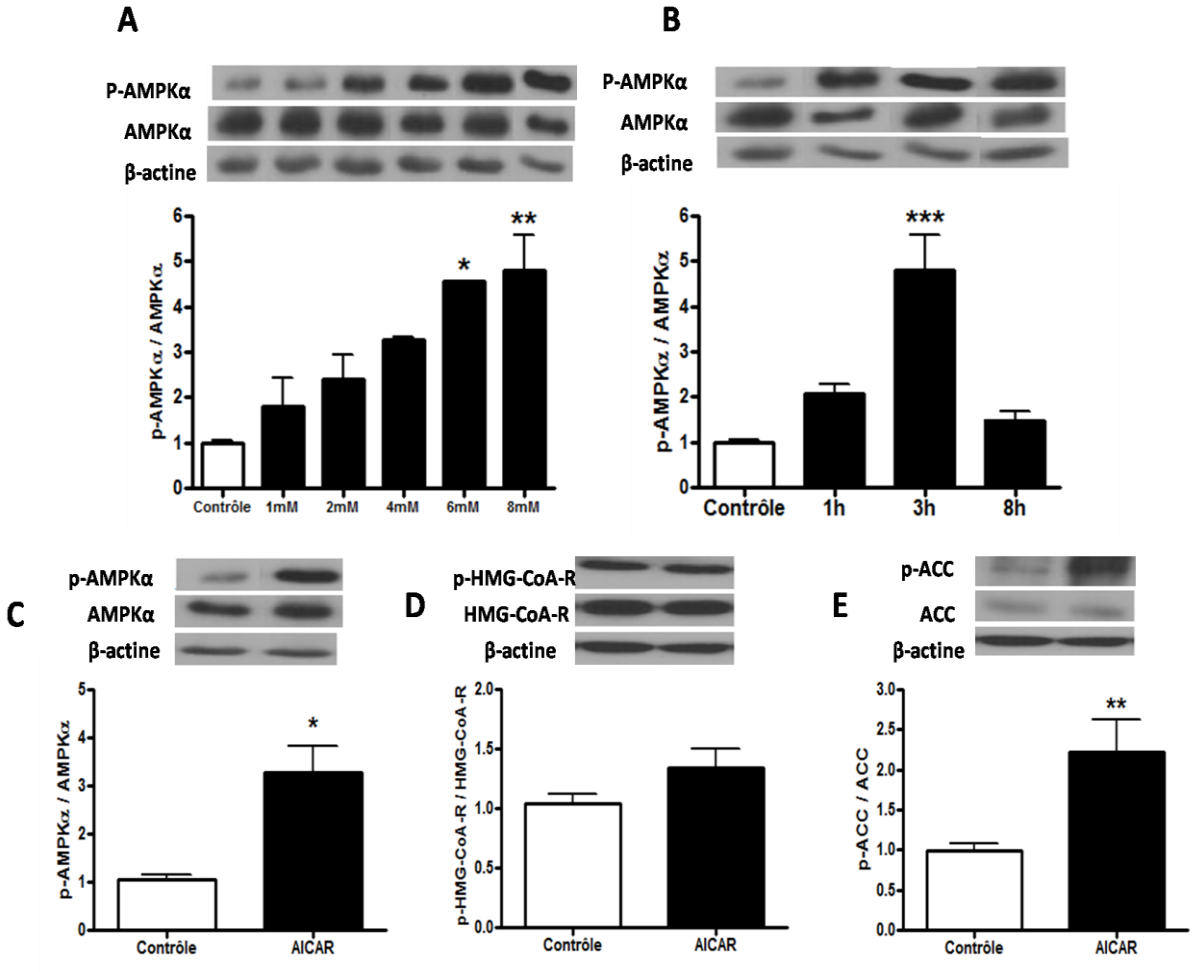


Figure 44: L'activation via la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) par l'AICAR inhibe la phosphorylation (Ser79) de l'ACC mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation (Ser872) de l'HMG-CoA Réductase. Les niveaux de phosphorylations sont examinés par immunobuvardage de type Western. Une courbe « dose-réponse » (1 à 8mM, 3 heures) (**A**) et de cinétique (1-3-8 heures, 8mM) (**B**) sont réalisées à partir de cellules Caco-2/15 différentiées lors de 2 expériences distinctes en duplicatas (N=2, n=4). Niveaux de phosphorylations de (**C**) l'AMPK, (**D**) l'HMG-CoA réductase, (**E**) l'ACC en présence d'AICAR (8mM, 3 heures). Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir de 3 expériences distinctes réalisées en triplicatas (N=3, n=9). *P<0,05 vs. Contrôle ; **P<0,01 vs. Contrôle.

D'après la **Figure 44E**, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR entraînait une augmentation de la phosphorylation de l'ACC (2 fois). Par contre, aucun effet n'était observé sur la phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase (**Figure 44D**).

Ces résultats, tout comme ceux obtenus avec le composé C, confirment que l'AMPK régule l'enzyme de synthèse des acides gras (ACC), mais elle ne semble pas réguler l'enzyme de synthèse du cholestérol (HMG-CoA Réductase) dans les cellules intestinales. Cependant, l'AICAR n'est pas spécifique de l'AMPK puisqu'il pourrait réguler d'autres enzymes, comme la glycogène phosphorylase (**Longnus et al., 2003**) et la fructose-1,6-biphosphatase (**Vincent et al., 1991**).

Pour cette raison, un autre activateur de l'AMPK, l'A-769662, a été testé dans les cellules Caco-2. Cet activateur a la particularité d'être complètement spécifique à l'AMPK (**Cool et al., 2006**). En revanche, il active seulement les complexes hétérotrimériques contenant la sous-unité β1 (**Goransson et al., 2007**; **Scott et al., 2008**). Or, la caractérisation de l'AMPK dans les cellules intestinales a montré que la sous-unité régulatrice β2 était majoritaire. Effectivement, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK par l'A-769662 était minime (**Figure 45**).

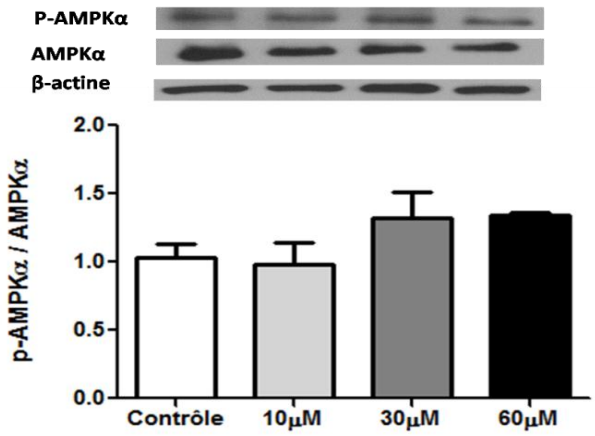


Figure 45: Le composé A-769662 ne permet pas l'activation par phosphorylation de l'AMPK dans les cellules Caco-2/15. Une courbe « dose-réponse » (10-30-60µM, 3 heures) du composé A-769662 sur la phosphorylation (Thr172) de l'AMPK a été réalisée à partir des protéines de lysats cellulaires Caco-2/15 et par immunobuvardage de type Western lors de 2 expériences distinctes en duplicatas (N=2, n=4). Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou d'AMPKα et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±SE.

Enfin, la Metformine est l'agent anti-diabétique le plus employé pour traiter les patients, c'est pourquoi nous l'avons utilisé pour montrer son action sur l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2/15 et confirmer l'absence de régulation de l'HMG-CoA Réductase par l'AMPK. Cet activateur n'est également pas spécifique de l'AMPK. La plupart

des études portant sur différents tissus ou types cellulaires ont utilisées des concentrations de Metformine disparates qui s'étendent de 10µM à 10mM pour phosphoryler et activer l'AMPK (**Huypens et al., 2005**; **Sakar et al., 2010**; **Walker et al., 2005**; **Zhou et al., 2001**). Or dans l'intestin, le mécanisme d'absorption de la Metformine est saturable : elle est le substrat des OCTs (Organic Cation Transporter) et de nombreuses études cliniques ont montré une diminution de la biodisponibilité de la Metformine à de fortes concentrations (**Proctor et al., 2008**). Une courbe « dose-réponse » (0,1mM à 4mM, 3 heures) a donc été établie pour déterminer la concentration optimale de la Metformine permettant de phosphoryler et d'activer l'AMPK intestinale (**Figure 46A**). Quelque soit la concentration, l'AMPK était fortement phosphorylée (9 fois) mais sa phosphorylation a tendance à diminuer (3 fois) avec les fortes concentrations de Metformine (4mM), probablement à cause de la saturation des transporteurs OCTs intestinaux. D'après les résultats, la concentration optimale de Metformine pour phosphoryler et activer l'AMPK était de 0,5mM après un traitement des cellules d'une durée de 3 heures (**Figure 46A et B**). Elle induisait la phosphorylation de ses substrats ACC et HMG-CoA Réductase (**Figure 46C et D**). L'ACC était fortement inhibée par phosphorylation (~5 fois). Par contre la phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase augmente légèrement (~1,5 fois) mais le test statistique n'est pas significatif. Ce qui confirme une fois de plus que l'HMG-CoA Réductase échappe au contrôle de l'AMPK dans l'intestin.

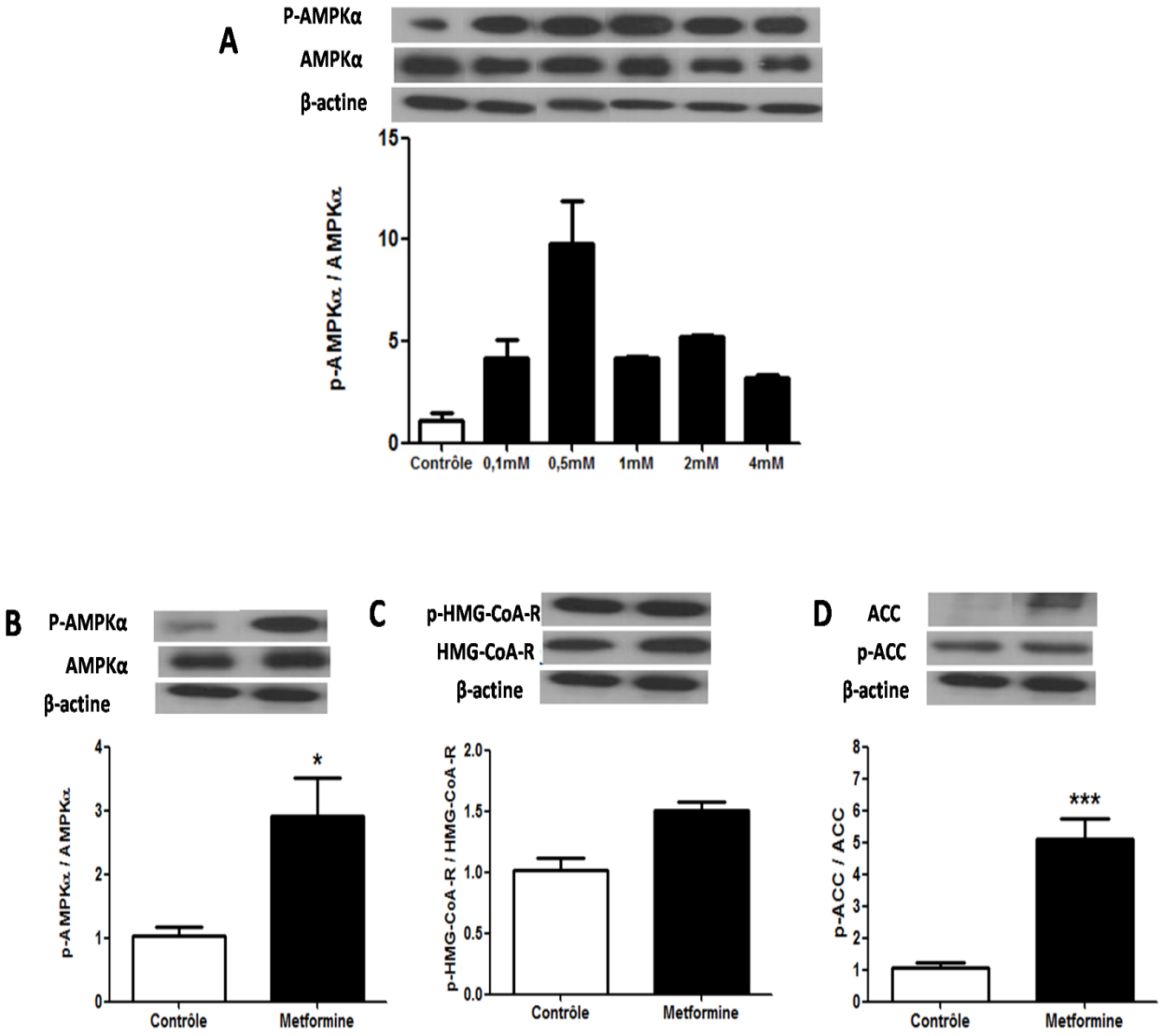


Figure 46 : L'activation via la phosphorylation (Thr172) de l'AMPK par la Metformine inhibe par phosphorylation (Ser79) l'activité de l'ACC mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation (Ser872) de l'HMG-CoA Réductase. Les niveaux de phosphorylations sont examinés par immunobuvardage de type Western. Une courbe « dose-réponse » (0,1 à 4mM, 3 heures) (**A**) est réalisée à partir de cellules Caco-2/15 différentiées lors d'une expérience effectuée en duplicatas (N=1, n=2). Niveaux de phosphorylations de (**B**) l'AMPK, (**C**) l'HMG-CoA réductase, (**D**) l'ACC en présence de Metformine (0,5mM, 3 heures). Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir de 3 expériences distinctes réalisées en triplicatas (N=3, n=9). *P<0,05 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

5.1.3 Régulation physiologique de l'AMPK *in vitro*

L'AMPK est une protéine kinase sensible aux variations énergétiques. Bien que sa fonction soit tissu-spécifique, son rôle principal dans toutes les cellules demeure celui de maintenir les réserves énergétiques en activant les voies cataboliques productrices d'ATP et en inhibant les voies anaboliques consommant l'ATP. Ainsi, le jeûne induit son activation alors qu'un excès de nutriments l'inhiberait (**Hardie et Carling, 1997**).

Dans cette optique, les cellules Caco-2 ont été incubées avec des milieux dont la concentration du glucose variait (0-5-25mM). Les cellules incubées en présence d'une concentration physiologique de glucose (5mM) ont été utilisées comme contrôles. Celles incubées avec un milieu dépourvu de glucose (0mM) représentaient les cellules « à jeun » tandis que celles incubées avec de fortes concentrations de glucose (25mM) représentaient les cellules « en excès énergétique ».

Tout d'abord une courbe de cinétique (0,5-1-4-8 heures) concernant l'effet de fortes concentrations de glucose (25mM) sur la phosphorylation de l'AMPK a été établie (**Figure 47A**). Bien que la cascade de phosphorylation se déroule théoriquement dans un intervalle de temps assez court, le glucose en excès n'affectait pas significativement la phosphorylation de l'AMPK après 30 minutes d'incubation. Une légère augmentation (1,3 fois) de sa phosphorylation était observée. Par contre, au-delà d'1 heure, l'excès de glucose inhibait la phosphorylation de l'AMPK (73%) surtout après 4 heures d'incubation (78%) mais l'effet était moins important après 8 heures (50%). L'intervalle de temps où l'effet du glucose en excès était le plus prononcé était donc de 1 à 4 heures. Ainsi, pour les expériences suivantes sur la régulation physiologique de l'AMPK, nous avons choisi une durée de 4 heures d'incubation des cellules Caco-2.

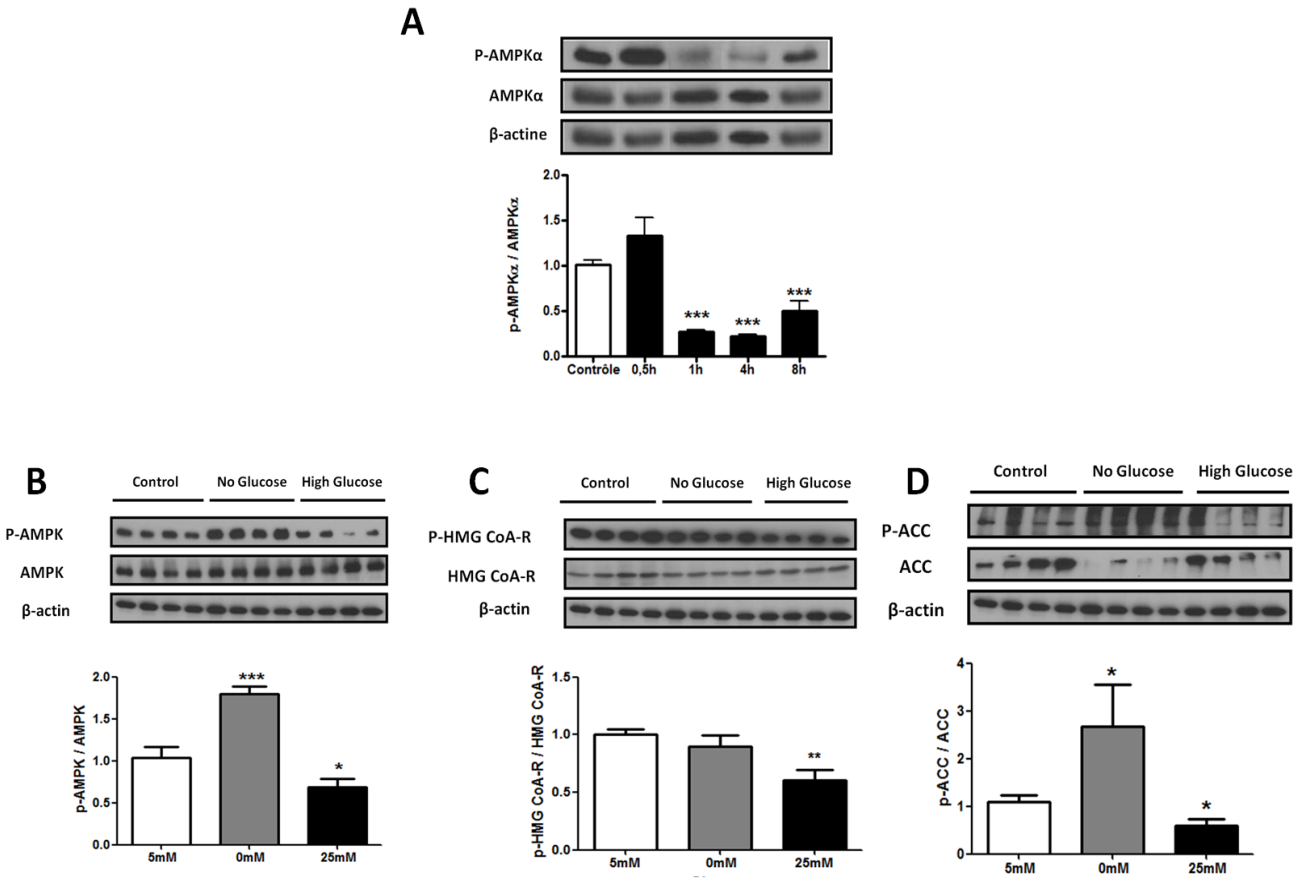


Figure 47 : Régulation de l'activité par phosphorylation de l'AMPK (Thr172) et des enzymes clés de la lipogenèse, l'HMG-CoA Réductase (Ser872) et l'ACC (Ser79) par différentes concentrations de glucose (0-5-25mM). Les niveaux de phosphorylations sont examinés par immunobuvardage de type Western. (**A**) Une courbe de cinétique (0,5-1-4-8h avec 25mM de glucose) est réalisée à partir de cellules Caco-2/15 différentiées et lors de 2 expériences effectuées en duplicatas (N=2, n=4). Niveaux de phosphorylations de (**B**) l'AMPK, (**C**) l'HMG-CoA réductase, (**D**) l'ACC en présence de glucose (0-5-25mM, 4 heures). Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir de 3 expériences distinctes réalisées en triplicatas (N=3, n=9). *P<0,05 vs. Contrôle ; **P< 0,01vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

D'après la **Figure 47B**, les cellules déplétées en glucose (à jeun) présentaient une augmentation de l'activité par phosphorylation de l'AMPK (1,8 fois), ce qui avait pour conséquence une inhibition importante de l'ACC par phosphorylation (2,7 fois). Toutefois, la phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase n'était pas modifiée. A l'inverse, l'excès de glucose inhibait l'activité de l'AMPK par diminution de sa phosphorylation (78%).

Parallèlement, les phosphorylations de l'ACC et de l'HMG-CoA Réductase étaient réduites de 50% et 40% respectivement (**Figure 47C et D**).

Ces résultats indiquent qu'en absence de glucose (situation de jeûne), l'AMPK est phosphorylée et activée. Dans cette situation, seule la synthèse des acides gras semble être réprimée puisque l'ACC est inhibée par phosphorylation des résidus Ser79 mais pas celle de l'HMG-CoA Réductase. Inversement, les fortes concentrations de glucose (situation d'excès énergétique) réduisent la phosphorylation de l'AMPK, de l'ACC et de l'HMG-CoA Réductase, suggérant une stimulation de la lipogenèse (synthèse des acides gras et du cholestérol).

5.1.4 Conclusions

Nos travaux ont permis de caractériser pour la première fois l'AMPK dans l'intestin. Des approches multiples ont été utilisées afin d'étudier la structure et la régulation de l'AMPK au niveau de l'intestin. En utilisant le modèle cellulaire Caco-2, nous avons pu révéler la signature du complexe hétérotrimérique (α1β2γ1) de l'AMPK intestinale et sa régulation par différents effecteurs. L'AMPK intestinale est finement régulée, activant ou inhibant l'enzyme de synthèse des acides gras en fonction de l'état énergétique de la cellule. Contrairement au foie, la synthèse du cholestérol dans l'intestin semble échapper au contrôle de l'AMPK car le niveau de phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase n'est pas modifié en présence d'activateurs ou d'inhibiteurs de l'AMPK. Toutefois, il est modifié en présence de fortes concentrations de glucose laissant croire que le « pool » de glucose pourrait moduler l'activité de l'HMG-CoA Réductase.

5.2 RÔLES DE L'AMPK DANS LA LIPOGENÈSE

Déterminer les rôles spécifiques de l'AMPK intestinale était un de nos objectifs afin de mieux cerner les mécanismes impliqués dans la régulation intra-entérocytaire du stockage énergétique. Nous avons montré par une approche principalement pharmacologique que l'AMPK régule l'enzyme de synthèse des acides gras mais pas celle du cholestérol. Une approche d'invalidation génique de la sous-unité catalytique principale α1 de l'AMPK a été utilisée dans ce chapitre afin de confirmer son implication dans la régulation des enzymes lipogéniques. En effet, l'utilisation de composés pharmacologiques qui n'étaient pas complètement spécifiques de l'AMPK nécessitait de valider les résultats par une autre approche telle que l'invalidation génique. De plus, cette approche devait permettre d'identifier quelle sous-unité de l'AMPK était impliquée dans la régulation des enzymes lipogéniques.

5.2.1 Validation du modèle d'invalidation de l'AMPKα1 (knock-down)

La sous-unité catalytique α1 de l'AMPK a été choisie pour l'invalidation de cette protéine kinase. En effet, notre travail de caractérisation de l'AMPK montrait que le complexe hétérotrimérique majeur dans les cellules Caco-2 était constitué de la sous-unité α1.

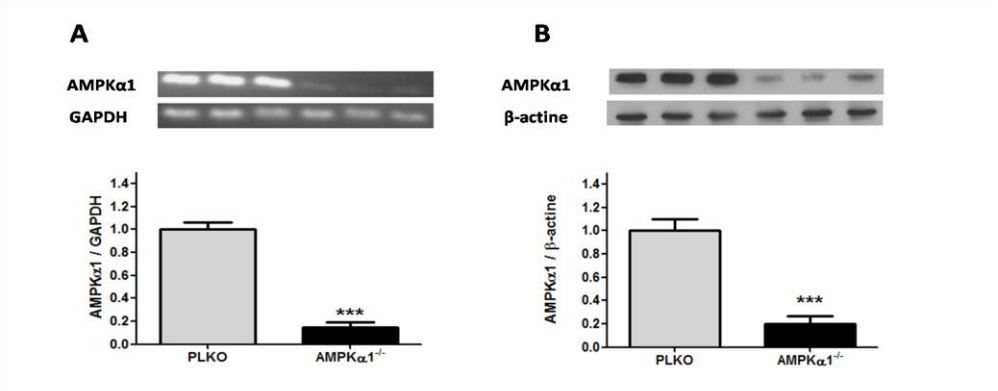


Figure 48 : Expression de l'AMPKα1 dans les cellules Caco-2/15 infectées avec des shRNAS (petits ARNs en épingle à cheveux). Après l'infection par les lentivirus, les cellules Caco-2/15 prolifèrent jusqu'à confluence puis se différencient pendant 10 jours avant d'être utilisées pour déterminer l'expression génique (**A**) et protéique (**B**) de l'AMPKα1. Une RT-PCR est réalisée après extraction de l'ARN total des cellules Caco-2. Un immunobuvardage de type Western permet de déterminer l'expression protéique à partir de protéines totales de lysats cellulaires. Les cellules contrôles sont obtenues par infection avec un lentivirus vide pLKO.1 présentant les mêmes caractéristiques que le shRNA. Les résultats d'expression génique et protéique sont normalisés respectivement par la quantité totale de GAPDH et de β-actine et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±ES obtenue à partir d'une expérience réalisée en triplicata (n=3). ***P<0,001 vs. Contrôle.

Une lignée de cellules Caco-2 présentant une invalidation de l'AMPKα1 (cellules AMPKα1$^{-/-}$) a été établie au moyen de lentivirus non réplicatif qui ciblent le gène PRKAA1 codant pour l'AMPKα1. Les lentivirus ont été produits au préalable en transfectant des cellules 293FT avec un plasmide contenant les petits ARNs en épingle à cheveu (shRNAs). L'expression de l'AMPKα1 a été ensuite mesurée dans les cellules Caco-2 mises en culture après 10 jours de différentiation et comparée avec les cellules contrôles infectées par le vecteur pLKO.1 vide (cellules PLKO) ne contenant pas de shRNAs.

Une réduction significative de l'expression génique de l'AMPKα1 (85%) était observée dans les cellules infectées avec les shRNAs dirigés contre PRKAA1 par rapport aux cellules PLKO (**Figure 48A**). Il en résultait une expression protéique de l'AMPKα1 réduite de 80% par rapport aux cellules contrôles PLKO (**Figure 48B**).

Nous pouvons donc en conclure que le modèle de « knock-down » de l'AMPKα1 est valide dans les cellules Caco-2. Les expériences subséquentes peuvent donc être réalisées à partir de cette lignée cellulaire dépourvue d'AMPKα1.

5.2.2 Impact de l'invalidation de l'AMPKα1 sur les enzymes de la lipogenèse

Nous avons analysé l'impact du « knock-down » de l'AMPKα1 sur le niveau de phosphorylation de l'ACC et de l'HMG-CoA Réductase impliquées dans la lipogenèse afin de confirmer le rôle de l'AMPK, en particulier de la sous-unité α1, dans la régulation de ces enzymes. Après les 10 jours « post-infection » des cellules Caco-2, ces dernières ont été ensuite traitées avec un activateur (AICAR) ou un inhibiteur (Composé C) de l'AMPK afin de mieux observer l'impact du knock-down de la sous-unité α1 sur l'activité de l'AMPK et de ses cibles potentielles.

Les cellules PLKO ou AMPKα1$^{-/-}$ ont été incubées pendant 3 heures avec ou sans AICAR (8mM), un activateur de l'AMPK. Les résultats illustrés dans la **Figure 49A** ont permis de confirmer la stabilité du knock-down puisque l'expression protéique de l'AMPKα1 était réduite en moyenne de 88%. Il est à noter que la présence d'AICAR n'affectait pas l'expression protéique de α1 ni dans les cellules PLKO, ni dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$.

Les résultats contenus dans la **Figure 49B** révèlent l'effet du knock-down avec ou sans AICAR sur l'activité par phosphorylation de l'AMPK. Dans les cellules PLKO incubées en présence d'AICAR, le niveau de phosphorylation de l'AMPK était augmenté de 3 fois, ce qui permet de valider les conditions expérimentales.

Au contraire, dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$, le niveau de phosphorylation de l'AMPK était réduit de 97% alors qu'en présence d'AICAR, il était identique aux cellules contrôles PLKO, probablement lié à la phosphorylation de la sous-unité catalytique α2 intacte.

Ces résultats donnent une meilleure vision de la proportion des isoformes α1 et α2 dans les cellules intestinales. La réduction quasiment complète de la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules déficientes en α1 montre que cette sous-unité est bien plus abondante que α2. Ce résultat confirme la prépondérance des complexes hétérotrimériques contenant la sous-unité α1. Toutefois, le rôle de la sous-unité α2 n'est pas à négliger puisque sa phosphorylation par l'AICAR permet d'activer l'AMPK au même niveau que les cellules PLKO.

Comme il est montré dans la **Figure 49C**, l'activation de l'AMPK par l'AICAR dans les cellules contrôles PLKO entraînait ensuite la phosphorylation de l'ACC (~ 40 fois). Cela confirmait à nouveau que les conditions expérimentales étaient bonnes. En outre, l'invalidation de la sous-unité α1 réduisait la phosphorylation de l'ACC de 69%. Par contre, son absence n'affectait pas la phosphorylation de l'ACC (~30 fois) lorsque l'AICAR était ajouté aux cellules AMPKα1$^{-/-}$. Ceci suggère que la sous-unité α2 compenserait la perte d'α1 ou bien elle détiendrait un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité de l'ACC. Par ailleurs, ces résultats confirment le rôle de l'AMPKα1 dans la régulation de la synthèse intestinale des acides gras par le biais de l'ACC.

Enfin, nous avons observé l'impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur la phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase afin de confirmer nos résultats précédents obtenus par l'approche pharmacologique. Les résultats montraient l'absence d'effet sur la phosphorylation de l'HMG-CoA Réductase par tous les traitements (cellules PLKO ou AMPKα1$^{-/-}$ avec ou sans AICAR) (**Figure 49D**). Ces données confirment que l'AMPK n'a aucun rôle dans la régulation de l'HMG-CoA réductase intestinale.

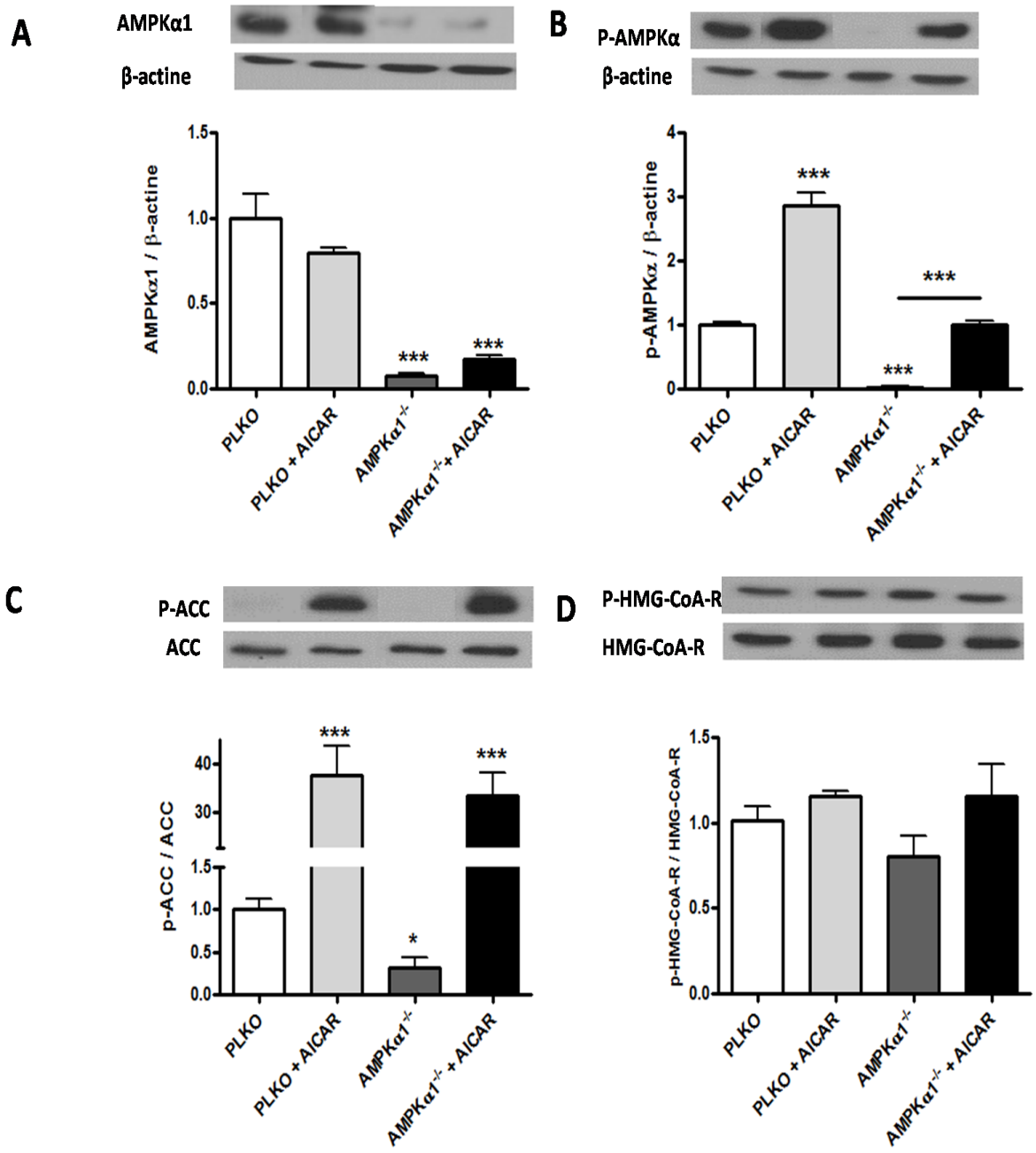


Figure 49: Impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur les enzymes clés de la lipogenèse (ACC et HMG-CoA Réductase) en présence ou non d'un activateur de l'AMPK, l'AICAR (8mM, 3 heures). (**A**) Expression protéique de l'AMPKα1et impact sur les niveaux de phosphorylations de (**B**) l'AMPK (Thr172), (**C**) l'ACC (Ser79), (**D**) l'HMG-CoA Réductase (Ser872). Les protéines totales issues de lysats cellulaires de Caco-2/15 différenciées sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine ciblée et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir d'une expérience réalisée en triplicata (n=3). *P<0,05 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

Etant donné que la sous-unité α2 semble compenser la perte de α1, nous avons également utilisé un inhibiteur de l'AMPK, le composé C (40µM, 3 heures) capable de réduire simultanément la phosphorylation des deux sous-unités α1 et α2 dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$. Cette technique devait également permettre de potentialiser l'invalidation de l'isoforme α1. D'après la **Figure 50A**, l'expression protéique de la sous-unité α1 était réduite de 93% et l'ajout du composé C n'affectait pas son expression dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$. En revanche, la phosphorylation de l'AMPK était réduite de 50% par le composé C dans les cellules contrôles PLKO, ce qui montre l'efficacité du composé C (**Figure 50B**). En outre, l'invalidation de la sous-unité α1 (cellules AMPKα1$^{-/-}$) réduisait la phosphorylation de l'AMPK de plus de 90%. Le traitement des cellules AMPKα1$^{-/-}$par le composé C maintenait l'inhibition de la phosphorylation de l'AMPK de plus de 90%.

Concernant l'activité de l'ACC, un effet synergique sur la phosphorylation de l'ACC était exercé par :

- l'inhibition de la phosphorylation des sous-unités α1 et α2 de l'AMPK par le composé C ;
- et l'invalidation de la sous-unité α1 (cellules AMPKα1$^{-/-}$ + CC)

En effet, l'inhibition de la phosphorylation par le composé C réduisait de 50% la phosphorylation de l'ACC dans les cellules contrôles PLKO (**Figure 50C**). L'invalidation génique de la sous-unité α1 entraînait une réduction de 75% de cette phosphorylation et la combinaison des deux paramètres induisait une inhibition de plus de 90%. Ce résultat montre donc l'implication de la sous-unité α2 de l'AMPK dans la régulation de l'ACC, enzyme clé de la synthèse des acides gras.

D'autre part, l'expression protéique de l'HMG-CoA Réductase a été analysée dans les mêmes conditions décrites précédemment (**Figure 50D**). Une fois de plus, il ne se produisait aucun effet sur la phosphorylation de cette enzyme. Ce résultat confirme que l'AMPK ne joue pas de rôle dans la régulation de l'HMG-CoA Réductase, l'enzyme clé de la synthèse du cholestérol.

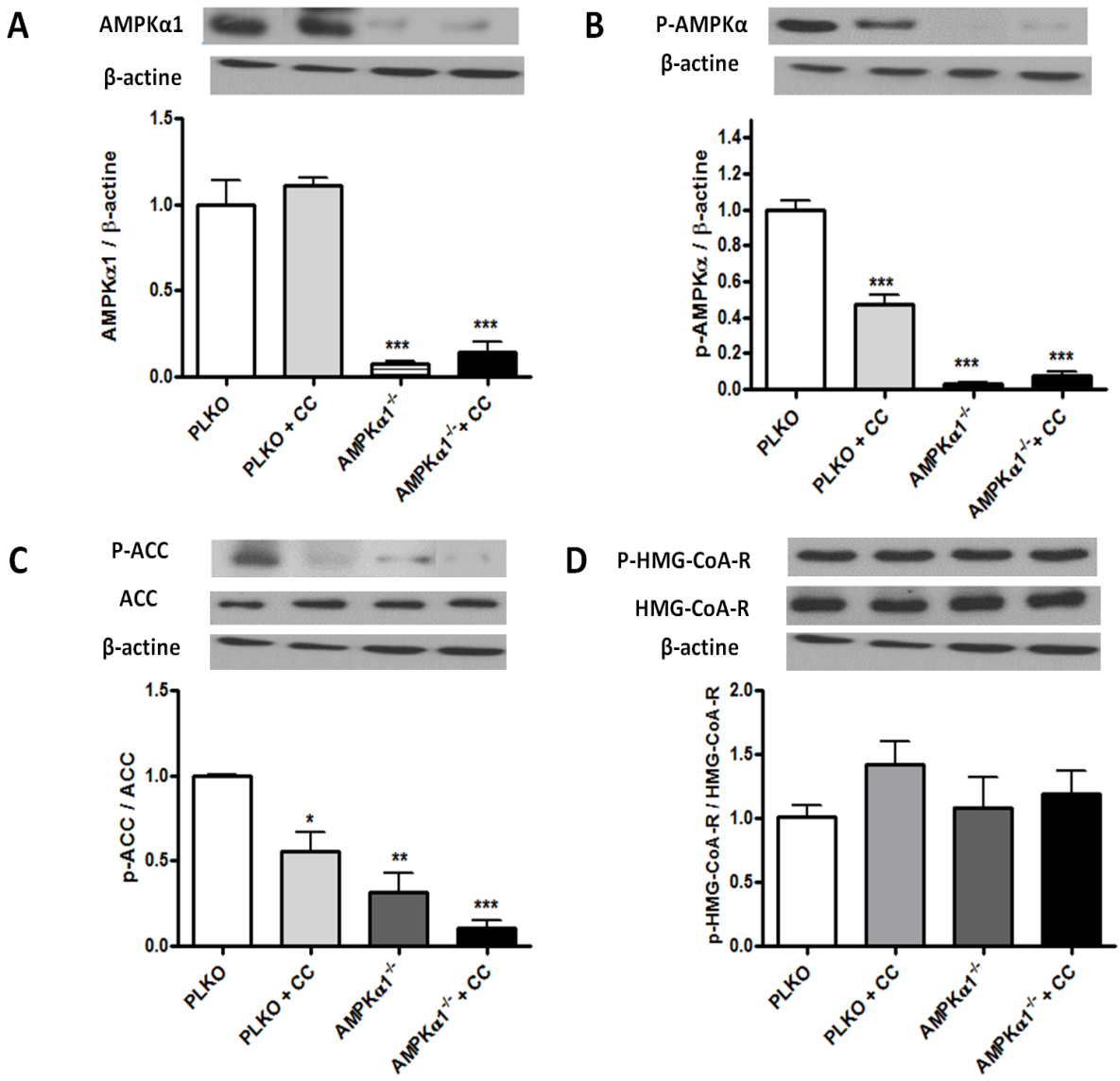


Figure 50: Impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur les enzymes clés de la lipogenèse (ACC et HMG-CoA Réductase) en présence ou non d'un inhibiteur de l'AMPK, le composé C (40µM, 3 heures). (**A**) Expression protéique de l'AMPKα1et impact sur les niveaux de phosphorylations de (**B**) l'AMPK (Thr172), (**C**) l'ACC (Ser79), (**D**) l'HMG-CoA Réductase (Ser872). Les protéines totales issues de lysats cellulaires de Caco-2/15 différenciées sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir d'une expérience réalisée en triplicatas (n=3). *P<0,05 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

5.2.3 Conclusions

Dans ce chapitre, le modèle cellulaire d'invalidation de la sous-unité α1 de l'AMPK, a permis de confirmer son rôle dans la régulation des enzymes lipogéniques au niveau de l'intestin. Elle régule finement l'enzyme de synthèse des acides gras, l'ACC. Contrairement au foie, elle ne régule pas l'enzyme de synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA Réductase.

Par ailleurs, il semble que la sous-unité catalytique α2 joue également un rôle important dans la régulation de l'ACC, notamment lorsque α1 est déficiente. Il se pourrait que la sous-unité α2 compense la perte de α1, ce qui expliquerait la phosphorylation de l'ACC en présence d'AICAR dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour comprendre les rôles respectifs des sous-unités α1 et α2 de l'AMPK dans la régulation de la lipogenèse.

5.3 AMPK IN THE SMALL INTESTINE IN NORMAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Les résultats de caractérisation de l'AMPK dans les cellules intestinales ont fait l'objet d'un deuxième article. Des travaux supplémentaires à partir du modèle animal *Psammomys obesus* d'insulino-résistance et de diabète de type II ont permis de compléter l'article afin d'éclaircir quant au rôle de l'AMPK intestinale dans les situations physiopathologiques. En effet, son rôle dans la régulation de la lipogenèse a bien été défini dans les tissus insulino-sensibles tels que le foie, le muscle et le tissu adipeux. Toutefois, sa fonction demeure inconnue dans l'intestin, un organe pourtant intimement lié aux désordres lipidiques et glucidiques associés au diabète de type II.

RESUME: Chez les mammifères, la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une enzyme clé dans la régulation de la balance énergétique à l'échelle cellulaire et de l'organisme entier, la plaçant ainsi au centre des études sur l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique. Lorsqu'elle est activée, l'AMPK réprime les voies anaboliques consommatrices d'énergie (lipogenèse, néoglucogenèse, synthèse protéique) et active les voies cataboliques productrices d'énergie (oxydation des acides gras, glycolyse, protéolyse). Bien que son importance dans la régulation de l'homéostasie des glucides et des lipides ait bien été étudiée dans le muscle squelettique et le foie, son rôle au niveau des entérocytes demeure non élucidé. Le but de cette étude était de déterminer le statut, la composition, la régulation et la fonction lipidique du complexe hétérotrimérique de l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2 ainsi que l'impact d'une insulino-résistance (IR) systémique et d'un diabète de type II (DT2) sur l'activité de l'AMPK intestinale corrélée à la sensibilité à l'insuline et la synthèse lipidique dans cet organe. Pour ce faire, les cellules intestinales Caco-2 et le modèle animal *Psammomys obesus* de diabètes nutritionnels ont été utilisés. Nos données ont montré la présence de toutes les sous-unités de l'AMPK (α1/α2/β1/β2/γ1/γ2/γ3) dans les cellules Caco-2. L'analyse de l'expression génique et protéique par RT-PCR et par immunobuvardage de type Western a révélé une nette différence dans l'abondance de chaque sous-unité de l'AMPK avec une prépondérance pour l'AMPKα1. La prévalence de l'hétérotrimère α1/β2/γ1 a été confirmée par immunoprécipitation. L'AMPK était activée par l'AICAR et la Metformine, favorisant ainsi la phosphorylation de sa cible en aval, l'Acétyl-CoA-Carboxylase (ACC),

suggérant une inhibition de la synthèse des acides gras. Curieusement, aucun effet sur l'HMG-CoA Réductase n'a été observé, une enzyme clé de la synthèse du cholestérol. Réciproquement, l'inhibition de la phosphorylation de l'AMPK par le Composé C stimule l'activité de l'ACC sans affecter l'HMG-CoA Réductase. Finalement, une forte concentration de glucose altère l'activité de l'AMPK alors qu'elle induit celle de l'ACC. L'administration de Metformine aux animaux *Psammomys obesus* insulino-résistants et diabétiques induisait (a) une réactivation de l'AMPK caractérisée par une augmentation de la phosphorylation du résidu Thr172 ; (b) une réduction de l'activité de l'ACC ; (c) une augmentation de l'expression génique et protéique de CPT1 favorisant la β-oxydation ; (d) une tendance à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline caractérisée par une augmentation de la phosphorylation de l'Akt et de la GSK3β et (e) une inactivation des voies de stress p38-MAPK et ERK1/2 par réduction de leur phosphorylation. Par ailleurs, le traitement de ces animaux diabétiques par la Metformine réduit les évènements intracellulaires qui gouvernent le transport des lipides (Sar1b GTPase) et l'assemblage des lipoprotéines dans le petit intestin (MGAT, DGAT, MTP, Apo-B48). Pour conclure, ces données suggèrent qu'une importante interaction entre les voies de signalisation de l'insuline et de l'AMPK est requise pour une synthèse des lipides et une sécrétion normale des lipoprotéines par le petit intestin.

AMPK in the small intestine in normal and pathophysiological conditions

Running Title: AMPK in intestinal absorptive cells

Elodie Harmel[1,2, 6], Emilie Grenier[1,2], Ali BenDjoudi Ouadda[1], Mounib El Chebly[1,3], Ehud Ziv[4], Jean François Beaulieu[5], Alain Sané[1], Schohraya Spahis[1,2], Martine Laville[6], Emile Levy[1,2,5*]

(1) Research Centre, CHU Ste-Justine
(2) Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada
(3) Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada
(4) Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah Ein Kerem Hospital, Jerusalem, Israel
(5) Canadian Institutes for Health Research Team on the Digestive Epithelium, Department of Anatomy and Cellular Biology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada
(6) Centre de recherche Rhône-Alpes en nutrition humaine, Hôpital Edouard-Herriot, Faculté de Médicine, Université de Lyon-1, France

Address correspondence to:

Dr. Emile Levy
Research Centre
Gastroenterology, hepatology and nutrition Unit
CHU-Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5
Tel.: (514) 345-7783
Fax: (514) 345-4999
E-mail: emile.levy@recherche-ste-Justine.qc.ca

ABSTRACT

Since the role of AMPK in regulating energy storage and depletion remains unexplored in the intestine, the aim of this study was to define its status, composition, regulation and lipid function in Caco-2/15 cells, as well as to examine the impact of systemic insulin resistance (IR) and type 2 diabetes (T2D) on intestinal AMPK activation, insulin sensitivity and lipid handling in the nutritional diabetes *Psammomys obesus* animal model. Our data showed the presence of all AMPK subunits (α1/α2/β1/β2/γ1/γ2/γ3) in Caco-2/15 cells with a marked difference in their abundance, but with a predominance of AMPKα1 and the prevalence of α1/β2/γ1 heterotrimer. AMPK was activated by AICAR and metformin, resulting in increased phosphorylation of the downstream target AcetylCoA carboxylases (ACC) and no influence on HMG-CoA reductase. Reciprocally, down-regulation of AMPK phosphorylation by Compound C and high glucose enhanced ACC activity without affecting HMG-CoA reductase. Administration of metformin to *Psammomys obesus* with IR and T2D led to (a) an upregulation of intestinal AMPK signaling pathway essentially typified by ascending AMPKα$^{-Thr172}$ phosphorylation; (b) a reduction in ACC activity; (c) an elevation in the gene and protein expression of CPT1, supporting a stimulation of β-oxidation; (d) a trend of increase in insulin sensitivity portrayed by augmentation of Akt and GSK3β phosphorylation; (e) an inactivation of the stress-responsive p38-MAPK and /ERK1/2 exemplified by their phosphorylation lessening; and (f) a decrease in diabetic dyslipidemia following lowering of intracellular events that govern lipoprotein assembly. These data suggest that AMPK fulfills key functions in metabolic processes in the small intestine.

Key words: AMPK, intestine, lipid synthesis, lipoprotein production, apolipoprotein biogenesis, insulin signaling, metformin, diabetes, *Psammomys obesus*.

INTRODUCTION

Mammalian 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine protein kinase that acts as a sensor of cellular energy homeostasis. It is expressed as a heterotrimer consisting of one catalytic α subunit and two regulatory subunits (β, γ). The subunits α and β are each encoded by two genes (α1/α2; β1/β2) while the γ subunit by three genes (γ1/γ2/γ3), yielding 12 possible heterotrimeric complexes, which provide a molecular basis for the multiple roles of the highly conserved AMPK signaling system in nutrient regulation and utilization in mammalian cells (1). The different complexes confer tissue specificity. Surprisingly, little information is available about the specific AMPK complex composition in the small intestine, an organ highly involved in nutrient transport and metabolism.

The control of AMPK activity is complex and the classic view is that AMPK is activated allosterically by an increase in the intracellular AMP/ATP ratio and/or by the phosphorylated-AMPK$^{-Thr172}$ within the α subunit. The enzyme is activated in response to intracellular stresses, leading to increased AMP/ATP ratios, and hormones that regulate whole-body energy metabolism (2,3). AMPK is also activated by powerful glucose lowering drugs such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside (AICAR) and metformin (4,5). Activation of AMPK leads to phosphorylation of multiple downstream targets that restore energy imbalances. In particular, AMPK attenuates lipogenesis in organs such as the liver and muscle, through phosphorylation and inhibition of acetyl-CoA carboxylases (ACC), resulting in lower malonyl-CoA levels and, thus, promoting mitochondrial β-oxidation while simultaneously suppressing fatty acid synthesis (6). The cholesterol *de novo* synthesis is controlled by AMPK as well through phosphorylation and inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase (6). Currently, the AMPK subunit profile as well as the AMPK phosphorylation degree, activity and role in the small intestine in normal and pathophysiological conditions are unresolved.

The huge interest in AMPK has been generated due to both acute and chronic effects on glucose and lipid metabolism through phosphorylation of key protein substrates, but above all because of the associations between the metabolic syndrome and the pathways that are regulated by AMPK at the cellular level. Previous studies have suggested that AMPK signaling may be suppressed with obesity and that therapeutic activation of AMPK may therefore be beneficial (7-9). At present, AMPK system appears as a major player in the development and/or treatment of type 2 diabetes (T2D), which has considerably increased in modern industrialized societies. Importantly, AMPK activation has been shown to improve skeletal muscle and liver insulin sensitivity through distinct mechanisms. The central question is how this explosion in knowledge applies to the intestinal system (10,11). Even if AMPK's importance in controlling lipid metabolism in skeletal muscle and liver has been well established (12-14), its role in regulating energy storage and depletion in enterocytes remains unexplored. In fact, little attention has been paid to the gastrointestinal tract, the first system to face nutrients, and particularly to the small intestine, an organ closely associated with diabetic postprandial dyslipidemia (15,16).

Since little is known to date about the status of AMPK in the intestine, we devoted multiple efforts towards defining its structure, activation and regulation using intestinal Caco-2/15 cells. Furthermore, to clarify the metabolic role of AMPK, experiments were performed to test how ablation of this enzyme by genetic manipulation in this intestinal cell model impacted on intracellular insulin signaling and lipid homeostasis. Finally, to figure out the status of intestinal AMPK in insulin resistance (IR) and T2D, we employed the *Psammomys obesus* (*P. obesus*) sand rat**,** a unique model of metabolic syndrome, and appraised the effects of metformin.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

The human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cell line was employed as previously described in our numerous studies (17-20). Briefly, Caco-2/15 cells were grown at 37°C with 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent Bicocenter, CA) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (Wisent Bicocenter, CA) 1% sodium pyruvate (Sigma Aldrich INC.), 1% glutamax (GIBCO BRL), and supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (Flow, McLean, VA). For experiments, cells were plated at a density of $1X10^6$ cells/well on six-well polycarbonate Transwell filter inserts plates (Costar, Cambridge, MA), permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayer. Cells were cultured for 21 days to fully differentiate for optimal lipid synthesis (21,22). The medium was refreshed every 48h.

Disruption of AMPKα1 gene expression by shRNA

Exponentially growing Caco-2 cells were transfected either with the pGIPZ non-silencing (scramble) lentiviral shRNAmir vector (V2LHS_57699) or the pGIPZ vector harbouring shRNAmir expression cassette against AMPK-α1 (V3LHS_348528) (Open Biosystems). Knockdown of AMPK-α1 was measured by RT-PCR and western blot. Forward primer AGGAAGAATCCTGTGACAAGCAC and reverse primer CCGATCTCTGTGGAGTAGCAGT were used for gene modification.

Animals

P. obesus gerbils (2.5–3.5 months old) from the Hebrew University colonies were obtained from Harlan (Jerusalem, Israel). They were housed in individual polypropylene cages in a temperature-controlled room with a 12-h light-dark cycle when water and food were supplied ad libitum as described previously (22-26). Metformin (300 mg/kg daily) was dissolved in drinking water and administered orally for 3 weeks. Metformin concentrations in

water were readjusted twice a week after measuring daily water intake. The untreated animals received drinking water without metformin ad libitum. In order to test the direct involvement of AMPK in these experiments, 3 days before sacrifice, the animals on Metformin treatment were injected with 50 nM Compound C, a poweful inhibitor of AMPK. All experimental procedures performed in the study were authorized by the Institutional Animal Care Committee.

Intestinal organ culture.

De novo intestinal lipid transport was performed as described in details previously (25). Briefly, the jejunum from *P. obesus* was washed and cut into explants, which were transferred onto lens paper, with the mucosal side facing up in each organ culture dish according to our techniques (18,27). After a 30-min stabilization period, the medium was replaced with fresh one containing a final amount of 1.0µmol/ml unlabeled oleic acid with 0.5µCi of [^{14}C]-oleic acid in a micellar mixture (6.6 mM sodium taurocholate, 1 mM oleic acid, 0.5 mM monoolein, 0.1 mMcholesterol, and 0.6 mM phosphatidylcholine) (28). Intestinal explants from *P. obesus* were cultured for 3 h. After this incubation period, tissue integrity was confirmed by morphological (lighted electron microscopy) and biochemical (sucrase activity) studies.

Miscellaneous techniques

All the biochemical methods were described in the Supplementary data.

Statistical analysis

Statistical analyses of data were performed with Prism 4.03 software (GraphPad Software). All values were expressed as the mean ± SEM. The data were evaluated by two-tailed To assess differences in the parameters studied, data were statistically analysed by ANOVA. Differences between mean values were evaluated by Student's two tailed *t*-test. A *P* value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Identification of the subunits of the major AMPK heterotrimeric complex

Since AMPK exists in most of the tissues as a heterotrimeric complex that confers different properties and shows relative tissue specificity, we first identified the composition of the major AMPK isoforms (α, β, γ) in intestinal Caco-2/15 cells. Although RT-PCR analyses revealed the presence of the seven isoforms (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2 and γ3), the predominant subunits were α1, β2 and γ1 (**Supplementary Fig. *1A***). The data were validated by Western blot (**Supplementary Fig. *1B***). In order to determine the direct interactions of the catalytic subunits (α) with the two regulatory subunits (β and γ), the co-immunoprecipitation technique was employed. This experimental approach allowed us to show a more intense cooperation between α1, β2 and γ1 whereas α2 showed more affinity for β1 and γ3 (**Supplementary Fig. *1C***). Interestingly, differences were noted between differentiated and non-differentiated Caco-2/15 cells: the gene expression of AMPK isoforms α1, β2 and γ1 was higher in differentiated than counterparts in non-differentiated Caco-2/15 cells (data not shown), suggesting a distinct regulation of AMPK in mature and immature cells.

Pharmacological modulation of AMPK

AMPK stimulation appears to be a fundamental process of the response of many cell types to various stresses. However, AMPK can intensively be phosphorylated and activated in various tissues by the powerful pharmacological agent AICAR. Given the paucity of information in the small intestine, we evaluated the potential of AICAR to act on AMPK in Caco-2/15 cells. As shown in **Figure *1A***, treatment of Caco-2/15 cells with AICAR induced a dose-dependent phosphorylation of AMPK$^{-Thr172}$. As no cytotoxicity was noted with high concentrations of AICAR using MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) test (data not shown) and cell differentiation markers, we selected 8 mM to ensure maximal effects on AMPK phosphorylation. With this concentration, AMPK phosphorylation was maximally

higher 3h after AICAR addition to Caco-2/15 cells before returning to baseline values at 8h (**Fig. *1B***). Under the same conditions, we could observe a 2-fold phosphorylation rise in ACC (**Fig. *1C*)** but not in HMG-CoA reductase (**Fig. *1D*)**, two known substrates of AMPK.

Thereafter, we turned to metformin, the most used anti-diabetic agent worldwide. When a dose-dependent curve from 0,1 mM to 4 mM during 3h was assessed, a 10-fold increase was observed in AMPK phosphorylation in the range of 0,1-0,5 mM (data not shown), as exemplified by the concentration of 0,5 mM metformin (**Fig. *1E*),** which induced a strong stimulation of ACC phosphorylation (5-fold) (**Fig. *1F***) with no significant effect on HMG CoA-R phosphorylation (**Fig. *1G***). On the other hand, as reported by available literature in different types of cells, Compound C at a 40 µM caused an inhibition of AMPK phosphorylation in a time course experiment (data not shown). The inhibition effect (50%) of Compound C on AMPK phosphorylation was detectable as early as the first hour of cell incubation (data not shown), deepened at 3h (90%) (**Fig. *2A***) and maintained this level for 24 hours (data not shown). As a consequence, a reduction of ACC phosphorylation (**Fig. *2B***) was noted but once again HMG-CoA reductase was unaffected (**Fig. *2C***).

Regulation of AMPK by glucose

Regulation of AMPK by physiological and high glucose concentrations was assessed. A significant reduction in AMPK phosphorylation resulted following treatment of the intestinal Caco-2/15 cells with 5 and 25 mM of glucose compared to medium without glucose (**Fig. *2D***) at 4h since this period of time was amply sufficient to modulate AMPK activation (**Fig. *2E***). Similarly, a substantial decrease was noticed in ACC phosphorylation (**Fig. *2F***) with the addition of glucose to the medium, but HMG-CoA reductase phosphorylation remained without significant effects at 5 mM and diminished only at 25 mM of glucose (**Fig. *2G***).

Lentiviral knock-down of AMPKα1 in Caco-2/15 cells and impact on AMPK target proteins.

To define the specific role of AMPK, stable Caco-2/15 cells with AMPKα1 knockdown were established using shRNA constructs targeting AMPKα1 encoding mRNA. AMPKα1 expression was measured in the selected clones, cultured on 6 wells plate, 10 days after their differentiation, and compared with noncoding shRNA vector control cells. A significant reduction in gene expression (≈80%) was noted in AMPKα1 shRNA-infected cells compared with control PLKO cells infected with empty vector as measured by RT-PCR (**Fig. *3A***). The inhibition of AMPKα1 protein expression (≈80%) by transduction with shRNA was confirmed by Western Blot analysis when compared with PLKO (**Fig. *3B***). In these conditions, there was a decline in AMPK phosphorylation (**Fig. *3C***), Furthermore, AMPKα1 knockdown reduced by 60% ACC phosphorylation (**Fig. *3D***), suggesting an enhancement of ACC activity, but did not result in alterations in HMG-CoA reductase phosphorylation (**Fig. *3E***). Interestingly, the residual AMPK responded to activation by AICAR and inhibition with glucose and Compound C as noted in **Figure *3F***.

Intestinal AMPKα/ACC signaling pathway in *Psammomys obesus*

We subsequently focused on the influence of IR and T2D on AMPKα activation status in the small intestine in association with the main cellular insulin signaling pathways, which are responsible for the uptake, utilization and secretion of several metabolic products. We first assessed the effects of IR and T2D on the gene expression of AMPKα1 and AMPKα2 using RT-PCR. A predominance was noted in AMPKα1 relatively to AMPKα2 in the jejunum (data not shown), but both isoforms were significantly reduced by the IR and diabetes conditions compared to the healthy *P. obesus* animals (**Figs. *4A, 4B***). Then, we examined the protein expression of the catalytic AMPKα by Western blotting and found it markedly decreased in the jejunum of animals with IR and TD2 (**Fig. *4C***). Evaluation of the phosphorylation state of the AMPKα was then undertaken using a specific antiphospho-Thr-172 AMPK antibody. As shown in **Figure *4D***, phosphorylation of AMPKα at Thr-172 followed the same trend of

decline in the two experimental *P. obesus* groups compared to controls. When the ratio of phosphorylated AMPKα to total AMPKα was calculated, it was significantly decreased in the jejunum from animals with IR with only a falling trend in diabetic animals (**Fig. *4E***).

We next determined how the decrease in phosphorylation and protein content in AMPK impacts on the intestinal ACC, its principal substrate, which catalyzes the carboxylation of acetyl-CoA to form malonyl-CoA, and represents the key enzyme in the control of intracellular FA metabolism (29,30). Our data showed a significant decrease in the ACC^{-Ser79} phosphorylation without any substantial changes in the protein content in the jejunal segment of the two experimental *P. obesu*s groups compared to controls (**Figs. *5A, 5B***). Therefore, when the ratio of phosphorylated ACC to total ACC was calculated, it was significantly reduced in IR and T2D compared to controls, indicating enhanced ACC activity (**Fig. *5C***). Accordingly, the fatty acid synthase protein expression increases in intestinal diabetic animal groups compared to controls (data not shown). Since lessening of AMPK activity may also result in a decline in fatty acid catabolism, we investigated CPT1, the rate limiting enzyme for β-oxidation of fatty acid. A subtantial decrease was noted in intestinal CPT1 mRNA abundance (**Fig. *5D***) and protein mass (**Fig. *5E***) of *P. obesus* animals with IR and T2D.

Given the positive relationship between AMPK and insulin sensitivity, we reasoned that the attenuation in AMPK activation in IR and T2D conditions may be linked to derangements in insulin signaling at the level of the jejunum. Therefore, we determined whether the intestine from animals with IR and T2D differed from control *P. obesus* with regard to their abundance and phosphorylation of the instrumental proteins Akt, p38-MAPK and ERK1/2. Our results showed a trend of decrease in Akt-^{Ser473} phosphorylation without significant changes in Akt protein mass in the jejunum (**Fig. *6A***) of IR and T2D animals compared to control group. On the other hand, our findings revealed a rise in the degree of p38-MAPK and ERK1/2 phosphorylation in IR and T2D animals even though their protein mass remained unchanged

(data not shown), thereby resulting in higher ratios of p38$^{-(Thr180/Tyr182)}$/p38 protein (**Fig. *6B***) and phosphorylated-ERK1/2/ERK1/2 protein (**Fig.*6C***). Overall, our data indicate an insulin signal dysfunction in link with unaccented AMPK phosphorylation.

We also examined the impact of the subtle decrease in Akt phosphorylation on activity of GSK3, an important Akt substrate in the insulin signaling pathway. In fact, mammals express two isoforms, GSK3α and GSK3β, which share similar kinase domains but differ considerably in their termini. Inactivation of GSK3β appears to be the major route by which insulin activates glycogen synthesis (31,32). We, therefore, quantified GSK3β (**Fig. *6D***) as well as its phosphorylation (**Fig. *6E***) extent in the intestine of *P. obesus*. P-GSK3β was found decreased and resulted in a reduced phosphorylated GSK3β^{-Ser9} /GSK3β ratio in the jejunum of IR and T2D animals compared to controls (**Fig. *6F***).

In order to gain more insight into the specific contribution of AMPK to insulin signaling and lipid homeostasis, we treated insulin resistant and diabetic *P. obesus* with metformin, one of the best AMPK activating drugs. We noted an improvement in systemic glycaemia, hyperinsulinemia, triglyceridemia and cholesterolemia (**Table *1***). At the jejunum level, metformin treatment improved AMPK phosphorylation (**Supplementary Fig. *2*A**) and insulin sensitivity as indicated by the increased phosphorylation of Akt (**Supplementary Fig. *2B***) and decreased phosphorylation of p38-MAPK (**Supplementary Fig. *2C***) and ERK1/2 (**Fig. Supplementary Fig. *2D***) in IR and T2D groups compared with controls. Since the main biological effect of AMPK is to downregulate fatty acid lipogenesis, we examined ACC whose activity was inhibited by metformin (**Supplementary Fig. *3A***). Conversely, the stimulation of CPT1 activity was recorded (**Supplementary Fig. *3B***). In the same line, metformin treatment was able to lower lipid esterification of the major lipid classes (e.g. triglycerides (TG), phospholipids and cholesteryl esters) in cells (**Supplementary Fig. *4***) and media (**Fig. *7A***), to lessen apolipoprotein (apo) B-48 biogenesis (**Fig. *7B***) and to diminish

TG-rich lipoprotein production (**Fig. *7B***) via downregulation of Sar1B GTPase (**Fig. *7C***), and enzymatic markers: MGAT, DGAT, and MTP (**Fig. *7D***). Taken together, these findings indicate that metformin attenuates IR-induced harmful effects by activating AMPK and controlling lipid metabolism. To investigate the beneficial involvement of AMPK in the metformin-mediated lipid changes, *P. obesus* animals on metformin treatment were daily injected with Compound C (50 nM) 3 days before sacrifice. As documented in **Supplementary Table 1** the favorable effects of metformin on AMPK, lipids, apo B-48, MTP and Sa1B GTPase were lightened by Compound C administration.

DISCUSSION

Native AMPK is a α/β/γ heterotrimer with multiple subunit isoforms encoded by seven genes (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2, γ3) allowing for up to 12 possible heterotrimeric combinations, which provide a molecular basis for the multiple roles of the highly conserved AMPK signaling system in nutrient regulation and utilization in mammalian cells (1). For example, in human skeletal muscle, the *α*2/*β*2/*γ*3 heterotrimer has been identified as the AMPK complex that is primarily activated by exercise, whereas the activities of complexes containing the *α*1 catalytic subunit remain unchanged (33). On the other hand, in the liver, the α1 and a2 isoform accounts each for the half of the enzyme activity and are predominantly associated with the β1 subunit (34). The α/β/γ combinations are worth investigating, since they confer different properties to the AMPK complexes and serve several roles within a given tissue. Our experiments indicate that the prevailing catalytic subunit of AMPK complex in the enterocyte is α1, and its preferential associated regulatory partners are β2 and γ1. This is the first demonstration for the ‘’signature’’ of the AMPK trimeric complex in the small intestine. Given that combinations of α/β/γ subunits confer different properties to the AMPK complexes through differences in subcellular localization and signaling functions (35), the tissue-specific subunit composition of the enterocytes may be important to determine a specialized cellular and systemic response to different metabolic stresses.

To study the regulation of AMPK in Caco-2/15 intestinal cells, several activators or inhibitors were used. AICAR was able to stimulate AMPK whereas Compound C demonstrated its inhibitory actions. As expected from these data, AMPK phosphorylated its ACC target in enterocytes according to the chemical agent stimulus, but was curiously unable to act on HMG-CoA reductase. Although the modulation of HMG-CoA reductase by phosphorylation-dephosphorylation has been well established in various tissues, divergent data were reported for the intestine that has a potent capability to synthesize cholesterol and plays an important

role in cholesterol and lipoprotein metabolism. In fact, Field et al. failed to inactivate intestinal microsomal HMG-CoA reductase by Mg2+-ATP (36) while others showed that intestinal reductase might be sensitive to regulation by the phosphorylation/dephosphorylation mechanism (37). Our data clearly indicate that HMG-CoA reductase in Caco-2/15 did not respond to AMPK.

Due to its role in maintaining energy balance, a dysfunction in AMPK signaling pathway may result in perturbations at the systemic level that contribute to development of metabolic disorders. In support, there is a strong correlation between low AMPK activation state, mainly due to over-nutrition and lack of exercise, and metabolic disorders such as IR (38). However, little work has been done on the relationship between AMPK and insulin sensitivity via a scrutiny of insulin cascade signaling. This aspect was particularly examined in the small intestine of *P. obesus*, which showed alterations in several components of the insulin receptor signaling pathways. Indeed, a decrease in PI3K (data not shown), a trend of drop in Akt phosphorylation and a rise in p38 and ERK1/2 characterized the jejunum of animals with IR and T2D, suggesting a reduced insulin sensitivity in the jejunum of insulin resistant and diabetic animals since defects in PI3K/Akt signaling have been implicated in IR (39) and T2D (40). The activation of this pathway is initiated at the plasma membrane, where phosphatidylinositol (40,41) trisphosphate [PI(3,4,5)P_3], generated by PI3K recruits Akt to the membrane for phosphorylation and activation, which allows it to adopt an active conformation and proceeds to phosphorylate a variety of protein substrates involved in insulin signaling and diverse cellular processes. Therefore, concomitantly to the reduced activation of jejunal AMPK in *P. obesus*, a marked decrease was noticed in PI3K that plays a pivotal role for the metabolic effects of insulin, with a trend of drop on Akt, however sufficient to lessen phosphorylation of GSK3. Importantly, the coupling of Akt and GSK3 leads to inverse changes in their activities: when Akt activity is high, GSK3 is maintained in a serine-

phosphorylated, inhibited state, whereas decreases in Akt activity lead to dephosphorylation and activation of GSK3 (42). Herein we report a decrease in Akt and GSK3β phosphorylation, which may represent an important signaling pathway in the intestine of *P. obesus* with IR and T2D. Particularly, the decline in GSK3β phosphorylation may impact on the intracellular lipid metabolism, since elevated GSK3 phosphorylation promotes proteasomal degradation of SREBP, a transcription factor that turns on the expression of genes involved in lipid biosynthesis (43). In fact, the protein expression of SREBP was higher in the small intestine of insulin resistant and diabetic *P. obesus* animals compared to controls (data not shown) and coincided with abnormal lipid synthesis, apo B-48 biogenesis and TG-rich lipoprotein production.

Since metformin is a powerful activator of AMPK, we anticipated that its administration to *P. obesus* may restore the aforementioned intestinal abnormalities in insulin signaling, lipid homeostasis and lipoprotein metabolism. Such an experimental approach can help us identify for example the crosstalk between AMPK and insulin signaling in the enterocyte. Our hypothesis proved true in view of the beneficial effects of metformin on restoration of AMPK activation, improvement of systemic IR, amelioration of enterocyte insulin sensitivity, and restitution of lipid/lipoprotein homeostasis. Although numerous studies have provided evidence directly linking metformin to AMPK signaling pathway for the various metabolic effects, mounting evidence suggests that other AMPK-independent mechanisms are involved, including the mitochondrial machinery. Therefore, to uncover the direct effects of AMPK, we treated the *P. obesus* animals with Compound C, and intestinal lipoprotein assembly was reevaluated. Our data clearly showed that inhibition of AMPK by Compound C attenuated the favorable effects of metformin, thereby suggesting AMPK involvement. Therefore, conserving AMPK activity at normal levels can preserve from harmful effects on lipid homeostasis.

In conclusion, our experiments provide strong biochemical evidence that AMPK has its proper signature and responds to established pharmacological agents in the Caco-2/15 cell line, a remarkable intestinal model. Insulin resistance and diabetes alter AMPK phosphorylation in the small intestine, which impacts on key target proteins controlling metabolic pathways of insulin signalling, fatty acid oxidation and lipid/lipoprotein synthesis in the *P. obesus*, a unique polygenic animal model for obesity and nutritionally induced T2D, which has been studied extensively in our laboratory. Restoration of AMPK activity with Metformin alleviated various aforementioned abnormalities, particularly those related to dysregulation of lipid homeostasis as highlighted by Compound C, a powerful AMPK inhibitor. Therefore, our studies showed that the salutary effects of metformin on the elevated lipids associated with insulin-resistant and diabetic states depend on AMPK and start in the gastrointestinal tract, the first system to face obesogenic nutrients and anti-diabetic drugs, to be closely associated with diabetic postprandial lipemia and diet-induced intestinal oxidative stress and inflammation, which represent significant mediators for the development of obesity and IR.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP 10584) and the JA deSève Research Chair in nutrition. The authors thank Dr Randy W Schekman, Howard Hugues Medical institute Reagents of the University of California for providing Sar1b/a antibody.

AUTHORS CONTRIBUTION

E.H, E.G., A.B.O. and A.S. performed various experiments under the supervision of E.L. who wrote the manuscript. M.L., M.E., E.Z. and J.F.B. contributed to the experiments and reviewed/edited the manuscript. S.S. contributed to the Discussion and reviewed/edited the manuscript.

Table 1: Effects of metformin on body weight and plasma lipid parameters in *Psammomys obesus*

	Controls	Type 2 diabetes	Type 2 diabetes + metformin
Body weight (g)	176 ± 6	221 ± 8*****	188 ± 7**&**
Glucose (mM)	5,1 ± 0,3	17,5 ± 1,4******	10,3 ± 1,2**&**
Insulin (pM)	49,6 ± 5,8	3484,9 ± 604,7******	1626,1 ± 229,0**&**
Triglycerides (mM)	0,69 ± 0,06	1,82 ± 0,16******	0,91 ± 0,11**&**
Cholesterol (mM)	1,64 ± 0,08	2,61 ± 0,12******	2,12 ± 0,13**&**

P*<0,05, ***P*<0,01 vs Controls ; **&*P*<0,05 vs diabetic animals.

REFERENCES

1. Gao G, Fernandez CS, Stapleton D et al. Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. J Biol Chem 1996;271:8675-8681
2. Hardie DG AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:774-785
3. Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. Biochem Soc Trans 2003;31:162-168
4. Wojtaszewski JF, Jorgensen SB, Hellsten Y et al. Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. Diabetes 2002;51:284-292
5. Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. Diabetes 1998;47:1369-1373
6. Carling D, Hardie DG The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. Biochim Biophys Acta 1989;1012:81-86
7. Brusq JM, Ancellin N, Grondin P et al. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. J Lipid Res 2006;47:1281-1288
8. Chen MB, McAinch AJ, Macaulay SL et al. Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:3665-3672
9. Dolinsky VW, Dyck JR Role of AMP-activated protein kinase in healthy and diseased hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006;291:H2557-H2569

10. Zang M, Zuccollo A, Hou X et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. J Biol Chem 2004;279:47898-47905
11. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA et al. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. Diabetes 2006;55:2180-2191
12. Kahn BB, Alquier T, Carling D et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab 2005;1:15-25
13. Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. Endocrinology 2003;144:5166-5171
14. Zong H, Ren JM, Young LH et al. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proc Natl Acad Sci U S A 2002;99:15983-15987
15. Hsieh J, Hayashi AA, Webb J et al. Postprandial dyslipidemia in insulin resistance: mechanisms and role of intestinal insulin sensitivity. Atheroscler Suppl 2008;9:7-13
16. Adeli K, Lewis GF Intestinal lipoprotein overproduction in insulin-resistant states. Curr Opin Lipidol 2008;19:221-228
17. Levy E, Mehran M, Seidman E Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. FASEB J 1995;9:626-635
18. Levy E, Menard D, Delvin E et al. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. J Biol Chem 2001;276:39679-39684
19. Mailhot G, Ravid Z, Barchi S et al. CFTR knockdown stimulates lipid synthesis and transport in intestinal Caco-2/15 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2009;297:G1239-G1249

20. Marcil V, Delvin E, Garofalo C et al. Butyrate impairs lipid transport by inhibiting microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells. J Nutr 2003;133:2180-2183
21. Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF et al. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007;293:G1178-G1189
22. Levy E, Stan S, Delvin E et al. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. J Biol Chem 2002;277:16470-16477
23. Levy E, Lalonde G, Delvin E et al. Intestinal and Hepatic Cholesterol Carriers in Diabetic Psammomys obesus. Endocrinology 2010;
24. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E et al. Circulating lipoproteins and hepatic sterol metabolism in Psammomys obesus prone to obesity, hyperglycemia and hyperinsulinemia. Atherosclerosis 2001;157:85-96
25. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E et al. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obesus: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetes 2003;52:2539-2545
26. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E et al. Both insulin resistance and diabetes in Psammomys obesus upregulate the hepatic machinery involved in intracellular VLDL assembly. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:118-123
27. Levy E, Thibault L, Menard D Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. J Lipid Res 1992;33:1607-1617
28. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ et al. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. J Lipid Res 1987;28:1263-1274
29. Kim YS, Kolattukudy PE Malonyl-CoA decarboxylase from the uropygial gland of waterfowl: purification, properties, immunological comparison, and role in regulating

the synthesis of multimethyl-branched fatty acids. Arch Biochem Biophys 1978;190:585-597

30. Ruderman NB, Saha AK, Vavvas D et al. Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. Am J Physiol 1999;276:E1-E18
31. Mora A, Sakamoto K, McManus EJ et al. Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. FEBS Lett 2005;579:3632-3638
32. McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ et al. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. EMBO J 2005;24:1571-1583
33. Birk JB, Wojtaszewski JF Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. J Physiol 2006;577:1021-1032
34. Stapleton D, Woollatt E, Mitchelhill KI et al. AMP-activated protein kinase isoenzyme family: subunit structure and chromosomal location. FEBS Lett 1997;409:452-456
35. Cheung PC, Salt IP, Davies SP et al. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem J 2000;346 Pt 3:659-669
36. Field FJ, Erickson SK, Shrewsbury MA et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat intestine: subcellular localization and in vitro regulation. J Lipid Res 1982;23:105-113
37. Oku H, Ide T, Sugano M Reversible inactivation-reactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase of rat intestine. J Lipid Res 1984;25:254-261
38. Roduit R, Nolan C, Alarcon C et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. Diabetes 2004;53:1007-1019

39. Zhu S, Sun F, Li W et al. Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. Mol Cell Biochem 2011;353:305-313

40. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. Exp Biol Med (Maywood) 2005;230:593-605

41. Bozulic L, Hemmings BA PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. Curr Opin Cell Biol 2009;21:256-261

42. White MF Insulin signaling in health and disease. Science 2003;302:1710-1711

43. Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X et al. Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). Cell Metab 2005;1:379-391

FIGURE LEGENDS

Figure 1 **Effects of AICAR and Metformin on AMPK phosphorylation and impact on its substrates in differentiated Caco-2/15 cells.** AMPK activation was estimated as a function of concentrations of AICAR (A) and incubation time (B). With the best conditions obtained, we evaluated the effects of AICAR (8 mM and 3h) and metformin (0.5 mM and 3h) on AMPK (E) ACC (C, F) and HMG-CoA reductase (D, G), respectively. Protein mass and phosphorylation were examined by SDS-PAGE and Western Blot. Values are expressed as means ± SEM for three independent experiments performed in triplicates. **P*<0.05; ***P*<0.001; ****P*<0.0001 vs. controls.

Figure 2 **Effects of Compound C and glucose on AMPK and substrates phosphorylation in differentiated Caco-2/15 cells.** The optimal incubation period and concentration were determined for Compound C (40 µM and 1h). Under these conditions, we determined the effects of Compound C on AMPK (A), ACC (B) and HMG-CoA reductase (C). Furthermore, activation of AMPK was estimated as a function of physiological (5 mM) and supraphysiological (25 mM) concentrations of glucose (D), and incubation periods (E). Under these conditions, we determined the effects of glucose on ACC (F) and HMG-CoA reductase (G). Protein mass and phosphorylation were examined by SDS-PAGE and Western Blot. Values are expressed as means ± SEM for three independent experiments performed in triplicates. **P*<0.05; ***P*<0.001; ****P*<0.0001 vs. Controls.

Figure 3 **Effects of pharmacological agents and knockdown on AMPK activation in differentiated Caco-2/15 cells**

Exponentially growing Caco-2/15 cells were transfected either with the pGIPZ non-silencing (scramble) lentiviral shRNAmir vector (V2LHS_57699) or the pGIPZ vector harbouring shRNAmir expression cassette against AMPK-α1 (V3LHS_348528) as described in Materials and Methods. Knockdown of AMPK-α1 was measured by RT-PCR (A) and Western blot (B). Protein mass and phosphorylation of AMPK at Thr172 (p-AMPK) (C), ACC at Ser79 (p-ACC) (D) and HMG-CoA reductase at Ser872 (p-HMG-COA-R) (E) were examined by SDS-PAGE and Western Blot in normal (PLKO) and genetically modified Caco-2/15 cells for AMPKα1 ($AMPK\alpha1^{-/-}$). In a second step, phosphorylation of AMPK was evaluated in the presence of AICAR (8mM), high glucose (HG, 25 mM) and Compound C (CC, 40 µM) in Caco-2/15 cells depleted of AMPKα1 (F).

Values are expressed as means ± SEM for three independent experiments performed in triplicates. **P*<0.05, ****P*<0.0001 vs. PLKO (Controls).

Figure 4 **AMPKα1 and AMPKα2 gene expression, and protein and phosphorylation levels of AMPK in intestinal *Psammomys obesus* animals.** cDNA was synthesized from total RNA extracted from jejunal specimens. Quantitative Real-time PCRs were performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting gene sequences of AMPKα1, AMPKα2 and GAPDH (housekeeping gene). All results were normalized to GAPDH, and fold-changes were calculated using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Following homogenization of jejunal specimens, proteins from the 3 animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against AMPKα and (C) AMPKα-Thr^{172} phosphorylation (D), followed by the the calculation of the ratio of phosphorylated AMPKα to total AMPKα (E). Data are expressed as

means ± SEM for control (CTR; *n* = 11), insulin resistant (IR; *n* = 8/group) and diabetic (T2D; n=8) animals. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.001$ vs Controls.

Figure 5 **ACC and CPT1 expressions in *Psammomys obesus animals***. Following homogenization of jejunal specimens, proteins from the 3 animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against ACC (A) and p-ACC-Ser^{79} (B), followed by the the calculation of the ratio of p-ACC to total ACC (C), and determination of CPT1 (E) and β-actin. In the other hand, cDNA was synthesized from total RNA extracted from jejunal specimens. Quantitative Real-time PCRs were performed using Quantitect SYBR Green kit and primer targeting sequences of CPT1 and GAPDH (housekeeping gene) (D). Data are expressed as means ± SEM for control (CTR; *n* = 11), insulin resistant (IR; *n* = 8) and diabetic (T2D) animals (n=8/group). $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.001$;$^{***}P<0.0001$ vs Controls; $^{\#}P<0.05$ vs Insulin Resistant animals.

Figure 6 **Insulin resistance biomarkers and their phosphorylated protein forms in *Psammomys obesus* animals.** Data are expressed as means ± SEM for control (CTR; *n* = 11), insulin resistant (IR; *n* = 8) and diabetic (T2D) animals (n=8/group). Following homogenization of jejunal specimens, proteins from the 3 animal groups were run on SDS-PAGE and immunoblotted against p-Akt-Ser^{473}(A), p-p38 MAPK-(Thr^{180}/Tyr^{182}) (B) and p-ERK1/2 (C), GSK3β (D), p-GSK3β-Ser^{9} (E), as well as against their corresponding proteins to calculate the ratio. Data are expressed as means ± SEM for control (CTR; *n* = 11), insulin resistant (IR; *n* = 8) and diabetic (T2D; n=8) animals. $^{**}P<0.001$;$^{***}P<0.0001$ vs Controls.

Figure 7 **Effect of metformin on *de novo* lipid synthesis, apo B biogenesis, TG-rich lipoprotein secretion and key proteins in lipoprotein assembly (MGAT,**

DGAT, Sar1B, MTP, GTPase) in the intestine of diabetic *Psammomys obesus*. Jejunal explants from the different groups were incubated with [^{14}C]-oleic acid substrate for 3h. Lipids (TG, PL, CE) in media (A) were then extracted with chloroform/methanol (2:1, vol/vol) isolated by TLC and quantitated. On the other hand, jejunal explants were incubated for 3h either with [^{14}C]-oleic acid or methionine-free medium containing ^{35}S-methionine to assess lipoprotein production and apo B-48 biogenesis, respectively (B).. Protein expression of Sar1B GTPase was run on SDS-PAGE and immunoblotted (C) while the Enzymatic activity of monoacylglycerol acyltransferase (MGAT), diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) was enzymatically measured (D). Data are means ± SEM for 4 animals/group. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001 vs control and diabetic animals.

TG: triglycerides; PL: phospholipids; CE: cholesteryl ester

Figure 1

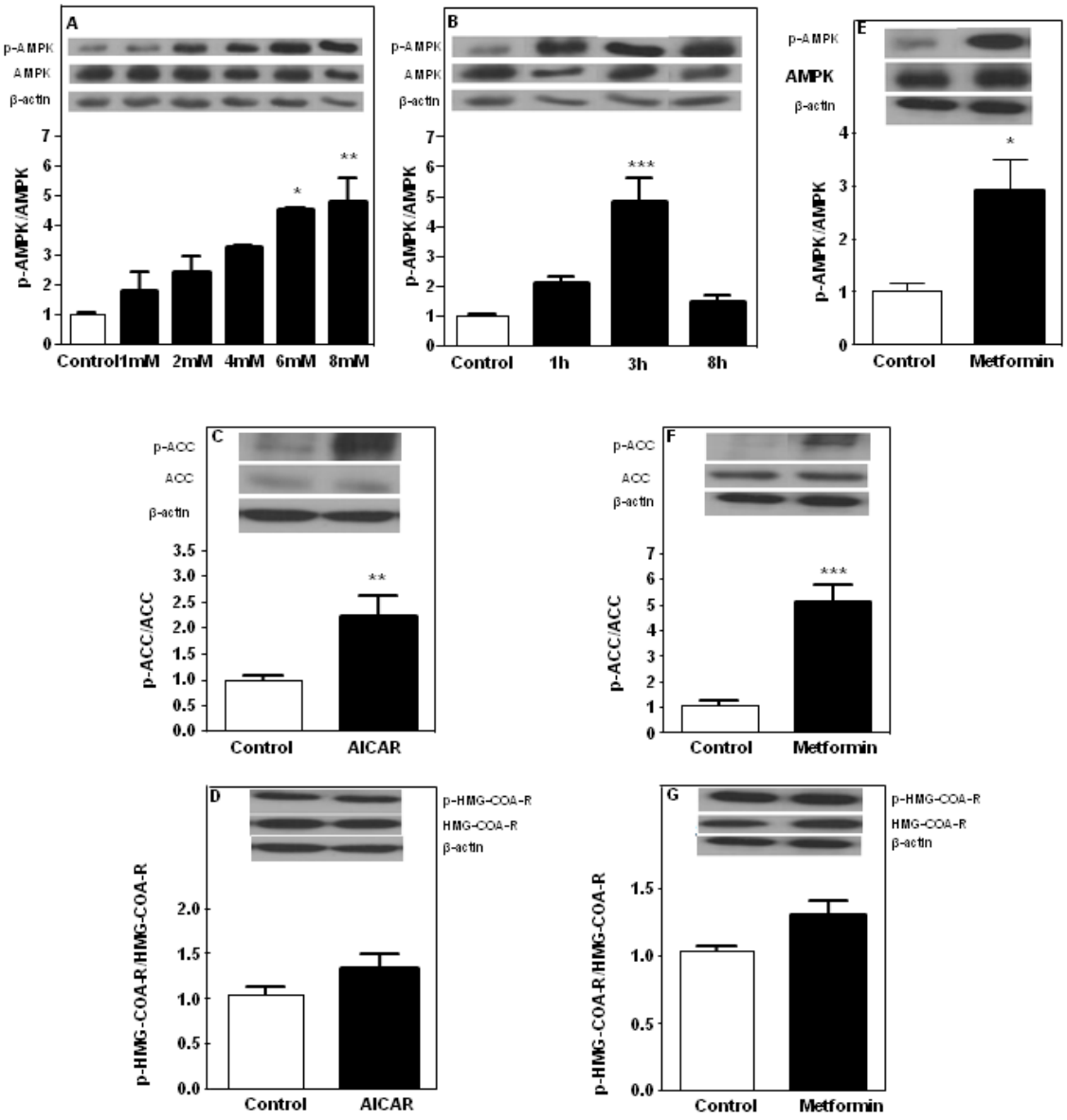

A
p-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK/AMPK
Control
1mM
2mM
4mM
6mM
8mM
B
Control
1h
3h
8h
E
Metformin
C
p-ACC
ACC
p-ACC/ACC
AICAR
F
D
p-HMG-COA-R
HMG-COA-R
p-HMG-COA-R/HMG-COA-R
G

Figure 2

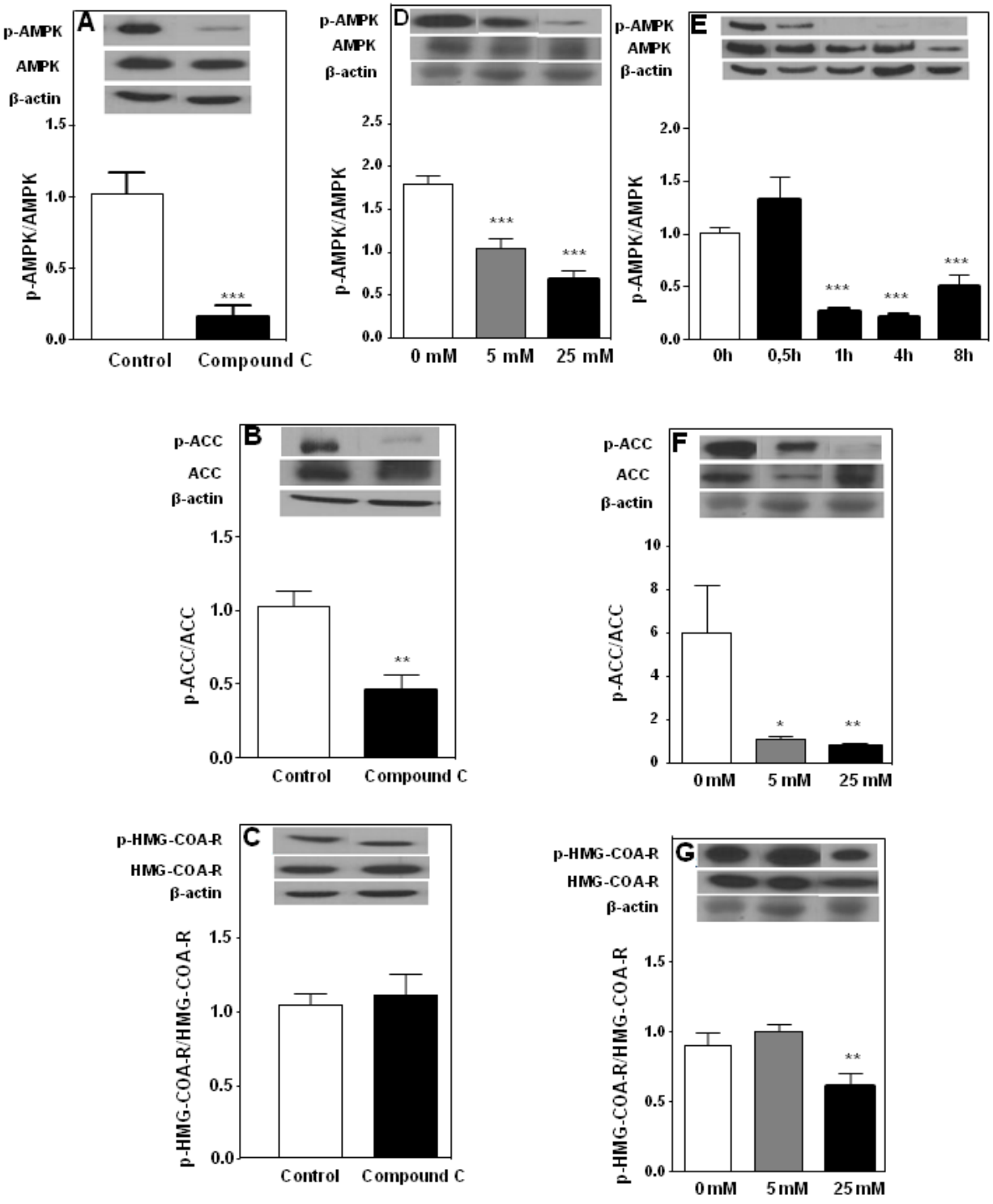

A
p-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK/AMPK
1.5
1.0
0.5
0.0
***
Control
Compound C
D
p-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK/AMPK
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
0 mM
5 mM
25 mM
E
p-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK/AMPK
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
***
0h
0,5h
1h
4h
8h
B
p-ACC
ACC
β-actin
p-ACC/ACC
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Control
Compound C
F
p-ACC
ACC
β-actin
p-ACC/ACC
10
8
6
4
2
0
*
**
0 mM
5 mM
25 mM
C
p-HMG-COA-R
HMG-COA-R
β-actin
p-HMG-COA-R/HMG-COA-R
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
Compound C
G
p-HMG-COA-R
HMG-COA-R
β-actin
p-HMG-COA-R/HMG-COA-R
1.5
1.0
0.5
0.0
**
0 mM
5 mM
25 mM

Figure 3

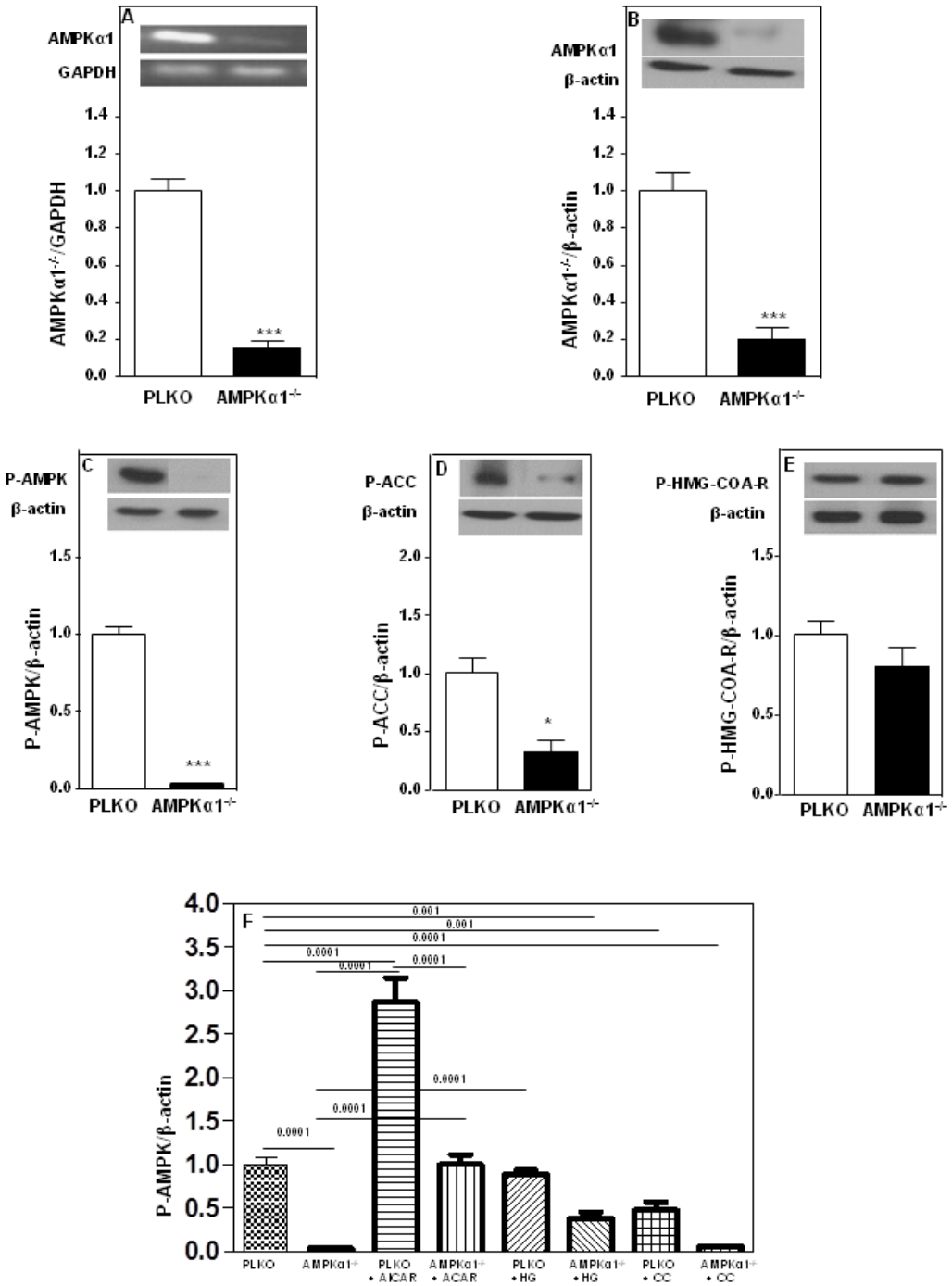

A
AMPKα1
GAPDH
AMPKα1-/-/GAPDH
PLKO
AMPKα1-/-
B
AMPKα1
β-actin
AMPKα1-/-/β-actin
C
P-AMPK
β-actin
P-AMPK/β-actin
D
P-ACC
β-actin
P-ACC/β-actin
E
P-HMG-COA-R
β-actin
P-HMG-COA-R/β-actin
F
P-AMPK/β-actin
PLKO
AMPKα1-/-
PLKO + AICAR
AMPKα1-/- + AICAR
PLKO + HG
AMPKα1-/- + HG
PLKO + CC
AMPKα1-/- + CC

Figure 4

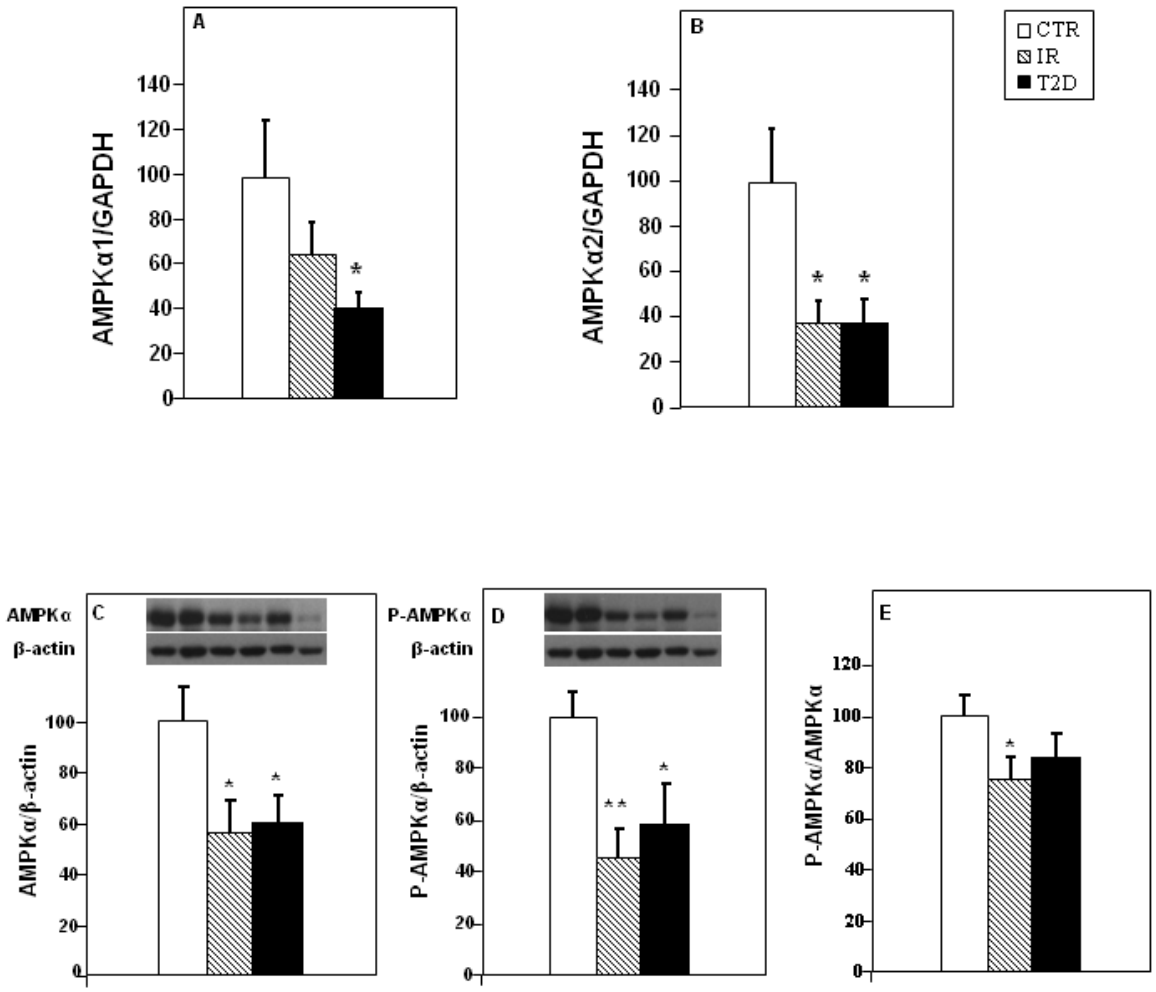

A
AMPKα1/GAPDH
B
AMPKα2/GAPDH
CTR
IR
T2D
C
AMPKα
β-actin
AMPKα/β-actin
D
P-AMPKα
β-actin
P-AMPKα/β-actin
E
P-AMPKα/AMPKα

Figure 5

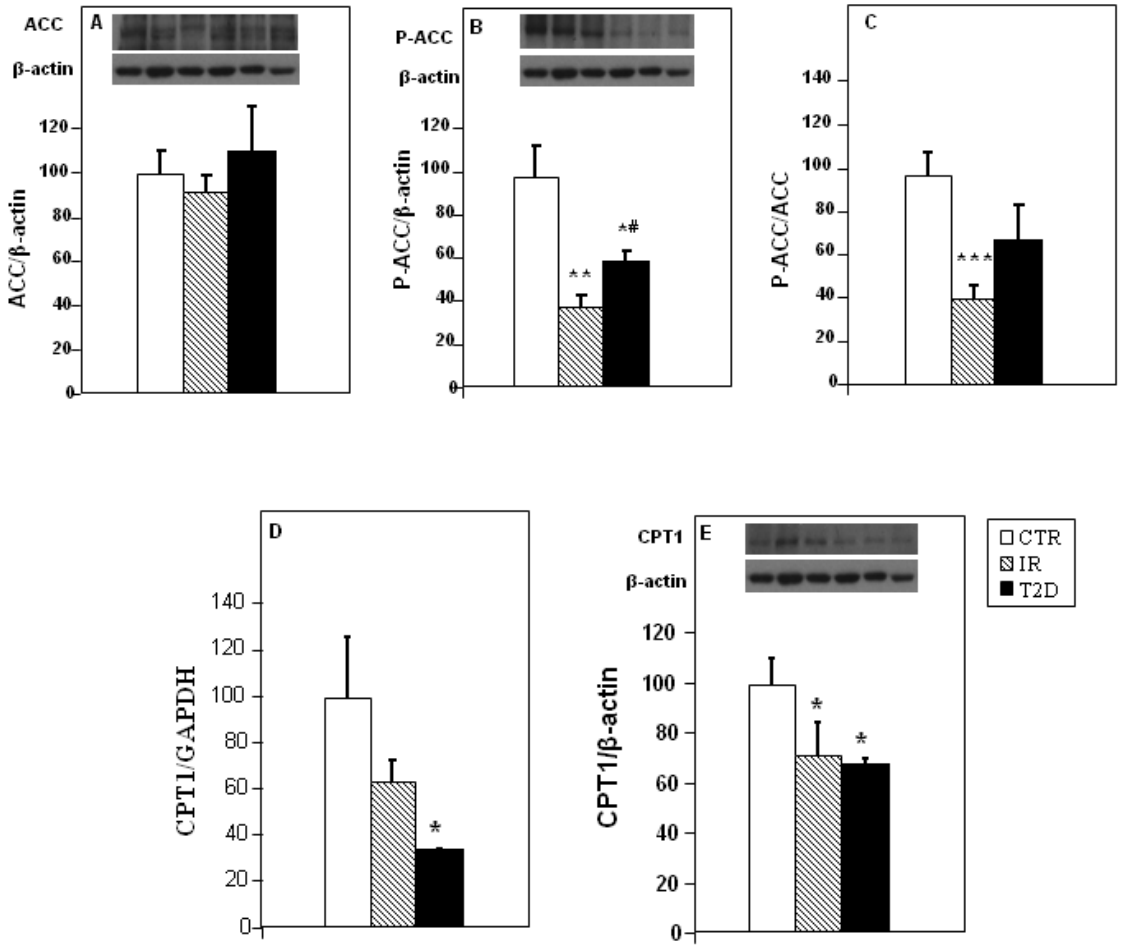

A
ACC
β-actin
ACC/β-actin
B
P-ACC
β-actin
P-ACC/β-actin
**
*#
C
P-ACC/ACC
***
D
CPT1/GAPDH
*
E
CPT1
β-actin
CPT1/β-actin
*
*
CTR
IR
T2D

Figure 6

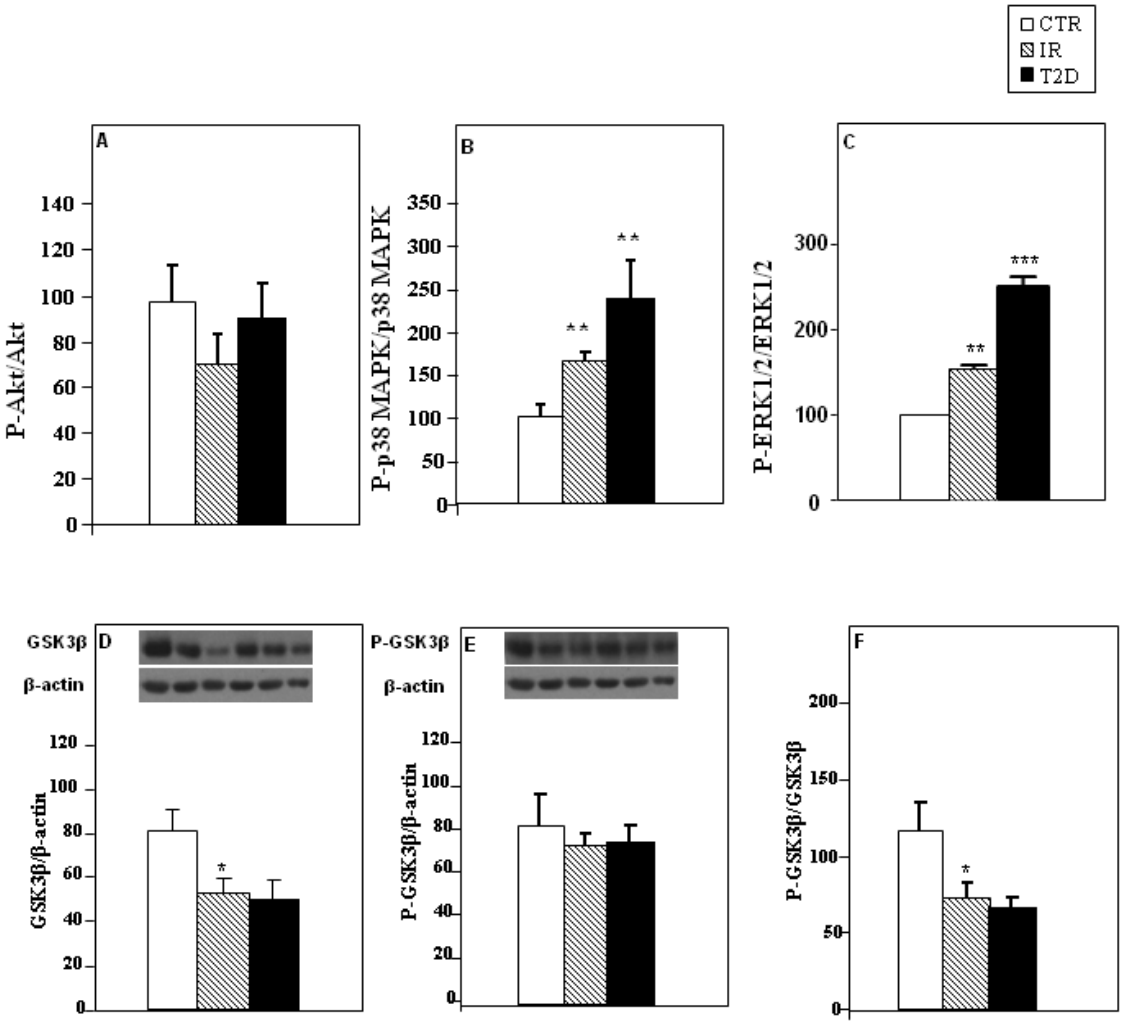
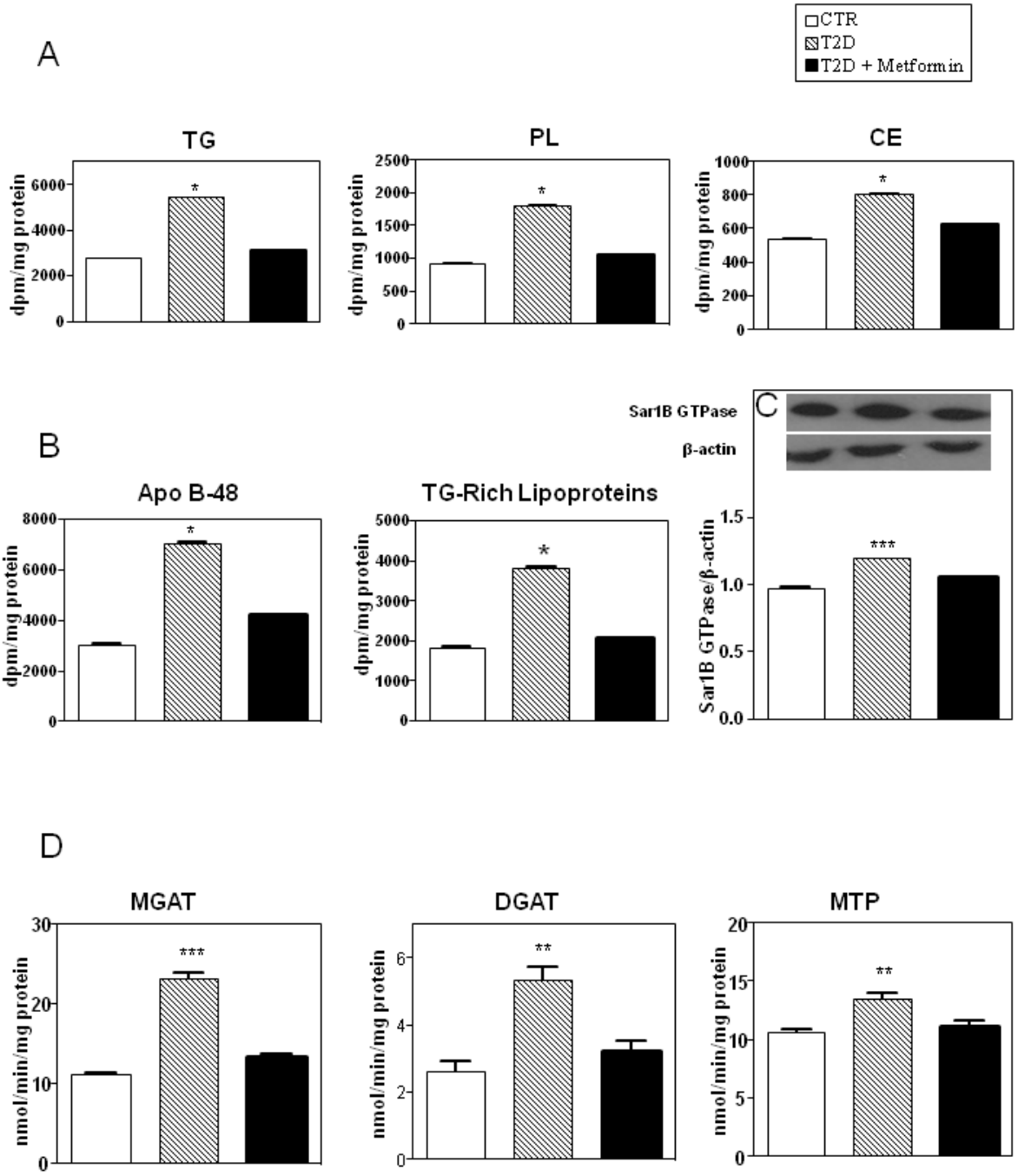

CTR
IR
T2D
A
P-Akt/Akt
B
P-p38 MAPK/p38 MAPK
C
P-ERK1/2/ERK1/2
D
GSK3β
β-actin
GSK3β/β-actin
E
P-GSK3β
β-actin
P-GSK3β/β-actin
F
P-GSK3β/GSK3β

Figure 7


A
CTR
T2D
T2D + Metformin
TG
PL
CE
dpm/mg protein
B
Apo B-48
TG-Rich Lipoproteins
C
Sar1B GTPase
β-actin
Sar1B GTPase/β-actin
D
MGAT
DGAT
MTP
nmol/min/mg protein

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

Compound C was purchased from CALBIOCHEM® (San Diego, CA). 5'-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) and antibodies against phospho-AMPKα (phospho Thr^{172}), AMPKα, phospho-acetyl CoA carboxylase (ACC) (phospho Ser^{79}), phospho-serine/threonine kinase (Akt)/PKB (phospho Ser^{473}), phospho-glycogen synthetase kinase (GSK)-3β (phospho Ser^{9}), phospho-p38 MAPK (phospho Thr^{180}/Tyr^{182}), p38 MAPK, and ERK1/2, and p-ERK1/2 were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-ACC from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Anti- carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) was from Santa Cruz Biotech, (Santa Cruz, CA) whereas anti-apolipoprotein (apo)-B48 was prepared by the investigators. Anti- β-actin antibody (FA-free bovine serum albumin) and all other reagents, unless stated otherwise, were from Sigma (St. Louis, MO).

Carnitine palmitoyl transferase (CPT1) and AcetylCoA carboxylases (ACC) activities. CPT1 (EC.2.3.1.21) and ACC activities were assessed as well described in detail in our previous studies (1,2).

Lipid assessment, lipoprotein analyses and *de novo* apolipoprotein synthesis. All these detrminations were carried out as described in details in our previous studies (3,4).

Microsomal TG transfer protein assays.

Intestinal microsomes were used as the source of microsomal triglyceride transfer protein (MTP) activity that was determined by the transfer of radiolabeled triacylglycerol from donor small unilamellar vesicles as described previously (4).

MGAT and DGAT activities

The activities of monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) were also determined in microsomes as reported previously (4).

RNA extraction and quantitative Real-Time (RT)-PCR

Total RNA was extracted from intestinal samples using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications and reverse transcribed into cDNA using the Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). The cDNA was used as template for RT-PCR analysis. Primers against the genes of interest were designed using the available mRNA sequence information in NCBI GeneBank. Basic local alignment search tool (BLAST, NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) was used for primer verification. Since the genes studied were not yet sequenced for the *Psammomys obesus*, we designed primers based on the conserved regions in mRNA of the three well characterized species: *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*. The designed primers were verified for their specificity by classic RT-PCR using rat intestinal tissue and human intestinal cells (Caco-2).

Quantitative RT-PCRs were performed using Quantitect SYBR Green kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism® 7000 Sequence Detection System. The RT-PCR reactions were carried in a 96-well plates with a final volume of 25 µl per well. 12.5 µl of SYBR Green Mix (2X) were added to a well containing 25 picomoles of the forward and reverse primers and 0.5 µg of cDNA template in a total of 12.5 µl of DEPC H_2O. Further, negative controls without cDNA were assessed. The reaction of amplification was carried out in 40 cycles. To normalize the different cDNA sample amounts, we used the housekeeping gene GAPDH as a reference gene. The analyses were performed for each gene and for GAPDH in the same plate in triplicate for each sample. The relative mRNA fold-changes between the three animal groups were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (5).

Western blots

To assess the presence and mass of specific proteins, intestinal tissues were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (1,2,6). The Bradford assay (Bio-Rad) was used to estimate protein concentration. Proteins were denatured in sample

buffer containing SDS and β-mercaptoethanol, separated on a 4–20% gradient SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked with defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed various proteins. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Even if identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the β-actin protein was used to confirm equal loading on SDS-PAGE (results not shown). Blots were developed and the protein mass was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software (UN-SCAN-IT-GEL 6.1).

Supplementary Table I: Impact of Compound C on metformin-mediated modifications

%	Type 2 diabetes	Metformin	Compound C
Phospho-AMPK	↓ 28.8 ± 3.3	↓ 5.8 ± 0.7*	↓ 23.9 ± 2.9$^{\#}$
Triglycerides (TG)	↑ 55.2 ± 4.6	↑ 5.6 ± 0.7*	↑ 36.2 ± 4.1$^{\#}$
Cholesterol ester	↑ 25.1 ± 2.9	↑ 4.3 ± 0.6*	↑ 21.9 ± 6.6$^{\#}$
Phospholipids	↑ 46.2 ± 5.0	↑ 7.7 ± 0.5*	↑ 37.7 ± 5.6$^{\#}$
TG-rich lipoprotein	↑ 49.4 ± 6.3	↑ 4.7 ± 0.7*	↑ 33.6 ± 6.8$^{\#}$
Apo B-48	↑ 64.5 ± 5.9	↑ 3.8 ± 0.2*	↑ 50.5 ± 4.2$^{\#}$
MTP	↑ 17.3 ± 3.6	↑ 2.6 ± 0.6*	↑ 13.7 ± 2.1$^{\#}$
Sar1B GTPase	↑ 21.2 ± 0.7	↑ 1.9 ± 0.4*	↑ 15.6 ± 1.5$^{\#}$

*P< 0.01 vs. type 2 diabetes; $^{\#}P$<0.01 vs. metformin

REFRENCES

1. Montoudis A, Seidman E, Boudreau F et al. Intestinal fatty acid binding protein regulates mitochondrion beta-oxidation and cholesterol uptake. J Lipid Res 2008;49:961-972
2. Ouadda AB, Levy E, Ziv E et al. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in Psammomys obesus. Biosci Rep 2009;29:283-292
3. Levy E, Spahis S, Ziv E et al. Overproduction of intestinal lipoprotein containing apolipoprotein B-48 in Psammomys obesus: impact of dietary n-3 fatty acids. Diabetologia 2006;49:1937-1945
4. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E et al. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obesus: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetes 2003;52:2539-2545
5. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402-408
6. Sane AT, Sinnett D, Delvin E et al. Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. J Lipid Res 2006;47:2112-2120

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1 **Distribution of gene and protein expressions of AMPK subunits in intestinal Caco-2/15 cells.** The conditions for growing and differentiating Caco-2/15 cells are reported in the Methods sections. AMPK subunits profile was examined by RT-PCR (A) and Western blot (B). To determine the subunits β and γ that form the AMPK complexes with α1 and α2, we proceeded with the immunoprecipitation approach (C). Values represent means± SEM for 3 independent experiments performed in triplicates. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

Supplementary Figure 2 **Effect of metformin on phosphorylation of AMPK and insulin resistance markers in the jejunum of *Psammomys obesus* animals**. Following metformin treatment for 3 weeks, treated and non-treated animals were sacrificed and the jejunum was removed. Aliquots were incubated with insulin (100 nM for 20 min) before being analyzed for insulin resistance biomarkers by western blot. AMPK was analyzed by the same procedure, but was not incubated with insulin. Values represent means ± SEM for 4 animals/group. $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$ vs. Controls; $^{\#}P<0.05$ vs Diabetic animals.

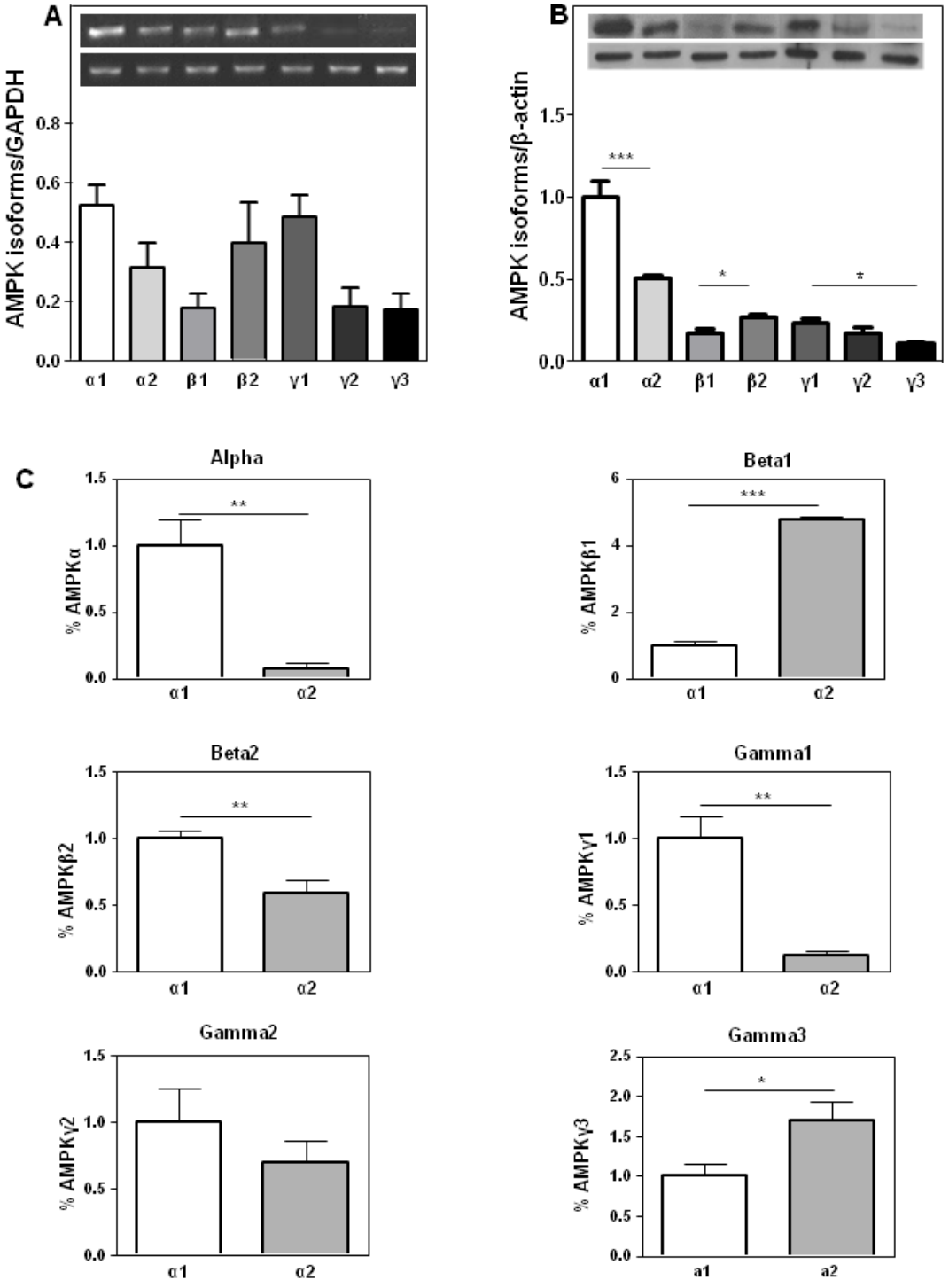
Supplementary Figure 3 **Effects of metformin on the activity of ACC and CPT-1 in the jejunum of *Psammomys obesus* animals**. The jejunal segment was homogenized and employed for the enzymatic determination of ACC (A) and CPT-1 (B). Values represent

means ± SEM for 4 animals/group. $^{**}P<0.01$; $^{**}P<0.001$ vs. Controls.

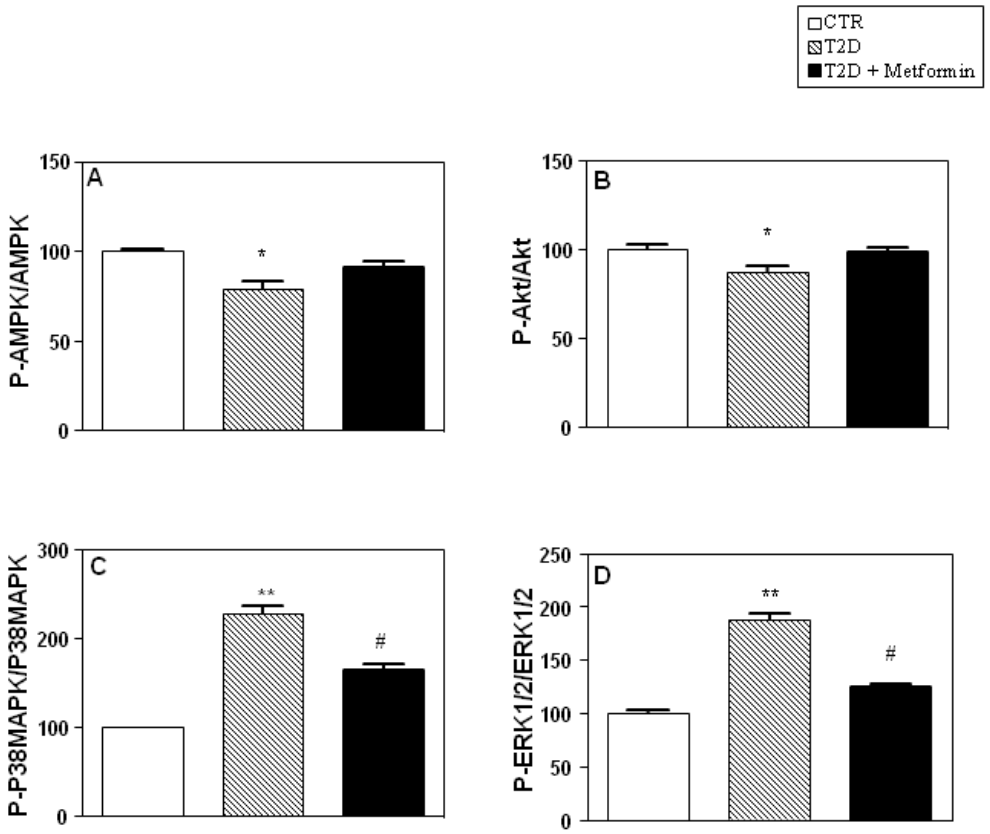
Supplementary Figure 4 **Effect of metformin on *de novo* lipid synthesis in the intestine of diabetic *Psammomys obesus***. Jejunal explants from the different groups were incubated with [^{14}C]-oleic acid substrate for 3h. Lipids (TG, PL, CE) of tissue homogenates were then extracted with chloroform/methanol (2:1, vol/vol) isolated by TLC and quantitated. Data are means ± SEM for 4 animals/group. *$P<0.05$ vs Control and diabetic animals.

TG: triglycerides; PL: phospholipids; CE: cholesteryl ester

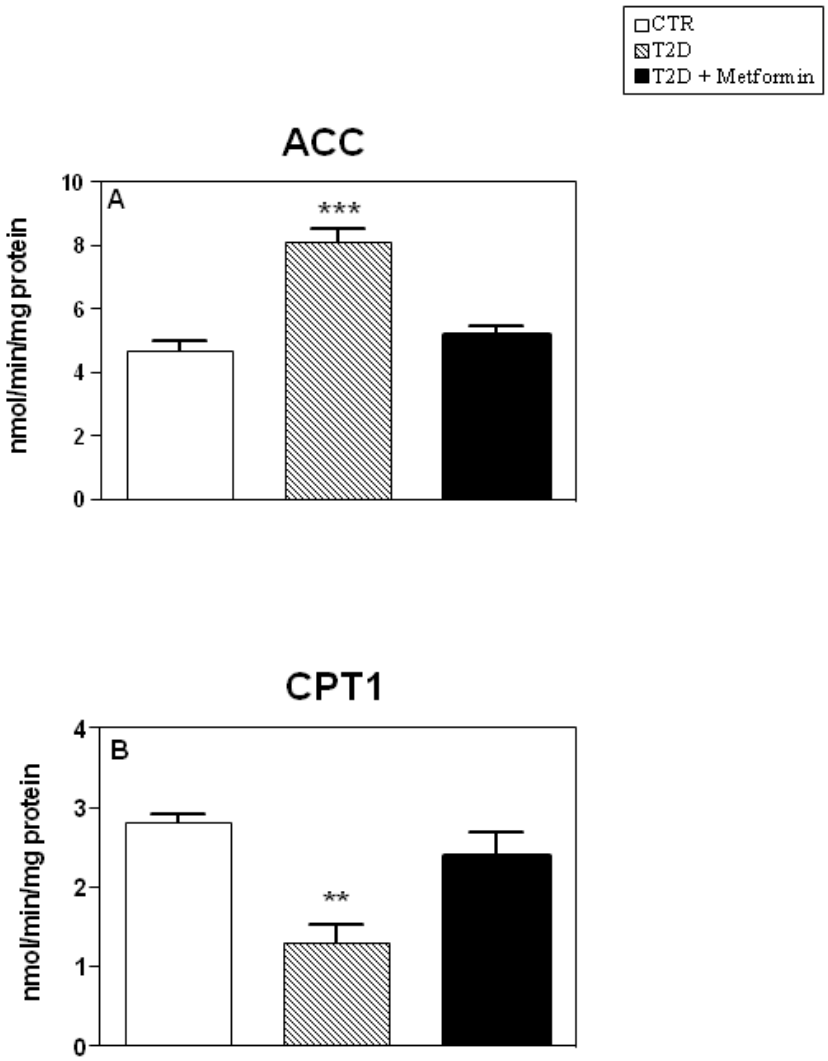
Supplementary Figure 1



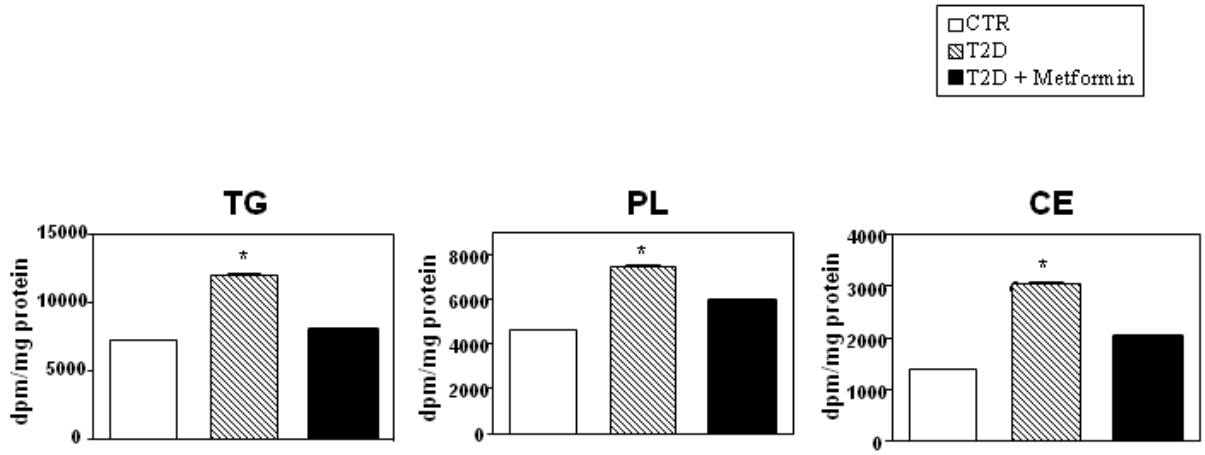
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



5.4 RÔLE DE L'AMPK DANS LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE

De nombreuses études ont montré l'implication de l'AMPK au niveau des tissus insulino-sensibles tels que le muscle squelettique dans l'amélioration de l'homéostasie glucidique (**Iglesias et al., 2004**; **Jelenik et al., 2010**; **Jorgensen et al., 2004**; **Kurth-Kraczek et al., 1999**). Elle est caractérisée notamment par une augmentation de la phosphorylation des résidus Ser473 et Thr308 de l'Akt par l'AMPK corrélée à une inhibition de l'activité de mTORC1, ce qui lève le rétrocontrôle négatif sur la voie IRS/PI3K/Akt exercé par mTORC1/S6K1 (**Hardie, 2008**; **Schultze et al., 2012**). Ces actions sur la voie de signalisation de l'insuline ont pour conséquence une stimulation de la capture du glucose par le biais de la translocation du GLUT4 (spécifique au muscle squelettique) à la membrane plasmique (**Figure 51**). Par conséquent, l'activation de l'AMPK au niveau des tissus périphériques insulino-résistants (muscle squelettique ou tissu adipeux) est une cible thérapeutique intéressante pour traiter l'hyperglycémie.

Mais qu'en est-il dans l'intestin ? En effet, l'intestin est un organe capable de développer l'insulino-résistance au même titre que le foie, le muscle squelettique ou le tissu adipeux, contribuant ainsi à l'hyperglycémie et aux dyslipidémies associées au diabète de type II (**Ait-Omar et al., 2011**; **Zoltowska et al., 2003**). De plus, il est le premier organe à être au contact des nutriments dont la fonction principale est de les absorber. Pour ces raisons, il paraît fondamental de déterminer le rôle de l'AMPK intestinale dans la régulation de la sensibilité à l'insuline.

Dans cette partie, nous avons utilisé une approche pharmacologique pour déterminer si l'activation via la phosphorylation de l'AMPK avait un impact sur la voie de signalisation de l'insuline, à savoir l'Akt et mTORC1. Nous avons également utilisé le modèle d'invalidation génique de la sous-unité α1 dans les cellules Caco-2 décrit précédemment pour évaluer le rôle de cette sous-unité dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline.

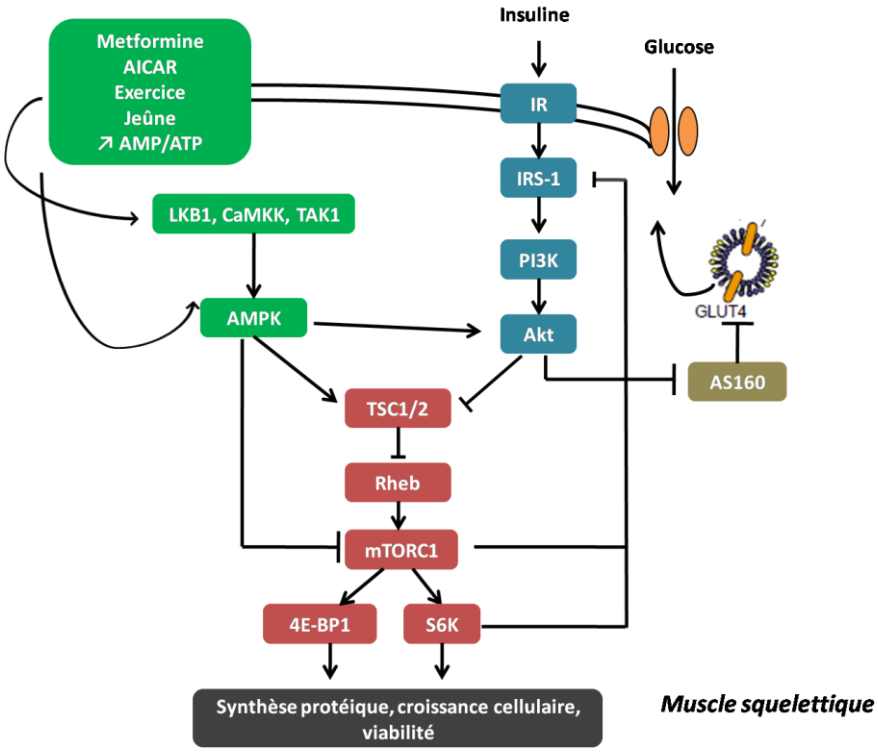


Figure 51: Interactions entre les voies de signalisation de l'AMPK et de l'insuline dans le muscle squelettique. L'AMPK favorise l'internalisation du glucose en stimulant la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique par le biais de l'Akt. L'AMPK inhibe également directement mTORC1 ou indirectement en stimulant TSC1/2.Cette inhibition lève le rétrocontrôle négatif sur l'IRS-1 exercé par mTORC1 et S6K**.**

5.4.1 Approche pharmacologique

5.4.1.1 Courbe « dose-réponse » de l'insuline dans les cellules entérocytaires

Pour étudier le rôle de l'AMPK dans la sensibilité à l'insuline, nous avons utilisé des composés pharmacologiques tels que des activateurs (AICAR, Metformine) et inhibiteurs de l'AMPK (Composé C) et de la PI3K (LY294002).

Tout d'abord, une courbe « dose-réponse » de l'insuline sur la phosphorylation de l'Akt a été réalisée dans les cellules Caco-2 afin de déterminer la concentration d'insuline nécessaire pour stimuler la voie de signalisation PI3K/Akt (**Figure 52**). Habituellement, la concentration d'insuline utilisée dans les études pour stimuler la voie PI3K/Akt dans le muscle squelettique est de 15mUI/ml ou 100nM pendant 10-15 minutes. Toutefois, il peut y avoir des différences d'un tissu à un autre ou d'une lignée cellulaire à une autre.

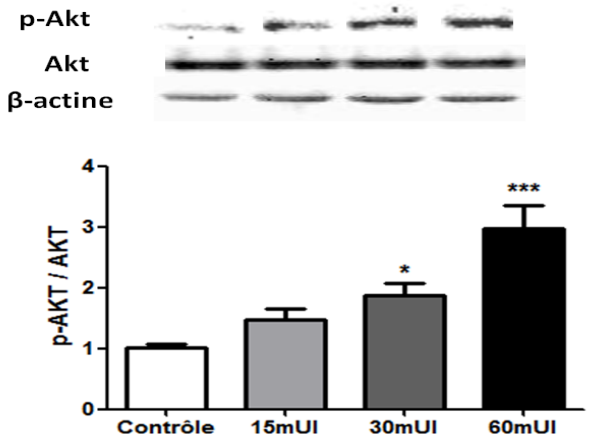


Figure 52: Courbe « dose-réponse » de l'insuline pour induire la phosphorylation de l'Akt (Ser473). La courbe « dose-réponse » (15-30-60 mUI/ml pendant 15min) de l'insuline a été réalisée à partir de protéines totales de lysats cellulaires Caco-2/TC7et par immunobuvardage de type Western lors de 3 expériences distinctes effectuées en triplicatas (N=3, n=9). Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou d'Akt et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±SE. *P<0,05 vs. Contrôle et ***P<0,001 vs. Contrôle.

Les résultats indiquent qu'une concentration d'insuline de 30 à 60mUI/ml pendant 15minutes est nécessaire pour stimuler l'Akt (2 à 3 fois) dans les cellules intestinales Caco-2 (**Figure 52**).

5.4.1.2 Effet de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline (Akt et mTORC1)

5.4.1.2.1 Régulation de l'AKT

Nous avons utilisé l'activateur AICAR de l'AMPK pour étudier l'implication de cette protéine kinase dans la régulation de la phosphorylation de l'Akt (Ser473), un marqueur de la sensibilité à l'insuline (**Figure 53**).

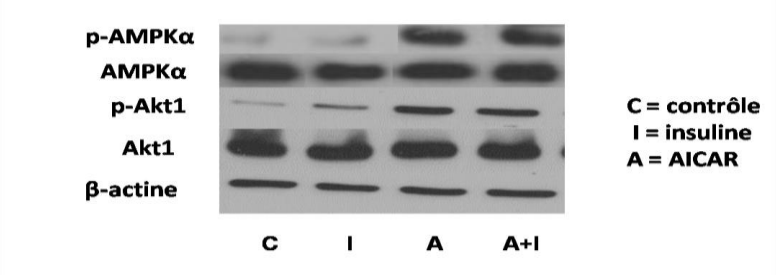


Figure 53: L'AMPK sous forme active est capable de stimuler l'Akt (Ser473) 2 fois plus que l'insuline seule. Les cellules Caco-2/15 différenciées sont incubées avec l'AICAR pendant 3heures puis sont stimulées par de l'insuline à 30mUI/ml pendant 10min. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors d'une expérience réalisée en duplicatas.

Les résultats révèlent que l'activation de l'AMPK par l'AICAR stimulait au moins 2 fois plus la phosphorylation de l'Akt (8 fois) (**Figure 53**, colonne A vs C) par rapport à l'insuline seule (4 fois) (**Figure 53**, colonne I vs C). L'addition simultanée d'insuline avec l'AICAR ne potentialisait pas l'activation de l'Akt suggérant que l'AMPK agirait en empruntant la même voie que celle de l'insuline pour activer l'Akt (**Figure 53**, colonne AI vs A).

Ces données montrent donc que l'activation de l'AMPK induit celle de l'Akt via leur phosphorylation respective. Inversement, l'insuline n'a pas d'effet significatif sur la phosphorylation de l'AMPK, ni sur celle de l'ACC (**Figure 54)**

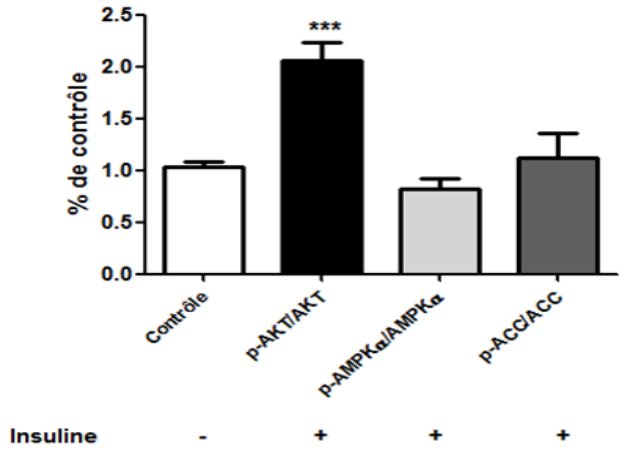


Figure 54 : L'insuline n'a pas d'effet sur la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC. Les cellules Caco-2/TC7 différenciées sont mises à « jeun » pendant 18 heures puis sont stimulées par de l'insuline à 60mUI/ml pendant 15 minutes. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes réalisées en triplicatas (N=3, n=9). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. ***P<0,001 vs. Contrôle.

5.4.1.2.2 Régulation de mTORC1

Outre l'Akt, nous avons également analysé l'effet de l'activation ou de l'inhibition (selon les niveaux de phosphorylations) de l'AMPK sur mTORC1, un acteur clé dans l'insulino-résistance puisqu'il induit un rétrocontrôle négatif sur l'IRS1 (**Schultze et al.,**

2012). Il est à noter que l'anticorps anti-phospho-mTOR (Ser2448) qui est utilisé dans cette étude est spécifique du complexe mTORC1 (**Copp et al., 2009**).

D'après les graphiques A et B de la **Figure 55**, l'inhibition via la déphosphorylation de l'AMPK (80%) par le composé C induisait une activation par phosphorylation de mTORC1 (3 fois) et réciproquement, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK (3 fois) par la Metformine induisait une diminution de p-mTORC1 de 51% (**Figure 55C et D**).

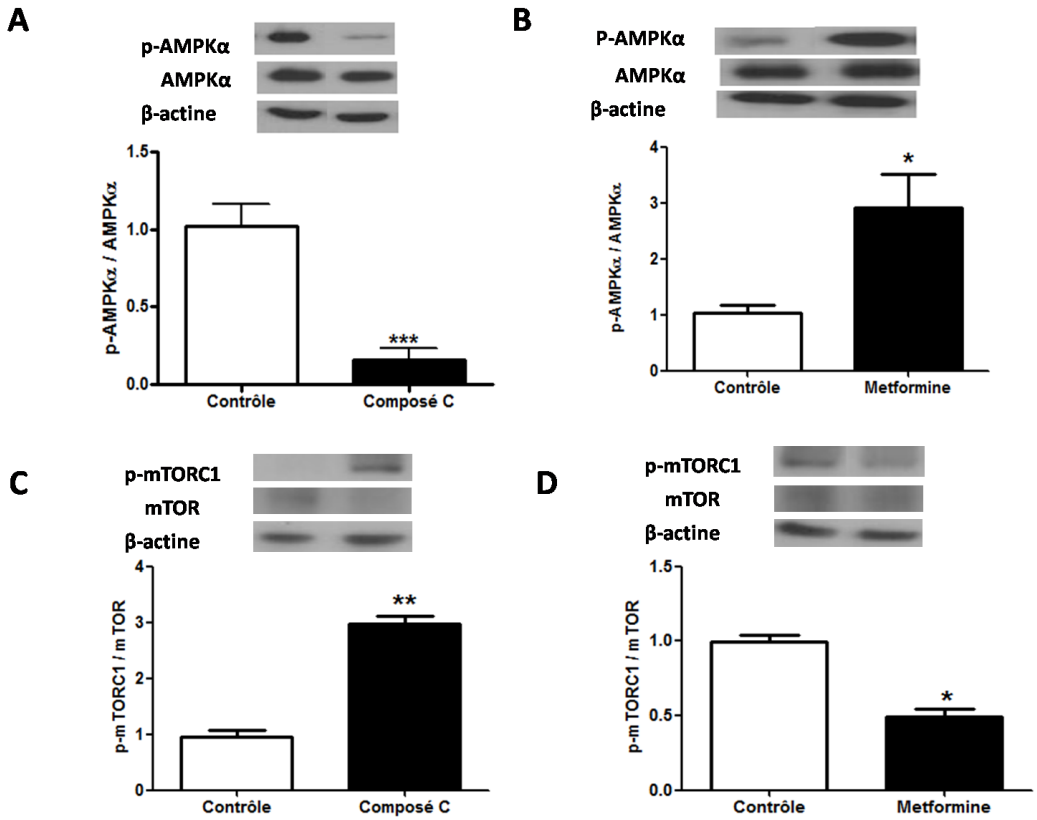


Figure 55: L'inhibition via la déphosphorylation de l'AMPK par le composé C induit la phosphorylation de mTORC1 (Ser2448) ; inversement, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK par la Metformine déphosphoryle et inhibe mTORC1. Les cellules Caco-2/15 différenciées sont incubées pendant 3 heures avec le composé C ou la Metformine. Niveaux de phosphorylations (**A** et **B**) de l'AMPK (Thr172) et (**C** et **D**) de mTORC1 (Ser2448) en présence de composé C (**A** et **C**) ou de Metformine (**B** et **D**). Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes (N=3, n=3 à 9). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. *P<0,05 ; **P<0,05 ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

En résumé, les résultats montrent l'existence d'une interaction entre la voie de l'AMPK et la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes, à savoir l'activation de l'Akt (↗ p-Akt) et l'inhibition de mTORC1 (↘ p-mTORC1), et ce comme dans le muscle squelettique (**Ginion et al., 2011**). D'après la **Figure 53**, il semble que l'action de l'AMPK emprunte la même voie de signalisation que celle de l'insuline, c'est-à-dire la voie IRS/PI3K/AKT. Cette hypothèse a été vérifiée dans les expériences subséquentes.

5.4.1.3 Mécanisme d'action de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline

Pour mieux comprendre cette interaction et déterminer si l'AMPK phosphoryle et active directement l'Akt ou bien si elle agit en amont de la PI3K, nous avons utilisé un inhibiteur de la PI3K, le composé LY294002. Une courbe « dose-réponse » de cet inhibiteur a été réalisée (**Figure 56**). Dès 10µM de LY294002, l'insuline n'est plus capable de stimuler l'Akt (réduction de 27% vs. Contrôle). L'effet était plus important à une concentration de 50µM (réduction de 80% vs. Contrôle).

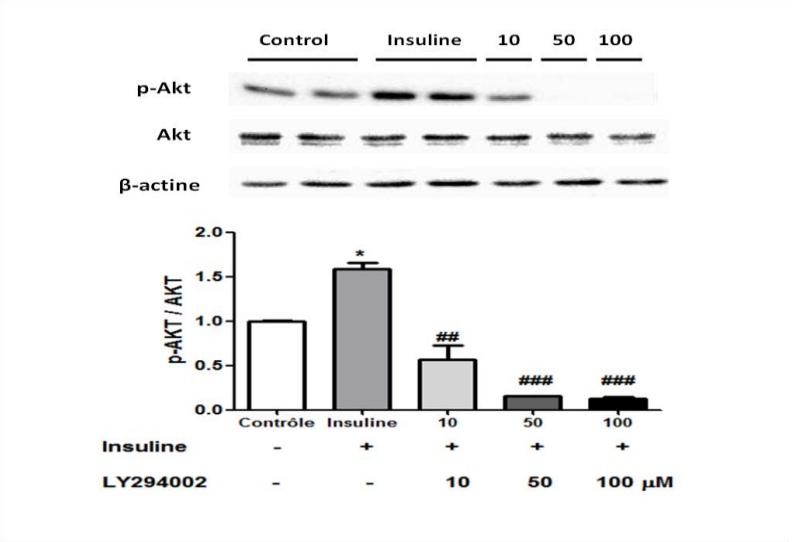


Figure 56 : Courbe « dose-réponse » de l'inhibiteur de PI3K, le composé LY294002, pour abolir l'effet stimulateur de l'insuline sur la phosphorylation de l'Akt (Ser473). La courbe « dose-réponse » (10-50-100 µM) de LY294002 (1 heure) est réalisée à partir de protéines totales de lysats cellulaires Caco-2/TC7 différenciées. Ces protéines sont soumises à un immunobuvardage de type Western à partir d'une expérience réalisée en duplicata (N=1, n=2). Les résultats sont normalisés par la quantité totale d'Akt et sont exprimés en % par rapport au contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±SE. *P<0,05 vs. Contrôle. ##P<0,001 vs. Insu ; ###P<0,001 vs. Insu.

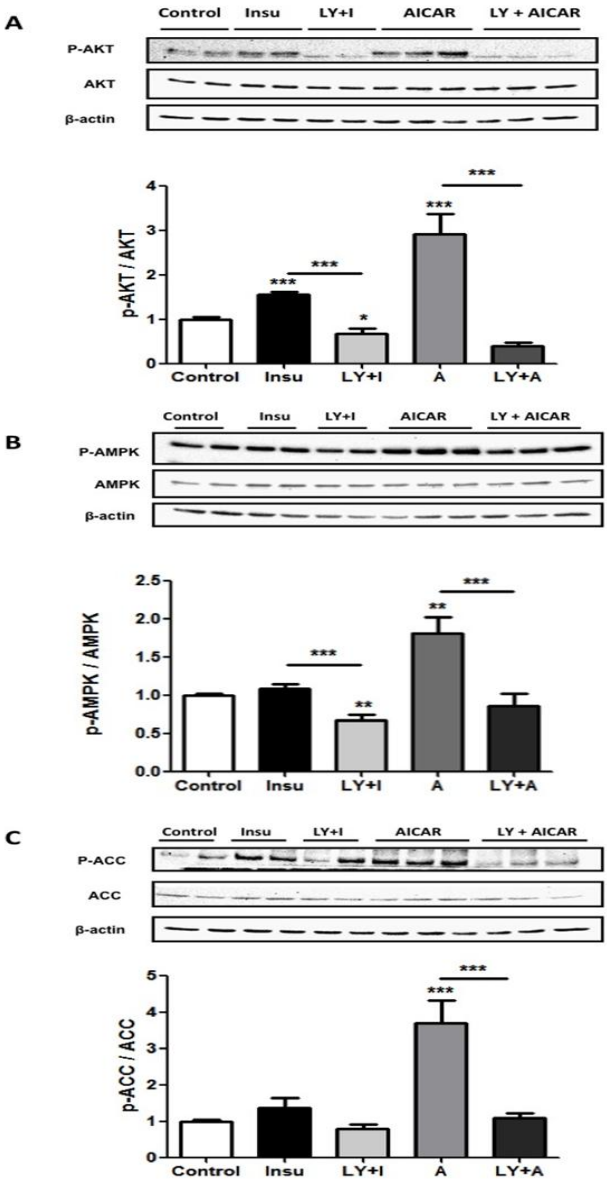


Figure 57: L'activation de l'Akt par l'AMPK est PI3K-dépendante et réciproquement, l'inhibition de la PI3K altère l'axe AMPK/ACC. Les cellules Caco-2/TC7 sont incubées simultanément avec un inhibiteur de la PI3K, le LY294002 (LY) (50µM, 1h) et un activateur de l'AMPK, l'AICAR (8mM, 3h). Puis elles sont stimulées par l'insuline (60mUI/ml, 15min). Niveaux de phosphorylations de l'AKT (Ser473) en présence de LY seul ou LY+AICAR (**A**), de l'AMPK (Thr172) en présence de LY seul ou LY+AICAR (**B**), de l'ACC (Ser79) en présence de LY seul ou LY+AICAR (**C**). Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes réalisées en triplicatas (N=3, n=9). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. **P<0,01 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

D'après les graphiques A, B et C de la **Figure 57**, les conditions expérimentales étaient validées puisque l'insuline phosphoryle l'Akt (1,6 fois) mais pas en présence de l'inhibiteur de PI3K (LY294002); et puisque l'AICAR favorisait la phosphorylation de l'axe AMPK/ACC. En outre, les résultats illustrés dans la **Figure 57A** confirment que l'activation de l'AMPK par l'AICAR stimule l'Akt. D'autre part, le graphique A indique que l'inhibition de la PI3K par LY294002 ne permettait plus à l'AMPK de phosphoryler l'Akt. Ainsi, l'AMPK stimule l'Akt en activant une kinase en amont de la PI3K ou elle-même. Le mécanisme d'action est donc similaire à celui de l'insuline puisque la phosphorylation de l'Akt est PI3K-dépendante.

Curieusement, l'inhibition de la PI3K altérait la phosphorylation de l'AMPK (**Figure 57B**). De même, l'inhibition de la PI3K ne permettait plus la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR. Ces résultats témoignent d'une réciprocité entre les deux voies de signalisation AMPK/insuline. Cela impliquerait que soit la PI3K a un effet direct sur l'AMPK, soit la PI3K inhibe une phosphatase qui régule négativement la phosphorylation de l'AMPK, soit elle régule positivement une des kinases en amont de l'AMPK (LKB1, CaMKKβ, TAK1). Par ailleurs, les résultats de la **Figure 57B et C**, montrent que l'inhibition de la PI3K altère l'axe AMPK/ACC impliqué dans la lipogenèse, puisque l'AICAR n'est plus capable d'augmenter la phosphorylation de l'ACC de manière AMPK-dépendante.

Ces résultats indiquent que la PI3K joue un rôle dans la régulation de l'AMPK. Il existe donc une réciprocité entre les deux voies de signalisation AMPK/insuline. L'activation de l'AMPK favorise l'activation de l'Akt. Au contraire, l'inhibition de la voie PI3K/Akt entraîne l'inhibition de l'axe AMPK/ACC.

<u>Absorption intestinale du glucose</u> :

Puisque l'AMPK, lorsqu'elle est active, est capable de stimuler la voie de signalisation de l'insuline (Ser473 phospho-Akt), nous avons étudié son effet sur l'absorption intestinale du glucose. Il est à noter que le rôle de l'insuline dans la régulation de l'absorption intestinale du glucose est sujet à des controverses dans la littérature. En effet, certains auteurs ont montré que l'insuline inhibe l'absorption intestinale du glucose (**Tobin et al., 2008**) alors que

d'autres ont montré le contraire (**Serhan et Kreydiyyeh, 2010**). Cette étude avait donc pour objectif de clarifier le rôle de l'insuline dans l'absorption entérocytaire du glucose et bien entendu de montrer l'implication de l'AMPK dans cette régulation.

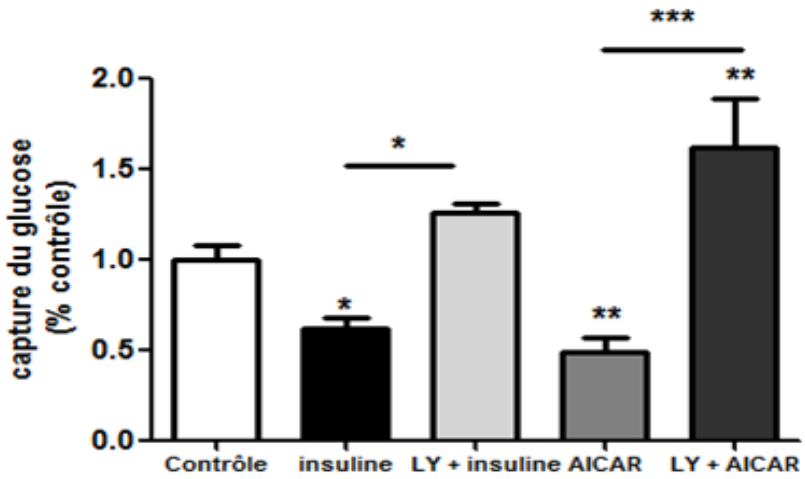


Figure 58: L'insuline et l'AICAR inhibent l'absorption entérocytaire du glucose par un mécanisme PI3K et AMPK-dépendant respectivement. Les cellules Caco-2/TC7 sont incubées pendant 1 heure avec le composé LY294002 (50µM) et/ou pendant 3 heures avec l'AICAR (8mM). La capture du glucose est mesurée par l'incorporation de [^{3}H]-2-désoxy-glucose. Les valeurs représentent la moyenne ±SE obtenues à partir de 3 expériences réalisées en duplicatas (N=3, n=6). Les résultats sont exprimés en % du contrôle. *P<0,05 ; **P<0,01 ; ***P<0,001.

Comme il a été montré dans la **Figure 58**, l'insuline inhibait de 40% l'absorption du glucose par les cellules intestinales Caco-2. Ce résultat confirme les travaux de Tobin & Brot-Laroche (**Tobin et al., 2008**). Par ailleurs, l'effet de l'insuline était PI3K-dépendant puisque l'inhibition de la PI3K par LY294002 ne permettait plus la réduction de l'absorption du glucose mais avait tendance à l'augmenter (25%). En outre, l'activation de l'AMPK par l'AICAR produisait le même effet que l'insuline, c'est-à-dire une diminution de l'absorption du glucose de 52%. L'inhibition de PI3K abolissait l'effet de l'AICAR en favorisant plutôt l'absorption du glucose de 60%.

D'après les résultats, l'action de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose est « entéro-spécifique ». Alors que dans le muscle squelettique ou le tissu adipeux l'insuline induit l'entrée du glucose, son rôle au niveau des entérocytes serait de limiter l'absorption du glucose. Ce mécanisme est PI3K-dépendant. D'autre part, l'activation de l'AMPK permet également de réduire l'absorption du glucose par un mécanisme PI3K-dépendant. Ces

données semblent indiquer que l'AMPK phosphorylerait et activerait l'AKT en empruntant la même voie que l'insuline. Elle jouerait donc un rôle dans l'amélioration de l'homéostasie glucidique en stimulant la voie de signalisation de l'insuline.

5.4.2 Approche d'invalidation génique de l'AMPKα1

Les données précédentes obtenues montraient que l'activation de l'AMPK stimulait l'Akt (**Figure 53**) et inhibait mTORC1 (**Figure 55D**). Pour approfondir le rôle de l'AMPK dans cette régulation, il était important de déterminer quelle-sous-unité de l'AMPK est impliquée dans la sensibilité à l'insuline (activation de Akt et inhibition de mTORC1). Nous avons donc utilisé le modèle d'invalidation génique de la sous-unité α1 de l'AMPK (AMPKα1$^{-/-}$) dans les cellules Caco-2.

L'effet de l'activation de l'AMPK par l'AICAR dans les cellules contrôles PLKO et AMPKα1$^{-/-}$ sur les protéines Akt et mTORC1 a été analysé. Les résultats présentés dans la **Figure 59A et B** permettent de valider les conditions expérimentales: l'expression protéique de l'AMPKα1 était réduite de 90%, ce qui abolissait de 95% l'activité ou la phosphorylation de l'AMPK. L'AICAR était encore capable de stimuler la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$ reflétant la proportion de l'isoforme α2 jouant un rôle dans cette activation. En outre, l'activation de l'AMPK par l'AICAR stimulait la phosphorylation de l'Akt (4,5 fois) dans les cellules contrôles. Toutefois, le knock-down AMPKα1$^{-/-}$ n'avait pas d'effet significatif sur l'Akt, ni en présence d'AICAR puisque sa phosphorylation était augmentée de plus de 4 fois (**Figure 59C**).

Nous pouvons donc en conclure que l'activation par phosphorylation de l'Akt n'est pas dépendante de la sous-unité α1 de l'AMPK. Il semble que ce soit plutôt la sous-unité α2 de l'AMPK qui régule la phosphorylation et l'activité de cette protéine.

Enfin, le rôle de l'AMPK dans la régulation de mTORC1 a été analysé (**Figure 59D**). Dans les cellules contrôles (PLKO), l'activation de l'AMPK par l'AICAR était capable d'inhiber la phosphorylation de mTORC1 (90%) ce qui confirme les résultats précédents obtenus avec la Metformine (**Figure 55D**). Toutefois, l'absence de la sous-unité α1 dans les cellules AMPKα1$^{-/-}$ n'affectait pas significativement la phosphorylation de mTORC1. Par

ailleurs, l'ajout d'AICAR dans cette situation permettait de réduire de 83% la phosphorylation de mTORC1. Par conséquent, la sous-unité α1 de l'AMPK ne semble pas jouer de rôle dans la régulation de mTORC1. C'est donc probablement la sous-unité α2 qui détient un rôle majeur dans cette régulation.

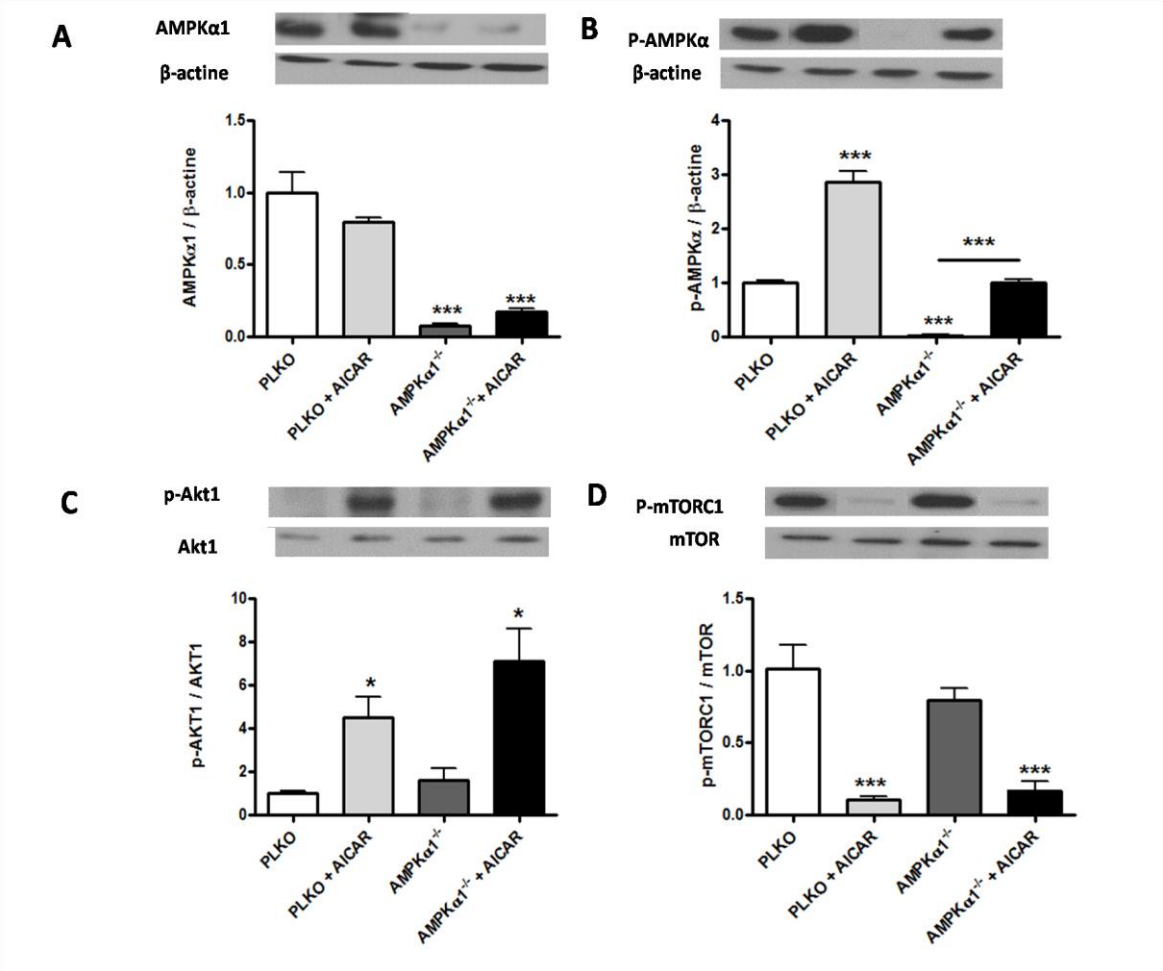


Figure 59: L'invalidation de la sous-unité α1 de l'AMPK n'a pas d'effet sur l'activité de l'Akt et mTORC1. Impact du knock-down AMPKα1$^{-/-}$ sur l'activité / phosphorylation des protéines clés de la signalisation de l'insuline (Akt et mTORC1) en présence ou non d'un activateur de l'AMPK, l'AICAR (8mM, 3 heures). (**A**) Expression protéique de l'AMPKα1et impact sur les niveaux de phosphorylations de (**B**) l'AMPK (Thr172), (**C**) l'Akt1 (Ser473), (**D**) mTORC1 (Ser2448). Les protéines totales issues de lysats cellulaires de Caco-2/15 différenciées sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine ciblée et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ± SE à partir d'une expérience réalisée en triplicatas (n=3). *P<0,05 vs. Contrôle ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

5.4.3 Conclusions

Contrairement aux autres tissus périphériques insulino-sensibles tels que le muscle squelettique, l'action de l'insuline sur les entérocytes semble réduire l'absorption intestinale du glucose par un mécanisme PI3K-dépendant. En effet, l'inhibition de la PI3K par le composé LY294002 empêche l'insuline de réduire l'absorption du glucose par les entérocytes. En outre, l'AMPK exerce le même effet que l'insuline sur l'absorption du glucose par les cellules intestinales puisque son activation permet de la réduire significativement. Son action est également PI3K-dépendante : l'inhibition de la PI3K par le composé LY294002 ne permet plus à l'AMPK d'activer l'Akt, ni de réduire l'absorption entérocytaire du glucose. Ces données suggèrent que l'effet de l'activation de l'AMPK emprunte la même voie que l'insuline (IRS/PI3K/Akt).

D'autre part, il existe une réciprocité entre les deux voies de signalisation AMPK/insuline puisque l'activation de l'AMPK entraîne l'activation de l'Akt et l'inhibition de la PI3K/Akt entraîne une inhibition de l'axe AMPK/ACC. Enfin, l'activation de l'Akt (Ser473 p-Akt) et l'inhibition de mTORC1 (Ser2448 p-mTORC1) par l'AMPK ne semble pas être dépendante de la sous-unité α1. Il se pourrait que la sous-unité α2 joue un rôle prépondérant dans cette régulation.

5.5 EFFETS DU 4-HHE SUR LES VOIES DE SIGNALISATION AMPK/INSULINE

Le 4-hydroxy-hexenal (4-HHE) est issu de l'oxydation des AGPI de la classe des omégas 3 (**Yamada et al., 2004**). Il existe également le 4-hydroxy-nonenal (4-HNE) issu de l'oxydation des AGPI de la classe des omégas 6. Ces dérivés toxiques de la peroxydation lipidique des AGPI sont regroupés dans une même famille, celle des 4-hydroxyalkénals (**Catala, 2009**; **Guichardant et al., 2006**). De nombreuses études montrent leurs implications dans la formation d'un stress oxydant et de l'inflammation. Cet état favorise le développement de maladies neuro-dégénératives (Alzheimer) (**Bradley et al., 2010**) mais aussi des maladies métaboliques telles que l'obésité, l'insulino-résistance et le diabète de type II (**Grimsrud et al., 2007**; **Pillon et al., 2012**).

Depuis quelques années, les chercheurs étudient de manière plus approfondie les mécanismes des 4-hydroxalkénals impliqués dans l'accumulation de lipides et le développement de l'insulino-résistance. Les études portent surtout sur le 4-HNE du fait de son caractère plus toxique que le 4-HHE et de sa présence en plus grande quantité dans l'alimentation (apport AGPI n-6/AGPI n-3 $\geq$10 dans la diète occidentale). Récemment, Shearn et Pillon ont montré l'induction d'une insulino-résistance dans les cellules hépatiques HepG2, les cellules musculaires C2C12 myotubes et les cellules 3T3-L1 adipocytaires par le 4-HNE (**Pillon et al., 2012**; **Shearn et al., 2011**). Toutefois, l'implication du 4-HHE dans les maladies métaboliques telles que l'insulino-résistance a suscité très peu d'intérêt jusqu'à présent. Alors que les recommandations nutritionnelles incitent les consommateurs à augmenter leurs apports en omégas-3, donc un risque accru d'ingérer du 4-HHE, il convient d'explorer d'avantage les effets toxiques du 4-HHE sur la santé.

En s'appuyant sur ces données de la littérature, nous avons utilisé le 4-HHE pour répondre à plusieurs questions fondamentales : Quels sont les effets du 4-HHE sur la sensibilité à l'insuline dans les entérocytes ? Peuvent-ils induire une insulino-résistance intestinale ? Si oui, l'activité de l'AMPK et l'absorption intestinale du glucose sont-elles affectées ?

5.5.1 Effets à court terme du 4-HHE : stimulation de la voie de signalisation de l'insuline

Les 4-hydroxyalkénals sont connus pour leurs propriétés cytotoxiques telles que l'induction de la mort cellulaire (**Alghazeer et al., 2008**). Un test de la LDH a été réalisé afin de déterminer si le 4-HHE pouvait induire une nécrose et si oui, à quelle concentration. D'après les résultats présentés dans la **Figure 60**, le 4-HHE n'induit pas de nécrose quel que soit la concentration utilisée.

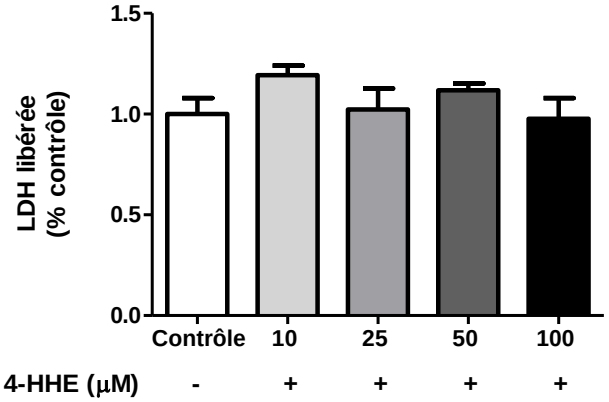


Figure 60 : A court terme, le 4-HHE n'induit pas de nécrose dans les cellules intestinales Caco-2/TC7. Un test de la LDH est effectué pour évaluer si une nécrose apparaît après 30 minutes d'incubation des cellules en présence d'une concentration croissante de 4-HHE (10-25-50-100µM). Les résultats sont issus de 4 expériences distinctes (N=4) et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±SE.

L'effet du 4-HHE sur la voie de signalisation de l'insuline dans les cellules intestinales n'a encore jamais été investigué. Pourtant, les études *in vitro* laissent croire que cette molécule pro-oxydante pourrait affecter la voie de signalisation de l'insuline (**Pillon et al., 2012**; **Shearn et al., 2011**). Nous avons donc incubé des cellules intestinales Caco-2 en présence d'une concentration croissante de 4-HHE pendant 30 minutes. Un contrôle positif de la stimulation de l'Akt par l'insuline permettait de comparer l'effet du 4-HHE et celui de l'insuline sur la phosphorylation de l'Akt (Ser473). Parallèlement, l'effet du 4-HHE sur l'activité de l'AMPK a également été investigué.

D'après la **Figure 61A**, l'insuline stimulait 2,2 fois la phosphorylation de l'Akt (Ser473) par rapport au contrôle, ce qui permettait de valider les conditions expérimentales. Curieusement, le 4-HHE avait le même effet que l'insuline, c'est à dire qu'il stimulait la

phosphorylation de l'Akt de manière dose-dépendante. L'effet était significatif à partir de 50µM (2,4 fois) et augmentait de 3,4 fois lorsque la concentration de 4-HHE atteignait 100µM. En outre, le 4-HHE stimulait de manière dose-dépendante la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) où l'effet maximal (1,8 fois) était observé avec une concentration de 100µM de 4-HHE (**Figure 61B**).

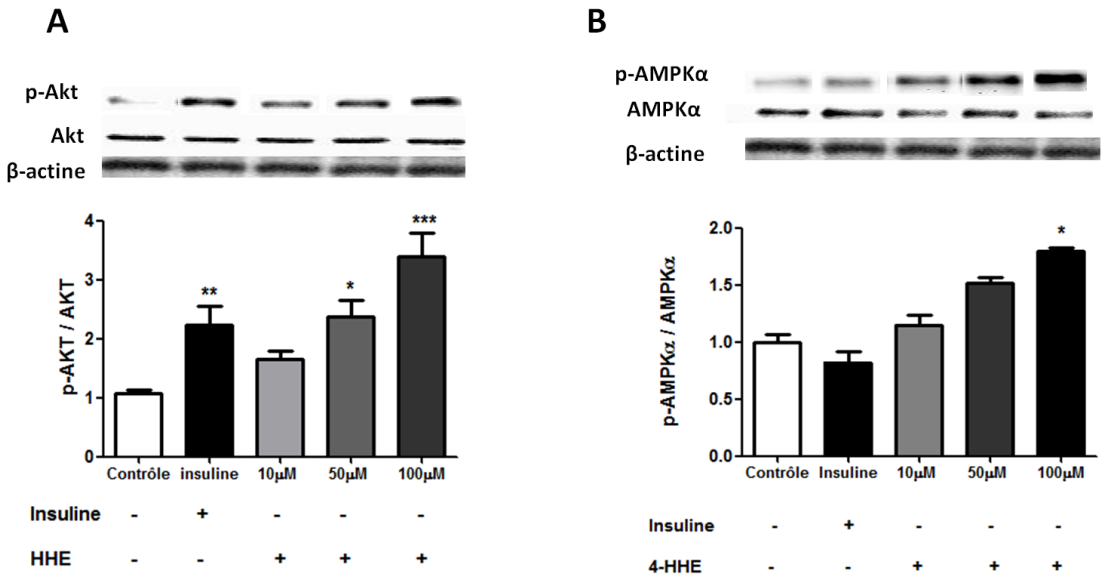


Figure 61 : Le 4-HHE stimule la phosphorylation de l'AKT et de l'AMPK de manière dose-dépendante. Les cellules Caco-2/TC7 différenciées sont incubées pendant 30 minutes avec le 4-HHE (10-50-100µM) puis stimulées ou non avec de l'insuline (60mUI/ml) pendant 15minutes. Niveaux de phosphorylations (**A**) de l'Akt (Ser473) et (**B**) de l'AMPK (Thr172) en présence d'insuline ou d'une concentration croissante de 4-HHE. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes (N=3). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. *P<0,05 ; **P<0,05 ; ***P<0,001 vs. Contrôle.

Ainsi l'AMPK et l'Akt étaient phosphorylées et activées par le 4-HHE au bout de 30 minutes. Cependant, le mécanisme d'action du 4-HHE sur la voie de l'AMPK et celle de l'Akt demeure inconnu. Nos données précédentes indiquent que l'activation de l'AMPK induit une stimulation de la voie PI3K/Akt. Dans cette situation, le 4-HHE pourrait activer en premier lieu l'AMPK qui stimulerait à son tour l'Akt de manière PI3K-dépendante comme l'insuline, ou bien il agirait simultanément sur les deux voies AMPK/insuline ou encore sur

une autre voie de signalisation complémentaire. Dans ce cas-là, il pourrait se produire un effet synergique de l'insuline en présence du 4-HHE.

Afin de montrer si l'effet du 4-HHE sur l'Akt s'additionne à celui de l'insuline, nous avons incubé les cellules intestinales Caco-2 avec une concentration croissante de 4-HHE pendant 30 minutes suivies de l'insuline pendant 15 minutes. Il en ressort que l'effet de l'insuline ne potentialisait pas significativement celui du 4-HHE sur la phosphorylation de l'Akt (**Figure 62**). Par ailleurs, le 4-HHE avait le même effet que celui de l'insuline sur l'absorption entérocytaire du glucose, c'est-à-dire qu'il la réduisait de 60 et 70% respectivement (**Figure 63**). De plus, l'addition simultanée de 4-HHE et d'insuline ne potentialisait pas significativement la réduction (87%) de l'absorption du glucose par rapport à l'insuline ou le 4-HHE seuls. Par conséquent, le 4-HHE emprunte probablement la même voie de signalisation que celle de l'insuline (IRS/PI3K/AKT) pour activer l'Akt et réduire l'absorption du glucose par les entérocytes.

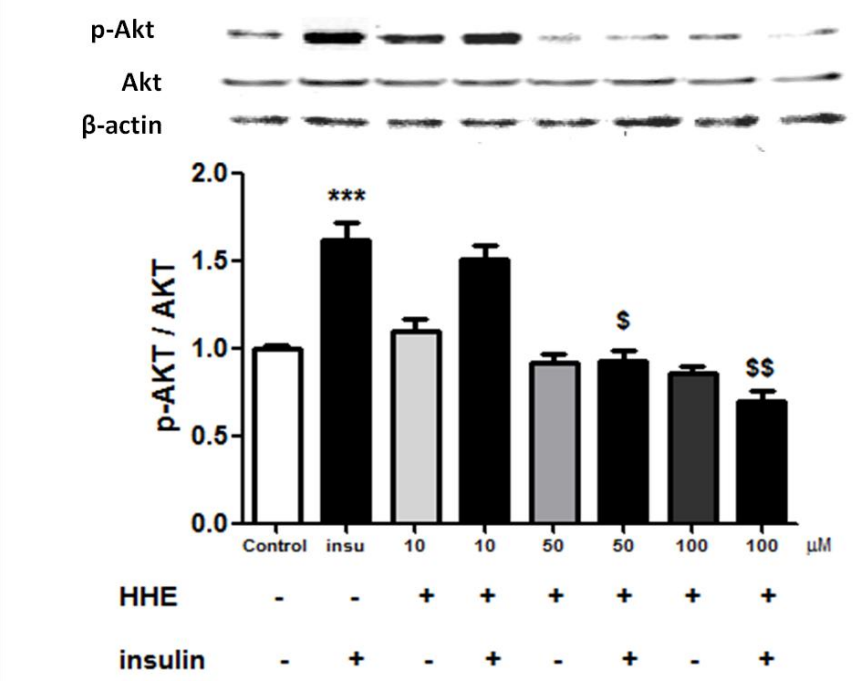


Figure 62 : L'insuline ne potentialise pas l'effet du 4-HHE sur la phosphorylation de l'Akt (Ser473). Le 4-HHE stimule la phosphorylation de l'AKT de manière dose-dépendante. Les cellules Caco-2/TC7 différenciées sont incubées pendant 30 minutes avec le 4-HHE (10-50-100µM) puis stimulées ou non avec de l'insuline (60mUI/ml) pendant 15 minutes. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes (N=3). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. **P<0,01.

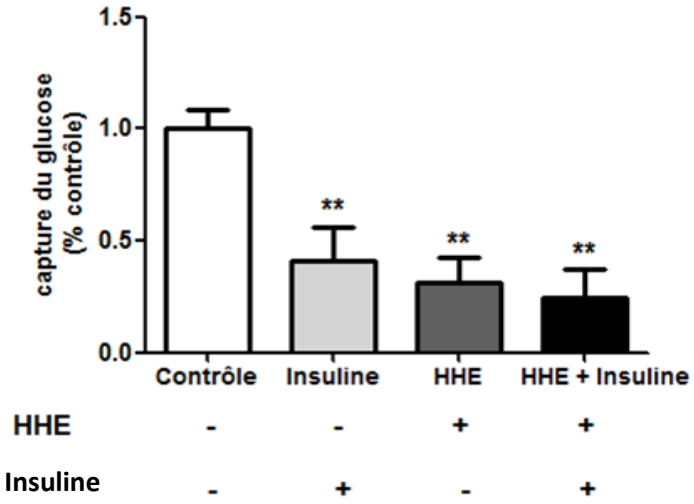


Figure 63 : A court terme, le 4-HHE et l'insuline réduisent l'absorption du glucose dans les cellules caco-2/TC7. L'addition simultanée de 4-HHE et d'insuline ne potentialise pas significativement la diminution de l'absorption du glucose. Les cellules sont incubées pendant 30min avec le 4-HHE (100µM) et/ou pendant 20min avec l'insuline (60mUI/ml). La capture du glucose est mesurée par l'incorporation de [^{3}H]-2-désoxy-glucose. Les valeurs représentent la moyenne ±SE obtenues à partir de 3 expériences réalisées en duplicatas (N=3, n=6). Les résultats sont exprimés en % du contrôle. **P<0,01 vs. Contrôle.

En résumé, bien que le 4-HHE soit connu pour son caractère cytotoxique, les résultats montrent qu'à court terme (30 minutes) ce composé stimule l'AMPK et l'Akt de manière dose-dépendante. Son effet sur l'Akt et l'absorption du glucose n'est pas additif à celui de l'insuline suggérant donc non pas une activation par une voie complémentaire de celle de l'insuline mais plutôt une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

5.5.2 Effets du 4-HHE à plus long terme (24h) : induction d'une insulino-résistance

Dans les cellules intestinales Caco-2, nous avons montré que le 4-HHE pouvait exercer un effet bénéfique à court terme (30min) sur l'AMPK et la voie de signalisation de l'insuline. Il semble donc agir comme un second messager permettant l'activation de plusieurs voies de signalisation concourant à la protection cellulaire.

Nous avons poursuivi l'étude sur le 4-HHE afin de déterminer si son effet bénéfique sur la signalisation de l'insuline perdurait après 24h d'incubation dans les cellules entérocytaires. Un test de la LDH a été à nouveau réalisé dans les cellules Caco-2 en présence

d'une concentration croissante de 4-HHE pour s'assurer de son innocuité après 24h d'incubation (**Figure 64**).

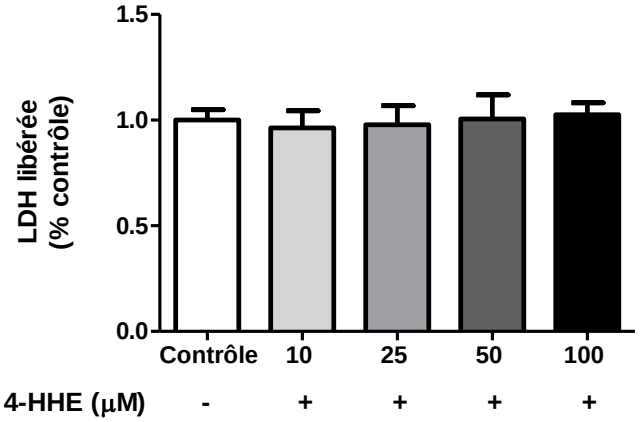


Figure 64 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE n'induit toujours pas de nécrose dans les cellules intestinales Caco-2/TC7. Un test de la LDH est effectué pour évaluer si une nécrose apparaît après 24 heures d'incubation des cellules en présence d'une concentration croissante de 4-HHE (10-25-50-100µM). Les résultats sont issus de 4 expériences distinctes (N=4) et sont exprimés en % du contrôle. Les valeurs représentent la moyenne ±SE.

Les cellules Caco-2 ont été incubées pendant 24 heures en présence d'une concentration croissante de 4-HHE (10-50-100µM) puis sont stimulées par l'insuline. En présence d'insuline seule, la phosphorylation de l'Akt est augmentée de 1,7 fois (**Figure 65A**). La phosphorylation de l'Akt par l'insuline diminuait d'autant plus que la concentration du 4-HHE augmentait (**Figure 65A et B)**. A 10µM de 4-HHE, l'Akt était toujours activée (1,6 fois), mais elle ne l'était plus à partir de 50µM. La **Figure 65B** illustre le pourcentage de réduction (40 à 50%) de la phosphorylation de l'Akt par l'insuline en présence du 4-HHE en prenant comme contrôle l'insuline seule.

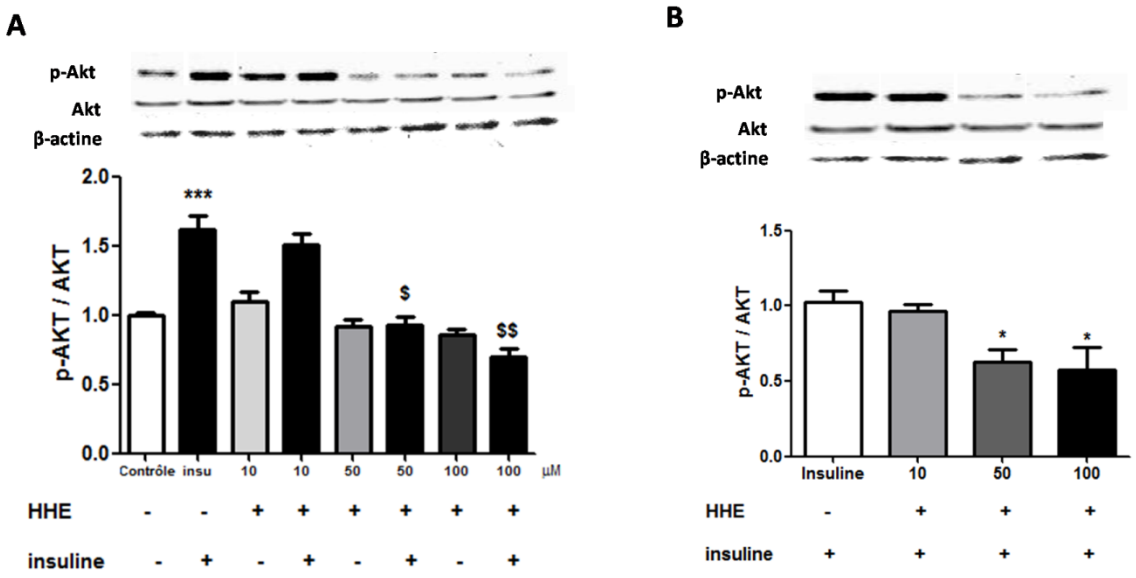


Figure 65 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE réduit la réponse de l'Akt (Ser473) à l'insuline de manière dose-dépendante. Les cellules Caco-2/TC7 différenciées sont incubées pendant 24h avec le 4-HHE (10-50-100µM) puis stimulées ou non avec de l'insuline (60mUI/ml) pendant 15 minutes. (**A**) Niveaux de phosphorylations de l'Akt (Ser473) en présence d'insuline et / ou d'une concentration croissante de 4-HHE. (**B**) Niveaux de phosphorylations de l'Akt en présence de 4-HHE en prenant comme contrôle l'insuline seule. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes (N=3). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. *P<0,05 vs. Contrôle; ***P<0,001 vs. Contrôle ; $P<0,05 vs. Insuline ; $$P<0,01.

D'après les résultats obtenus, le 4-HHE (50µM) induisait une insulino-résistance après 24 heures d'incubation des cellules intestinales. Pour le vérifier, des expériences de capture du [^{3}H]-2-désoxy-glucose ont été réalisées à partir de cellules intestinales Caco-2 cultivées sur filtres en plaques de 6 puits et différenciées pendant 21 jours. Les cellules étaient donc polarisées présentant un compartiment apical (assimilé à la lumière intestinale) et un compartiment basolatéral (assimilé à la circulation sanguine) afin de reproduire in vitro la barrière intestinale. Le 4-HHE était incubé dans le compartiment apical pendant 24h. Ensuite, les cellules étaient stimulées pendant 20 minutes par l'insuline en l'incubant du côté basolatéral pour respecter la physiologie du système.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 66**. L'insuline réduit de 64% l'absorption du glucose par les cellules intestinales (A). De même, une réduction de50% du glucose libéré dans le milieu basolatéral est induite par l'insuline (B), ce qui permet de valider les conditions expérimentales du système.

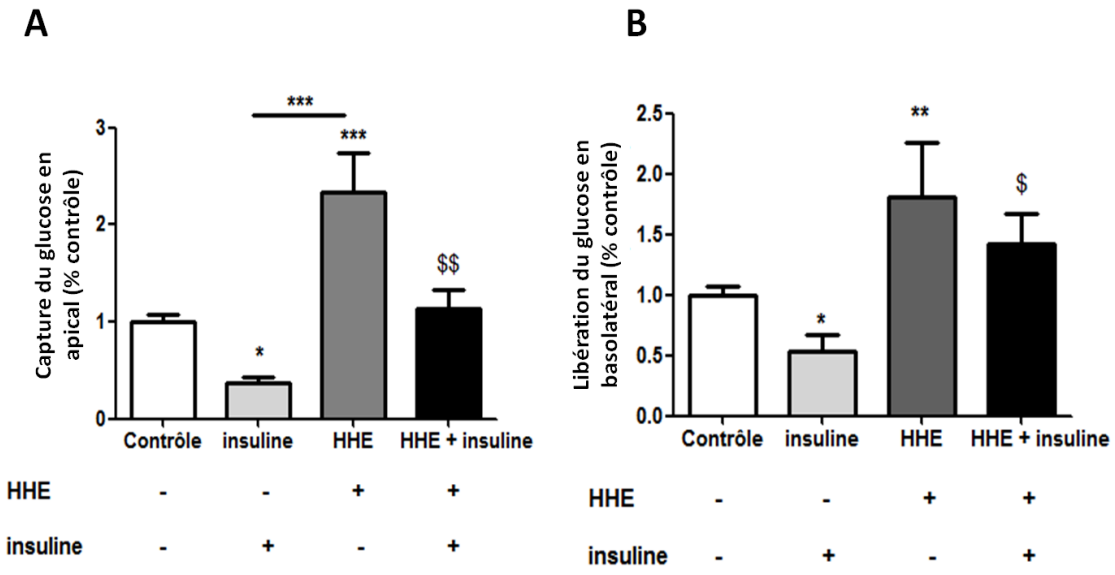


Figure 66 : Après 24h d'incubation, le 4-HHE stimule l'absorption de glucose à travers la membrane apicale des entérocytes ainsi que sa libération dans le milieu basolatéral assimilé à la circulation sanguine. Il réduit également l'effet inhibiteur de l'insuline sur le transport du glucose. Les cellules Caco-2/TC7 sont différenciées pendant 21 jours sur filtres afin de les polariser (pôle apical et basolatéral) puis elles sont incubées pendant 24h avec le 4-HHE (100µM) en apical et/ou pendant 20min avec l'insuline (60mUI/ml) dans le compartiment basolatéral. La capture du glucose est mesurée par l'incorporation de [^{3}H]-2-désoxy-glucose dans (**A**) les cellules Caco-2 et (**B**) sa libération dans le milieu basolatéral. Les valeurs représentent la moyenne ±SE obtenues à partir de 3 expériences réalisées en duplicatas (N=3, n=6). Les résultats sont exprimés en % du contrôle. *P<0,05 vs. Contrôle ; **P<0,01 vs. Contrôle ; $P<0,05 vs. HHE.

Le 4-HHE seul exerçait un effet contraire à celui de l'insuline c'est-à-dire une augmentation significative de l'absorption du glucose (2,3 fois) (**Figure 66A**) et de sa libération dans le milieu basolatéral (1,8 fois) (**Figure 66B**). En outre, après traitement des cellules avec le 4-HHE, l'insuline n'était plus capable d'exercer son effet inhibiteur sur l'absorption du glucose (augmentation de 77% vs. insuline) (A) et sa libération dans le milieu basolatéral (augmentation de 40% vs. contrôle et 85% vs. insuline) (B).

Ces données montrent donc que le 4-HHE exerce un effet délétère à plus long terme (24h d'incubation) en induisant une insulino-résistance entérocytaire qui se caractérise par l'augmentation de l'absorption du glucose et de sa libération dans la « circulation » en corrélation avec l'altération de la phosphorylation de l'Akt.

A partir de ce modèle d'insulino-résistance induite par le 4-HHE, nous avons étudié les niveaux de phosphorylation de l'axe AMPK/ACC afin de déterminer si la voie de l'AMPK est altérée dans cette situation. Les résultats révèlent que la phosphorylation de l'AMPK était significativement altérée de 70% par 100µM de 4-HHE (**Figure 67A**). De même, la phosphorylation de l'ACC, l'enzyme de synthèse des acides gras, était réduite de 50% dès 50µM de 4-HHE (**Figure 67B**) suggérant une activation de la lipogenèse.

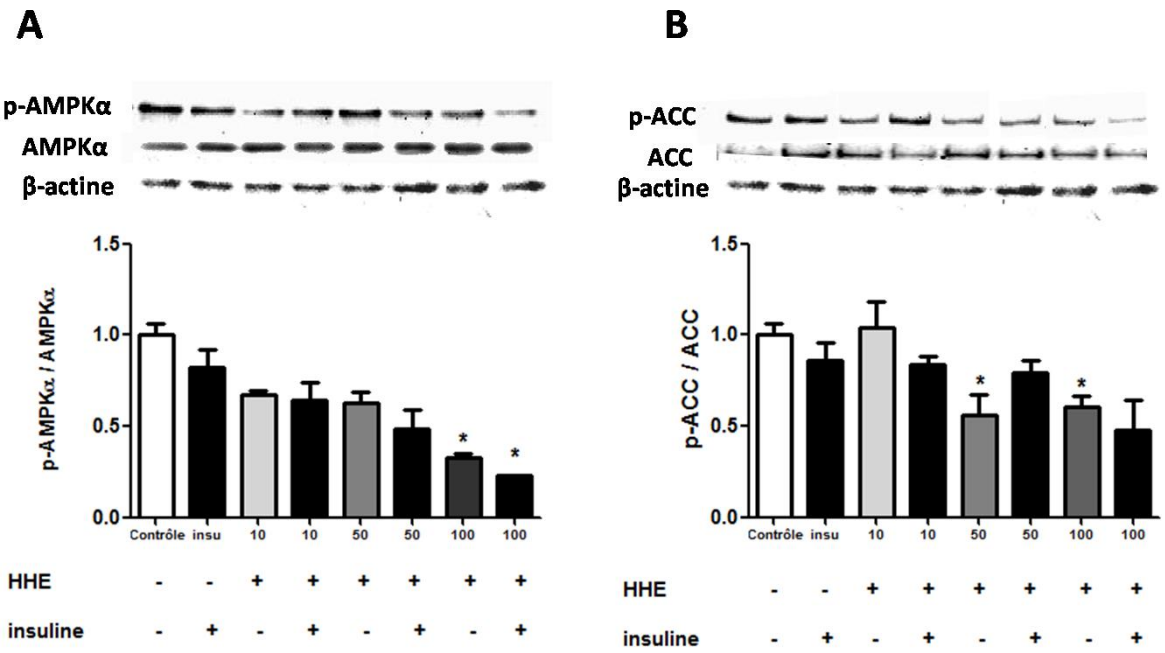


Figure 67 : A plus long terme (24 heures), le 4-HHE réduit les niveaux de phosphorylations de l'AMPK (Thr172) et de l'ACC (Ser79) de manière dose-dépendante dans les cellules entérocytaires. Les cellules Caco-2/TC7 différenciées sont incubées pendant 24h avec le 4-HHE (10-50-100µM) puis stimulées ou non avec de l'insuline (60mUI/ml) pendant 15 minutes. Niveaux de phosphorylations de (**A**) l'AMPK (Thr172) et (**B**) l'ACC (Ser79) en présence d'insuline et / ou d'une concentration croissante de 4-HHE. Les protéines totales issues de lysats cellulaires sont examinées par immunobuvardage de type Western. Les résultats obtenus sont normalisés par la quantité totale de β-actine ou de la protéine d'intérêt lors de 3 expériences distinctes (N=3). Les valeurs représentent la moyenne ±SE et sont exprimées en % du contrôle. *P<0,05 vs. Contrôle.

5.5.3 Conclusions

Les résultats de cette partie de l'étude ont permis d'élucider plusieurs points à savoir :

- ✓ le rôle du 4-HHE sur la voie de signalisation de l'insuline :

A court terme (30 minutes), le 4-HHE joue un rôle de second messager induisant un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline puisqu'il stimule l'activité de l'AMPK (Thr172 p-AMPK) et de l'Akt (Ser473 p-Akt) dans les entérocytes.
A long terme (24 heures), le 4-HHE exerce au contraire un effet néfaste puisqu'il induit une insulino-résistance entérocytaire caractérisée par une réduction de l'activité de l'Akt (Ser473 p-Akt).

- ✓ Les conséquences d'une modification de la sensibilité à l'insuline par le 4-HHE sur l'absorption entérocytaire du glucose :

A court terme (30 minutes), l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par le 4-HHE est corrélée à une réduction de l'absorption du glucose par les entérocytes.
A long terme (24 heures), l'altération de la sensibilité à l'insuline induite par le 4-HHE est corrélée à une augmentation de l'absorption intestinale du glucose et de sa sécrétion dans le milieu basolatéral. Cette conséquence confirme l'état d'insulino-résistance induite par le 4-HHE.

- ✓ L'impact d'une modification de la sensibilité à l'insuline par le 4-HHE sur l'activité de l'AMPK :

Une augmentation de la sensibilité à l'insuline est corrélée à une activation de l'AMPK (Thr172 p-AMPK) et inversement, une altération de cette sensibilité à l'insuline est reliée à une réduction de l'activité de l'AMPK.

Au final, l'induction d'une insulino-résistance intestinale par le 4-HHE se caractériserait par :

- une réduction de la phosphorylation de l'Akt (Ser473),
- une augmentation de l'absorption intestinale du glucose et de sa sécrétion dans la circulation,
- une altération de l'axe AMPK/ACC (Thr172 p-AMPK, Ser79 p-ACC) suggérant une augmentation de la synthèse des acides gras

5.1 CROSSTALK BETWEEN AMPK AND INSULIN SIGNALING PATHWAYS IS ABLE TO REDUCE GLUCOSE UPTAKE BY INTESTINAL CACO-2 CELLS BUT NOT IN HHE INDUCED INSULIN-RESISTANCE STATE

Nous avons approfondi la mécanistique expliquant comment l'altération des voies de signalisation de l'AMPK et de l'insuline aboutissait à des anomalies de l'absorption des lipides et du glucose.

RESUME : Une augmentation de la capture du glucose associée à la stimulation des voies de signalisation de l'AMPK et de l'insuline a bien été établie dans le muscle squelettique, le tissu adipeux et le foie. Cependant, l'interaction de ces deux voies dans la régulation de l'absorption intestinale du glucose a été pauvrement étudiée. Le but de cette étude était de déterminer si (a) l'activation de l'AMPK affectait la voie de signalisation de l'insuline et l'absorption du glucose ; (b) le 4-HHE, un produit de peroxydation des oméga-3, altérait les voies de signalisation de l'insuline et de l'AMPK perturbant ainsi l'absorption du glucose ainsi que la sécrétion des chylomicrons. En utilisant la lignée cellulaire intestinale Caco-2, l'activation de la voie de signalisation de l'insuline et la capture du glucose par le biais du 2-deoxy-D-[^{3}H]-glucose ont été évaluées en présence d'un activateur de l'AMPK (AICAR) et/ou d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002). Le 4-HHE a été utilisé pour induire une insulino-résistance dans les cellules Caco-2. L'augmentation de la phosphorylation de l'Akt (Ser473) par l'insuline était associée à une réduction de la capture du glucose par les cellules Caco-2 tandis que l'inhibition de la PI3K/Akt par le composé LY294002 bloquait l'effet de l'insuline sur l'absorption du glucose. De plus, l'activation de l'AMPK par l'AICAR induisait une augmentation de la phosphorylation de l'Akt résultant en une diminution de la capture du glucose par les cellules intestinales. En revanche, le 4-HHE induisait une réduction de la phosphorylation de l'Akt (Ser473), de l'AMPK (Thr172) et de l'ACC(Ser79) de manière dose-dépendante, ce qui avait pour conséquence une augmentation du transport transépithéliale du glucose ainsi qu'une augmentation de l'expression de l'ApoB48 et de la sécrétion des TG par les cellules Caco-2. Nous avons donc démontré (a) le rôle entéro-spécifique de l'insuline sur l'absorption du glucose ; (b) l'activation de l'AMPK mimait l'effet de l'insuline puisqu'elle était capable de réduire la capture du glucose par les entérocytes d'une manière PI3K-dépendante; (c) l'état d'insulino-résistance induit par le 4-

HHE dans les cellules intestinales est associé à une augmentation de l'absorption du glucose et une surproduction de chylomicrons qui pourraient exacerber les désordres métaboliques postprandiaux associés au diabète de type II.

Crosstalk between the AMPK and insulin signaling pathways is able to reduce glucose uptake by intestinal Caco-2 cells but not in HHE induced insulin-resistant state.

Harmel, Elodie[acd]; Awada, Manar[b]; Peretti, Noël[ab]; Vidal, Hubert[b]; Michalski Marie-Caroline[b]; Levy Emile[cd]; Laville, Martine[a]

a. Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre Hospitalier Lyon Sud, Faculté de Médicine, Université de Lyon-1, France.
b. INSERM U1060, CarMeN laboratory, Université Lyon 1 and INSA-Lyon, IMBL, Villeurbanne, France.
c. Research Centre, CHU Ste-Justine, Montréal, Québec, Canada
d. Department of Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada

Address correspondence to: Pr Martine Laville
CRNH Rhône-Alpes - Centre d'analyses
Centre Hospitalier Lyon Sud - CBS - Bât. 3D
165 chemin du Grand Revoyet
69310 PIERRE-BENITE
Tél. : 04 78 86 29 81
Fax : 04 78 86 66 54
E-mail: martine.laville@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

The role of AMPK and insulin in regulating glucose absorption by enterocytes has been poorly explored whereas it could participate to type 2 diabetes disorders. The aim of this study was to assess whether (i) AMPK activation affects insulin signaling pathway and glucose absorption (ii) peroxidation product 4-HHE affects AKT/AMPK/ACC pathways perturbing enterocytes glucose and lipid absorption. Using Caco-2 cells, 2-deoxy-D-[^{3}H]-glucose uptake was evaluated upon stimulation in the presence of AMPK activator (AICAR) and PI3K/Akt inhibitor (LY294002). The 4-hydroxy-2-hexenal (4-HHE) derived from omega-3 peroxidation was used to induce insulin-resistance. Increased Akt-Ser473p by insulin was associated with reduced glucose uptake by Caco-2 cells whereas PI3K/Akt inhibition by LY294002 blocked insulin effects on glucose uptake. AMPK activation by AICAR induced Akt-Ser473p resulting in a reduced glucose uptake by cells. On the other hand, 4-HHE induced a decrease in Akt-Ser473p, AMPK-Thr172p and ACC-Ser79p resulting in increased lipid and glucose transport in enterocytes. We have demonstrated (i) the entero-specific role of insulin on glucose uptake; (ii) AMPK activation was able to reduce glucose uptake in enterocytes in a PI3K-dependent manner (iii) 4-HHE-induced insulin-resistant state was associated with an increased glucose absorption and chylomicron overproduction which may exacerbate postprandial disorders in T2D.

Introduction:

Mammalian 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine (Ser/Thr) protein kinase that acts as a sensor of cellular energy homeostasis [11]. AMPK stimulates multiple metabolic pathways that increase energy production (e.g. glycolysis, fatty acid oxidation) while switches off processes that consume energy (e.g. lipogenesis and gluconeogenesis) [13]. Dysfunction of this major regulatory enzyme affects glucose and lipid metabolism as well as vital organ functions [18;27] whereas its activation by pharmacologic agents like Metformin or AICAR restores those metabolic parameters [15;37]. As such, AMPK represents a key player in regulating energy balance at both cellular and whole-body levels, placing it at the center stage in studies of obesity, diabetes and the metabolic syndrome [14]. AMPK attenuates lipogenesis in organs such as muscle and liver, through phosphorylation and inhibition of Acetyl-CoA Carboxylases (ACC) resulting in lower malonyl-CoA levels and, therefore, promoting mitochondrial β-oxidation while simultaneously suppressing fatty acid synthesis [3]. Moreover, in skeletal muscle AMPK activation induces Akt activation leading to translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane and enhanced glucose uptake by the cells [19].

The interaction between AMPK and insulin signaling pathway in the regulation of lipid and glucose metabolism is well documented in the liver, skeletal muscle and adipose tissue [26]. Nevertheless its role in regulating energy storage and depletion in enterocytes remains poorly understood. In fact, little attention has been paid to the small intestine, an organ closely associated with diabetic postprandial dyslipidemia [25;38]. Particularly, the regulatory role of insulin in intestinal glucose absorption is not clear. Some studies suggest an increase of glucose absorption upon insulin stimulation of the enterocytes [28;32] while other have indicated an opposite effect [17;23;34]. Similarly, several studies generated conflicting

results regarding the role AMPK on glucose uptake in enterocytes and its implication in insulin resistant enterocytes [2;16;35;36].

Recently, 4-hydroxyalkenals like 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 4-hydroxyhexenal (4-HHE) issued from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) peroxidation respectively, were shown to alter insulin signaling pathway inducing insulin-resistance in several cell lines including HepG2 and 3T3-L1 [24;29] due to oxidative stress generated by these high reactive molecules. Moreover, the effect of 4-HNE and 4-HHE on enterocytes and its possible effect on glucose and lipid metabolism have not been evaluated yet.

The present study assess whether (i) AMPK activation affects insulin signaling pathway and modulate intestinal glucose absorption, (ii) 4-HHE induced impaired insulin signaling pathway is associated to an alteration of AMPK activity resulting in glucose and lipid disorders.

Materials and methods :

Materials, Reagents and Antibodies. The human colon carcinoma cell line (Caco-2/TC7) was provided by Monique Rousset (INSERM, Paris, France). The 4-hydroxy-hexenal was synthetized as previously described [31]. AICAR, an AMPK activator and LY294002, a PI3K inhibitor were purchased from Cell Signaling. Rabbit anti-AKT/PKB and anti-phospho-AKT (Ser473); rabbit anti-AMPKα and anti-phospho-AMPKα (Thr172); rabbit anti-ACC and anti-phospho-ACC (Ser79) antibodies were purchased from Cell Signaling. Rabbit anti-ApoB and anti-rabbit IgG conjugated to horseradish were purchased from Abcam and Bio-Rad respectively. Super Signal West Pico Chemiluminescent substrate (ECL). Protease (Complete, Roche) and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich) were used. Radioactive ^{3}H-2-désoxy-D-glucose was purchased from Perkin Elmer.

Caco-2/TC7 Cell Culture. The human intestinal Caco-2/TC7 cell line, a clone of the parent Caco-2 cell line was utilized between passage 43 and 46. Cells were seeded on 75-cm2 flasks (Falcon, Becton Dickinson) until 80- 90% confluence. They were grown in complete DMEM medium (Gibco) supplemented with 20% FCS (Gibco), 1% nonessential amino acids (Gibco) and 1% antibiotics (penicillin/streptomycin, Gibco), and incubated in 10% CO_2 at 37°C. Cells were seeded at a density of 25×10^4 cells per well on plastic support or on microporous (0.4 μm pore size) Transwells filters (Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA), grown in complete medium and the cells were used 14 days after confluence.

Cell Treatment. Prior experiment, Caco-2 cells were starved overnight in a medium without FCS. The involvement of AMPK and PI3K in glucose uptake was studied using their respective activator AICAR (8mM) and inhibitor LY294002 (50μM). The compound

LY294002 was added for 1 hour before treatment with AICAR (3 hour) followed (or not) by 20min insulin (60mUI/ml) stimulation. To study the effect of 4-HHE on insulin sensitivity, different concentrations (10, 50 and 100μM) were used for 24 hours. Micelles were used to measure the effect of 4-HHE on triglycerides secretion in basolateral medium [21]. Briefly, in the apical compartment, monolayers were incubated with medium containing mixed lipid micelles prepared as follows: oleic acid (0.5mM), 2-oleyglycerol (0.03mM), soybean lecithin (phosphatidylcholine, 2mM), cholesterol (0.1mM), sodium taurocholate (5mM) were vortexed in serum-free complete medium and further dispersed in an ultrasonic bath for 10min at room temperature. The 4-HHE then was added to the incubation medium at 100μM (brought in DMSO 0.5%).

Western Blot for Protein Analysis. Cells were scrapped in RIPA lysis buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with protease and phosphatase inhibitors at 4°C. Insoluble materiel was removed by centrifugation (13000rpm-20min-4°C) and protein concentration in the supernatant was determined by Bradford assay. For Western Blotting, proteins were boiled in Laemmli buffer [20], separated by SDSPAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes. After saturation with 5% BSA, membranes were probed with primary antibodies. After incubation with a HRP-secondary antibody, membranes were processed for chemiluminescence and quantified by densitometry using Quantity One software from Bio-Rad.

Measurements of Glucose Uptake. After treatment, cells were incubated for 20min with 60mUI/ml insulin (added in the lower compartment of the filter) or 20μM cytochalasin B. Glucose uptake was initiated by the addition of 2-deoxy-D-[3H]-glucose (1mCi/ml) to a final concentration of 0.1μCi/ml for 10min at room temperature. Uptake was terminated by

removal of the assay buffer and keeping of basolateral medium (for further analysis), followed by three washes in ice-cold PBS. Cells were solubilized with 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 2-deoxy-D-[3H]-glucose was measured in cell fraction and basolateral medium using liquid scintillation counter (Tri-Corb, Packard). Results were normalized to protein concentration, and nonspecific uptake measured in presence of cytochalasin B was subtracted from each determination.

Measurements of Triglycerides (TG) in the basolateral medium. TG were measured by Triglyceride Quantification Kit (BioVision, CliniSciences-France) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. All values were expressed as the mean±S.E.M. The data were evaluated by ANOVA, where appropriate, and the differences between the means were assessed using the Tukey's post-hoc test. Pairwise comparisons between treatments were performed using unpaired Student's *t*-test.

Results and discussion

In peripheral tissues like skeletal muscle, it's well known that AMPK activation improves insulin sensitivity by increasing phospho-Akt (Ser473), GLUT4 translocation to the membrane and glucose uptake [15;19]. However, insulin effect on glucose uptake by enterocytes is still not clear [17;23;28;32]. In addition, the role of AMPK on insulin pathway and intestinal glucose absorption is poorly defined [2;16;35]. Using intestinal human Caco-2 cells, we showed that AMPK activation by AICAR induces AKT phosphorylation (3-fold) by a PI3K-dependent mechanism (**Fig. 1A**) since AKT phosphorylation on Ser473 was decreased in the presence of LY294002, a PI3K inhibitor, (reduced by 50% vs. control) during AICAR-induced AMPK activation suggesting that activation of Akt by AMPK acts through the same signaling pathway like insulin. This was in agreement with the recent work of Chopra et al. that have demonstrated in skeletal muscle cells using Insulin receptor (IR) immunoprecipitation that AMPK could stimulate insulin pathway (IRS, AKT) by direct phosphorylation of IR on tyrosine residues [4]. Furthermore, abrogation of insulin pathway by PI3K inhibitor induced a basal reduction of AMPK (44%) and ACC (45%) phosphorylation levels, suggesting an enhanced fatty acid synthesis (**Fig. 1B and C**). Importantly, cells treatment by LY294002 abrogates completely enhanced effect on AMPK and ACC phosphorylation by AICAR (**Fig. 1B and C**) indicating that PI3K inhibition prevents AICAR-induced AMPK activation. These results give more insight about impact of AMPK on insulin pathway in intestinal Caco-2 cells and suggesting a reciprocal interplay/crosstalk between both signaling pathways. Our results are supported by studies from Zou et al. showing that AICAR or Metformin-induced AMPK activation was abolished by LY294002 inhibiting PI3K in bovine aortic cells [39]. Nevertheless, it was shown that compound LY294002 was not completely specific of PI3K since it also inhibits mTORC1 and mTORC2 [8]. It is well

known that AMPK inhibits mTORC1 but not mTORC2 [12]. The inhibition of both mTOR complexes could have an impact on AMPK activity and results should be confirmed using PI3K-specific inhibitor [7].

Stimulation of AKT activity by insulin or by AICAR-induced AMPK activation had an impact on glucose uptake by Caco-2 cells (**Fig. 2**). Firstly, insulin was able to reduce significantly (38%) glucose absorption by enterocytes confirming previous studies [17;23;34]. Indeed, Tobin et al. have recently shown in Caco-2 cells and in healthy mice that insulin induces glucose/fructose transporter GLUT2 internalization from apical and basolateral membrane resulted in a significant reduction of transepithelial glucose absorption [34]. Moreover, we demonstrated that insulin effect on glucose absorption was PI3K-dependent since its inhibition using LY294002 showed glucose internalization levels similar to control (**Fig. 2**). The link between PI3K activation and glucose uptake reduction by Caco-2 cells confirm previous literature reports in Caco-2 cell line showing that PI3K activation by pine bark extracts reduced apical GLUT2 and glucose absorption [6]. Moreover, AMPK activation by AICAR mimics insulin in reducing glucose uptake (52%) by Caco-2 cells (**Fig. 2**). This observation is in line with the demonstrated effect on intestinal glucose absorption of anti-diabetic agents such as biguanides (Metformine, Phenformin) [16;36], polyphenols [10] and other anti-diabetic medicinal plants [22]. We also showed that this effect was PI3K-dependent since LY294002 abolished AICAR-activated AMPK effect on glucose uptake (**Fig. 2**) confirming that AMPK mimics insulin action in enterocytes (**Fig. 1**). On the other hand, several studies have demonstrated that hypoglycemic effect of anti-diabetic agents like Metformin or AICAR was likely due to increase glucose absorption and utilization by intestine from rats [2] correlated to a redistribution of glucose transporters depicting an increase of GLUT2 and a reduction of SGLT1 in apical membranes of murine jejunal enterocytes [35]. The difference with our results could be due to the gap between *in vitro* and

in vivo studies. However, the effect of AMPK activation on basolateral GLUT2 is not known. It is possible that it could reduce both activity and number of basolateral GLUT2. This would explain the observed reduced glucose transepithelial absorption by Caco-2 cells. In fact, our results clearly demonstrated by Western Blotting and 2-deoxy-D-[3H]-glucose uptake experiments that AICAR induced-AMPK activation mimics insulin effect by reducing glucose transport in enterocytes. These observations depict firstly that insulin induces an entero-specific effect by inhibiting glucose transepithelial transport, and secondly that AMPK activation could mimic insulin effect by a PI3K-dependent manner on intestinal glucose absorption. Our results suggest that impaired AMPK and insulin signaling pathways in intestine could be associated to enhanced ACC activity and lipogenesis as well as glucose absorption by enterocytes.

To validate this hypothesis, we used 4-hydroxyhexenal (4-HHE), a highly reactive alkenal derived from oxidized omega-3 PUFA [9] to determine whether it could alter insulin pathway as previously shown by in other cell types [24;29] and its impact on glucose transepithelial transport as well as chylomicron secretion by Caco-2 cells. Lactate deshydrogenase (LDH) assays demonstrated that 4-HHE at the concentrations used in our experiments did not induce cell necrosis (data not shown). As shown **Figure 3A**, 4-HHE was able to reduce AKT phosphorylation level upon insulin stimulation in a dose-dependent manner. In fact, insulin induced phospho-Akt (Ser473) by 60% in control cells whereas addition of 50μM and 100μM 4-HHE was able to reduce phospho-Akt by 40% and 50%, respectively (**Fig. 3A**) significantly altering insulin signaling. To demonstrate the deleterious effects of 4-HHE in Caco-2 cells, we first explored its impact on transepithelial glucose transport by using polarized cells on filter insert permitting access to the apical side (upper chamber) and or the basolateral side (lower compartments) of the monolayers. The compound 4-HHE (100μM) was incubated to the upper chamber for 24 hours, whereas insulin was added

to the basolateral medium and glucose uptake by Caco-2 cells was evaluated (**Fig. 3B**) as well as secretion into the basolateral medium (**Fig. 3C**). As shown **Figure 2**, insulin is able to reduce glucose uptake by 64% whereas 4-HHE increased it by 2.3-fold. Moreover, cell treatment by 4-HHE reduced significantly insulin inhibitory effect on glucose uptake since it was increased by 49% compared to control cell upon insulin stimulation (**Fig. 3B**). The same pattern was observed for glucose secretion in basolateral medium by Caco-2 cells (**Fig. 3C**); insulin decreased glucose secretion by 46% whereas 4-HHE enhanced it by 1.8-fold suggesting a hyperglycemic effect of this oxidized compound derived from omega-3 PUFA. Importantly, insulin effect was reduced after 4-HHE cell treatment since glucose secretion was enhanced by 42% vs. control and by 88% vs. insulin. Our data clearly show defective insulin signaling pathway associated with impaired transepithelial glucose transport suggesting a 4-HHE induced insulin-resistant state. These observations corroborate previous studies in diabetic rats showing increased glucose uptake at the level of the jejunum [5;33]. More recently data indicates that the mechanism for glucose uptake by insulin-resistant enterocytes could be due to GLUT2 accumulation in apical membrane because of impaired insulin signaling pathway as showned in insulin-resistant mice [34] and in jejunum biopsies from morbidly obese humans [1]. Regarding the effect of 4-HHE, 4-hydroxyalkenals were reported to induce oxidative stress and protein carbonylation [24], in particular by forming Michael adducts on AKT2 in HepG2 cells [29], a similar mechanism that could take place in Caco-2 cells.

Finally, the impact of 4-HHE-induced insulin-resistant state on AMPK/ACC pathway and chylomicron secretion was investigated (**Fig. 4**). As depicted in **Figure 4A** and **B**, 50µM and 100µM 4-HHE induced a reduction (50%) of AMPK and ACC levels suggesting an enhanced fatty acid synthesis. Moreover, 4-HHE was able to enhance Apo-B48 protein expression by 30% (**Fig. 4C**) as well as TG secretion by 40% (**Fig. 4D**). These results suggest

that 4-HHE induced insulin-resistant state is associated to chylomicron overproduction confirming as previously shown in several rodent models that insulin-resistance is associated with increased chylomicron synthesis and secretion [25;38]. Nevertheless, it is not known how 4-HHE could alter PI3K/AKT-AMPK/ACC cascades. It may reduce first PI3K/AKT pathway that could alter AMPK/ACC axis. It could also act simultaneously on both insulin and AMPK pathways. A previous study has shown fat accumulation induced by 4-hydroxynonenal (4-HNE) issued from oxidized omega-6 PUFA in nematode *C.elegans* [30] related to the formation of covalent adducts with Krebs cycle enzymes. Further studies would be needed to determine the precise mechanism of action of 4-HHE in Caco-2 cells.

In conclusion, the entero-specific role of insulin on glucose absorption regulation was highlighted. AMPK activation was able to mimic insulin effect by reducing glucose uptake in a PI3K-dependent manner. Our results show also that 4-HHE induced insulin-resistant state in intestinal cells was associated with (i) impaired AMPK and ACC activities, (ii) enhanced Apo B-48 protein expression and increased (iii) chylomicron and (iv) glucose secretion which may exacerbate postprandial hyperglycemia and hyperlipidemia suggesting that intestinal AMPK could be an important therapeutic target in Type II Diabetes.

Aknowledgments: This work was supported by the Nestle Foundation France. Parts of experiments were funded by the ANR project AGECANINOX. We thanks Dr Soulage and Marine Croze for their help.

Reference List

[1] A. Ait-Omar, M. Monteiro-Sepulveda, C. Poitou, G.M. Le, A. Cotillard, J. Gilet, K. Garbin, A. Houllier, D. Chateau, A. Lacombe, N. Veyrie, D. Hugol, J. Tordjman, C. Magnan, P. Serradas, K. Clement, A. Leturque, E. Brot-Laroche, GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. Diabetes 60 (2011) 2598-2607.

[2] C.J. Bailey, K.J. Mynett, T. Page, Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. Br.J.Pharmacol. 112 (1994) 671-675.

[3] D. Carling, P.R. Clarke, V.A. Zammit, D.G. Hardie, Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. Eur.J.Biochem. 186 (1989) 129-136.

[4] A.R. Chopra, R. Kommagani, P. Saha, J.F. Louet, C. Salazar, J. Song, J. Jeong, M. Finegold, B. Viollet, F. DeMayo, L. Chan, D.D. Moore, B.W. O'Malley, Cellular energy depletion resets whole-body energy by promoting coactivator-mediated dietary fuel absorption. Cell Metab 13 (2011) 35-43.

[5] E.S. Debnam, G. Chowrimootoo, Streptozotocin diabetes and sugar transport by rat ileal enterocytes: evidence for adaptation caused by an increased luminal nutrient load. Biochim.Biophys.Acta 1107 (1992) 86-92.

[6] O. El-Zein, S.I. Kreydiyyeh, Pine bark extract inhibits glucose transport in enterocytes via mitogen-activated kinase and phosphoinositol 3-kinase. Nutrition 27 (2011) 707-712.

[7] M.E. Feldman, K.M. Shokat, New inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR pathway: insights into mTOR signaling from a new generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs). Curr.Top.Microbiol.Immunol. 347 (2010) 241-262.

[8] S.I. Gharbi, M.J. Zvelebil, S.J. Shuttleworth, T. Hancox, N. Saghir, J.F. Timms, M.D. Waterfield, Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. Biochem.J. 404 (2007) 15-21.

[9] M. Guichardant, S. Bacot, P. Moliere, M. Lagarde, Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids 75 (2006) 179-182.

[10] K. Hanhineva, R. Torronen, I. Bondia-Pons, J. Pekkinen, M. Kolehmainen, H. Mykkanen, K. Poutanen, Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. Int.J.Mol.Sci. 11 (2010) 1365-1402.

[11] D.G. Hardie, AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 8 (2007) 774-785.

[12] D.G. Hardie, AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. Mol.Cell 30 (2008) 263-265.

[13] D.G. Hardie, AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. Int.J.Obes.(Lond) 32 Suppl 4 (2008) S7-12.

[14] B.D. Hegarty, N. Turner, G.J. Cooney, E.W. Kraegen, Insulin resistance and fuel homeostasis: the role of AMP-activated protein kinase. Acta Physiol (Oxf) 196 (2009) 129-145.

[15] M.A. Iglesias, S.M. Furler, G.J. Cooney, E.W. Kraegen, J.M. Ye, AMP-activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats in vivo. Diabetes 53 (2004) 1649-1654.

[16] T. Ikeda, K. Iwata, H. Murakami, Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. Biochem.Pharmacol. 59 (2000) 887-890.

[17] G.L. Kellett, A. Jamal, J.P. Robertson, N. Wollen, The acute regulation of glucose absorption, transport and metabolism in rat small intestine by insulin in vivo. Biochem.J. 219 (1984) 1027-1035.

[18] E.W. Kraegen, A.K. Saha, E. Preston, D. Wilks, A.J. Hoy, G.J. Cooney, N.B. Ruderman, Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. Am.J.Physiol Endocrinol.Metab 290 (2006) E471-E479.

[19] E.J. Kurth-Kraczek, M.F. Hirshman, L.J. Goodyear, W.W. Winder, 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. Diabetes 48 (1999) 1667-1671.

[20] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (1970) 680-685.

[21] F. Laugerette, J.P. Furet, C. Debard, P. Daira, E. Loizon, A. Geloen, C.O. Soulage, C. Simonet, J. Lefils-Lacourtablaise, N. Bernoud-Hubac, J. Bodennec, N. Peretti, H. Vidal, M.C. Michalski, Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice. Am.J.Physiol Endocrinol.Metab 302 (2012) E374-E386.

[22] L.A. Nistor Baldea, L.C. Martineau, A. Benhaddou-Andaloussi, J.T. Arnason, E. Levy, P.S. Haddad, Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia. J.Ethnopharmacol. 132 (2010) 473-482.

[23] A.M. Pennington, C.P. Corpe, G.L. Kellett, Rapid regulation of rat jejunal glucose transport by insulin in a luminally and vascularly perfused preparation. J.Physiol 478 (Pt 2) (1994) 187-193.

[24] N.J. Pillon, M.L. Croze, R.E. Vella, L. Soulere, M. Lagarde, C.O. Soulage, The Lipid Peroxidation By-Product 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle through Both Carbonyl and Oxidative Stress. Endocrinology2012).

[25] B. Qin, H. Dawson, R.A. Anderson, Elevation of tumor necrosis factor-alpha induces the overproduction of postprandial intestinal apolipoprotein B48-containing very low-density lipoprotein particles: evidence for related gene expression of inflammatory,

insulin and lipoprotein signaling in enterocytes. Exp.Biol.Med.(Maywood.) 235 (2010) 199-205.

[26] N.B. Ruderman, H. Park, V.K. Kaushik, D. Dean, S. Constant, M. Prentki, A.K. Saha, AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. Acta Physiol Scand. 178 (2003) 435-442.

[27] A.K. Saha, P.R. Avilucea, J.M. Ye, M.M. Assifi, E.W. Kraegen, N.B. Ruderman, Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. Biochem.Biophys.Res.Commun. 314 (2004) 580-585.

[28] M.F. Serhan, S.I. Kreydiyyeh, Insulin down-regulates the Na+/K+ ATPase in enterocytes but increases intestinal glucose absorption. Gen.Comp Endocrinol. 167 (2010) 228-233.

[29] C.T. Shearn, K.S. Fritz, P. Reigan, D.R. Petersen, Modification of Akt2 by 4-hydroxynonenal inhibits insulin-dependent Akt signaling in HepG2 cells. Biochemistry 50 (2011) 3984-3996.

[30] S.P. Singh, M. Niemczyk, L. Zimniak, P. Zimniak, Fat accumulation in Caenorhabditis elegans triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE). Aging (Albany.NY) 1 (2009) 68-80.

[31] L. Soulere, Y. Queneau, A. Doutheau, An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds. Chem.Phys.Lipids 150 (2007) 239-243.

[32] F. Stumpel, T. Kucera, A. Gardemann, K. Jungermann, Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption via hepatoenteral nerves in the rat. Gastroenterology 110 (1996) 1863-1869.

[33] A.B. Thomson, R. Rajotte, Effect of dietary modification on the uptake of glucose, fatty acids, and alcohols in diabetic rats. Am.J.Clin.Nutr. 38 (1983) 394-403.

[34] V. Tobin, G.M. Le, X. Fioramonti, E. Stolarczyk, A.G. Blazquez, C. Klein, M. Prigent, P. Serradas, M.H. Cuif, C. Magnan, A. Leturque, E. Brot-Laroche, Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. Diabetes 57 (2008) 555-562.

[35] J. Walker, H.B. Jijon, H. Diaz, P. Salehi, T. Churchill, K.L. Madsen, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK. Biochem.J. 385 (2005) 485-491.

[36] C. Wilcock, C.J. Bailey, Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. J.Pharm.Pharmacol. 43 (1991) 120-121.

[37] M. Zang, A. Zuccollo, X. Hou, D. Nagata, K. Walsh, H. Herscovitz, P. Brecher, N.B. Ruderman, R.A. Cohen, AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. J.Biol.Chem. 279 (2004) 47898-47905.

[38] M. Zoltowska, E. Ziv, E. Delvin, D. Sinnett, R. Kalman, C. Garofalo, E. Seidman, E. Levy, Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obesus: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetes 52 (2003) 2539-2545.

[39] M.H. Zou, S.S. Kirkpatrick, B.J. Davis, J.S. Nelson, W.G. Wiles, U. Schlattner, D. Neumann, M. Brownlee, M.B. Freeman, M.H. Goldman, Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. J.Biol.Chem. 279 (2004) 43940-43951.

Figures legends

Figure 1: AKT activation by AMPK is PI3K-dependant and reciprocally PI3K inhibition affects AMPK/ACC phosphorylation and abolishes AICAR's effect. Caco-2 cells were incubated with LY294002 (LY) (50µM) for 1 hour and then for 3 hours in the presence or absence of AICAR (A) (8mM). Cells without AICAR were subsequently stimulated with insulin (I) (60mUI/ml) for 15 minutes. After treatment, proteins were quantitated by SDS-PAGE and Western Blotting. Graphics depicts phosphorylation levels of AKT (Ser473) with LY+I or LY+A **(A)**, levels of AMPKα (Thr172) with LY+I or LY+A **(B)**, levels of ACC (Ser79) with LY+I or LY+A **(C)**. Values were expressed as means ± SE from three independent experiments performed in triplicate, and are reported as percent difference relative to control values. **P*<0.05 vs. Control; ***P*<0.01 vs. Control; ****P*<0.001 vs. Control.

Figure 2: Insulin and AICAR reduce glucose uptake in enterocytes Caco-2 cells by a PI3K and AMPK-dependent mechanism. Caco-2 cells were treated for 1 hour with PI3K inhibitor LY294002 (50µM) and/or with AMPK activator AICAR (8mM). Glucose uptake was measured using 2-deoxy-D-[3H]-glucose as described in Materials and Methods. Values were expressed as means ± SE from three independent experiments performed in duplicate, and are reported as percent difference relative to control values. **P*<0.05 vs. Control; ***P*<0.01 vs. Control; ****P*<0.001 vs. Control.

Figure 3: 4-HHE induces insulin resistance: a decrease of phospho-Akt upon insulin stimulation in a dose-dependent manner and an increased glucose absorption and secretion into the basolateral medium. Using Caco-2 cells plated on plastic support, AKT activation was quantitated using SDS-PAGE and Western Blotting. Polarized Caco-2 cells grown on insert filter were used for glucose absorption experiments permitting access to the apical side (upper chamber) and or the basolateral side (lower compartments) of the

monolayers. Cells were treated with 4-HHE in the apical compartment for 24 hours and then stimulated with insulin on the basolateral side (60mUI/ml, 20 minutes) (A) Phosphorylation levels of AKT (Ser473) in presence of 4-HHE (10-50-100µM) for 24 hours and/or insulin (60mUI/ml) for 15 minutes. (B) Glucose uptake and (C) glucose secretion in basolateral medium by Caco-2 cells treated with 4-HHE (100µM for 24 hours) were measured using 2-deoxy-D-[3H]-glucose as described in Materials and Methods. Values were expressed as means ± SE from four independent experiments, and are reported as percent difference relative to control values. *$P<0.05$ vs. Control; **$P<0.01$ vs. Control; ***$P<0.001$ vs. Control; $P<0.05 vs. Insulin; $$P<0.01 vs. Insulin.

Figure 4: 4-HHE alters AMPK/ACC pathway in a dose-dependent manner and enhances chylomicron synthesis and secretion as suggest by increased ApoB48 and TG secretion in basolateral medium of Caco-2 cells. To study phosphorylation levels of AMPK and ACC, cells were plated on plastic support and incubated after 14 days post-confluence with 10, 50 or 100µM 4-HHE for 24 hours followed by insulin stimulation (60mUI/ml for 15 minutes). To study ApoB48 synthesis and TG secretion, cells were incubated with micelles at the apical side and then treated with 100µM 4-HHE for 24 hours. (A) Phosphorylation levels of AMPK (Thr 172), (B) ACC (Ser79) and protein level of (C) ApoB48 were quantitated by SDS-PAGE and Western Blotting. (D) Level of TG secreted in basolateral medium was measured as described in Materiel and Methods. Values were expressed as means ± SE from four independent experiments, and are reported as percent difference relative to control values. *$P<0.05$ vs. Control; **$P<0.01$ vs. Control; ***$P<0.001$ vs. Control.

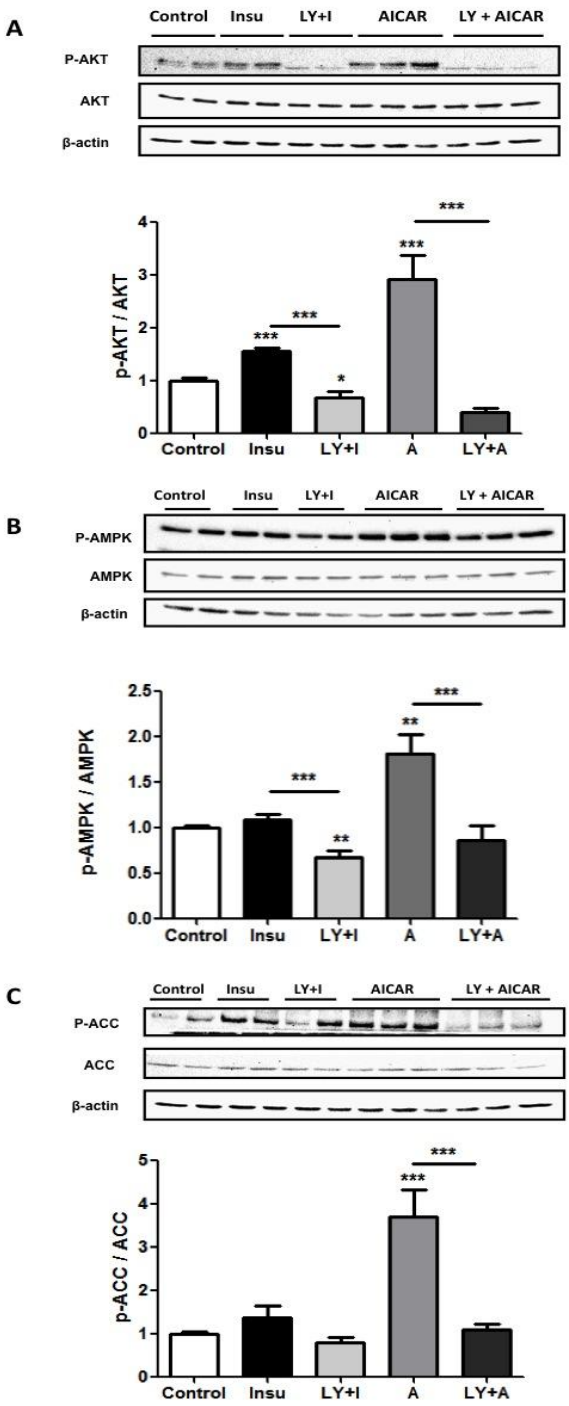

A
Control
Insu
LY+I
AICAR
LY + AICAR
P-AKT
AKT
β-actin
p-AKT / AKT
Control
Insu
LY+I
A
LY+A
B
P-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK / AMPK
C
P-ACC
ACC
β-actin
p-ACC / ACC

Figure 1

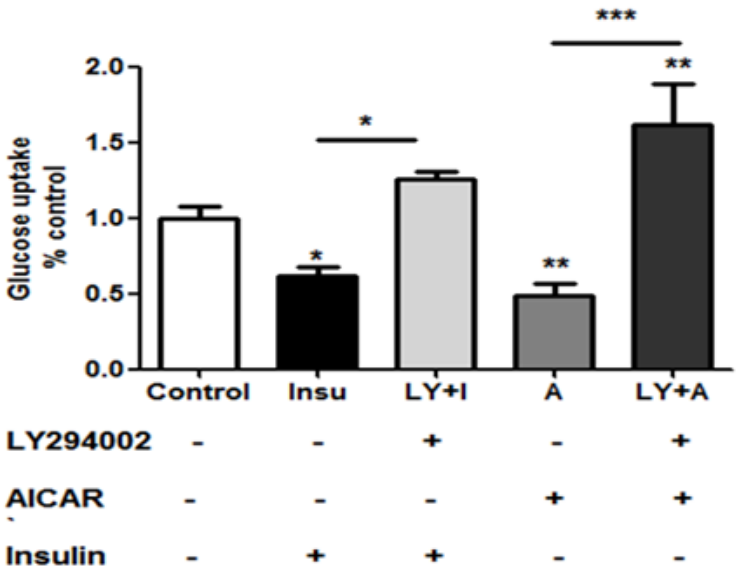

***
**
*
*
**
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Glucose uptake
% control
Control
Insu
LY+I
A
LY+A
LY294002 - - + - +
AICAR - - - + +
Insulin - + + - -

Figure 2

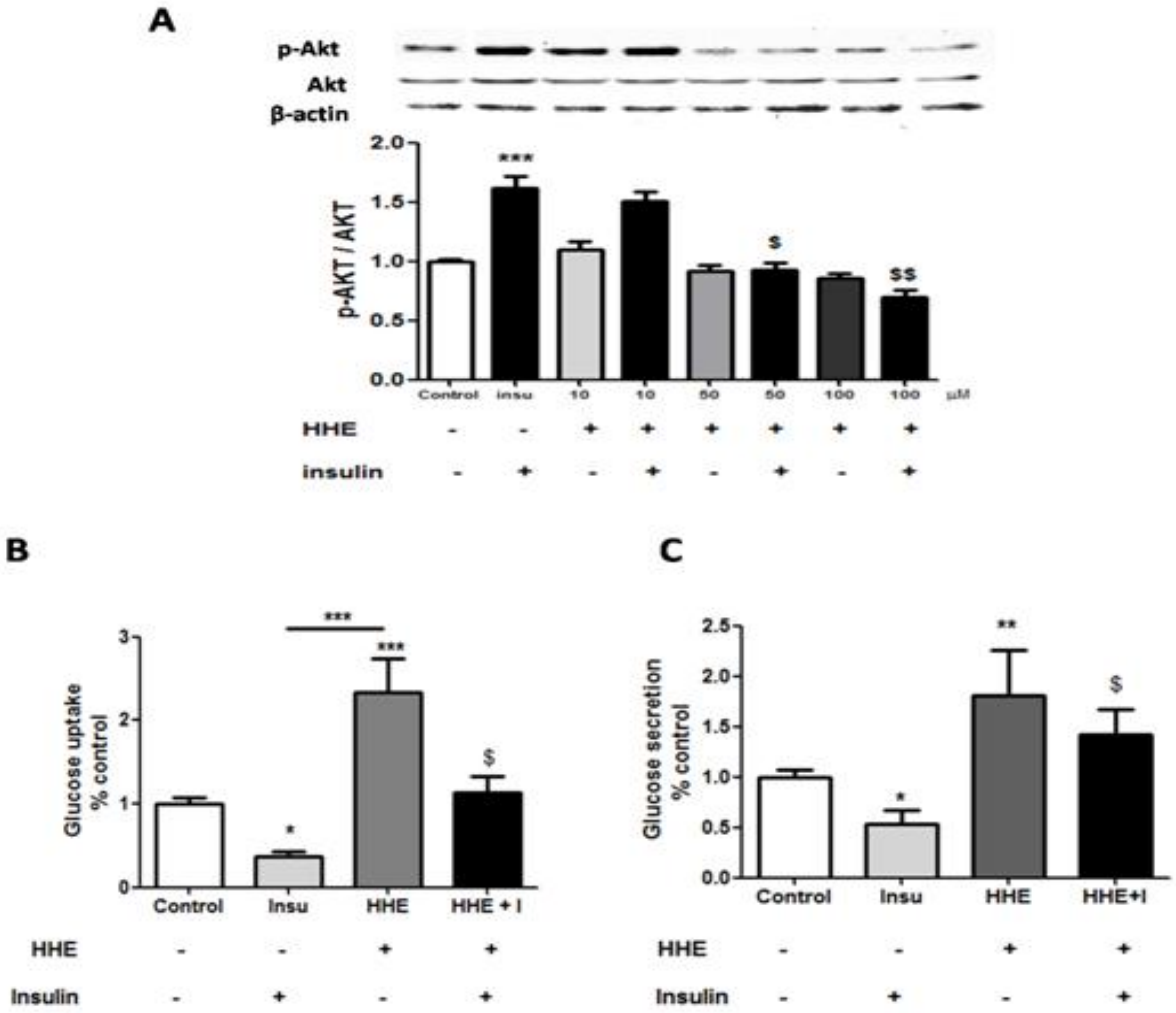

A
p-Akt
Akt
β-actin
p-AKT / AKT
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
$
$$
Control
insu
10
10
50
50
100
100
μM
HHE
insulin
B
Glucose uptake
% control
3
2
1
0
***
***
*
$
Control
Insu
HHE
HHE + I
HHE
Insulin
C
Glucose secretion
% control
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
**
*
$
Control
Insu
HHE
HHE+I
HHE
Insulin

Figure 3

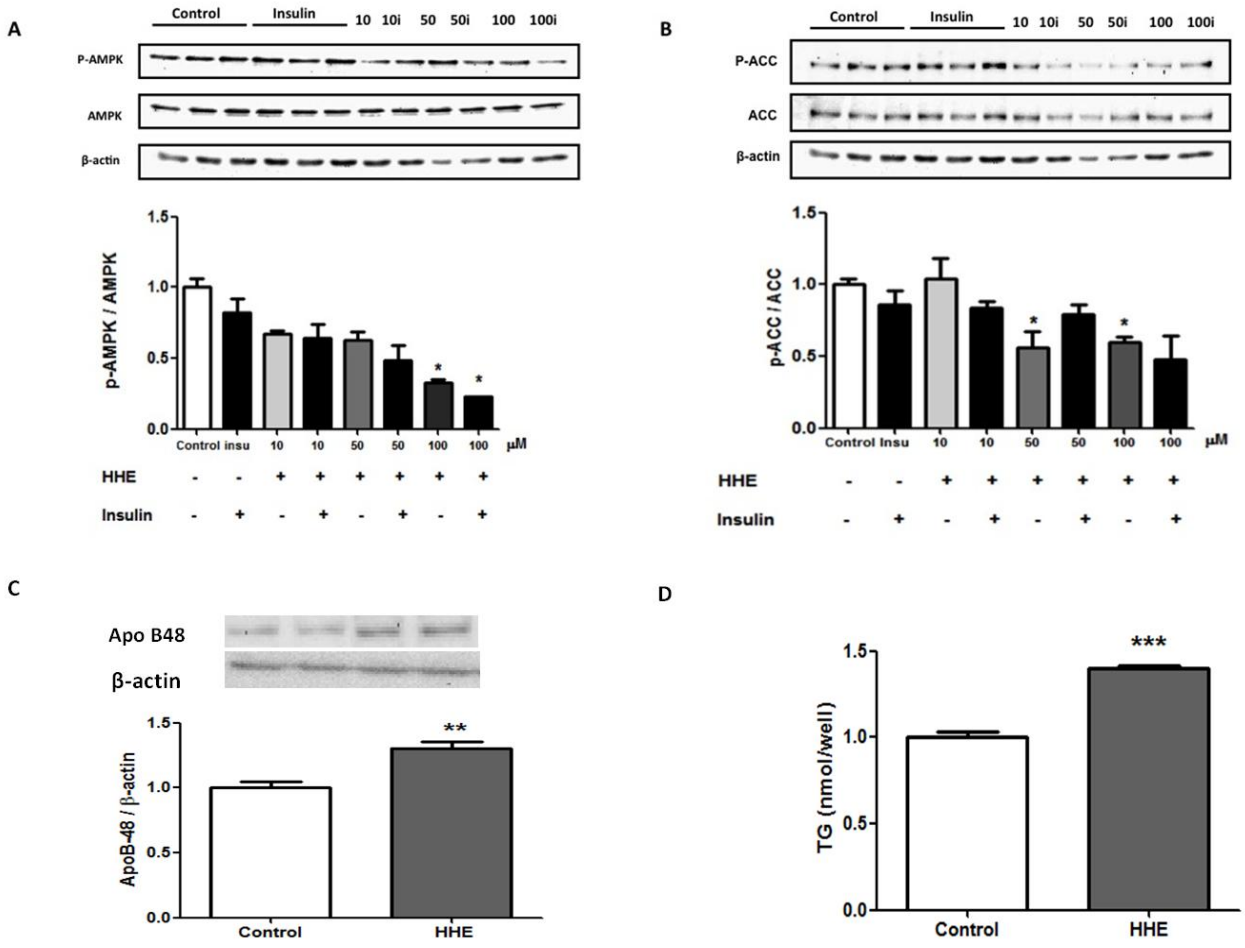

A
Control
Insulin
10 10i 50 50i 100 100i
P-AMPK
AMPK
β-actin
p-AMPK / AMPK
Control insu 10 10 50 50 100 100 μM
HHE
Insulin
B
P-ACC
ACC
β-actin
p-ACC / ACC
C
Apo B48
β-actin
ApoB-48 / β-actin
Control
HHE
D
TG (nmol/well)
***

Figure 4

CHAPITRE 6
DISCUSSION

La compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline puis de la survenue du diabète de type II (DT2) est un enjeu majeur pour l'identification de nouvelles pistes préventives et thérapeutiques. La physiopathologie du DT2 se caractérise par de sévères anomalies métaboliques telles que l'hyperglycémie et les dyslipidémies contribuant au développement des maladies cardiovasculaires (**Bornfeldt et Tabas, 2011**; **Ginsberg, 1996**). Ces perturbations associées à une résistance à l'insuline des tissus périphériques (foie, muscle squelettique et tissu adipeux) ont été largement étudiées depuis plusieurs décennies (**Bikman et al., 2010**; **Heilbronn et Campbell, 2008**; **Ouadda et al., 2009**).

Depuis quelques années, de nombreux laboratoires ont montré que l'intestin pouvait développer l'insulino-résistance au même titre que le foie, le muscle et le tissu adipeux, et contribuer aux dyslipidémies diabétiques en augmentant la production de lipoprotéines riches en TG tels que les chylomicrons (**Federico et al., 2006**; **Qin et al., 2010**; **Zoltowska et al., 2003**). Par ailleurs, le rôle majeur de cet organe est d'absorber les nutriments. En situation d'insulino-résistance, un dérèglement de la machinerie intracellulaire des entérocytes favorise une augmentation de l'absorption intestinale des lipides et des glucides (**Ait-Omar et al., 2011**; **Thomson et al., 1987**; **Thomson et al., 1993**; **Tobin et al., 2008**). Cependant, les mécanismes de régulation de ce processus sont moins bien compris au niveau entérocytaire.

Dans cette optique, nos travaux consistaient à identifier les mécanismes moléculaires entérocytaires qui pourraient être impliqués dans le développement de l'hyperglycémie et des dyslipidémies associées au diabète de type II.

Nous avons ciblé nos recherches sur l'AMPK, une protéine kinase dépendante de l'AMP jouant un rôle majeur dans la régulation du métabolisme énergétique. Pour la première fois en 2001, Zhou et al. ont montré que les effets bénéfiques de la Metformine sur la glycémie et la lipémie étaient AMPK-dépendants (**Zhou et al., 2001**). C'est à partir de cette

découverte que les recherches sur la signalisation de l'AMPK se sont multipliées. Sa composition trimérique (αβγ) hétérogène et les rôles tissus-spécifiques de cette protéine apportent un certain degré de complexité dans la compréhension des mécanismes cellulaires. En effet, en situation d'insulino-résistance ou de diabète de type II, il a été montré que l'AMPK pouvait être inhibée dans le muscle squelettique alors qu'elle était activée dans le foie (**Bonnard et al., 2008**; **Ouadda et al., 2009**). Des études approfondies sur le rôle de l'AMPK tissu-spécifique en situation d'insulino-résistance sont donc requises afin mieux cerner les avenues thérapeutiques.

Pour ce faire, nous nous sommes consacrés à caractériser pour la première fois l'AMPK dans l'intestin, à savoir sa structure en relation avec ses rôles entéro-spécifiques dans la régulation de la lipogenèse et de l'absorption du glucose. En effet, les études montrent que la structure du complexe hétérotrimérique de l'AMPK est tissu-spécifique (**Cheung et al., 2000**; **Wojtaszewski et al., 2000**). De plus, au sein même d'un tissu, plusieurs complexes hétérotrimériques sont présents et sont associés à des rôles distincts (**Wojtaszewski et al., 2000**). Pour ces raisons, il était fondamental de déterminer la structure et la régulation de l'AMPK dans les entérocytes pour ensuite explorer ses rôles entéro-spécifiques dans des conditions normales et d'insulino-résistance.

Outre le modèle animal *Psammomys obesus* de diabète de type II utilisé pour débuter l'étude sur l'AMPK intestinale, nous avons établi un projet de collaboration dans lequel l'utilisation du 4-hydroxy-héxénal (4-HHE) issu de la peroxydation lipidique des omégas-3 devait permettre d'induire une insulino-résistance dans les cellules intestinales Caco-2. Nous avons émis l'hypothèse que l'AMPK pouvait être altérée en situation d'insulino-résistance, contribuant ainsi à des aberrations métaboliques telles que l'activation de la lipogenèse associée à une surproduction de chylomicrons et à une augmentation de l'absorption intestinale du glucose.

Les résultats de cette étude ont eu pour but d'éclaircir le rôle de l'AMPK intestinale avec l'idée qu'elle pourrait être une cible thérapeutique du diabète de type II

.

6.1 STRUCTURE ET REGULATION DE L'AMPK

Ce travail de thèse consistait à caractériser pour la première fois l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2. Ces cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain représentent un excellent modèle intestinal puisqu'elles ont la particularité de former des jonctions serrées, de se différencier et d'acquérir toutes les propriétés physiologiques de l'intestin grêle (**Fogh et al., 1977**; **Jumarie et Malo, 1991**; **Levy et al., 1995**).

L'AMPK est une protéine kinase ubiquitaire mais dont la structure du complexe hétérotrimérique αβγ varie d'un tissu à un autre lui conférant des rôles bien spécifiques. En effet, il existe 7 isoformes α1, α2, β1, β2, γ1, γ2 et γ3 donnant lieu à la formation de 12 complexes αβγ possibles (**Hardie et Carling, 1997**). Il a été montré que le muscle squelettique humain comportait 3 complexes hétérotrimériques α2β2γ1>>α2β2γ3≥α1β2γ1 (**Wojtaszewski et al., 2000**). Alors que l'exercice physique intense mais de courte durée qui sollicite les fibres musculaires rouges à contraction rapide (type II) permet d'activer le complexe α2β2γ3, l'exercice d'intensité modérée qui sollicite les fibres musculaires blanches à contraction lentes (type I) induit l'activation du complexe α2β2γ1 (**Wojtaszewski et al., 2000**). L'activation du complexe α2β2γ3 était corrélée à une inhibition de l'ACC2, c'est-à-dire une augmentation de l'oxydation des acides gras (**Treebak et al., 2007**).

Dans cette optique, nous avons déterminé les complexes hétérotrimériques majoritaires dans les cellules intestinales pour pouvoir explorer par la suite les rôles tissus ou complexes-spécifiques de l'AMPK. La distribution des expressions géniques et protéiques des 7 isoformes dans les cellules Caco-2 différenciées (21 jours) confirmait leur présence au niveau des cellules entérocytaires Caco-2(**Figure 35** et **Figure 36**). Des immunoprécipitations des sous-unités α1 et α2 ont permis de détecter par immunobuvardage leur affinité pour les sous-unités régulatrices β et γ. Cette technique a rendu possible l'identification de deux complexes hétérotrimériques majoritaires de l'AMPK, soit α1β2γ1>>α2β1γ3 (**Figure 39**). Cette hétérogénéité de structure reflète probablement une fonction distincte pour chacun des deux complexes. Par ailleurs, dans les cellules non différenciées (3 à 6 jours), le profil d'expression protéique était différent marqué par une abondance pour α1, β1 et γ3 (**Figure 36**). Ces résultats suggèrent que la composition des complexes αβγ de l'AMPK est différente entre les cellules intestinales de la crypte (non différenciées) et celles des villosités

(différenciées). Une récente étude confirme nos résultats quant à la prépondérance de la sous-unité catalytique α1 dans du tissu intestinal humain (**Quentin et al., 2011**).

6.2 RÔLE DE L'AMPK DANS LA LIPOGENÈSE

Approches pharmacologiques et physiologiques

Des approches pharmacologiques et physiologiques ont été employées pour étudier le rôle ainsi que la régulation de l'AMPK dans les cellules Caco-2. En utilisant différents activateurs (AICAR, Metformine, déplétion en glucose : ↗ AMP : ATP) et inhibiteurs (Composé C et excès de glucose : ↘ AMP : ATP) de l'AMPK, nous avons pu montrer que l'activité via le niveau de phosphorylation de cette protéine était finement régulée, elle-même régulant l'enzyme de synthèse des acides gras, l'ACC. En revanche, contrairement au foie (**Carling et al., 1989**), l'enzyme de synthèse du cholestérol, l'HMG-CoA Réductase, semblait échapper au contrôle de l'AMPK (**Figure 41** à **Figure 46**). Pourtant, l'intestin est connu pour être un site important de synthèse du cholestérol et certains auteurs le placeraient au même titre que le foie (**Shefer et al., 1972**; **Spady et Dietschy, 1983**). La structure anatomique et physiologique du tube digestif est complexe, notamment par la différence morphologique et fonctionnelle des cellules tout au long de l'intestin mais aussi au niveau de l'axe crypte-villosité. Il est donc possible que la synthèse du cholestérol dans ces différentes régions de l'intestin varie également leur conférant des rôles distincts. En effet, c'est surtout au niveau des cellules de la crypte que la synthèse du cholestérol est active, probablement pour assurer la synthèse membranaire des cellules immatures en continuelle prolifération (**Dietschy et Gamel, 1971**; **Stange et al., 1981**). Or, nous avons montré que le profil des isoformes de l'AMPK était différent dans les cellules non différentiées (**Figure 35** et **Figure 36**). Il se pourrait donc que la synthèse du cholestérol soit régulée par un autre complexe de l'AMPK seulement présent dans les cellules cryptiques. Il est à noter que l'absorption du cholestérol provenant entre autre de la diète s'effectue majoritairement par les cellules des villosités (**Sylven et Nordstrom, 1970**), ce qui pourrait expliquer pourquoi l'activité de l'HMG-CoA réductase serait moins importante. Field et al. ont effectivement montré d'une part que la localisation subcellulaire de l'HMG-CoA Réductase était différente entre l'intestin et le foie, d'autre part que le contrôle kinase-phosphatase était beaucoup plus faible dans l'intestin (**Field et al., 1982**). Il est à noter toutefois que dans notre étude, seul un excès de glucose

(25mM) induisait une activation de l'HMG-CoA Réductase dans les cellules Caco-2 différenciées. Ceci suggère que l'enzyme de synthèse du cholestérol ne serait pas régulée par l'AMPK mais elle pourrait l'être par le pool de glucose entrant dans les cellules villositaires. En effet, il est connu qu'un excès de glucose puisse stimuler la lipogenèse en activant le facteur de transcription ChREBP (Carbohydrate Response Element Binding Protein) dans différents tissus (**Uyeda et al., 2002**). Plus particulièrement dans l'intestin, Mitro et al. ont montré que le glucose pouvait activer le facteur de transcription LXR impliqué dans l'efflux du cholestérol (**Mitro et al., 2007**). Cette action pourrait être corrélée à une activation de la synthèse du cholestérol pour maintenir l'homéostasie du cholestérol.

Bien que les résultats de régulation de l'AMPK, de l'ACC et de l'HMG-CoA Réductase soient reproductibles avec les différentes approches utilisées, leurs interprétations doivent être effectuées avec précaution puisque les composés pharmacologiques ne sont pas complètement spécifiques à l'AMPK. En effet, l'AICAR produit un analogue de l'AMP, le ZMP qui permet l'activation allostérique de l'AMPK mais il activerait également d'autres kinases telles que la glycogène phosphorylase et la fructose 1,6 bi-phosphatase (**Longnus et al., 2003**; **Vincent et al., 1991**). Quant à la Metformine, elle agirait en inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui éleverait le ratio AMP : ATP (**Owen et al., 2000**). Elle semble également activer l'AMPK en stimulant la protéine kinase PKCζ qui elle-même phosphorylerait et activerait LKB1 (**Xie et al., 2008**). Dans cette situation, LKB1 est capable de phosphoryler 13 autres kinases (**Lizcano et al., 2004**). Pour ces raisons, un activateur complètement spécifique de l'AMPK, l'A-769662, le plus connu à l'heure actuelle, a été utilisé (**Cool et al., 2006**). Son mécanisme d'action implique le domaine de liaison au glycogène de la sous-unité β1 ainsi que des résidus présents sur la sous-unité γ mais n'impliquant pas le domaine de fixation de l'AMP (**Goransson et al., 2007**; **Scott et al., 2008**). Bien qu'il active sélectivement les complexes hétérotrimériques contenant la sous-unité régulatrice β1, cet activateur permettait de confirmer la prépondérance de la sous-unité β2 dans les cellules entérocytaires. En effet, l'A-769662 n'était pas capable d'induire l'activation de l'AMPK contrairement aux autres activateurs utilisés (**Figure 45**), probablement parce que la quantité de complexes contenant l'isoforme β1 dans les cellules Caco-2 était trop faible par rapport à ceux contenant β2.

Approche d'invalidation génique

L'établissement d'un modèle d'invalidation de la sous-unité catalytique α1 de l'AMPK dans les cellules Caco-2 devait permettre :

- de confirmer le rôle de l'AMPK dans la régulation des enzymes de la lipogenèse comme suggéré par l'approche pharmacologique.
- de déterminer quelle sous-unité catalytique est impliquée dans la synthèse des acides gras. En effet, les activateurs pharmacologiques n'activent pas un complexe spécifique mais tous les complexes présents dans un type cellulaire.

En invalidant la sous-unité principale α1 (>80%) de l'AMPK présente dans les cellules Caco-2, nous avons observé une abolition quasiment complète de la phosphorylation de l'AMPK (>90%) (**Figure 49A et B**). Cette observation confirme la prépondérance de l'isoforme α1 par rapport à α2. D'autre part, la déficience de cette sous-unité α1 induisait une nette réduction (50%) de la phosphorylation de l'ACC, mais aucun effet sur celle de l'HMG-CoA Réductase (**Figure 49C et D**). Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment par l'approche pharmacologique : l'enzyme de synthèse du cholestérol (HMG-CoA-R) n'est pas régulée par l'AMPK dans les cellules intestinales Caco-2 contrairement à l'ACC, l'enzyme de synthèse des acides gras. Ainsi, la régulation de la synthèse intestinale du cholestérol est différente de celle du foie comme le suggéraient les travaux de Field & Dietschy (**Dietschy et Gamel, 1971**; **Dietschy et Wilson, 1968**; **Field et al., 1982**). Néanmoins, ces résultats montrent l'implication de la sous-unité α1 dans la synthèse des acides gras. D'autres études suggèrent également un rôle de cette sous-unité dans la régulation de la lipogenèse hépatique (**Michell et al., 1996**) ou de la lipolyse du tissu adipeux (**Daval et al., 2005**) quoique la sous-unité α2 du cœur (**Dyck et al., 1999**) et du muscle squelettique (**Treebak et al., 2007**) joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'ACC. Effectivement, la sous-unité α2 semble également détenir un rôle important dans la régulation de l'ACC puisque l'invalidation de l'isoforme α1 (>80%) n'abolissait pas complètement la phosphorylation de l'ACC (50%) (**Figure 49C)**. Par ailleurs, l'activation de l'AMPK par l'AICAR permettait encore de stimuler la phosphorylation de l'ACC dans les cellules déficientes en AMPKα1 (**Figure 49D)**. Cela pourrait être dû à une compensation de la perte de l'isoforme α1 par α2 comme le suggère Jorgensen et al. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de la sous-

unité α1 suite à l'invalidation de α2 dans le muscle squelettique (**Jorgensen et al., 2007**). De plus, bien que l'isoforme α1 soit prédominante dans le tissu adipeux, l'invalidation de la sous-unité α2 induit l'augmentation du poids corporel et de la masse grasse (**Villena et al., 2004**). Cette étude suggère que même si ce n'est pas le rôle principal de la sous-unité α2, elle pourrait prendre le relai dans la régulation de la synthèse des acides gras.

6.3 ROLE DE L'AMPK DANS LA SENSIBILITE A L'INSULINE

L'activation de l'AMPK dans les tissus insulino-sensibles améliore l'homéostasie glucidique. Dans le foie, son activation permet de réduire la néoglucogenèse et par conséquent la production hépatique de glucose (**Zhou et al., 2001**). Dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, l'activation de cette protéine kinase induit une augmentation de l'internalisation du glucose en favorisant la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique (**Iglesias et al., 2004**; **Jelenik et al., 2010**; **Jorgensen et al., 2004**; **Kurth-Kraczek et al., 1999**). Ces différentes actions tissus-spécifiques contribuent à réduire la glycémie. L'AMPK exerce donc un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique.

L'exploration des mécanismes moléculaires a permis d'identifier les cibles de l'AMPK au niveau de la voie de signalisation de l'insuline dans ces tissus (**Figure 51**). L'amélioration de la sensibilité à l'insuline se caractérise par une augmentation de la phosphorylation des résidus Ser473 et Thr308 de l'Akt par l'AMPK et par une inhibition de l'activité de mTORC1, ce qui lève le rétrocontrôle négatif sur la voie IRS/PI3K/Akt exercé par mTORC1/S6K1 (**Hardie, 2008**; **Schultze et al., 2012**). Ces actions sur la voie de signalisation de l'insuline du muscle squelettique ont pour conséquence une stimulation de la capture du glucose circulant par le biais de la translocation du GLUT4 à la membrane plasmique (**Jorgensen et al., 2004**; **Kurth-Kraczek et al., 1999**). Par conséquent, l'activation de l'AMPK dans les tissus périphériques insulino-résistants (muscle squelettique ou tissu adipeux) est une cible thérapeutique intéressante pour traiter l'hyperglycémie.

Etant donné le rôle tissu-spécifique de l'AMPK, nous avons exploré son action sur la sensibilité à l'insuline dans les entérocytes à partir de la lignée cellulaire Caco-2. Bien que la possibilité que l'intestin puisse être un organe insulino-sensible soit encore peu étudiée, la pertinence de cette étude se basent sur plusieurs arguments : (i) les entérocytes comportent des récepteurs à l'insuline au niveau de leur membrane basolatérale (**Fernandez-Moreno et al., 1987**; **Forgue-Lafitte et al., 1980**), (ii) en situation d'insulino-résistance et/ou de diabète de type II, il est bien admis que l'intestin contribue aux dyslipidémies diabétiques par la surproduction de chylomicrons (**Federico et al., 2006**; **Zoltowska et al., 2003**), (iii) quelques études montrent une altération de la voie de signalisation de l'insuline dans l'intestin de

modèles animaux d'insulino-résistance (**Federico et al., 2006**; **Qin et al., 2007**). Toutefois, la signalisation entérocytaire de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose reste très peu documentée et est sujet à controverses.

Dans notre étude, une courbe de concentration de l'insuline sur l'activation de l'Akt (phospho-Akt Ser473) montrait que les cellules Caco-2 étaient sensibles à l'action de l'insuline à partir de 30mUI/ml (**Figure 52**). De plus, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR ou par la Metformine stimule la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes puisqu'elle induisait l'activation de l'Akt à l'instar des autres tissus insulino-sensibles tels que le foie, le tissu-adipeux et le muscle squelettique (**Figure 53**). Réciproquement l'activation de l'Akt par l'insuline ne modifiait pas le niveau de phosphorylation de l'AMPK ni de l'ACC (**Figure 54**). L'action de l'insuline sur l'AMPK est probablement tissu-spécifique puisque dans le foie, elle semble activer l'AMPK (**Zhang et al., 2010**) alors qu'elle l'inhiberait dans le pancréas et le cœur (**Horman et al., 2006**; **Kovacic et al., 2003**). Dans le tissu adipeux et le muscle squelettique, l'insuline n'exercerait pas d'effet sur l'AMPK (**Kahn et al., 2005**). Bien que cette hormone anabolique soit connue pour stimuler la lipogenèse, elle ne déphosphoryle et n'active pas l'ACC dans les cellules Caco-2. Il a été pourtant montré dans les cellules adipocytaires 3T3-L1 que l'activation de l'Akt était corrélée à une déphosphorylation des résidus Ser79 de l'ACC (**Berggreen et al., 2009**). Il se pourrait que dans les entérocytes, l'insuline active des facteurs de transcription comme SREBP et PPARγ qui régulent l'expression des gènes lipogéniques tels que l'ACC, la FAS et la SCD permettant la synthèse des acides gras. Toutefois, le temps d'incubation de l'insuline était de seulement 15 minutes ne permettant probablement pas l'activation de ces enzymes lipogéniques par les facteurs de transcription.

D'autre part, l'addition simultanée d'AICAR et d'insuline ne potentialisait pas la phosphorylation de l'Akt suggérant que l'effet de l'AMPK emprunterait la même voie de phosphorylation et d'activation de l'Akt par l'insuline, c'est-à-dire la voie IRS/PI3K/Akt (**Figure 53**). Toutefois, des études réalisées à partir d'autres tissus (cœur, muscle de rat) ou d'autres types cellulaires (HepG2) indiquent le contraire, à savoir un effet synergique de l'insuline et de l'activation de l'AMPK sur la stimulation de l'Akt (**Longnus et al., 2005**; **Saha et al., 2010**; **Tzatsos et Kandror, 2006**) alors que d'autres auteurs confirment nos

résultats (**Chen et al., 2010**; **Chopra et al., 2012**). Cette divergence pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des activateurs et de leur concentration utilisés (AICAR, Metformine, Berberine etc.).

Quel est le mécanisme d'action sous-jacent ?

Pour comprendre le mécanisme d'action de l'AMPK sur la voie de signalisation de l'insuline dans les entérocytes, un inhibiteur de la PI3K (LY294002) a été utilisé. Nous avons montré que l'inhibition de la PI3K ne permet plus à l'AMPK de phosphoryler et d'activer l'Akt, ce qui signifie qu'elle agit en amont de la PI3K ou sur la PI3K elle-même (**Figure 57 A**). Le fait que la phosphorylation de l'AMPK par l'AICAR ne potentialise pas la stimulation de l'Akt par l'insuline suggère également que l'AMPK emprunte la même voie que l'insuline. Il se pourrait que l'AMPK puisse induire une activation allostérique d'une kinase phosphorylant ensuite le récepteur de l'insuline et ce, indépendamment de l'insuline. Une toute récente étude sur le muscle de rongeur corrobore nos résultats puisque l'activation de l'AMPK augmente la phosphorylation du récepteur de l'insuline (IR) sur des résidus sérine catalysant l'autophosphorylation des sous-unités β sur des résidus tyrosine ; cette action aboutit à la phosphorylation de l'IRS1 sur des résidus tyrosine, ainsi que celle de l'Akt (Thr308 et Ser473) (**Chopra et al., 2012**). En outre, la purification du récepteur à l'insuline (IR) par immunoprécipitation en présence d'AMPK active induisait sa phosphorylation et celle de son substrat (IRS1) sur des résidus tyrosine (**Chopra et al., 2012**). Ces données suggèrent que le récepteur à l'insuline pourrait être une cible directe de l'AMPK

De plus, nos résultats montrent une réciprocité entre la voie de l'AMPK et celle de l'insuline puisque l'AMPK activait l'Akt tandis que l'inhibition de la PI3K altérait l'activité de l'AMPK et abolissait complètement la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC par l'AICAR (**Figure 57 B et C**). Par contre, l'activation de l'Akt par l'insuline ne stimulait pas la phosphorylation de l'AMPK comme le laissait présager l'altération de la voie AMPK/ACC par l'inhibition de la PI3K. Cet effet a été également observé dans les cellules aortiques bovines (**Zou et al., 2004**).

Par ailleurs, l'activation via la phosphorylation de l'AMPK dans les cellules Caco-2 par l'AICAR et la Metformine permettait d'inhiber mTORC1 (ser2448) tout en maintenant l'activation via la phosphorylation de l'Akt (Ser473). Inversement, l'inhibition de l'AMPK

par le composé C stimulait mTORC1 (**Figure 55**). Ceci a également été montré dans d'autres tissus excepté l'intestin (**Chopra et al., 2012**; **Schultze et al., 2012**). Or, il est connu que mTORC1 et sa cible S6K exercent un rétrocontrôle négatif sur l'IRS (**Zhang et al., 2008**). L'activation via la phosphorylation de l'AMPK empêcherait donc potentiellement l'action inhibitrice de mTORC1 sur l'IRS. Il a également été montré que l'AMPK pouvait stimuler mTORC2 afin de maintenir la phosphorylation de l'Akt (Ser473) (**Chopra et al., 2012**). Ainsi l'AMPK intestinale stimulerait la voie IR/IRS/PI3K/Akt grâce à son action en amont de la PI3K, probablement sur l'IR comme il a été montré dans le muscle squelettique (**Chopra et al., 2012**) mais aussi en inhibant mTORC1.

Impact sur l'absorption entérocytaire du glucose

Dans les tissus insulino-sensibles tels que le muscle squelettique ou le tissu adipeux, il a été démontré que l'AMPK stimule l'internalisation du glucose par un mécanisme AKT/AS160-dépendant induisant la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique (**Kurth-Kraczek et al., 1999**; **Treebak et al., 2006**). Cette action permet de réduire la glycémie et reflète l'effet hypoglycémiant de l'AMPK qui s'ajoute à celui de l'insuline. En revanche, au niveau entérocytaire, non seulement l'effet de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose demeure obscur mais aussi celui de l'AMPK n'est pas clair. Dans les cellules Caco-2, nos résultats montrent que l'insuline réduit significativement l'absorption du glucose par un mécanisme PI3K-dépendant (**Figure 58**). En effet, l'inhibition de la PI3K ne permettait plus à l'insuline de réduire l'internalisation du glucose. Bien qu'il existe des controverses (**Serhan et Kreydiyyeh, 2010**; **Stumpel et al., 1996**), ces résultats confirment les travaux récents de Tobin & Brot-Laroche et de Kellett qui ont montré d'une part, que l'absorption du glucose au niveau de la membrane apicale des entérocytes ne s'effectuait pas seulement par le transporteur SGLT-1 mais principalement par GLUT2 qui s'insère transitoirement dans la membrane apicale sous l'effet de la PKCβII et du récepteur du goût T1R (**Dockray, 2003**; **Helliwell et al., 2003**; **Kellett et Helliwell, 2000**), et d'autre part, que l'insuline permettait d'internaliser le GLUT2 loin des membranes apicales et basolatérales afin de réduire l'absorption du glucose en phase post-prandiale (**Kellett et al., 1984**; **Pennington et al., 1994**; **Tobin et al., 2008**). Plus précisément, Tobin et al. ont démontré cet effet de l'insuline sur le transporteur GLUT2 *in vitro* en utilisant le même

modèle cellulaire que notre étude, c'est-à-dire les cellules Caco-2/TC7 (**Tobin et al., 2008**). D'autre part, El-Zein et al. confirment nos résultats quant à l'implication de la PI3K dans l'absorption du glucose par les cellules Caco-2. L'inhibition de la PI3K par la Wortmannine augmentait l'absorption du glucose par les entérocytes (**El-Zein et Kreydiyyeh, 2011**). Ainsi, nos observations appuient les travaux de Tobin et El-Zein. Elles démontrent clairement l'effet entéro-spécifique de l'insuline qui permettrait de réduire les excursions glycémiques post-prandiales.

Par ailleurs, l'activation de l'AMPK par l'AICAR mimait l'effet de l'insuline puisqu'elle induisait également une réduction de l'absorption du glucose par un mécanisme PI3K-dépendant (**Figure 58**). En effet, l'AMPK sous forme activée était capable de stimuler la voie PI3K/Akt alors que l'inhibition de la PI3K ne lui permettait plus de réduire l'absorption du glucose par les entérocytes. Ainsi l'activation de l'AMPK mime l'effet de l'insuline sur l'absorption du glucose par un mécanisme PI3K/Akt-dépendant. En ce sens, elle exerce un effet insulino-sensibilisateur. Toutefois, des controverses subsistent puisque certaines études ont montré une réduction de l'absorption intestinale du glucose par les biguanides (Metformine, Phenformine) (**Bolufer et Lasheras, 1975**; **Ikeda et al., 2000**; **Wilcock et Bailey, 1991**) alors que d'autres indiquent une augmentation de l'absorption du glucose et de son utilisation par l'intestin (**Bailey et al., 1994**; **Walker et al., 2005**). En outre, deux études ont montré que l'activation de l'AMPK par l'AICAR ou la Metformine induisait une augmentation de l'absorption du glucose dans les tissus jéjunaux de souris par une redistribution des transporteurs du glucose SGLT1 et GLUT2 au niveau de la membrane apicale en augmentant GLUT2 et en réduisant SGLT1 (**Krimi et al., 2009**; **Walker et al., 2005**). La divergence des résultats pourrait s'expliquer par le choix du modèle (animal vs. humain) et le type d'étude (*in vitro* vs. *in vivo*). Dans notre étude *in vitro*, les cellules Caco-2 étaient cultivées sur un support en plastique sans filtre ne permettant pas leur polarisation. De ce fait, les membranes apicales et basolatérales se situent du même côté. Si nous considérons que la présence de GLUT2 au niveau des membranes (apicales ou basolatérales) régie l'absorption du glucose, mais que nous ne connaissons pas l'effet de l'AMPK sur la distribution du GLUT2 au niveau de la membrane basolatérale, alors les résultats devraient être interprétés avec précaution. Toutefois, le choix de ce modèle reposait sur l'effet de l'insuline sur l'internalisation du GLUT2 situé au niveau des membranes apicales et

basolatérales (**Tobin et al., 2008**). Dans cette situation, que les cellules soient polarisées ou non, l'absorption du glucose régulée par l'insuline n'était pas modifiée **(Figure 58 et Figure 66).**

Quelle sous-unité de l'AMPK régule la sensibilité à l'insuline ?

L'invalidation de la sous-unité α1 de l'AMPK altérait la phosphorylation de l'AMPK sans affecter la phosphorylation de l'Akt ni celle de mTORC1, ce qui excluait la possibilité que cette isoforme puisse jouer un rôle dans la sensibilité à l'insuline (**Figure 59**). En outre, l'activation de l'AMPK par l'AICAR dans les cellules dépourvues de la sous-unité α1 permettait encore d'augmenter la phosphorylation de l'AMPKα du fait de la présence de la sous-unité α2. Cette activation permettait de stimuler la phosphorylation de l'Akt et d'inhiber celle de mTORC1 de la même façon que les cellules contrôles PLKO. Cela suggère que la sous-unité α2 détiendrait un rôle majeur dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. D'ailleurs, dans les modèles de souris transgéniques pour lesquelles la sous-unité α1 ou α2 était invalidées dans l'organisme entier, il a été montré que l'invalidation de l'isoforme α2 induisait une forte résistance à l'insuline corrélée à une diminution de la tolérance au glucose et de la sécrétion de l'insuline alors que l'invalidation de l'isoforme α1 n'affectait pas la sensibilité à l'insuline (**Jorgensen et al., 2004**; **Viollet et al., 2003b**). Une invalidation de la sous-unité α2 tissu-spécifique confirmait dans le foie son rôle prépondérant dans l'inhibition de la production hépatique de glucose puisque la sous-unité α1 n'était pas suffisante pour l'inhiber (**Andreelli et al., 2006**). Dans le muscle squelettique de souris, l'invalidation de la sous-unité α2 par la technique du knock-out ou du knock-down ne permettait plus la capture du glucose après la contraction musculaire (**Kramer et al., 2006**; **Treebak et al., 2006**). Enfin, chez *Caenorhabditis elegans*, seule l'invalidation de aak-2 (homologue de la sous-unité α2) entraînait l'inactivation de gènes impliqués dans la signalisation de l'insuline (**Apfeld et al., 2004**).

La **Figure 68** représente un schéma de synthèse sur la régulation de la voie de signalisation de l'insuline par l'AMPK. L'action inhibitrice de l'insuline sur l'absorption intestinale du glucose est entéro-spécifique. L'AMPK mime l'effet de l'insuline en réduisant l'absorption du glucose dans les cellules Caco-2 par un mécanisme PI3K-dépendant. En effet, l'AMPK stimule la voie de signalisation de l'insuline non pas directement sur l'Akt mais en

amont de la PI3K suggérant que la même voie est empruntée pour induire le même effet. Toutefois, le mécanisme reliant l'activation de l'Akt et l'absorption du glucose demeure inconnu dans les entérocytes. L'AMPK inhibe également mTORC1, ce qui contribue probablement à lever le rétrocontrôle négatif sur l'IRS et à améliorer la sensibilité à l'insuline. L'inhibition de la PI3K altère l'axe AMPK/ACC suggérant une augmentation de la synthèse des acides gras dans cette situation. Enfin, la sous-unité α2 de l'AMPK semble détenir un rôle important dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. Cette étude suggère donc que l'AMPK intestinale pourrait être une cible thérapeutique pour le traitement de l'hyperglycémie.

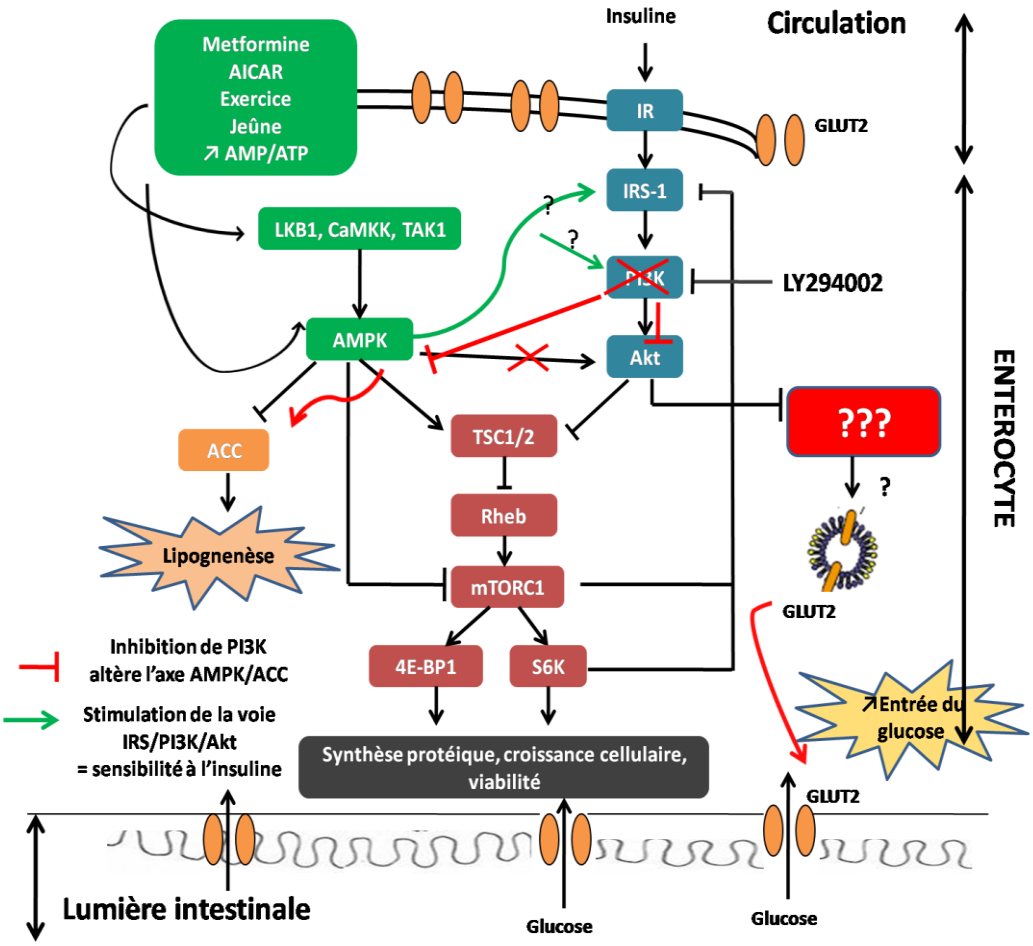


Figure 68: Schéma de synthèse décrivant les effets PI3K-dépendants de l'insuline et de l'AMPK. Mécanisme d'action proposé de l'AMPK dans la régulation dans la sensibilité à l'insuline et l'absorption intestinale du glucose. L'inhibition de PI3K/akt ne permet plus l'action de l'AMPK, ni de l'insuline pour réduire l'absorption du glucose par les entérocytes. Il en résulte une augmentation de l'absorption du glucose dans les entérocytes probablement lié à la présence de GLUT2 dans la membrane apicale. Cependant, le mécanisme de régulation de PI3K/Akt sur GLUT2 est inconnu à ce jour.

6.4 EFFETS DU 4-HYDROXY-HEXENAL (4-HHE) SUR LA SENSIBILITE A L'INSULINE

Les 4-hydroxyalkénals tels que le 4-HNE et le 4-HHE issus de la peroxydation lipidique des AGPI n-6 et n-3 respectivement, sont connus pour leurs effets cytotoxiques (**Je et al., 2004**; **Lee et al., 2004a**; **Lee et al., 2004b**; **Uchida et al., 1999**). De nombreuses études ont montré qu'en situation de stress oxydant, les hydroxyalkénals pouvaient contribuer au développement des maladies métaboliques telles que l'insulino-résistance, le diabète de type II et l'obésité (**Bondia-Pons et al., 2012**; **Grimsrud et al., 2007**; **Pillon et al., 2012**; **Singh et al., 2008**). En revanche, aucune étude n'a exploré leurs effets sur la signalisation de l'insuline dans les entérocytes.

Pertinence des concentrations utilisées

A l'heure actuelle, peu de dosages plasmatiques du 4-HHE sont disponibles dans la littérature. Les concentrations seraient 2 à 3 fois plus élevées que celle du 4-HNE (**Guichardant et al., 2006**). D'après le **Tableau 6 page 92**, les concentrations plasmatiques de 4-HNE varient entre 0,2 et 10µM. En situation physiopathologique, les concentrations plasmatiques sont doublées voire triplées. Ces variations sont probablement liées à la difficulté de mesurer des composés très réactifs et instables. Par ailleurs, la méthode de dosage n'est pas identique d'une étude à l'autre. Le dosage par GC-MS ou LC-MS ne détecte que la fraction libre du 4-HNE ou du 4-HHE. De ce fait, les concentrations mesurées sont susceptibles de sous-estimer la quantité totale produite dans les cellules ou les tissus. Ainsi, les concentrations tissulaires ou cellulaires sont généralement considérées comme plus élevées que les concentrations circulantes, même si, à l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant les niveaux de 4-HHE dans les tissus humains ou animaux. Dans la présente étude, les concentrations de 4-HHE choisies variaient entre 10 et 100µM afin de se rapprocher de façon réaliste des niveaux qui pourraient être observés dans les cellules en situation pathologique. Ces concentrations sont comparables à celles retrouvées dans la plupart des études *in vitro,* où les hydroxyalkénals sont utilisés à des concentrations de 10µM à 1mM (**Pillon et al., 2012**; **Shearn et al., 2011**).

Effet du 4-HHE à court terme

A partir du modèle de cellules intestinales Caco-2, nous avons mesuré la cytotoxicité du 4-HHE par un test LDH après 30 minutes d'incubation (**Figure 60)**. Les résultats montraient que le 4-HHE n'induisait pas de nécrose des cellules Caco-2. Curieusement, le 4-HHE semblait mimer l'effet de l'insuline puisqu'il induisait une activation de l'Akt (phospho-Ser473) de manière dose-dépendante corrélée à une réduction de l'absorption entérocytaire du glucose (**Figure 61 et Figure 63**). Parallèlement, le 4-HHE induisait une activation dose-dépendante de l'AMPK (**Figure 61**). Dans cette situation, le 4-HHE pourrait activer en premier lieu l'AMPK qui stimulerait à son tour l'Akt de manière PI3K-dépendante comme l'insuline, ou bien il agirait simultanément sur les deux voies AMPK/insuline ou encore sur une autre voie de signalisation complémentaire. Dans ce cas de figure, les effets de l'insuline et du 4-HHE sur l'Akt et l'absorption du glucose devraient être additifs. Toutefois, nous avons montré qu'ils ne l'étaient pas suggérant un mécanisme d'action commun entre l'insuline et le 4-HHE (**Figure 62**).

Bien que le 4-HHE soit connu pour ses effets cytotoxiques, il semble qu'il agisse plutôt comme un second messager en activant les voies de signalisation de l'AMPK et de PI3K/Akt dans les cellules Caco-2. Il en résulte une réduction de plus de 50% de l'absorption entérocytaire du glucose (**Figure 63)**. En se basant sur nos résultats précédents, le 4-HHE semble donc plutôt exercer des effets bénéfiques identiques à ceux des omégas-3 probablement parce que leurs structures chimiques sont relativement proches (**Guichardant et al., 2006**). En effet, quelques études ont mis en évidence l'effet des omégas-3 sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par un mécanisme AMPKα2-dépendant dans le foie et dans le tissu adipeux (**Jelenik et al., 2010**; **Lorente-Cebrian et al., 2009**). En outre, il a été montré que les omégas-3 induisaient une augmentation de l'expression génique des IRS1/2 et de GLUT4 (**Gonzalez-Periz et al., 2009**). Toutefois, dans notre étude, l'incubation des cellules Caco-2 avec le 4-HHE pendant seulement 30 minutes ne modifiait pas l'expression des protéines totales (AMPK et Akt) indiquant un effet direct du 4-HHE sur la voie de signalisation et la phosphorylation des protéines mais pas sur des facteurs de transcription susceptibles de modifier l'expression des gènes.

Effet du 4-HHE à plus long terme

L'effet à plus long terme (24 heures) du 4-HHE sur la voie de signalisation de l'insuline montrait au contraire une réduction de la phosphorylation de l'Akt de manière dose-dépendante en réponse à l'insuline (**Figure 65)**. L'effet était significatif à partir de 50µM de 4-HHE. A cette diminution de la phosphorylation de l'Akt était corrélée une réduction significative de l'effet de l'insuline sur l'absorption entérocytaire du glucose, ce qui reflète un état d'insulino-résistance (**Figure 66**). D'autres travaux ont effectivement montré que les 4-hydroxyalkénals induisaient une résistance à l'insuline dans différentes lignées cellulaires telles que les hépatocytes HepG2 (**Shearn et al., 2011**), les pré-adipocytes 3T3-L1 et les myotubes C2C12 (**Pillon et al., 2012**). Dans ces études, la résistance à l'insuline était caractérisée par une altération des phosphorylations de l'Akt résultant en une incapacité de ces cellules à internaliser le glucose. Par ailleurs, il a été montré que le 4-HNE pouvait induire un stress oxydatif et participer à la carbonylation des protéines (**Pillon et al., 2012**), notamment en formant des adduits de Michael avec l'Akt2 dans les cellules HepG2 (**Shearn et al., 2011**), un processus qui pourrait se dérouler dans les cellules Caco-2 en présence du 4-HHE responsable de l'altération de la phosphorylation de l'Akt.

En outre, le 4-HHE seul augmentait significativement l'absorption du glucose par rapport aux contrôles. Néanmoins la phosphorylation de l'Akt n'était pas significativement altérée par le 4-HHE. Cela suggère qu'une autre voie de signalisation régulant le nombre de transporteurs du glucose et/ou leur activité intrinsèque serait activée par le 4-HHE. En effet, il a été montré qu'en situation de stress induite par l'hyperglycémie, la p38MAPK était activée, ce qui augmentait l'activité intrinsèque et le nombre de transporteurs GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes (**El-Zein et Kreydiyyeh, 2011**; **Helliwell et al., 2000**). De plus, il a été montré que le 4-HHE stimulait les voies de stress p38MAPK et ERK(**Je et al., 2004**), des marqueurs de l'insulino-résistance, ainsi que la phospholipase C (PLC) (**Rossi et al., 1990**) connue pour stimuler la protéine kinase C (PKC) (**Mace et al., 2009**), elle-même favorisant la translocation des transporteurs GLUT2 et GLUT4 (**Helliwell et al., 2003**). Il se pourrait donc que le 4-HHE puisse activer la p38MAPK impliquée dans l'augmentation des transporteurs GLUT2 et l'absorption du glucose dans les entérocytes.

Par ailleurs, dans cette expérience (**Figure 66**), les cellules Caco-2 étaient cultivées et différentiées sur des filtres poreux où elles formaient une monocouche polarisée qui délimitait le compartiment apical mimant la lumière intestinale et le compartiment basal mimant la circulation sanguine. Grâce à ce modèle *in vitro*, il était possible de mesurer l'absorption et la libération du glucose radioactif par les entérocytes du côté basolatéral. Nos résultats indiquent que le 4-HHE favorisait non seulement l'absorption entérocytaire du glucose, mais aussi sa libération dans le milieu basolatéral suggérant un effet hyperglycémique de ce composé. En outre, l'action inhibitrice de l'insuline sur l'absorption du glucose était réduite significativement et elle était corrélée à une augmentation de la libération du glucose dans le compartiment basolatéral par rapport aux cellules traitées avec l'insuline seule. Ces résultats reflètent un état d'insulino-résistance induit par le 4-HHE ayant pour conséquence une augmentation de l'absorption intestinale du glucose. Bien que nous n'ayons pas analysé l'effet du 4-HHE sur les transporteurs du glucose SGLT1 et GLUT2 au niveau de la membrane apicale des entérocytes, des études chez l'homme et la souris ont montré qu'en situation d'insulino-résistance, le GLUT2 était localisé en permanence au niveau de la membrane apicale, ce qui exacerberait l'hyperglycémie (**Ait-Omar et al., 2011**; **Tobin et al., 2008**). Ainsi, par extrapolation *in vivo*, le 4-HHE pourrait induire une élévation de la glycémie.

A partir du modèle d'insulino-résistance dans les cellules Caco-2 induite par le 4-HHE, nous avons exploré l'impact d'une telle situation physiopathologique sur l'axe AMPK/ACC. Les données indiquaient que les phosphorylations de ces protéines étaient réduites de manière dose-dépendante et significativement à 50 et 100µM (**Figure 67)**. Ainsi, en situation d'insulino-résistance, la phosphorylation de l'AMPK était diminuée, ce qui levait l'inhibition par phosphorylation de l'ACC suggérant une augmentation de la synthèse des acides gras. Ces résultats corroborent ceux obtenus à partir de jéjunums insulino-résistants et diabétiques de *Psammomys obesus* (cf. article page 147.) pour lesquels l'activité de l'AMPK était réduite de 50%, corrélée à une augmentation de l'activité de l'ACC (50%) et une diminution de l'expression protéique de CPT1 (30%). En outre, il se pourrait que le 4-HHE puisse altérer l'activité de l'ACC à cause de la formation d'adduits covalents au niveau des enzymes du cycle de Krebs comme il a été montré chez le nématode *C. elegans* (**Singh et al., 2009**).

Pour conclure, une insulino-résistance intestinale induite par le 4-HHE pourrait favoriser une accumulation de lipides intra-entérocytaires corrélée à une réduction de l'oxydation des acides gras et/ou une augmentation de leur synthèse. Ces anomalies métaboliques seraient associées à une altération de l'axe AMPK/ACC. Les données obtenues à partir d'intestins insulino-résistants et diabétiques de *Psammomys obesus* corroborent nos résultats puisqu'il était observé une accumulation de lipides (TG, CE, PL) et de leur sécrétion par les entérocytes associée à une altération des voies de signalisation de l'insuline (↘p-AKT, ↘p-GSK3β, ↗p38MAPK, ↗ERK) et de l'axe AMPK/ACC/CPT1. Plusieurs études permettent de supporter nos résultats puisque l'induction d'insulino-résistance dans différents types cellulaires ou tissus provoquait une altération de l'AMPK corrélée à une augmentation de la synthèse des acides gras (**Kraegen et al., 2006**; **Saha et al., 2010**; **Zang et al., 2004**). Toutefois, il a été montré que dans le foie de rongeurs diabétiques, l'activité de l'AMPK était augmentée (**Atkinson et al., 2002**; **Bonnard et al., 2008**; **Ouadda et al., 2009**). Les auteurs suggèrent une adaptation métabolique afin de réduire l'activité de l'ACC et les niveaux de malonyl-CoA. La modification de l'activité de l'AMPK en situation d'insulino-résistance semble donc différente d'un tissu à un autre. Cela pourrait être lié à la fonction spécifique d'un tissu donné corrélée à la composition des sous-unités du principal complexe hétérotrimérique de l'AMPK.

Enfin, les résultats obtenus à partir du *Psammomys obesus* (cf. article page 147) diabétique indiquent une augmentation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons étant donné que (i) la lipogenèse de novo, (ii) l'activité des enzymes MGAT/DGAT, MTP et Sar1b GTPase, (iii) la synthèse d'Apo-B48 et (iv) la sécrétion de TG, CE et PL étaient augmentées. Ces données corroborent l'étude de Zoltowska et al. montrant une surproduction de chylomicrons chez le *Psammomys obesus* en situation d'insulino-résistance et de DT2 (**Zoltowska et al., 2003**). Ces désordres lipidiques étaient associés à une augmentation de l'activité de Sar1b GTPase confirmant nos précédents résultats quant au rôle majeur de cette protéine dans le transport des chylomicrons (**Levy et al., 2011**). Par ailleurs, le traitement de ces animaux par la Metformine permettait de restaurer les désordres lipidiques observés suggérant que l'AMPK pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle pour le traitement des dyslipidémies post-prandiales associées au DT2. Toutefois, la Metformine n'étant pas un activateur spécifique de l'AMPK, d'autres approches seraient nécessaires pour confirmer nos résultats.

PERSPECTIVES

Ces travaux ont permis de caractériser pour la première fois l'AMPK intestinale à partir de la lignée cellulaire Caco-2. Nous avons déterminé la structure des principaux complexes hétérotrimériques de l'AMPK ainsi que son rôle et sa régulation dans la lipogenèse et la sensibilité à l'insuline. Les actions entéro-spécifiques de l'AMPK et de l'insuline ont été mis en évidence, à savoir : (i) une absence de contrôle de l'AMPK sur l'HMG-CoA Réductase à la différence du foie, (ii) l'effet inhibiteur de l'insuline et de l'AMPK sur l'absorption intestinale du glucose. Par ailleurs, le 4-HHE issu de l'oxydation des omégas-3 est capable d'induire une insulino-résistance dans les cellules intestinales Caco-2 en altérant l'axe AMPK/ACC. Ces données suggèrent que l'AMPK pourrait être une cible thérapeutique potentielle du diabète de type II (**Figure 69**).

Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de la voie PI3K/Akt par le composé LY294002 réduisait la phosphorylation et par conséquent l'activité de l'AMPK. En situation d'insulino-résistance, l'altération de la voie PI3K/Akt était corrélée à une diminution de la phosphorylation de l'AMPK. Cependant, quelle voie serait affectée en premier ? Est-ce l'altération de la voie PI3K/Akt qui affecte l'AMPK ou bien le contraire ? La mise au point de l'invalidation génique de la sous-unité α2 permettrait d'étudier la réciprocité des deux voies.

Par ailleurs, en situation d'insulino-résistance induite par le 4-HHE, l'absorption intestinale du glucose était augmentée. Serait-elle corrélée à une augmentation du nombre de transporteurs GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes ? En outre, il conviendrait de déterminer le mécanisme d'action du 4-HHE sur les voies de l'AMPK et PI3K/Akt en utilisant une approche pharmacologique.

Enfin l'utilisation de modèles animaux knock-out des isoformes de l'AMPK intestinale permettrait de déterminer leur rôle respectif dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose ; ce qui faciliterait la mise au point d'agents pharmacologiques spécifiques de l'AMPK.

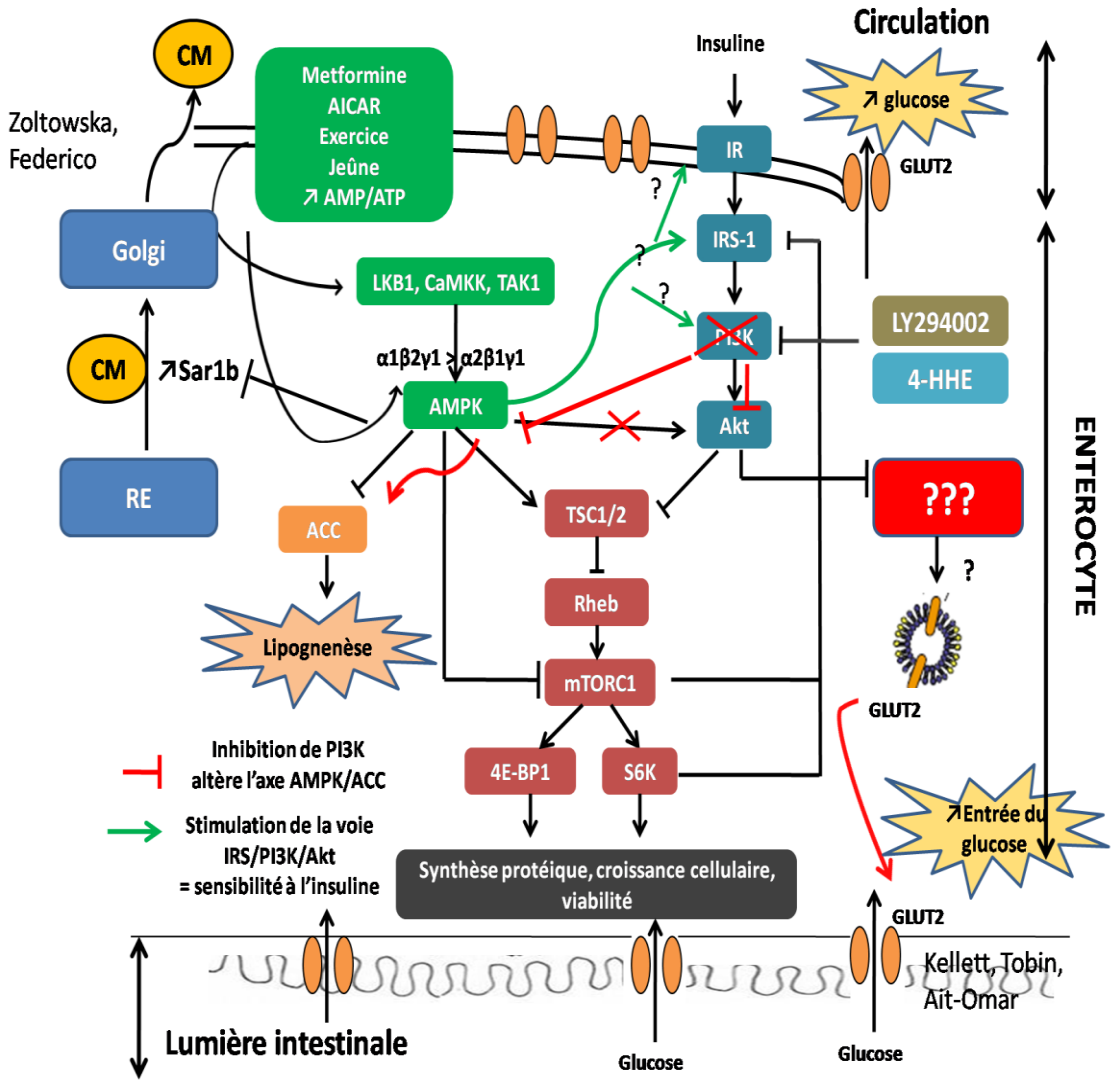


Figure 69 : Synthèse de l'étude : hypothèses, résultats et expériences validées au cours de ce travail et par d'autres équipes. Mécanisme d'action proposé de l'AMPK dans la régulation de la voie de signalisation de l'insuline et l'absorption intestinale du glucose. L'activation pharmacologique de l'AMPK réduit l'absorption du glucose par un mécanisme PI3K-dépendant. L'inhibition pharmacologique de PI3K/Akt ou l'insulino-résistance induite par le 4-HHE altère l'absorption du glucose et l'axe AMPK/ACC. Il en résulte une augmentation de l'activité de l'ACC conduisant à la synthèse des acides gras, et une augmentation de l'absorption du glucose. La surexpression de Sar1b entraîne une augmentation de l'assemblage et de la sécrétion des chylomicrons. Un lien possible peut être établi entre l'augmentation de l'activité de Sar1b et l'altération de l'AMPK en situation d'insulino-résistance contribuant à la surproduction de chylomicrons. Le mécanisme d'internalisation du GLUT2 par l'insuline n'a pas été encore élucidé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le, G.M., Cotillard, A., Gilet, J., Garbin, K., Houllier, A., Chateau, D., Lacombe, A., Veyrie, N., Hugol, D., Tordjman, J., Magnan, C., Serradas, P., Clement, K., Leturque, A.,Brot-Laroche, E., 2011. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. Diabetes. 60, 2598-2607.

Alghazeer, R., Gao, H.,Howell, N.K., 2008. Cytotoxicity of oxidised lipids in cultured colonal human intestinal cancer cells (caco-2 cells). Toxicol. Lett. 180, 202-211.

Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D.,Small, C.J., 2004. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. J. Biol. Chem. 279, 12005-12008.

Andreelli, F., Foretz, M., Knauf, C., Cani, P.D., Perrin, C., Iglesias, M.A., Pillot, B., Bado, A., Tronche, F., Mithieux, G., Vaulont, S., Burcelin, R.,Viollet, B., 2006. Liver adenosine monophosphate-activated kinase-alpha2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. Endocrinology. 147, 2432-2441.

Andreu, P., Perret, C.,Romagnolo, B., 2006. [Wnt and gastrointestinal stem cells: dangerous connections]. Med. Sci. (Paris). 22, 693-695.

Apfeld, J., O'Connor, G., McDonagh, T., DiStefano, P.S.,Curtis, R., 2004. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans. Genes Dev. 18, 3004-3009.

Atkinson, L.L., Kelly, S.E., Russell, J.C., Bar-Tana, J.,Lopaschuk, G.D., 2002. MEDICA 16 inhibits hepatic acetyl-CoA carboxylase and reduces plasma triacylglycerol levels in insulin-resistant JCR: LA-cp rats. Diabetes. 51, 1548-1555.

Au, A., Gupta, A., Schembri, P.,Cheeseman, C.I., 2002. Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. Biochem. J. 367, 247-254.

Avruch, J., 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. Mol. Cell Biochem. 182, 31-48.

Awasthi, Y.C., Ansari, G.A.,Awasthi, S., 2005. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferases. Methods Enzymol. 401, 379-407.

Awasthi, Y.C., Sharma, R., Cheng, J.Z., Yang, Y., Sharma, A., Singhal, S.S.,Awasthi, S., 2003. Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. Mol. Aspects Med. 24, 219-230.

Bacot, S., Bernoud-Hubac, N., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., Ponsin, G., Lagarde, M.,Guichardant, M., 2007. Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals. J. Lipid Res. 48, 816-825.

Baggio, L.L.Drucker, D.J., 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology. 132, 2131-2157.

Bailey, C.J., Mynett, K.J.,Page, T., 1994. Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. Br. J. Pharmacol. 112, 671-675.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R.,Cohen, P., 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem. J. 408, 297-315.

Bandyopadhyay, G.K., Yu, J.G., Ofrecio, J.,Olefsky, J.M., 2006. Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects. Diabetes. 55, 2277-2285.

Banerjee, R.R., Rangwala, S.M., Shapiro, J.S., Rich, A.S., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, M.W., Pocai, A., Scherer, P.E., Steppan, C.M., Ahima, R.S., Obici, S., Rossetti, L.,Lazar, M.A., 2004. Regulation of fasted blood glucose by resistin. Science. 303, 1195-1198.

Barrenetxe, J., Villaro, A.C., Guembe, L., Pascual, I., Munoz-Navas, M., Barber, A.,Lostao, M.P., 2002. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. Gut. 50, 797-802.

Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K.D., Roth, R.A.,Joost, H.G., 2002. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. Endocrinology. 143, 3183-3186.

Bashan, N., Kovsan, J., Kachko, I., Ovadia, H.,Rudich, A., 2009. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. Physiol Rev. 89, 27-71.

Battezzati, A., Caumo, A., Martino, F., Sereni, L.P., Coppa, J., Romito, R., Ammatuna, M., Regalia, E., Matthews, D.E., Mazzaferro, V.,Luzi, L., 2004. Nonhepatic glucose production in humans. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 286, E129-E135.

Beg, Z.H., Stonik, J.A.,Brewer, H.B., Jr., 1987. Modulation of the enzymic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by multiple kinase systems involving reversible phosphorylation: a review. Metabolism. 36, 900-917.

Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E.,Goransson, O., 2009. Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 296, E635-E646.

Beri, R.K., Marley, A.E., See, C.G., Sopwith, W.F., Aguan, K., Carling, D., Scott, J.,Carey, F., 1994. Molecular cloning, expression and chromosomal localisation of human AMP-activated protein kinase. FEBS Lett. 356, 117-121.

Berriot-Varoqueaux, N., Aggerbeck, L.P., Samson-Bouma, M.,Wetterau, J.R., 2000. The role of the microsomal triglygeride transfer protein in abetalipoproteinemia. Annu. Rev. Nutr. 20, 663-697.

Betters, J.L.Yu, L., 2010. NPC1L1 and cholesterol transport. FEBS Lett. 584, 2740-2747.

Bikman, B.T., Zheng, D., Reed, M.A., Hickner, R.C., Houmard, J.A.,Dohm, G.L., 2010. Lipid-induced insulin resistance is prevented in lean and obese myotubes by AICAR treatment. Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol. 298, R1692-R1699.

Blais, A., Bissonnette, P.,Berteloot, A., 1987. Common characteristics for Na+-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. J. Membr. Biol. 99, 113-125.

Bloks, V.W., Bakker-Van Waarde, W.M., Verkade, H.J., Kema, I.P., Wolters, H., Vink, E., Groen, A.K.,Kuipers, F., 2004. Down-regulation of hepatic and intestinal Abcg5 and Abcg8 expression associated with altered sterol fluxes in rats with streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 47, 104-112.

Bloomgarden, Z.T., 2007. Insulin resistance, dyslipidemia, and cardiovascular disease. Diabetes Care. 30, 2164-2170.

Blundell, J.E., Goodson, S.,Halford, J.C., 2001. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. Int. J. Obes. Relat Metab Disord. 25 Suppl 1, S29-S34.

Bolufer, J.Lasheras, B., 1975. Inhibition of intestinal sugar transport by phenformin. Rev. Esp. Fisiol. 31, 251-254.

Bondia-Pons, I., Ryan, L.,Martinez, J.A., 2012. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. J. Physiol Biochem.

Bonnard, C., Durand, A., Vidal, H.,Rieusset, J., 2008. Changes in adiponectin, its receptors and AMPK activity in tissues of diet-induced diabetic mice. Diabetes Metab. 34, 52-61.

Bornfeldt, K.E.Tabas, I., 2011. Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. Cell Metab. 14, 575-585.

Bradley, M.A., Markesbery, W.R.,Lovell, M.A., 2010. Increased levels of 4-hydroxynonenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. Free Radic. Biol. Med. 48, 1570-1576.

Brazil, D.P.Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. Trends Biochem. Sci. 26, 657-664.

Bronner, F., 2003. Mechanisms of intestinal calcium absorption. J. Cell Biochem. 88, 387-393.

Bruce, C.R., Mertz, V.A., Heigenhauser, G.J.,Dyck, D.J., 2005. The stimulatory effect of globular adiponectin on insulin-stimulated glucose uptake and fatty acid oxidation is impaired in skeletal muscle from obese subjects. Diabetes. 54, 3154-3160.

Brunmair, B., Staniek, K., Gras, F., Scharf, N., Althaym, A., Clara, R., Roden, M., Gnaiger, E., Nohl, H., Waldhausl, W.,Furnsinn, C., 2004. Thiazolidinediones, like metformin,

inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? Diabetes. 53, 1052-1059.

Buhman, K.F., Accad, M.,Farese, R.V., 2000. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. Biochim. Biophys. Acta. 1529, 142-154.

Buhman, K.K., Smith, S.J., Stone, S.J., Repa, J.J., Wong, J.S., Knapp, F.F., Jr., Burri, B.J., Hamilton, R.L., Abumrad, N.A.,Farese, R.V., Jr., 2002. DGAT1 is not essential for intestinal triacylglycerol absorption or chylomicron synthesis. J. Biol. Chem. 277, 25474-25479.

Burant, C.F., Flink, S., DePaoli, A.M., Chen, J., Lee, W.S., Hediger, M.A., Buse, J.B.,Chang, E.B., 1994. Small intestine hexose transport in experimental diabetes. Increased transporter mRNA and protein expression in enterocytes. J. Clin. Invest. 93, 578-585.

Calegari, V.C., Zoppi, C.C., Rezende, L.F., Silveira, L.R., Carneiro, E.M.,Boschero, A.C., 2011. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. J. Endocrinol. 208, 257-264.

Calzada, C., Colas, R., Guillot, N., Guichardant, M., Laville, M., Vericel, E.,Lagarde, M., 2010. Subgram daily supplementation with docosahexaenoic acid protects low-density lipoproteins from oxidation in healthy men. Atherosclerosis. 208, 467-472.

Canto, C.Auwerx, J., 2010. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. Cell Mol. Life Sci. 67, 3407-3423.

Carling, D., Clarke, P.R., Zammit, V.A.,Hardie, D.G., 1989. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. Eur. J. Biochem. 186, 129-136.

Carling, D.Hardie, D.G., 1989. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. Biochim. Biophys. Acta. 1012, 81-86.

Carling, D., Zammit, V.A.,Hardie, D.G., 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. FEBS Lett. 223, 217-222.

Catala, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chem. Phys. Lipids. 157, 1-11.

Ceolotto, G., Gallo, A., Papparella, I., Franco, L., Murphy, E., Iori, E., Pagnin, E., Fadini, G.P., Albiero, M., Semplicini, A.,Avogaro, A., 2007. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27, 2627-2633.

Chang, C.C., Chang, C.Y., Wu, Y.T., Huang, J.P., Yen, T.H.,Hung, L.M., 2011. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. J. Biomed. Sci. 18, 47-

Chantret, I., Rodolosse, A., Barbat, A., Dussaulx, E., Brot-Laroche, E., Zweibaum, A.,Rousset, M., 1994. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. J. Cell Sci. 107 (Pt 1), 213-225.

Cheeseman, C.I., 1997. Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. Am. J. Physiol. 273, R1965-R1971.

Cheeseman, C.I.Tsang, R., 1996. The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. Am. J. Physiol. 271, G477-G482.

Chen, C., Zhang, Y.,Huang, C., 2010. Berberine inhibits PTP1B activity and mimics insulin action. Biochem. Biophys. Res. Commun. 397, 543-547.

Chen, M.B., McAinch, A.J., Macaulay, S.L., Castelli, L.A., O'brien, P.E., Dixon, J.B., Cameron-Smith, D., Kemp, B.E.,Steinberg, G.R., 2005. Impaired activation of AMP-kinase and fatty acid oxidation by globular adiponectin in cultured human skeletal muscle of obese type 2 diabetics. J. Clin. Endocrinol. Metab. 90, 3665-3672.

Chen, Z., Heierhorst, J., Mann, R.J., Mitchelhill, K.I., Michell, B.J., Witters, L.A., Lynch, G.S., Kemp, B.E.,Stapleton, D., 1999. Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle. FEBS Lett. 460, 343-348.

Cherian, B., Meka, N., Katragadda, S.,Arora, R., 2009. Therapeutic implications of diabetes in cardiovascular disease. Am. J. Ther. 16, e51-e59.

Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G.,Carling, D., 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. Biochem. J. 346 Pt 3, 659-669.

Chopra, I., Li, H.F., Wang, H.,Webster, K.A., 2012. Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. Diabetologia. 55, 783-794.

Choudhary, S., Zhang, W., Zhou, F., Campbell, G.A., Chan, L.L., Thompson, E.B.,Ansari, N.H., 2002. Cellular lipid peroxidation end-products induce apoptosis in human lens epithelial cells. Free Radic. Biol. Med. 32, 360-369.

Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H.S.,Frevert, E., 2006. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Cell Metab. 3, 403-416.

Copp, J., Manning, G.,Hunter, T., 2009. TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. Cancer Res. 69, 1821-1827.

Corton, J.M., Gillespie, J.G.,Hardie, D.G., 1994. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. Curr. Biol. 4, 315-324.

Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A.,Hardie, D.G., 1995. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? Eur. J. Biochem. 229, 558-565.

Cosgrove, J.P., Church, D.F.,Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Lipids. 22, 299-304.

CRANE, R.K., 1962. Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars. Fed. Proc. 21, 891-895.

Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J.M., Montano, S.,Mithieux, G., 2001. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. Diabetes. 50, 740-746.

Crute, B.E., Seefeld, K., Gamble, J., Kemp, B.E.,Witters, L.A., 1998. Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 273, 35347-35354.

Cui, X.L., Soteropoulos, P., Tolias, P.,Ferraris, R.P., 2004. Fructose-responsive genes in the small intestine of neonatal rats. Physiol Genomics. 18, 206-217.

Dandona, P., Ghanim, H., Chaudhuri, A., Dhindsa, S.,Kim, S.S., 2010. Macronutrient intake induces oxidative and inflammatory stress: potential relevance to atherosclerosis and insulin resistance. Exp. Mol. Med. 42, 245-253.

Daval, M., Diot-Dupuy, F., Bazin, R., Hainault, I., Viollet, B., Vaulont, S., Hajduch, E., Ferre, P.,Foufelle, F., 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. J. Biol. Chem. 280, 25250-25257.

Daval, M., Foufelle, F.,Ferre, P., 2006. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. J. Physiol. 574, 55-62.

Davidson, N.O.Shelness, G.S., 2000. APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. Annu. Rev. Nutr. 20, 169-193.

Dawson, P.A.Rudel, L.L., 1999. Intestinal cholesterol absorption. Curr. Opin. Lipidol. 10, 315-320.

Debnam, E.S.Chowrimootoo, G., 1992. Streptozotocin diabetes and sugar transport by rat ileal enterocytes: evidence for adaptation caused by an increased luminal nutrient load. Biochim. Biophys. Acta. 1107, 86-92.

Decker, T.Lohmann-Matthes, M.L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. J. Immunol. Methods. 115, 61-69.

Dietschy, J.M.Gamel, W.G., 1971. Cholesterol synthesis in the intestine of man: regional differences and control mechanisms. J. Clin. Invest. 50, 872-880.

Dietschy, J.M.Wilson, J.D., 1968. Cholesterol synthesis in the squirrel monkey: relative rates of synthesis in various tissues and mechanisms of control. J. Clin. Invest. 47, 166-174.

Dockray, G.J., 2003. Luminal sensing in the gut: an overview. J. Physiol Pharmacol. 54 Suppl 4, 9-17.

Dolinsky, V.W., Chan, A.Y., Robillard, F., I, Light, P.E., Des, R.C.,Dyck, J.R., 2009. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. Circulation. 119, 1643-1652.

Duez, H., Lamarche, B., Valero, R., Pavlic, M., Proctor, S., Xiao, C., Szeto, L., Patterson, B.W.,Lewis, G.F., 2008. Both intestinal and hepatic lipoprotein production are stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in humans. Circulation. 117, 2369-2376.

Dyck, J.R., Kudo, N., Barr, A.J., Davies, S.P., Hardie, D.G.,Lopaschuk, G.D., 1999. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5'-AMP activated protein kinase. Eur. J. Biochem. 262, 184-190.

Dyer, J., Vayro, S., King, T.P.,Shirazi-Beechey, S.P., 2003. Glucose sensing in the intestinal epithelium. Eur. J. Biochem. 270, 3377-3388.

Dyer, J., Wood, I.S., Palejwala, A., Ellis, A.,Shirazi-Beechey, S.P., 2002. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 282, G241-G248.

El-Zein, O.Kreydiyyeh, S.I., 2011. Pine bark extract inhibits glucose transport in enterocytes via mitogen-activated kinase and phosphoinositol 3-kinase. Nutrition. 27, 707-712.

Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O.,Koller, E., 1987. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. J. Lipid Res. 28, 495-509.

Esterbauer, H., Schaur, R.J.,Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radic. Biol. Med. 11, 81-128.

Esterbauer, H.Zollner, H., 1989. Methods for determination of aldehydic lipid peroxidation products. Free Radic. Biol. Med. 7, 197-203.

FARQUHAR, M.G.PALADE, G.E., 1963. Junctional complexes in various epithelia. J. Cell Biol. 17, 375-412.

Federico, L.M., Naples, M., Taylor, D.,Adeli, K., 2006. Intestinal insulin resistance and aberrant production of apolipoprotein B48 lipoproteins in an animal model of insulin resistance and metabolic dyslipidemia: evidence for activation of protein tyrosine phosphatase-1B, extracellular signal-related kinase, and sterol regulatory element-binding protein-1c in the fructose-fed hamster intestine. Diabetes. 55, 1316-1326.

Feingold, K.R., Wilson, D.E., Wood, L.C., Kwong, L.K., Moser, A.H.,Grunfeld, C., 1994. Diabetes increases hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase protein and mRNA levels in the small intestine. Metabolism. 43, 450-454.

Fernandez-Moreno, M.D., Serrano-Rios, M.,Prieto, J.C., 1987. Identification of insulin receptors in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum in the rat. Diabete Metab. 13, 135-139.

Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Lloyd, K.C., Mirzayan, R.,Diamond, J.M., 1990. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. Am. J. Physiol. 259, G822-G837.

Field, F.J., Erickson, S.K., Shrewsbury, M.A.,Cooper, A.D., 1982. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat intestine: subcellular localization and in vitro regulation. J. Lipid Res. 23, 105-113.

Fogh, J., Fogh, J.M.,Orfeo, T., 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst. 59, 221-226.

Foretz, M., Ancellin, N., Andreelli, F., Saintillan, Y., Grondin, P., Kahn, A., Thorens, B., Vaulont, S.,Viollet, B., 2005. Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver. Diabetes. 54, 1331-1339.

Foretz, M., Hebrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F.,Viollet, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. J. Clin. Invest. 120, 2355-2369.

Foretz, M., Taleux, N., Guigas, B., Horman, S., Beauloye, C., Andreelli, F., Bertrand, L.,Viollet, B., 2006. [Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]. Med. Sci. (Paris). 22, 381-388.

Forgue-Lafitte, M.E., Marescot, M.R., Chamblier, M.C.,Rosselin, G., 1980. Evidence for the presence of insulin binding sites in isolated rat intestinal epithelial cells. Diabetologia. 19, 373-378.

Fryer, L.G., Parbu-Patel, A.,Carling, D., 2002. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. J. Biol. Chem. 277, 25226-25232.

Funai, K.Cartee, G.D., 2009. Inhibition of contraction-stimulated AMP-activated protein kinase inhibits contraction-stimulated increases in PAS-TBC1D1 and glucose transport without altering PAS-AS160 in rat skeletal muscle. Diabetes. 58, 1096-1104.

Gami, A.S., Witt, B.J., Howard, D.E., Erwin, P.J., Gami, L.A., Somers, V.K.,Montori, V.M., 2007. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. J. Am. Coll. Cardiol. 49, 403-414.

Gauthier, M.S., O'Brien, E.L., Bigornia, S., Mott, M., Cacicedo, J.M., Xu, X.J., Gokce, N., Apovian, C.,Ruderman, N., 2011. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. Biochem. Biophys. Res. Commun. 404, 382-387.

Genot, C.Michalski, M.C., 2010. Metabolic impact of lipid structure and oxidation in foods. Innovations agronomiques. 10, 43-67.

Ginion, A., Auquier, J., Benton, C.R., Mouton, C., Vanoverschelde, J.L., Hue, L., Horman, S., Beauloye, C.,Bertrand, L., 2011. Inhibition of the mTOR/p70S6K pathway is not involved in the insulin-sensitizing effect of AMPK on cardiac glucose uptake. Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol. 301, H469-H477.

Ginsberg, H.N., 1996. Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. Diabetes. 45 Suppl 3, S27-S30.

Ginsberg, H.N.MacCallum, P.R., 2009. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: Part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. J. Cardiometab. Syndr. 4, 113-119.

Glatz, J.F.van der Vusse, G.J., 1990. Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. Mol. Cell Biochem. 98, 237-251.

Gleeson, A., Owens, D., Collins, P., Johnson, A.,Tomkin, G.H., 2000. The relationship between cholesterol absorption and intestinal cholesterol synthesis in the diabetic rat model. Int. J. Exp. Diabetes Res. 1, 203-210.

Goda, T., 2000. Regulation of the expression of carbohydrate digestion/absorption-related genes. Br. J. Nutr. 84 Suppl 2, S245-S248.

Gonzalez-Periz, A., Horrillo, R., Ferre, N., Gronert, K., Dong, B., Moran-Salvador, E., Titos, E., Martinez-Clemente, M., Lopez-Parra, M., Arroyo, V.,Claria, J., 2009. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. FASEB J. 23, 1946-1957.

Goransson, O., McBride, A., Hawley, S.A., Ross, F.A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D.G.,Sakamoto, K., 2007. Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 282, 32549-32560.

Gordon, D.A.Jamil, H., 2000. Progress towards understanding the role of microsomal triglyceride transfer protein in apolipoprotein-B lipoprotein assembly. Biochim. Biophys. Acta. 1486, 72-83.

Gresser, M.J., 1983. Regulation of enzyme activity by cyclic phosphorylation-dephosphorylation cascades. Thermodynamic constraints. Biochim. Biophys. Acta. 743, 316-322.

Grimsrud, P.A., Picklo, M.J., Sr., Griffin, T.J.,Bernlohr, D.A., 2007. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. Mol. Cell Proteomics. 6, 624-637.

Grune, T., Kramer, K., Hoppe, P.P.,Siems, W., 2001. Enrichment of eggs with n-3 polyunsaturated fatty acids: effects of vitamin E supplementation. Lipids. 36, 833-838.

Guichardant, M., Bacot, S., Moliere, P.,Lagarde, M., 2006. Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 75, 179-182.

Guichardant, M., Taibi-Tronche, P., Fay, L.B.,Lagarde, M., 1998. Covalent modifications of aminophospholipids by 4-hydroxynonenal. Free Radic. Biol. Med. 25, 1049-1056.

Haidari, M., Leung, N., Mahbub, F., Uffelman, K.D., Kohen-Avramoglu, R., Lewis, G.F.,Adeli, K., 2002. Fasting and postprandial overproduction of intestinally derived lipoproteins in an animal model of insulin resistance. Evidence that chronic fructose feeding in the hamster is accompanied by enhanced intestinal de novo lipogenesis and ApoB48-containing lipoprotein overproduction. J. Biol. Chem. 277, 31646-31655.

Hales, C.N., 1971. The role of insulin in the regulation of glucose metabolism. Proc. Nutr. Soc. 30, 282-288.

Hamilton, J.A.Kamp, F., 1999. How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? Diabetes. 48, 2255-2269.

Hardie, D.G., 2008. AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. Mol. Cell. 30, 263-265.

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

Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A.,Hudson, E.R., 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. FEBS Lett. 546, 113-120.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Makela, T.P., Alessi, D.R.,Hardie, D.G., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. J. Biol. 2, 28-

Hayashi, A.A., Webb, J., Choi, J., Baker, C., Lino, M., Trigatti, B., Trajcevski, K.E., Hawke, T.J.,Adeli, K., 2011. Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 301, G326-G337.

Hayashi, T., Hirshman, M.F., Kurth, E.J., Winder, W.W.,Goodyear, L.J., 1998. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. Diabetes. 47, 1369-1373.

Heilbronn, L.K.Campbell, L.V., 2008. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. Curr. Pharm. Des. 14, 1225-1230.

Helliwell, P.A., Richardson, M., Affleck, J.,Kellett, G.L., 2000. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. Biochem. J. 350 Pt 1, 163-169.

Helliwell, P.A., Rumsby, M.G.,Kellett, G.L., 2003. Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C betaII mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways. J. Biol. Chem. 278, 28644-28650.

Hemi, R., Yochananov, Y., Barhod, E., Kasher-Meron, M., Karasik, A., Tirosh, A.,Kanety, H., 2011. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent transactivation of ErbB receptor family: a novel common mechanism for stress-induced IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance. Diabetes. 60, 1134-1145.

Henin, N., Vincent, M.F., Gruber, H.E.,Van den Berghe, G., 1995. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. FASEB J. 9, 541-546.

Hogue, J.C., Lamarche, B., Tremblay, A.J., Bergeron, J., Gagne, C.,Couture, P., 2007. Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. J. Lipid Res. 48, 1336-1342.

Holz, M.K.Blenis, J., 2005. Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. J. Biol. Chem. 280, 26089-26093.

Hopps, E., Noto, D., Caimi, G.,Averna, M.R., 2010. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. Nutr. Metab Cardiovasc. Dis. 20, 72-77.

Hori, M., Satoh, M., Furukawa, K., Sakamoto, Y., Hakamata, H., Komohara, Y., Takeya, M., Sasaki, Y., Miyazaki, A.,Horiuchi, S., 2004. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-2 (ACAT-2) is responsible for elevated intestinal ACAT activity in diabetic rats. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 1689-1695.

Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L.,Rider, M.H., 2006. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. J. Biol. Chem. 281, 5335-5340.

Hsieh, J., Hayashi, A.A., Webb, J.,Adeli, K., 2008. Postprandial dyslipidemia in insulin resistance: mechanisms and role of intestinal insulin sensitivity. Atheroscler. Suppl. 9, 7-13.

Huang, S.Czech, M.P., 2007. The GLUT4 glucose transporter. Cell Metab. 5, 237-252.

Hudson, E.R., Pan, D.A., James, J., Lucocq, J.M., Hawley, S.A., Green, K.A., Baba, O., Terashima, T.,Hardie, D.G., 2003. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. Curr. Biol. 13, 861-866.

Hundal, H.S., Ramlal, T., Reyes, R., Leiter, L.A.,Klip, A., 1992. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. Endocrinology. 131, 1165-1173.

Hundal, R.S., Krssak, M., Dufour, S., Laurent, D., Lebon, V., Chandramouli, V., Inzucchi, S.E., Schumann, W.C., Petersen, K.F., Landau, B.R.,Shulman, G.I., 2000. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. Diabetes. 49, 2063-2069.

Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H.,Bakillah, A., 1996. Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. Biochim. Biophys. Acta. 1300, 151-170.

Huypens, P., Moens, K., Heimberg, H., Ling, Z., Pipeleers, D.,Van de Casteele, M., 2005. Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells. Life Sci. 77, 1273-1282.

Iglesias, M.A., Furler, S.M., Cooney, G.J., Kraegen, E.W.,Ye, J.M., 2004. AMP-activated protein kinase activation by AICAR increases both muscle fatty acid and glucose uptake in white muscle of insulin-resistant rats in vivo. Diabetes. 53, 1649-1654.

Ikeda, T., Iwata, K.,Murakami, H., 2000. Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine. Biochem. Pharmacol. 59, 887-890.

Inigo, C., Patel, N., Kellett, G.L., Barber, A.,Lostao, M.P., 2007. Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo. Acta Physiol (Oxf). 190, 303-310.

Inui, K., Yamamoto, M.,Saito, H., 1992. Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 261, 195-201.

Ishimura, A., Ishige, K., Taira, T., Shimba, S., Ono, S., Ariga, H., Tezuka, M.,Ito, Y., 2008. Comparative study of hydrogen peroxide- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced cell death in HT22 cells. Neurochem. Int. 52, 776-785.

Jang, H.J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R.F.,Egan, J.M., 2007. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 15069-15074.

Je, J.H., Lee, J.Y., Jung, K.J., Sung, B., Go, E.K., Yu, B.P.,Chung, H.Y., 2004. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. FEBS Lett. 566, 183-189.

Jelenik, T., Rossmeisl, M., Kuda, O., Jilkova, Z.M., Medrikova, D., Kus, V., Hensler, M., Janovska, P., Miksik, I., Baranowski, M., Gorski, J., Hebrard, S., Jensen, T.E., Flachs, P., Hawley, S., Viollet, B.,Kopecky, J., 2010. AMP-activated protein kinase alpha2 subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. Diabetes. 59, 2737-2746.

Jones, B., Jones, E.L., Bonney, S.A., Patel, H.N., Mensenkamp, A.R., Eichenbaum-Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., Meadows, N., Quattrone, A., Islam, S.A., Naoumova, R.P., Angelin, B., Infante, R., Levy, E., Roy, C.C., Freemont, P.S., Scott, J.,Shoulders, C.C., 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. Nat. Genet. 34, 29-31.

Jorgensen, S.B., Treebak, J.T., Viollet, B., Schjerling, P., Vaulont, S., Wojtaszewski, J.F.,Richter, E.A., 2007. Role of AMPKalpha2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 292, E331-E339.

Jorgensen, S.B., Viollet, B., Andreelli, F., Frosig, C., Birk, J.B., Schjerling, P., Vaulont, S., Richter, E.A.,Wojtaszewski, J.F., 2004. Knockout of the alpha2 but not alpha1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle. J. Biol. Chem. 279, 1070-1079.

Jumarie, C.Malo, C., 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. J. Cell Physiol. 149, 24-33.

Kadowaki, T., Yamauchi, T.,Kubota, N., 2008. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. FEBS Lett. 582, 74-80.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D.,Hardie, D.G., 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. Cell Metab. 1, 15-25.

Kaikaus, R.M., Bass, N.M.,Ockner, R.K., 1990. Functions of fatty acid binding proteins. Experientia. 46, 617-630.

Kanazawa, K.Ashida, H., 1998a. Catabolic fate of dietary trilinoleoylglycerol hydroperoxides in rat gastrointestines. Biochim. Biophys. Acta. 1393, 336-348.

Kanazawa, K.Ashida, H., 1998b. Dietary hydroperoxides of linoleic acid decompose to aldehydes in stomach before being absorbed into the body. Biochim. Biophys. Acta. 1393, 349-361.

Kaushik, V.K., Young, M.E., Dean, D.J., Kurowski, T.G., Saha, A.K.,Ruderman, N.B., 2001. Regulation of fatty acid oxidation and glucose metabolism in rat soleus muscle: effects of AICAR. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 281, E335-E340.

Kellett, G.L., 2001. The facilitated component of intestinal glucose absorption. J. Physiol. 531, 585-595.

Kellett, G.L.Helliwell, P.A., 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. Biochem. J. 350 Pt 1, 155-162.

Kellett, G.L., Jamal, A., Robertson, J.P.,Wollen, N., 1984. The acute regulation of glucose absorption, transport and metabolism in rat small intestine by insulin in vivo. Biochem. J. 219, 1027-1035.

Kido, Y., Nakae, J.,Accili, D., 2001. Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 972-979.

Kim, S.K.Novak, R.F., 2007. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. Pharmacol. Ther. 113, 88-120.

Kim, Y.D., Park, K.G., Lee, Y.S., Park, Y.Y., Kim, D.K., Nedumaran, B., Jang, W.G., Cho, W.J., Ha, J., Lee, I.K., Lee, C.H.,Choi, H.S., 2008. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. Diabetes. 57, 306-314.

Kinoshita, M., Ohnishi, H., Maeda, T., Yoshimura, N., Takeoka, Y., Yasuda, D., Kusano, J., Mashimo, Y., Saito, S., Shimamoto, K.,Teramoto, T., 2009. Increased serum apolipoprotein B48 concentration in patients with metabolic syndrome. J. Atheroscler. Thromb. 16, 517-522.

Klippert, P., Borm, P.,Noordhoek, J., 1982. Prediction of intestinal first-pass effect of phenacetin in the rat from enzyme kinetic data--correlation with in vivo data using mucosal blood flow. Biochem. Pharmacol. 31, 2545-2548.

Koh, H.J., Hirshman, M.F., He, H., Li, Y., Manabe, Y., Balschi, J.A.,Goodyear, L.J., 2007. Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. Biochem. J. 403, 473-481.

Koschak, A., Reimer, D., Huber, I., Grabner, M., Glossmann, H., Engel, J.,Striessnig, J., 2001. alpha 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca2+ channels activating at negative voltages. J. Biol. Chem. 276, 22100-22106.

Kovacic, S., Soltys, C.L., Barr, A.J., Shiojima, I., Walsh, K.,Dyck, J.R., 2003. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. J. Biol. Chem. 278, 39422-39427.

Kraegen, E.W., Saha, A.K., Preston, E., Wilks, D., Hoy, A.J., Cooney, G.J.,Ruderman, N.B., 2006. Increased malonyl-CoA and diacylglycerol content and reduced AMPK activity accompany insulin resistance induced by glucose infusion in muscle and liver of rats. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 290, E471-E479.

Kramer, H.F., Witczak, C.A., Fujii, N., Jessen, N., Taylor, E.B., Arnolds, D.E., Sakamoto, K., Hirshman, M.F.,Goodyear, L.J., 2006. Distinct signals regulate AS160 phosphorylation in response to insulin, AICAR, and contraction in mouse skeletal muscle. Diabetes. 55, 2067-2076.

Krimi, R.B., Letteron, P., Chedid, P., Nazaret, C., Ducroc, R.,Marie, J.C., 2009. Resistin-like molecule-beta inhibits SGLT-1 activity and enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport. Diabetes. 58, 2032-2038.

Kristal, B.S., Park, B.K.,Yu, B.P., 1996. 4-Hydroxyhexenal is a potent inducer of the mitochondrial permeability transition. J. Biol. Chem. 271, 6033-6038.

Krusinova, E.Pelikanova, T., 2008. Fatty acid binding proteins in adipose tissue: a promising link between metabolic syndrome and atherosclerosis? Diabetes Res. Clin. Pract. 82 Suppl 2, S127-S134.

Kudoh, A., Satoh, H., Hirai, H.,Watanabe, T., 2011. Pioglitazone upregulates adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. Life Sci. 88, 1055-1062.

Kurth-Kraczek, E.J., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J.,Winder, W.W., 1999. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. Diabetes. 48, 1667-1671.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.

Lally, S., Owens, D.,Tomkin, G.H., 2007. The different effect of pioglitazone as compared to insulin on expression of hepatic and intestinal genes regulating post-prandial lipoproteins in diabetes. Atherosclerosis. 193, 343-351.

Lally, S., Tan, C.Y., Owens, D.,Tomkin, G.H., 2006. Messenger RNA levels of genes involved in dysregulation of postprandial lipoproteins in type 2 diabetes: the role of Niemann-Pick C1-like 1, ATP-binding cassette, transporters G5 and G8, and of microsomal triglyceride transfer protein. Diabetologia. 49, 1008-1016.

Le, G.M., Tobin, V., Stolarczyk, E., Dalet, V., Leturque, A.,Brot-Laroche, E., 2007. Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. J. Cell Physiol. 213, 834-843.

LeBrasseur, N.K., Kelly, M., Tsao, T.S., Farmer, S.R., Saha, A.K., Ruderman, N.B.,Tomas, E., 2006. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 291, E175-E181.

Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A.,Viollet, B., 2001. Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase. Diabetes. 50, 1515-1521.

Lee, H.M., Lee, O.H., Kim, K.J.,Lee, B.Y., 2011. Ginsenoside Rg1 Promotes Glucose Uptake Through Activated AMPK Pathway in Insulin-resistant Muscle Cells. Phytother. Res.

Lee, J.Y., Je, J.H., Jung, K.J., Yu, B.P.,Chung, H.Y., 2004a. Induction of endothelial iNOS by 4-hydroxyhexenal through NF-kappaB activation. Free Radic. Biol. Med. 37, 539-548.

Lee, J.Y., Je, J.H., Kim, D.H., Chung, S.W., Zou, Y., Kim, N.D., Ae, Y.M., Suck, B.H., Yu, B.P.,Chung, H.Y., 2004b. Induction of endothelial apoptosis by 4-hydroxyhexenal. Eur. J. Biochem. 271, 1339-1347.

Lehmann, J.M., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Wilkison, W.O., Willson, T.M.,Kliewer, S.A., 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome

proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J. Biol. Chem. 270, 12953-12956.

Leonarduzzi, G., Robbesyn, F.,Poli, G., 2004. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. Free Radic. Biol. Med. 37, 1694-1702.

Levy E, 2000. Digestion and absorption of carbohydrates, fat and proteins. 162-182.

Levy, E., 1996. The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport. Clin. Invest Med. 19, 317-324.

Levy, E., Harmel, E., Laville, M., Sanchez, R., Emonnot, L., Sinnett, D., Ziv, E., Delvin, E., Couture, P., Marcil, V.,Sane, A.T., 2011. Expression of Sar1b enhances chylomicron assembly and key components of the coat protein complex II system driving vesicle budding. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31, 2692-2699.

Levy, E., Loirdighi, N., Thibault, L., Nguyen, T.D., Labuda, D., Delvin, E.,Menard, D., 1996. Lipid processing and lipoprotein synthesis by the developing human fetal colon. Am. J. Physiol. 270, G813-G820.

Levy, E., Marcel, Y., Deckelbaum, R.J., Milne, R., Lepage, G., Seidman, E., Bendayan, M.,Roy, C.C., 1987a. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. J. Lipid Res. 28, 1263-1274.

Levy, E., Marcel, Y.L., Milne, R.W., Grey, V.L.,Roy, C.C., 1987b. Absence of intestinal synthesis of apolipoprotein B-48 in two cases of abetalipoproteinemia. Gastroenterology. 93, 1119-1126.

Levy, E., Mehran, M.,Seidman, E., 1995. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. FASEB J. 9, 626-635.

Levy, E., Menard, D., Suc, I., Delvin, E., Marcil, V., Brissette, L., Thibault, L.,Bendayan, M., 2004. Ontogeny, immunolocalisation, distribution and function of SR-BI in the human intestine. J. Cell Sci. 117, 327-337.

Lewis, G.F., Naples, M., Uffelman, K., Leung, N., Szeto, L.,Adeli, K., 2004. Intestinal lipoprotein production is stimulated by an acute elevation of plasma free fatty acids in the fasting state: studies in insulin-resistant and insulin-sensitized Syrian golden hamsters. Endocrinology. 145, 5006-5012.

Lihn, A.S., Jessen, N., Pedersen, S.B., Lund, S.,Richelsen, B., 2004. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. Biochem. Biophys. Res. Commun. 316, 853-858.

Liu, W., Akhand, A.A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Itoigawa, M., Kato, M., Suzuki, H., Ishikawa, N.,Nakashima, I., 2003. Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal. Cell Death. Differ. 10, 772-781.

Liu, Z.Cao, W., 2009. p38 mitogen-activated protein kinase: a critical node linking insulin resistance and cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. Endocr. Metab Immune. Disord. Drug Targets. 9, 38-46.

Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G.,Alessi, D.R., 2004. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. EMBO J. 23, 833-843.

Lochhead, P.A., Salt, I.P., Walker, K.S., Hardie, D.G.,Sutherland, C., 2000. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. Diabetes. 49, 896-903.

Long, E.K., Rosenberger, T.A.,Picklo, M.J., Sr., 2010. Ethanol withdrawal increases glutathione adducts of 4-hydroxy-2-hexenal but not 4-hydroxyl-2-nonenal in the rat cerebral cortex. Free Radic. Biol. Med. 48, 384-390.

Long, Y.C.Zierath, J.R., 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. J. Clin. Invest. 116, 1776-1783.

Longnus, S.L., Segalen, C., Giudicelli, J., Sajan, M.P., Farese, R.V.,Van, O.E., 2005. Insulin signalling downstream of protein kinase B is potentiated by 5'AMP-activated protein kinase in rat hearts in vivo. Diabetologia. 48, 2591-2601.

Longnus, S.L., Wambolt, R.B., Parsons, H.L., Brownsey, R.W.,Allard, M.F., 2003. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1-beta -D-ribofuranoside (AICAR) stimulates myocardial glycogenolysis by allosteric mechanisms. Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol. 284, R936-R944.

Lorente-Cebrian, S., Bustos, M., Marti, A., Martinez, J.A.,Moreno-Aliaga, M.J., 2009. Eicosapentaenoic acid stimulates AMP-activated protein kinase and increases visfatin secretion in cultured murine adipocytes. Clin. Sci. (Lond). 117, 243-249.

Luo, Z., Zhang, Y., Li, F., He, J., Ding, H., Yan, L.,Cheng, H., 2009. Resistin induces insulin resistance by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms in HepG2 cells. Endocrine. 36, 60-69.

Ma, H., Guo, R., Yu, L., Zhang, Y.,Ren, J., 2011. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. Eur. Heart J. 32, 1025-1038.

Mace, O.J., Lister, N., Morgan, E., Shepherd, E., Affleck, J., Helliwell, P., Bronk, J.R., Kellett, G.L., Meredith, D., Boyd, R., Pieri, M., Bailey, P.D., Pettcrew, R.,Foley, D., 2009. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. J. Physiol. 587, 195-210.

Madara JL, 1994. The functional morphology of the mucosa of the small intestine. 1577-1622.

Madara, J.L.Pappenheimer, J.R., 1987. Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. J. Membr. Biol. 100, 149-164.

Madsen, K.L., Ariano, D.,Fedorak, R.N., 1996. Insulin downregulates diabetic-enhanced intestinal glucose transport rapidly in ileum and slowly in jejunum. Can. J. Physiol Pharmacol. 74, 1294-1301.

Magun, A.M., Brasitus, T.A.,Glickman, R.M., 1985. Isolation of high density lipoproteins from rat intestinal epithelial cells. J. Clin. Invest. 75, 209-218.

Mansbach CM, I.I., Dowell, R.F.,Pritchett, D., 1991. Portal transport of absorbed lipids in rats. Am. J. Physiol. 261, G530-G538.

Manz, F., Bickel, H., Brodehl, J., Feist, D., Gellissen, K., Gescholl-Bauer, B., Gilli, G., Harms, E., Helwig, H., Nutzenadel, W.,., 1987. Fanconi-Bickel syndrome. Pediatr. Nephrol. 1, 509-518.

Marcil, V., Peretti, N., Delvin, E.,Levy, E., 2004. [Digestive and absorptive processes of lipids]. Gastroenterol. Clin. Biol. 28, 1257-1266.

Margolskee, R.F., 2002. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. J. Biol. Chem. 277, 1-4.

Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L.,Bravo, L., 2005. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 827, 76-82.

Mehenni, H., Lin-Marq, N., Buchet-Poyau, K., Reymond, A., Collart, M.A., Picard, D.,Antonarakis, S.E., 2005. LKB1 interacts with and phosphorylates PTEN: a functional link between two proteins involved in cancer predisposing syndromes. Hum. Mol. Genet. 14, 2209-2219.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G.,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-E1112.

Michalski, M.C., Calzada, C., Makino, A., Michaud, S.,Guichardant, M., 2008. Oxidation products of polyunsaturated fatty acids in infant formulas compared to human milk--a preliminary study. Mol. Nutr. Food Res. 52, 1478-1485.

Michell, B.J., Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., House, C.M., Katsis, F., Witters, L.A.,Kemp, B.E., 1996. Isoform-specific purification and substrate specificity of the 5'-AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 271, 28445-28450.

Minehira, K.Tappy, L., 2002. Dietary and lifestyle interventions in the management of the metabolic syndrome: present status and future perspective. Eur. J. Clin. Nutr. 56, 7-

Mithieux, G., 2001. New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care. 4, 267-271.

Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A.,Saez, E., 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. Nature. 445, 219-223.

Momcilovic, M., Hong, S.P.,Carlson, M., 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. J. Biol. Chem. 281, 25336-25343.

Moore, F., Weekes, J.,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.

Morgan, E.L., Mace, O.J., Affleck, J.,Kellett, G.L., 2007. Apical GLUT2 and Cav1.3: regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. J. Physiol. 580, 593-604.

Muoio, D.M., Seefeld, K., Witters, L.A.,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.

Murphy, E.J., 1998. Sterol carrier protein-2 expression increases NBD-stearate uptake and cytoplasmic diffusion in L cells. Am. J. Physiol. 275, G237-G243.

Musi, N., Fujii, N., Hirshman, M.F., Ekberg, I., Froberg, S., Ljungqvist, O., Thorell, A.,Goodyear, L.J., 2001. AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise. Diabetes. 50, 921-927.

Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigo-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberdon, I., Tourette, J.A., Mithieux, G.,Rajas, F., 2011. Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. Diabetes. 60, 3121-3131.

Namkoong, C., Kim, M.S., Jang, P.G., Han, S.M., Park, H.S., Koh, E.H., Lee, W.J., Kim, J.Y., Park, I.S., Park, J.Y.,Lee, K.U., 2005. Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. Diabetes. 54, 63-68.

Niki, E., 2009. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. Free Radic. Biol. Med. 47, 469-484.

Nogueira, J.P., Maraninchi, M., Beliard, S., Padilla, N., Duvillard, L., Mancini, J., Nicolay, A., Xiao, C., Vialettes, B., Lewis, G.F.,Valero, R., 2012. Absence of Acute Inhibitory Effect of Insulin on Chylomicron Production in Type 2 Diabetes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.

Ohashi, K., Ishibashi, S., Yamamoto, M., Osuga, J., Yazaki, Y., Yukawa, S.,Yamada, N., 1998. A truncated species of apolipoprotein B (B-38.7) in a patient with homozygous hypobetalipoproteinemia associated with diabetes mellitus. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 18, 1330-1334.

Ohori, M., 2008. ERK inhibitors as a potential new therapy for rheumatoid arthritis. Drug News Perspect. 21, 245-250.

Ouadda, A.B., Levy, E., Ziv, E., Lalonde, G., Sane, A.T., Delvin, E.,Elchebly, M., 2009. Increased hepatic lipogenesis in insulin resistance and Type 2 diabetes is associated with AMPK signalling pathway up-regulation in Psammomys obesus. Biosci. Rep. 29, 283-292.

Owen, M.R., Doran, E.,Halestrap, A.P., 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. Biochem. J. 348 Pt 3, 607-614.

Palanivel, R.Sweeney, G., 2005. Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. FEBS Lett. 579, 5049-5054.

Pappenheimer, J.R.Reiss, K.Z., 1987. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. J. Membr. Biol. 100, 123-136.

Park, H., Kaushik, V.K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N.B.,Saha, A.K., 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. J. Biol. Chem. 277, 32571-32577.

Parthasarathy, S., Subbaiah, P.V.,Ganguly, J., 1974. The mechanism of intestinal absorption of phosphatidylcholine in rats. Biochem. J. 140, 503-508.

Pencek, R.R., Shearer, J., Camacho, R.C., James, F.D., Lacy, D.B., Fueger, P.T., Donahue, E.P., Snead, W.,Wasserman, D.H., 2005. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside causes acute hepatic insulin resistance in vivo. Diabetes. 54, 355-360.

Pennington, A.M., Corpe, C.P.,Kellett, G.L., 1994. Rapid regulation of rat jejunal glucose transport by insulin in a luminally and vascularly perfused preparation. J. Physiol. 478 (Pt 2), 187-193.

Pereira, S., Marliss, E.B., Morais, J.A., Chevalier, S.,Gougeon, R., 2008. Insulin resistance of protein metabolism in type 2 diabetes. Diabetes. 57, 56-63.

Petersen, D.R.Doorn, J.A., 2004. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. Free Radic. Biol. Med. 37, 937-945.

Phillips, C., Bennett, A., Anderton, K., Owens, D., Collins, P., White, D.,Tomkin, G.H., 2002. Intestinal rather than hepatic microsomal triglyceride transfer protein as a cause of postprandial dyslipidemia in diabetes. Metabolism. 51, 847-852.

Phillips, C., Mullan, K., Owens, D.,Tomkin, G.H., 2006. Intestinal microsomal triglyceride transfer protein in type 2 diabetic and non-diabetic subjects: the relationship to triglyceride-rich postprandial lipoprotein composition. Atherosclerosis. 187, 57-64.

Pillon, N., Zarrouki, B., Lagarde, M.,Soulage, C., 2009. Alteration of intracellular signaling pathways of insulin in muscle and fat cells by products of lipid peroxidation 4-

hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 4-hydroxy-hexenal (4-HHE). Diabetes & Metabolism. 35, A46-A47.

Pillon, N., Soulere, L., Lagarde, M.,Soulage, C., 2010. Alteration of the biological function of insulin by lipi peroxidation products in 4-hdroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Diabetes & Metabolism. 36, A33-A33.

Pillon, N.J., Croze, M.L., Vella, R.E., Soulere, L., Lagarde, M.,Soulage, C.O., 2012. The Lipid Peroxidation By-Product 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) Induces Insulin Resistance in Skeletal Muscle through Both Carbonyl and Oxidative Stress. Endocrinology. 153, 2099-2111.

Pizzimenti, S., Menegatti, E., Berardi, D., Toaldo, C., Pettazzoni, P., Minelli, R., Giglioni, B., Cerbone, A., Dianzani, M.U., Ferretti, C.,Barrera, G., 2010. 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product of dietary polyunsaturated fatty acids, has anticarcinogenic properties in colon carcinoma cell lines through the inhibition of telomerase activity. J. Nutr. Biochem. 21, 818-826.

Porter, N.A., Caldwell, S.E.,Mills, K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. Lipids. 30, 277-290.

Pre, J., 1991. [Lipid peroxidation]. Pathol. Biol. (Paris). 39, 716-736.

Proctor, W.R., Bourdet, D.L.,Thakker, D.R., 2008. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. Drug Metab Dispos. 36, 1650-1658.

Qin, B., Dawson, H.,Anderson, R.A., 2010. Elevation of tumor necrosis factor-alpha induces the overproduction of postprandial intestinal apolipoprotein B48-containing very low-density lipoprotein particles: evidence for related gene expression of inflammatory, insulin and lipoprotein signaling in enterocytes. Exp. Biol. Med. (Maywood.). 235, 199-205.

Qin, B., Qiu, W., Avramoglu, R.K.,Adeli, K., 2007. Tumor necrosis factor-alpha induces intestinal insulin resistance and stimulates the overproduction of intestinal apolipoprotein B48-containing lipoproteins. Diabetes. 56, 450-461.

Quan, H.Y., Yuan, H.D., Jung, M.S., Ko, S.K., Park, Y.G.,Chung, S.H., 2012. Ginsenoside Re lowers blood glucose and lipid levels via activation of AMP-activated protein kinase in HepG2 cells and high-fat diet fed mice. Int. J. Mol. Med. 29, 73-80.

Quentin, T., Kitz, J., Steinmetz, M., Poppe, A., Bar, K.,Kratzner, R., 2011. Different expression of the catalytic alpha subunits of the AMP activated protein kinase--an immunohistochemical study in human tissue. Histol. Histopathol. 26, 589-596.

Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C.,Mithieux, G., 1999. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. Gastroenterology. 117, 132-139.

Rajas, F., Croset, M., Zitoun, C., Montano, S.,Mithieux, G., 2000. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. Diabetes. 49, 1165-1168.

Ravid, Z., Bendayan, M., Delvin, E., Sane, A.T., Elchebly, M., Lafond, J., Lambert, M., Mailhot, G.,Levy, E., 2008. Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol. 295, G873-G885.

Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M.,Mangelsdorf, D.J., 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science. 289, 1524-1529.

Richards, S.K., Parton, L.E., Leclerc, I., Rutter, G.A.,Smith, R.M., 2005. Over-expression of AMP-activated protein kinase impairs pancreatic {beta}-cell function in vivo. J. Endocrinol. 187, 225-235.

Rosensweig, N.S., 1972. Dietary sugars and intestinal enzymes. J. Am. Diet. Assoc. 60, 483-486.

Rossi, M.A., Fidale, F., Garramone, A., Esterbauer, H.,Dianzani, M.U., 1990. Effect of 4-hydroxylalkenals on hepatic phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-phospholipase C. Biochem. Pharmacol. 39, 1715-1719.

Roy, C.C., Levy, E., Green, P.H., Sniderman, A., Letarte, J., Buts, J.P., Orquin, J., Brochu, P., Weber, A.M., Morin, C.L.,., 1987. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. Gastroenterology. 92, 390-399.

Ruderman, N.B., Park, H., Kaushik, V.K., Dean, D., Constant, S., Prentki, M.,Saha, A.K., 2003. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. Acta Physiol Scand. 178, 435-442.

Ruef, J., Moser, M., Bode, C., Kubler, W.,Runge, M.S., 2001. 4-hydroxynonenal induces apoptosis, NF-kappaB-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells. Basic Res. Cardiol. 96, 143-150.

Russell, A.P., Gastaldi, G., Bobbioni-Harsch, E., Arboit, P., Gobelet, C., Deriaz, O., Golay, A., Witztum, J.L.,Giacobino, J.P., 2003. Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? FEBS Lett. 551, 104-106.

Saha, A.K., Avilucea, P.R., Ye, J.M., Assifi, M.M., Kraegen, E.W.,Ruderman, N.B., 2004. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 314, 580-585.

Saha, A.K., Xu, X.J., Lawson, E., Deoliveira, R., Brandon, A.E., Kraegen, E.W.,Ruderman, N.B., 2010. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. Diabetes. 59, 2426-2434.

Sakar, Y., Meddah, B., Faouzi, M.A., Cherrah, Y., Bado, A.,Ducroc, R., 2010. Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporters. J. Physiol Pharmacol. 61, 301-307.

Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D.,Hardie, D.G., 1998. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. Biochem. J. 334 (Pt 1), 177-187.

Saltiel, A.R.Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 414, 799-806.

Sambuy, Y., De, A., I, Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A.,Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol. Toxicol. 21, 1-26.

Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A.,Carling, D., 2007. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. Biochem. J. 403, 139-148.

Santer, R., Hillebrand, G., Steinmann, B.,Schaub, J., 2003. Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. Gastroenterology. 124, 34-39.

Santer, R., Schneppenheim, R., Dombrowski, A., Gotze, H., Steinmann, B.,Schaub, J., 1997. Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. Nat. Genet. 17, 324-326.

Sasase, T., Morinaga, H., Yamamoto, H., Ogawa, N., Matsui, K., Miyajima, K., Kawai, T., Mera, Y., Masuyama, T., Shinohara, M., Ohta, T.,Matsushita, M., 2007. Increased fat absorption and impaired fat clearance cause postprandial hypertriglyceridemia in Spontaneously Diabetic Torii rat. Diabetes Res. Clin. Pract. 78, 8-15.

Sayre, L.M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X.,Tang, X., 2006. Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. Drug Metab Rev. 38, 651-675.

Schaur, R.J., 2003. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. Mol. Aspects Med. 24, 149-159.

Schultze, S.M., Hemmings, B.A., Niessen, M.,Tschopp, O., 2012. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. Expert. Rev. Mol. Med. 14, e1-

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G.,Hardie, D.G., 2004. CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. J. Clin. Invest. 113, 274-284.

Scott, J.W., Van Denderen, B.J., Jorgensen, S.B., Honeyman, J.E., Steinberg, G.R., Oakhill, J.S., Iseli, T.J., Koay, A., Gooley, P.R., Stapleton, D.,Kemp, B.E., 2008. Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. Chem. Biol. 15, 1220-1230.

Sengupta, T.K., Leclerc, G.M., Hsieh-Kinser, T.T., Leclerc, G.J., Singh, I.,Barredo, J.C., 2007. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside

(AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. Mol. Cancer. 6, 46-

Seo, E., Park, E.J., Joe, Y., Kang, S., Kim, M.S., Hong, S.H., Park, M.K., Kim, D.K., Koh, H.,Lee, H.J., 2009. Overexpression of AMPKalpha1 Ameliorates Fatty Liver in Hyperlipidemic Diabetic Rats. Korean J. Physiol Pharmacol. 13, 449-454.

Serhan, M.F.Kreydiyyeh, S.I., 2010. Insulin down-regulates the Na+/K+ ATPase in enterocytes but increases intestinal glucose absorption. Gen. Comp Endocrinol. 167, 228-233.

Shaw, C.S., Clark, J.,Wagenmakers, A.J., 2010. The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. Annu. Rev. Nutr. 30, 13-34.

Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., DePinho, R.A., Montminy, M.,Cantley, L.C., 2005. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. Science. 310, 1642-1646.

She, P., Burgess, S.C., Shiota, M., Flakoll, P., Donahue, E.P., Malloy, C.R., Sherry, A.D.,Magnuson, M.A., 2003. Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. Diabetes. 52, 1649-1654.

Shearn, C.T., Fritz, K.S., Reigan, P.,Petersen, D.R., 2011. Modification of Akt2 by 4-hydroxynonenal inhibits insulin-dependent Akt signaling in HepG2 cells. Biochemistry. 50, 3984-3996.

Shefer, S., Hauser, S., Lapar, V.,Mosbach, E.H., 1972. HMG CoA reductase of intestinal mucosa and liver of the rat. J. Lipid Res. 13, 402-412.

Singh, S.P., Niemczyk, M., Saini, D., Awasthi, Y.C., Zimniak, L.,Zimniak, P., 2008. Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. Biochemistry. 47, 3900-3911.

Singh, S.P., Niemczyk, M., Zimniak, L.,Zimniak, P., 2009. Fat accumulation in Caenorhabditis elegans triggered by the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal (4-HNE). Aging (Albany. NY). 1, 68-80.

SLATER, T.F., SAWYER, B.,STRAEULI, U., 1963. STUDIES ON SUCCINATE-TETRAZOLIUM REDUCTASE SYSTEMS. III. POINTS OF COUPLING OF FOUR DIFFERENT TETRAZOLIUM SALTS. Biochim. Biophys. Acta. 77, 383-393.

Soares, A.F., Guichardant, M., Cozzone, D., Bernoud-Hubac, N., Bouzaidi-Tiali, N., Lagarde, M.,Geloen, A., 2005. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. Free Radic. Biol. Med. 38, 882-889.

Soulere, L., Queneau, Y.,Doutheau, A., 2007. An expeditious synthesis of 4-hydroxy-2E-nonenal (4-HNE), its dimethyl acetal and of related compounds. Chem. Phys. Lipids. 150, 239-243.

Spady, D.K.Dietschy, J.M., 1983. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. J. Lipid Res. 24, 303-315.

Stange, E.F., Preclik, G., Schneider, A., Seiffer, E.,Ditschunneit, H., 1981. Hormonal regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and alkaline phosphatase in cultured intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta. 678, 202-206.

Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A.,Kemp, B.E., 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. J. Biol. Chem. 271, 611-614.

Steinberg, G.R., Smith, A.C., Van Denderen, B.J., Chen, Z., Murthy, S., Campbell, D.J., Heigenhauser, G.J., Dyck, D.J.,Kemp, B.E., 2004. AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 4575-4580.

Steiner, G.Lewis, G.F., 1996. Hyperinsulinemia and triglyceride-rich lipoproteins. Diabetes. 45 Suppl 3, S24-S26.

Stumpel, F., Burcelin, R., Jungermann, K.,Thorens, B., 2001. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 11330-11335.

Stumpel, F., Kucera, T., Gardemann, A.,Jungermann, K., 1996. Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption via hepatoenteral nerves in the rat. Gastroenterology. 110, 1863-1869.

Sullivan, J.E., Brocklehurst, K.J., Marley, A.E., Carey, F., Carling, D.,Beri, R.K., 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. FEBS Lett. 353, 33-36.

Surh, J., Lee, S.,Kwon, H., 2007. 4-hydroxy-2-alkenals in polyunsaturated fatty acids-fortified infant formulas and other commercial food products. Food Addit. Contam. 24, 1209-1218.

Sylven, C.Nordstrom, C., 1970. The site of absorption of cholesterol and sitosterol in the rat small intestine. Scand. J. Gastroenterol. 5, 57-63.

Takekoshi, K., Fukuhara, M., Quin, Z., Nissato, S., Isobe, K., Kawakami, Y.,Ohmori, H., 2006. Long-term exercise stimulates adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and subunit expression in rat visceral adipose tissue and liver. Metabolism. 55, 1122-1128.

Tanaka, T., Hidaka, S., Masuzaki, H., Yasue, S., Minokoshi, Y., Ebihara, K., Chusho, H., Ogawa, Y., Toyoda, T., Sato, K., Miyanaga, F., Fujimoto, M., Tomita, T., Kusakabe, T., Kobayashi, N., Tanioka, H., Hayashi, T., Hosoda, K., Yoshimatsu, H., Sakata, T.,Nakao, K., 2005. Skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation parallels metabolic phenotype in leptin transgenic mice under dietary modification. Diabetes. 54, 2365-2374.

Tang, V.W.Goodenough, D.A., 2003. Paracellular ion channel at the tight junction. Biophys. J. 84, 1660-1673.

Thomson, A.B., Keelan, M., Clandinin, M.T., Rajotte, R.V., Cheeseman, C.I.,Walker, K., 1987. Treatment of the enhanced intestinal uptake of glucose in diabetic rats with a polyunsaturated fatty acid diet. Biochim. Biophys. Acta. 905, 426-434.

Thomson, A.B., Keelan, M., Rajotte, R.V., Cheng, T., Fedorak, R.N., Cheeseman, C.,Clandinin, M.T., 1990. Long-term effects of manipulations of dietary omega-3 fatty acids on clinical control and in vitro uptake of glucose and lipids in diabetic rats. Diabetes Res. 15, 85-93.

Thomson, A.B.Rajotte, R., 1983. Effect of dietary modification on the uptake of glucose, fatty acids, and alcohols in diabetic rats. Am. J. Clin. Nutr. 38, 394-403.

Thomson, A.B., Schoeller, C., Keelan, M., Smith, L.,Clandinin, M.T., 1993. Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. Can. J. Physiol Pharmacol. 71, 531-555.

Thwaites, D.T., McEwan, G.T., Cook, M.J., Hirst, B.H.,Simmons, N.L., 1993. H(+)-coupled (Na(+)-independent) proline transport in human intestinal (Caco-2) epithelial cell monolayers. FEBS Lett. 333, 78-82.

Tobin, V., Le, G.M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A.G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M.H., Magnan, C., Leturque, A.,Brot-Laroche, E., 2008. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. Diabetes. 57, 555-562.

Tomkin, G.H., 2008. The intestine as a regulator of cholesterol homeostasis in diabetes. Atheroscler. Suppl. 9, 27-32.

Treebak, J.T., Birk, J.B., Rose, A.J., Kiens, B., Richter, E.A.,Wojtaszewski, J.F., 2007. AS160 phosphorylation is associated with activation of alpha2beta2gamma1- but not alpha2beta2gamma3-AMPK trimeric complex in skeletal muscle during exercise in humans. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 292, E715-E722.

Treebak, J.T., Glund, S., Deshmukh, A., Klein, D.K., Long, Y.C., Jensen, T.E., Jorgensen, S.B., Viollet, B., Andersson, L., Neumann, D., Wallimann, T., Richter, E.A., Chibalin, A.V., Zierath, J.R.,Wojtaszewski, J.F., 2006. AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. Diabetes. 55, 2051-2058.

Tzatsos, A.Kandror, K.V., 2006. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. Mol. Cell Biol. 26, 63-76.

Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y.,Osawa, T., 1999. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. J. Biol. Chem. 274, 2234-2242.

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

Vaillancourt, F., Fahmi, H., Shi, Q., Lavigne, P., Ranger, P., Fernandes, J.C.,Benderdour, M., 2008. 4-Hydroxynonenal induces apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes: the protective role of glutathione-S-transferase. Arthritis Res. Ther. 10, R107-

van Kuijk, F.J., Siakotos, A.N., Fong, L.G., Stephens, R.J.,Thomas, D.W., 1995. Quantitative measurement of 4-hydroxyalkenals in oxidized low-density lipoprotein by gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Biochem. 224, 420-424.

van, V.W., Korsse, S.E., van de Laar, L.,Peppelenbosch, M.P., 2011. The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. Oncogene. 30, 2289-2303.

Vazquez, M.J., Gonzalez, C.R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., Williams, L.M., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Lopez, M.,Dieguez, C., 2008. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. Endocrinology. 149, 4534-4543.

Veerkamp, J.H., 1995. Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins. Proc. Nutr. Soc. 54, 23-37.

Veerkamp, J.H., van Kuppevelt, T.H., Maatman, R.G.,Prinsen, C.F., 1993. Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid-binding proteins. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 49, 887-906.

Velasco, G., Geelen, M.J.,Guzman, M., 1997. Control of hepatic fatty acid oxidation by 5'-AMP-activated protein kinase involves a malonyl-CoA-dependent and a malonyl-CoA-independent mechanism. Arch. Biochem. Biophys. 337, 169-175.

Vestergaard, E.T., Gormsen, L.C., Jessen, N., Lund, S., Hansen, T.K., Moller, N.,Jorgensen, J.O., 2008. Ghrelin infusion in humans induces acute insulin resistance and lipolysis independent of growth hormone signaling. Diabetes. 57, 3205-3210.

Villena, J.A., Viollet, B., Andreelli, F., Kahn, A., Vaulont, S.,Sul, H.S., 2004. Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase-alpha2 subunit. Diabetes. 53, 2242-2249.

Vincent, M.F., Marangos, P.J., Gruber, H.E.,Van den Berghe, G., 1991. Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes. Diabetes. 40, 1259-1266.

Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Flamez, D., Mu, J., Wojtaszewski, J.F., Schuit, F.C., Birnbaum, M., Richter, E., Burcelin, R.,Vaulont, S., 2003a. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. Biochem. Soc. Trans. 31, 216-219.

Viollet, B., Andreelli, F., Jorgensen, S.B., Perrin, C., Geloen, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Bennoun, M., Gomas, E., Nicolas, G., Wojtaszewski, J.F., Kahn, A., Carling, D., Schuit, F.C., Birnbaum, M.J., Richter, E.A., Burcelin, R.,Vaulont, S., 2003b. The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. J. Clin. Invest. 111, 91-98.

Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hebrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F.,Foretz, M., 2009. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. Acta Physiol (Oxf). 196, 81-98.

Walker, J., Jijon, H.B., Diaz, H., Salehi, P., Churchill, T.,Madsen, K.L., 2005. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK. Biochem. J. 385, 485-491.

Webster, I., Friedrich, S.O., Lochner, A.,Huisamen, B., 2010. AMP kinase activation and glut4 translocation in isolated cardiomyocytes. Cardiovasc. J. Afr. 21, 72-78.

Westergaard, H., 1989. Insulin modulates rat intestinal glucose transport: effect of hypoinsulinemia and hyperinsulinemia. Am. J. Physiol. 256, G911-G918.

White, M.F., 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab. 283, E413-E422.

Wilcock, C.Bailey, C.J., 1991. Reconsideration of inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption. J. Pharm. Pharmacol. 43, 120-121.

Wilson, R., Lyall, K., Smyth, L., Fernie, C.E.,Riemersma, R.A., 2002. Dietary hydroxy fatty acids are absorbed in humans: implications for the measurement of 'oxidative stress' in vivo. Free Radic. Biol. Med. 32, 162-168.

Winnick, J.J., An, Z., Ramnanan, C.J., Smith, M., Irimia, J.M., Neal, D.W., Moore, M.C., Roach, P.J.,Cherrington, A.D., 2011. Hepatic glycogen supercompensation activates AMP-activated protein kinase, impairs insulin signaling, and reduces glycogen deposition in the liver. Diabetes. 60, 398-407.

Witters, L.A., Gao, G., Kemp, B.E.,Quistorff, B., 1994. Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states. Arch. Biochem. Biophys. 308, 413-419.

Wojtaszewski, J.F., Birk, J.B., Frosig, C., Holten, M., Pilegaard, H.,Dela, F., 2005. 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. J. Physiol. 564, 563-573.

Wojtaszewski, J.F., Nielsen, P., Hansen, B.F., Richter, E.A.,Kiens, B., 2000. Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. J. Physiol. 528 Pt 1, 221-226.

Wollen, N.Kellett, G.L., 1988. Regulation of glucose homeostasis in rat jejunum by despentapeptide-insulin in vitro. Gut. 29, 1064-1069.

Wong, K.A.Lodish, H.F., 2006. A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits. J. Biol. Chem. 281, 36434-36442.

Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M.,Carling, D., 2005. Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. Cell Metab. 2, 21-33.

Woolf, T.B.Tychko, M., 1998. Simulations of fatty acid-binding proteins. II. Sites for discrimination of monounsaturated ligands. Biophys. J. 74, 694-707.

Wu, M.S., Johnston, P., Sheu, W.H., Hollenbeck, C.B., Jeng, C.Y., Goldfine, I.D., Chen, Y.D.,Reaven, G.M., 1990. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. Diabetes Care. 13, 1-8.

Wu, Y., Song, P., Xu, J., Zhang, M.,Zou, M.H., 2007. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. J. Biol. Chem. 282, 9777-9788.

Wyss-Coray, T.Rogers, J., 2012. Inflammation in Alzheimer disease-a brief review of the basic science and clinical literature. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2, a006346-

Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., Martin, S.R., Carling, D.,Gamblin, S.J., 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. Nature. 449, 496-500.

Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D.,Zou, M.H., 2008. Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. Circulation. 117, 952-962.

Yamada, S., Funada, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Kawai, Y., Tatsuda, E., Furuhata, A.,Uchida, K., 2004. Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids. J. Lipid Res. 45, 626-634.

Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B.,Kadowaki, T., 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat. Med. 8, 1288-1295.

Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Ide, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Miki, H., Tsuchida, A., Akanuma, Y., Nagai, R., Kimura, S.,Kadowaki, T., 2001. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. J. Biol. Chem. 276, 41245-41254.

Yang, J., Maika, S., Craddock, L., King, J.A.,Liu, Z.M., 2008. Chronic activation of AMP-activated protein kinase-alpha1 in liver leads to decreased adiposity in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 370, 248-253.

Yu, X., McCorkle, S., Wang, M., Lee, Y., Li, J., Saha, A.K., Unger, R.H.,Ruderman, N.B., 2004. Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. Diabetologia. 47, 2012-2021.

Zang, M., Zuccollo, A., Hou, X., Nagata, D., Walsh, K., Herscovitz, H., Brecher, P., Ruderman, N.B.,Cohen, R.A., 2004. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. J. Biol. Chem. 279, 47898-47905.

Zhang, J., Gao, Z., Yin, J., Quon, M.J.,Ye, J., 2008. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. J. Biol. Chem. 283, 35375-35382.

Zhang, W.Y., Lee, J.J., Kim, I.S., Kim, Y., Park, J.S.,Myung, C.S., 2010. 7-O-methylaromadendrin stimulates glucose uptake and improves insulin resistance in vitro. Biol. Pharm. Bull. 33, 1494-1499.

Zheng, Y., Scow, J.S., Duenes, J.A.,Sarr, M.G., 2012. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. Surgery. 151, 13-25.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J.,Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J. Clin. Invest. 108, 1167-1174.

Zilversmit, D.B., 1995. Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. Clin. Chem. 41, 153-158.

Zoltowska, M., Ziv, E., Delvin, E., Sinnett, D., Kalman, R., Garofalo, C., Seidman, E.,Levy, E., 2003. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in Psammomys obesus: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. Diabetes. 52, 2539-2545.

Zong, H., Ren, J.M., Young, L.H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M.J.,Shulman, G.I., 2002. AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 15983-15987.

Zou, M.H., Kirkpatrick, S.S., Davis, B.J., Nelson, J.S., Wiles, W.G., Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M.B.,Goldman, M.H., 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. J. Biol. Chem. 279, 43940-43951.

ANNEXE

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology
Journal of the American Heart Association

American Heart Association®
Learn and Live℠

Expression of Sar1b Enhances Chylomicron Assembly and Key Components of the Coat Protein Complex II System Driving Vesicle Budding

Emile Levy, Elodie Harmel, Martine Laville, Rocio Sanchez, Léa Emonnot, Daniel Sinnett, Ehud Ziv, Edgard Delvin, Patrick Couture, Valérie Marcil and Alain T. Sane

Arterioscler Thromb Vasc Biol published online August 11, 2011
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514
Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://atvb.ahajournals.org/content/early/2011/08/11/ATVBAHA.111.233908

Data Supplement (unedited) at:
http://atvb.ahajournals.org/http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/08/11/ATVBAHA.111.233908.DC1.html

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at
http://atvb.ahajournals.org//subscriptions/

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
http://www.lww.com/reprints

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

Journal of the American Heart Association



Expression of Sar1b Enhances Chylomicron Assembly and Key Components of the Coat Protein Complex II System Driving Vesicle Budding

Emile Levy, Elodie Harmel, Martine Laville, Rocio Sanchez, Léa Emonnot, Daniel Sinnett, Ehud Ziv, Edgard Delvin, Patrick Couture, Valérie Marcil and Alain T. Sane

Arterioscler Thromb Vasc Biol published online August 11, 2011
Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association. 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 72514
Copyright © 2011 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://atvb.ahajournals.org/content/early/2011/08/11/ATVBAHA.111.233908

Data Supplement (unedited) at:
http://atvb.ahajournals.org/http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2011/08/11/ATVBAHA.111.233908.DC1.html

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is online at
http://atvb.ahajournals.org//subscriptions/

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
http://www.lww.com/reprints

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Expression of Sar1b Enhances Chylomicron Assembly and Key Components of the Coat Protein Complex II System Driving Vesicle Budding

Emile Levy, Elodie Harmel, Martine Laville, Rocio Sanchez, Léa Emonnot, Daniel Sinnett, Ehud Ziv, Edgard Delvin, Patrick Couture, Valérie Marcil, Alain T. Sane

Objective—SAR1b plays a significant role in the assembly, organization, and function of the coat protein complex II, a critical complex for the transport of proteins from the endoplasmic reticulum to the Golgi. Recently, mutations in *SARA2* have been associated with lipid absorption disorders. However, functional studies on Sar1b-mediated lipid synthesis pathways and lipoprotein packaging have not been performed.

Methods and Results—Sar1b was overexpressed in Caco-2/15 cells and resulted in significantly augmented triacylglycerol, cholesteryl ester, and phospholipid esterification and secretion and markedly enhanced chylomicron production. It also stimulated monoacylglycerol acyltransferase/diacylglycerol acyltransferase activity and enhanced apolipoprotein B-48 protein synthesis, as well as elevated microsomal triglyceride transfer protein activity. Along with the enhanced chylomicrons, microsomes were characterized by abundant Sec12, the guanine exchange factor that promotes the localization of Sar1b in the endoplasmic reticulum. Furthermore, coimmunoprecipitation experiments revealed high levels of the complex components Sec23/Sec24 and p125, the Sec23-interacting protein. Finally, a pronounced interaction of Sec23/Sec24 with SCAP and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) was noted, thereby permitting the transfer of the transcription factor SREBP-1c to the nucleus for the activation of genes involved in lipid metabolism.

Conclusion—Our data suggest that Sar1b expression may promote intestinal lipid transport with the involvement of the coat protein complex II network and the processing of SREBP-1c. (***Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:00-00.)**

Key Words: lipoproteins ■ metabolism ■ nutrition ■ Anderson's disease

Intense efforts have been made over the past 2 decades to better understand the physiological events behind chylomicron (CM) formation.[1–4] CMs are essential for the transport of alimentary lipids and fat-soluble vitamins to the bloodstream via the lymphatic system. Although there has been significant progress in intestinal fat transport, major issues remain unsolved regarding the sites, steps, and identity of critical protein participants and regulation involved in lipid translocation from the enterocyte to blood circulation. Uncovering this essential information would serve to better ascertain and appropriately treat lipid transport abnormalities, including fat malabsorption and lipoprotein overproduction, which results in dyslipidemia and atherosclerosis.[5]

Several groups, including ours, have contributed widely to dissecting the multistep CM assembly within the enterocyte.[1–4,6] This complex process includes cellular lipid esterification, translocation of cellular lipid pools, biogenesis and posttranslational modification of various apolipoproteins (apo), and, finally, packaging lipid and apo components into CM. Until now, it has been thought that the key process in CM assembly/secretion is the intracellular association of the essential apo B-48 with lipids[7] with the obligatory involvement of microsomal triglyceride transfer protein (MTP).[8] Mutations of apo B-48 and MTP result in hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia, respectively, with impaired lipid transfer from intestinal enterocytes into the plasma, steatorrhea, failure to thrive during infancy, and other symptoms due to deficiencies of essential fatty acids (FA) and fat-soluble vitamins. Our recent studies provided compelling evidence that Sar1b GTPase (commonly named Sar1b) also plays a pivotal role in CM exocytosis from the enterocytes because its mutations lead to CM retention disease (CRD), or Anderson disease,[9,10] which shares common clinical characteristics with hypobetalipoproteinemia and abetalipoproteinemia. In fact, Sar1b protein rallies coat protein complex II (COPII) to form a shell around the vesicles

Received on: May 4, 2011; final version accepted on: July 28, 2011.

From the Research Centre (E.L., E.H., R.S., L.E., D.S., E.D., V.M., A.T.S.), CHU-Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada; Departments of Nutrition (E.L., E.H., V.M.), Pediatrics (D.S.), and Biochemistry (E.D.), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; Centre de recherche Rhône-Alpes en nutrition humaine, Hôpital Edouard-Herriot, Faculté de Médicine, Université de Lyon-1, France (M.L.); Diabetes Unit, Division of Internal Medicine, Hadassah University Hospital, Jerusalem, Israel (E.Z.); Lipid Research Center, Centre Hospitalier Universitaire de Quebec, Quebec, Canada (P.C.).

Correspondence to Emile Levy, Research Centre, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Unit, CHU-Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1C5, Canada. E-mail emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca

© 2011 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol **is available at http://atvb.ahajournals.org** **DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.233908**

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

transporting CM cargo in the secretory pathway for their budding and fusion with the Golgi.

Newly synthesized and properly folded proteins are transported from the endoplasmic reticulum (ER) to the trans-Golgi network via COPII vesicles to reach their final destination.[11–13] COPII coats are assembled from 3 components, ie, Sar1b, Sec23/24, and Sec13/31 complexes, necessary to capture cargo proteins and sculpt the ER membrane into vesicles.[14] Current models for protein sorting propose that Sar1b is first activated to function as a molecular switch for the recruitment of the 2 additional cytosolic complexes that direct vesicle budding from the ER.[15] Sar1b cycles between inactive GDP- and active GTP-bound forms play a key role in the regulation of the formation of COPII-coated vesicles.[12] COPII-coated vesicle biogenesis commences when Sar1b is converted from the GDP- to GTP-bound state, triggering a sequence of recruitment events that assemble the COPII coat and subsequently initiate the budding of COPII-coated vesicles.[16]

Sar1b is likely to have a multiple functions in cargo sorting, regulation of COPII coat dynamics, and membrane deformation through the process of vesicle formation.[17,18] Although defects in Sar1b were found to be associated with severe lipid absorption disorder in humans, this important protein has not been extensively investigated in relation to intestinal lipid transport and regulation. In particular, no studies have so far performed functional investigations to show that Sar1b may be at the center of crucial pathways of lipid transport. In the present work, functional studies were carried out to determine the regulatory influence of Sar1b on lipid synthesis, apo biogenesis, and lipoprotein formation, as well as on components that contribute to the efficiency of COPII-mediated protein export from the ER.

Methods

Experiments were performed using the Caco-2/15 cell line to overexpress Sar1B/GTPase ($Sar1b^{+/+}$). The intestinal cells were transduced with lentivirus-*Sar1b*-green fluorescent protein. After lentivirus infection, cells were allowed to proliferate until reaching confluence and differentiate for 14 days before being tested for $Sar1b^{+/+}$ and compared with control mock cells infected with empty vector. Precautions were taken to ensure that genetically modified Caco-2/15 cells were viable, fully differentiated, and endowed with normal permeability and function. Thereafter, lipid synthesis, de novo apo biogenesis, and lipoprotein assembly were assessed using radioactive precursors ([^{14}C]oleic acid, [^{35}S]methionine). Examination of the mechanisms comprised the activity of various enzymes (monoacylglycerol acyltransferase, diacylglycerol acyltransferase, MTP) involved in intracellular lipid metabolism and lipoprotein assembly. The impact of Sar1b forcing on the protein expression COPII components was examined by analyzing the Sec23/24 and Sec13/31 complexes by Western blot. Moreover, a coimmunoprecipitation technique in combination with Western blotting was used to determine the interaction between COPII components and various factors (the guanine nucleotide exchange factor Sec12, the Sec23-interacting protein p125A, SCAP, and sterol regulatory element binding protein-1c [SREBP-1c]), as well as between apo B-48 and L-FABP, CD36, Sar1, Sec12/Sec23/24, and p125A in pre-CM transport vesicles isolated from the ER of $Sar1b^{+/+}$ cells.

Further details are given in the supplemental materials, available online at http://atvb.ahajournals.org.

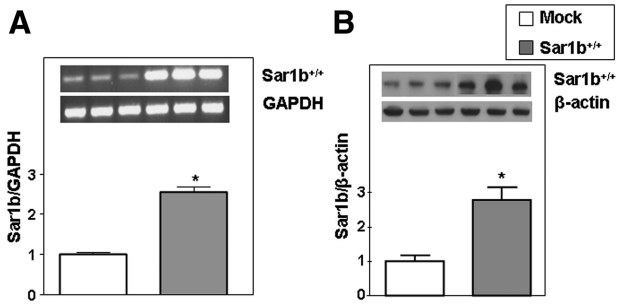


Figure 1. Gene and protein expressions of Sar1b following Caco-2/15 cell transfection. Caco-2/15 cells were transduced with lentivirus-*Sar1b*-green fluorescent protein (GFP). After lentivirus infection, cells were allowed to proliferate until reaching confluence and differentiate for 14 days before being tested for $Sar1b^{+/+}$. Control mock cells were obtained by infection with GFP lentivirus. Reverse transcription–polymerase chain reaction (A) and Western blot (B) assays were carried out, and the quantification of band intensities showed a significant increase in Sar1b gene and protein expression, respectively, in cells that were transduced with lentivirus-*Sar1b*-GFP compared with Caco-2/15 transduced with GFP only (mock cells). Results represent the means±SEM for n=3 independent experiments and are represented as ratio of $Sar1b^{+/+}$ to GAPDH or $Sar1b^{+/+}$ to β-actin. *$P<0.001$ vs control mock cells.

Results

Sar1b Overexpression and Cell Integrity

To examine the role played by Sar1b in intestinal lipid metabolism, studies were carried out using lentivirus as an experimental approach to generate a cellular model overexpressing Sar1b. Sar1b expression was measured after clone selection after 14-day differentiation. The infected Caco-2/15 cells exhibited a marked *SAR1B* gene overexpression and a significant protein increase compared with mock cells infected with empty vector (Figure 1). Because mock cells were comparable to noninfected Caco-2/15 cells in terms of gene and protein expressions (data not shown), only mock cells were used as controls in subsequent experiments.

We then examined how genetic manipulation of Sar1b level altered Caco-2/15 cell integrity. No pronounced alterations were noted in cell viability (assessed with the Trypan Blue dye exclusion method) or transepithelial resistance between mock and Caco-2/15 cells overexpressing Sar1b (data not shown). Similarly, estimation of the expression of the 2 characteristic brush border membrane markers, villin (Supplemental Figure IA) and sucrase (Supplemental Figure IB) proteins, did not reveal significant changes. Collectively, these data suggest that genetically modified Caco-2/15 cells are viable, fully differentiated, and endowed with normal permeability and function.

Measurement of Lipid Esterification

To elucidate the impact of $Sar1b^{+/+}$ on lipid esterification and delivery, Caco-2/15 cells were cultured for 24 hours with [^{14}C]oleic acid. As illustrated in Supplemental Figure II, substantial changes were recorded in the major lipid classes in cells and media. The augmentation in Sar1b expression led to a significant augmentation in cellular triglycerides (TGs) (Figure 2), cholestryl ester, and phospholipids (Supplemental Figure II). A similar trend was noted in the medium lipid

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

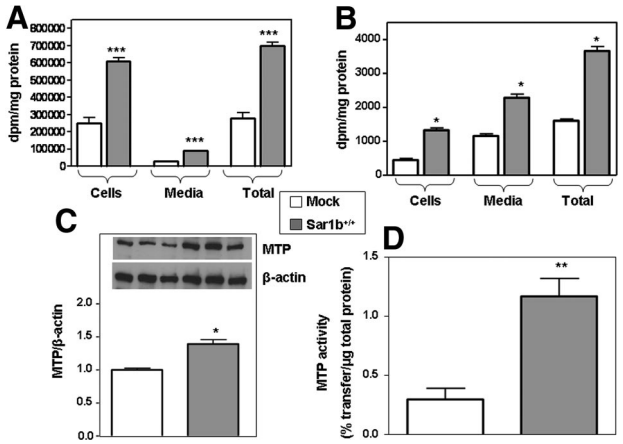


Figure 2. Impact of Sar1b overexpression on triglyceride esterification, apolipoprotein B-48 biogenesis, and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) expression and activity in Caco-2/15 cells. Following transduction with lentivirus-*Sar1b*-green fluorescent protein and 14-day differentiation, Caco-2/15 cells were incubated with [^{14}C]oleic acid or [^{35}S]methionine, respectively, for 20 hours at 37°C. A, Triglycerides from cell homogenates and basolateral medium were extracted with chloroform-methanol (2:1), separated by TLC, and quantitated as described in Materials and Methods. B, Cells were incubated with [^{35}S]methionine in the apical compartment for 20 hours. Thereafter, cell homogenates and basolateral medium were incubated overnight with a mixture of antibodies against apo B-48 and protein A/G–agarose beads. The immune complexes were then thoroughly washed and analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis, gels were stained in Coomassie Blue, and bands corresponding to apo B-48 were excised and counted for the radioactivity incorporated. C, The proteins of tissue homogenates were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes. The blots were then incubated with the polyclonal antibody overnight at 4°C. Immunocomplexes were revealed by means horseradish peroxidase–conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin and an enhanced chemiluminescence kit. MTP mass was quantitated by use of an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software. D, MTP activity was determined on the purified microsomal fraction by measuring the rate of [^{3}H]trioleylglycerol transfer between donor and acceptor unilamellar vesicles. Data represent the means±SEM of n=3 separate experiments. *P<0.005, **P<0.001, ***P<0.0001 vs control mock cells.

content on TGs (Figure 2), cholestryl ester, and phospholipids (Supplemental Figure II). Together, these findings suggest a role of Sar1b$^{+/+}$ in lipid synthesis and secretion.

Apo Biosynthesis and Secretion

The subsequent step was to examine the modulation of apo production by in intestinal epithelial cells overexpressing Sar1b. To this end, Caco-2/15 cells were cultured with [^{35}S]methionine for 24 hours, and the delivery of newly synthesized apos in the medium was analyzed by SDS-PAGE following immunoprecipitation. On the incubation of Caco-2/15 cells with the radiolabeled precursor, a rise in the synthesis and secretion of apo B-48 (Figure 2) and apo B-100 was observed (Supplemental Figure IIIA). A similar trend characterized apo A-IV (Supplemental Figure IIIB) without significant changes in the production and output of [^{35}S]methionine-labeled apo E (Supplemental Figure IIIC).

Importantly, the ratio of apo B-48 (the main apo B form)/TGs in the medium revealed a significantly (P<0.001) diminished value of Sar1b$^{+/+}$ cells (2.50±0.32) compared with mock cells (4.10±0.37), suggesting an increased lipoprotein size of TG-rich lipoprotein particles.

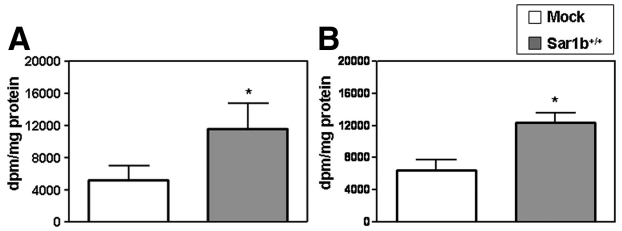


Figure 3. Effect of Sar1b overexpression on triglyceride-rich lipoprotein output by Caco-2/15 cells. Following 14 days of differentiation, transduced cells were incubated with [^{14}C]oleic acid for 20 hours. Then, chylomicrons (A) and very-low-density lipoproteins (B) were isolated by ultracentrifugation according to their specific densities. Radioactivity incorporated into each fractions was further determined. Data were analyzed as dpm/mg of total protein and represent means±SEM for n=6 independent experiments. *P<0.001 vs control mock cells.

MTP

Because the assembly of TG-rich lipoproteins represents a complex process in which apo B-48 is packaged with lipids with the obligatory involvement of MTP, we examined the activity of this key protein to gain insight into the mechanisms responsible for the induced apo B-containing lipoprotein assembly and secretion. Both the protein expression (Figure 2) and the activity (Figure 2) of MTP were found to be elevated in Caco-2/15 cells overexpressing Sar1b.

Lipoprotein Assembly

To determine whether Sar1b$^{+/+}$ was able to regulate lipid transport, Caco-2/15 cells were incubated with [^{14}C]oleic acid for 24 hours, medium was collected, and lipoprotein fractions were immediately separated by ultracentrifugation. Figure 3 shows that Sar1b$^{+/+}$ in Caco-2/15 cells resulted in a consistent delivery increase in the CM (2-fold, P<0.01) and very-low-density lipoprotein (1.8-fold, P<0.01) fractions.

Monoacylglycerol Acyltransferase and Diacylglycerol Acyltransferase Activity Assay

The rise in intracellular production of TGs prompted us to determine whether the activity of monoacylglycerol acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase, involved in FA esterification, was influenced by Sar1b forcing. Caco-2/15 cells with Sar1b$^{+/+}$ displayed a significant increase in the activity levels of monoacylglycerol acyltransferase (Supplemental Figure IVA) and diacylglycerol acyltransferase (Supplemental Figure IVB) enzymes compared with controls.

Process Specificity

To test whether all the lipid and lipoprotein processes observed in response to Sar1b overexpression were specific, we have evaluated the impact of Sar1b$^{+/+}$ on cellular incorporation of various nutrients. No significant changes were observed between mock and genetically modified cells in the uptake of calcium (2.22±0.17 versus 2.34±0.20 pmol/mg protein per minute), glutamine (209.45±17.22 versus 188.33±21.23 pmol/mg protein per minute), and deoxy-

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

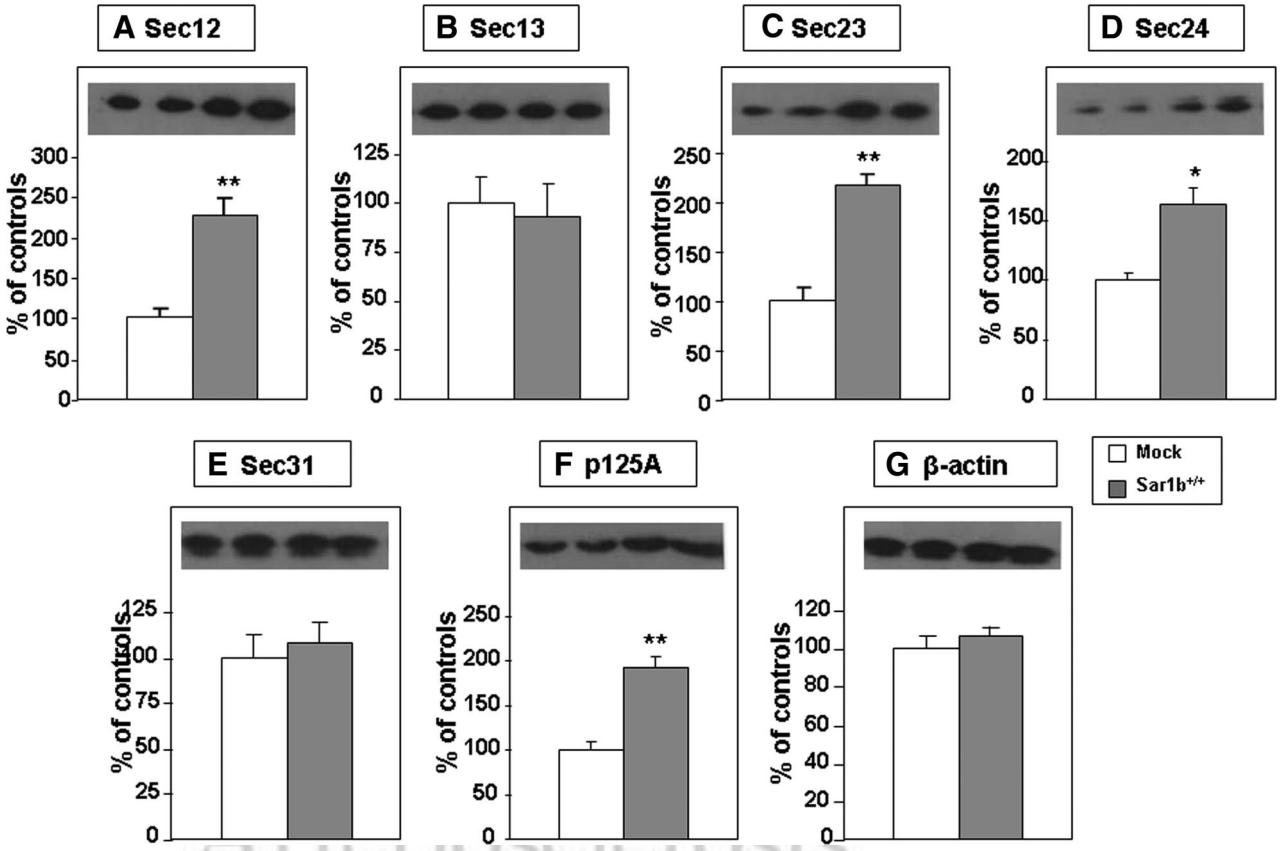


Figure 4. Impact of Sar1b overexpression on microsomal protein mass of coat protein complex II components, the guanine nucleotide exchange factor Sec12, and the Sec23-interacting protein p125A in Caco-2/15 cells. Microsomal fractions were prepared from control mock and Caco-2/15 cells overexpressing Sar1b. The microsomal proteins (50 μg) were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred onto Hybond-ECL nitrocellulose membranes that were blocked in Tris-buffered saline (pH 7.5) containing 0.1% Tween 20 and 5% nonfat dry milk. The blot was then incubated overnight at 4°C in a blocking solution with the specific antibodies. Immune complexes were revealed by means of horseradish peroxidase–conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) and an enhanced chemiluminescence kit. Protein mass was quantitated by using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software. Values are expressed as mean±SEM for n=3 separate experiments. *$P<0.05$, **$P<0.02$ vs control mock cells.

glucose (563.3±37.3 versus 548.1±42.5 pmol/mg protein per minute), respectively. Therefore, one cannot argue that the overexpression of this gene globally generates higher cell functions.

Does Sar1b Overexpression Have an Impact on Sar1a Protein Mass?

In mammals, there are 2 isoforms of *Sar1*, Sar1a and Sar1b. The second human protein isoform of Sar1, Sar1a, is encoded by the *SAR1A* gene (OMIM 607691). To determine whether Sar1b forcing influences the expression of Sar1a, we assessed the mass protein of the latter. Western blot analysis could not reveal any changes in Sar1a protein expression in response to Sar1b overexpression in Caco-2/15 cells (Supplemental Figure V). These findings clearly exclude the interference of Sar1a with the TG-rich lipoprotein assembly mediated by Sar1b$^{+/+}$.

Sar1b Forcing and Involvement of COPII Components

As mentioned before, the COPII coat consists of the small GTPase Sar1b, the Sec23/24, and the Sec13/31 complexes that sequentially bind to the ER membrane. We were first interested to determine whether Sar1b overexpression alters the expression of Sec12 because this ER-localized transmembrane protein catalyzes GDP/GTP exchange on Sar1b, resulting in GTP loaded Sar1b that recruits the cargo adaptor complex Sec23/Sec24 to ER exit domains.[19] Using Western blot, a substantial increase was noted in the protein mass of Sec12 in the microsomal fraction prepared following cellular Sar1b forcing (Figure 4A). We thereafter turned to Sec23, which represents the GTPase-activating protein that stimulates the enzymatic activity of Sar1b.[20] Once again, analysis by Western blotting revealed an abundant quantity not only of Sec23 (Figure 4C) but also of Sec24 (Figure 4D) in microsomal fractions, but without any significant changes in Sec13 (Figure 4B) and Sec31 (Figure 4E) protein expression. We finally focused on p125A protein, which is required for Sec23 interaction,[21] and detected a raised protein level in the microsomal fraction of cells with Sar1b overexpression (Figure 4F).

To determine the impact of Sar1b overexpression on the interaction of various components that trigger the COPII machinery, we used the coimmunoprecipitation technique. This experimental approach allowed us to show a more intense cooperation between the Sec12 guanine nucleotide exchange factor, the Sec23/Sec24 adaptor complex, and the Sec23-interacting p125A protein (Figure 5).

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

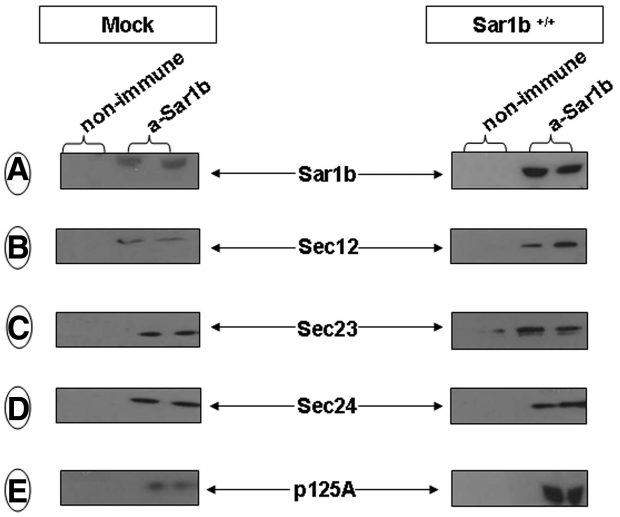


Figure 5. Coimmunoprecipitation of Sar1b, Sec12, Sec23/24, and p125A in Caco-2/15 cells. To determine the direct interactions of Sar1b with important proteins required for coat protein complex II formation, the coimmunoprecipitation technique was used. Microsomal proteins (50 μg) were reacted with Sar1b antibodies. The immunoprecipitates were subjected to gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Thereafter, the latter were blotted with antibodies directed against Sec12, Sec13, Sec23, Sec24, and p125A.

Because SREBP-1c is considered to be profoundly involved in the transcriptional regulation of lipogenic enzymes following its lateral movement in COPII-coated vesicles, we assessed its interaction with COPII proteins. Coimmunoprecipitation studies in microsomes isolated from Caco-2/15 cells with Sar1b overexpression documented a strong coupling of Sec23/Sec24 with SCAP/SREBP1-c complex (Figure 6A to 6C). Furthermore, more SREBP1-c signal intensity was noted in the nucleus fraction (Figure 6D).

Finally, for validation purposes, we isolated the pre-CM transport vesicles from the ER of Sar1b$^{+/+}$ cells, as reported previously.[22–26] The characterization of these vesicles revealed various proteins that collocate with apo B-48, including liver-FA binding proteins and CD36, as well as Sar1, Sec12/Sec23/24, and p125A (Supplemental Table I).

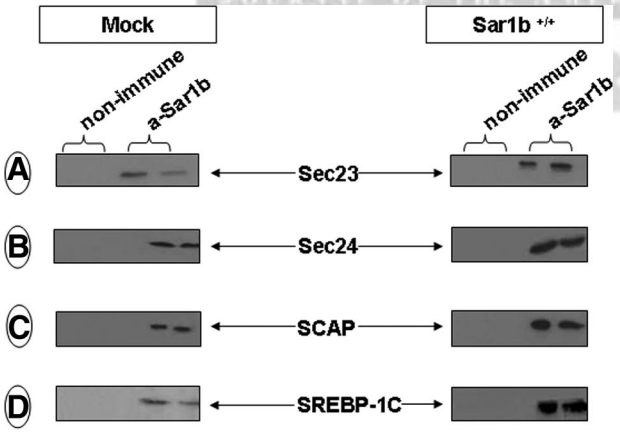


Figure 6. Coimmunoprecipitation of Sec23, Sec24, SCAP, and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) in Caco-2/15 cells. To determine the direct interactions of Sar1b with important proteins required for coat protein complex II formation, the coimmunoprecipitation technique was used. Microsomal proteins (50 μg) were reacted with Sar1b antibodies. The immunoprecipitates were subjected to gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Thereafter, the latter were blotted with antibodies directed against Sec23, Sec24, SCAP, and SREBP-1c.

Discussion

Intensive work on genetic disorders of fat transport has afforded new insights into the mechanisms involved in intestinal lipid handling and lipoprotein metabolism. Three inherited disorders, namely abetalipoproteinemia, hypobetalipoproteinemia, and CRD, have provided significant advances in our understanding of human physiology related to the assembly of TG-rich lipoproteins. Although their molecular genetic causes have been defined and it is particularly stressed that MTP, apo B, and Sar1b are essential and key components of the TG-rich lipoprotein assembly pathway, relatively few functional studies at the molecular and cellular level have been reported specifically on CRD. To tackle this issue in the present work, we have successfully overexpressed Sar1b in Caco-2/15 cells and can for the first time document that the stable forcing of Sar1b is tightly associated with the amplification of lipid transport. Mechanistically, we were able to highlight the Sar1b-mediated induction of apo B and MTP to augment the assembly of TG-rich lipoproteins. Our findings also emphasize the requirement of particular proteins, such as Sec12, p125A, and Sec23/Sec24, to accommodate Sar1b overexpression for the stimulation of lipid transport via lipoprotein assembly and secretion. Finally, the lateral movement of SREBP-1c into COPII-coated vesicles on ER membranes seems to be implicated in the regulation of lipid processing.

The secretion process of lipoproteins has been largely described in Caco-2 cells under different physiological conditions. Studies from various laboratories have reported the low capacity of Caco-2 cells to transport lipids under the form of lipoproteins. About 15% to 20% of TGs are exported, whereas residual TGs are retained, as was the case in the present investigation. On the other hand, Figure 2 documents the total FA incorporation and esterification, which indicates higher FA uptake in Sar1b$^{+/+}$ cells than in control mock cells.

The formation of CMs, the largest lipoproteins synthesized exclusively by intestinal epithelial cells, is crucial for the transport of alimentary lipids and fat-soluble vitamins. To date, mechanisms by which lipids are recruited during CM assembly are incompletely understood. According to the prevailing concept, association of apo B-48 with lipids is mediated by MTP in the rough ER, resulting in a lipid-poor, small apo B-48-containing particle that serves as a precursor of mature CM. Our laboratory has not only contributed to illustrating the essential role of apo B-48 and MTP but also been able to point out the absolute requirement of Sar1b for CM assembly.[9,10,27] Mutations of the *SARA2* gene coding for Sar1b lead to CRD, characterized by varying degrees of chronic fat malabsorption, hypocholesterolemia, fat-soluble vitamin deficiency, failure to thrive, chronic diarrhea, and neurological manifestations.[6,10,27–30] Importantly, the intracellular traffic of apo B-48-containing CM is dependent on the COPII coat complex, which buds vesicles from the ER

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

membrane to transport newly synthesized proteins to the Golgi apparatus. Because COPII vesicle biogenesis and assembly begins when Sar1b triggers a sequence of recruitment events that assemble the COPII coat from its cytosolic components and ultimately drives vesicle budding,[12] we have reasoned that $Sar1b^{+/+}$ may influence intestinal lipoprotein trafficking and sorting. Indeed, the present experiments reveal a stimulation of CM assembly and output in the presence of abundant Sar1b in Caco-2/15 cell line. Therefore, it seems that by being critical for COPII functioning, Sar1b GTPase action represents a limiting step that is determinant for the routing/movement or of apo B-48-containing CM from the ER to the Golgi apparatus. Sar1b likely activates cargo sorting and completion of the final fission plays to fuel apo B-48-containing CM trafficking.

Apo B-48 is the principal protein component of CM and is cotranslationally lipidated by MTP.[31] The lipidation process may be facilitated by the addition of TGs, and when this occurs, the production of apo B-48 and CM increases. Accordingly, it was shown that enhanced apo B output likely reflects adequate lipidation of apo B by MTP, a critical player in the early posttranslational regulation of apo B.[32] One can therefore assume that profuse Sar1b efficiently drives COPII machinery action capable of diverting apo B-48 to the secretory pathway and promoting CM processing and secretion. Additional studies are needed to delineate the mechanisms of action of Sar1b, because the information on the processes of translational apo B-48 in the intestine is not as abundant as the apo B-100 in the liver, which is retrotranslocated to the cytoplasm through the translocon in lipid-poor situations, ubiquitylated, and degraded by the proteasome.[33] Nevertheless, the available literature allows us to mention that apo B-48 may be regulated by the ubiquitin-proteasome pathway and cytosolic hsp70. Our previous observations suggest that the development of insulin resistance and diabetes stimulated the intestinal transport of lipids by augmenting apo B-48 synthesis through reduced proteasomal degradation activity, resulting in enhanced TG-rich lipoprotein assembly and secretion.[5] Moreover, Fischer's group showed that hsp90 facilitates the interaction between ER-associated apo B and components of the proteasomal pathway, perhaps in cooperation with hsp70.[34] In the present work, the presence of the proteasome inhibitor benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-leucinal (MG132) at the concentration of 50 μmol/L was ineffective in augmenting the levels of apo B-48 (data not shown), suggesting a direct effect of increased biogenesis rather than any involvement in proteasomal degradation activity in response to Sar1b overexpression.

ER export is mediated by vesicle formation at specialized ER domains known as the ER exit sites by the COPII complex. COPII subunits must first be recruited to the correct sites on the ER membrane, ie, that of the ER exit sites. The COPII coat is formed through sequential binding of 3 cytosolic components, a small GTPase Sar1,[15,19,21] the Sec23/Sec24 heterodimer complex,[35] and the Sec13/Sec31 heterotetramer complex,[36] to the ER exit sites. Following Sar1-GTP binding to the Sec23/24p complex via Sec23p, Sec24p captures the cytoplasmically exposed signal of the transmembrane cargo[37,38] to form a prebudding complex.[39] Sec23p is the GTPase-activating protein for Sar1 and therefore stimulates GTP hydrolysis on binding to Sar1,[20] leading to disassembly of the prebudding complex.[40] Our own findings reinforce the need for increased amounts of Sec23/Sec24 in parallel with the appeal of profuse Sar1b to cope with the transfer of proteins and lipoproteins from ER to Golgi.

Although 2 isoforms characterize Sar1, only Sar1b has been associated with the rare recessive disorder CRD,[9] characterized by the selective retention of CM-like particles within the ER of enterocytes.[30,41] To date, 11 separate mutations in the *SAR1b* gene (*SARA2*) have been detected.[42] In some patients' duodenal biopsies, the fall in Sar1b gene expression was related to Sar1 mRNA elevation, an indication of a certain degree of compensation.[43] However, in the present investigation, we could not detect any changes in Sar1a protein expression in response to Sar1b overexpression in Caco-2/15 cells.

The sequence of COPII protein assembly was established by the sequential addition of COPII components to an in vitro ER vesicle budding assay.[44,45] Even though COPII vesicle formation could be minimally reconstituted using purified COPII proteins,[14] additional regulatory factors, such as Sec12 and p125A, are obviously necessary to efficiently support ER-Golgi transport. Indeed, assembly of the COPII coat is initiated through the activation of Sar1 through conversion of its GDP to GTP under the control of Sec12, a guanine-nucleotide-exchange factor for Sar1.[46] This GDP-to-GTP transition triggers the exposure of the N-terminal amphipathic α-helix element of Sar1 that inserts into the ER membrane.[47,48] On the other hand, p125A was identified as an interacting partner for Sec23A to facilitate ER export from the ER exit sites.[49,50] p125 contains an N-terminal proline-rich region responsible for the interaction with Sec23p.[51] Our results here show that p125A is a Sec23A-interacting protein and likely part of a Sec23/Sec24/p125A heterohexameric complex, for which additional studies are required to define its actual contribution to the efficiency of COPII-mediated protein and especially lipoprotein export from the ER.

SREBPs are transcription factors that belong to the basic helix-loop-helix leucine zipper family and are considered to be profoundly involved in the transcriptional regulation of cholesterogenic and lipogenic enzymes.[52,53] Unlike other members of the basic helix-loop-helix leucine zipper family, SREBPs are synthesized as precursors bound to the ER. To activate lipid synthesis, the SREBPs must be transported to the Golgi, where proteases release the active domains that enter the nucleus. ER-to-Golgi transport requires that the SREBPs form complexes with SCAP, an escort protein.[54]

On inhibition, SCAP is tightly associated with Insig-1, causing retention of the SCAP/SREBP-1c complex in the ER and thus preventing proteolytic processing of the nascent SREBP-1c. Conversely, on activation, Insig-1 dissociates from the SCAP/SREBP-1c complex, thereby facilitating its transport to the Golgi, where full-length SREBP-1c undergoes proteolysis to generate nSREBP-1c. It has been reported that the SCAP/SREBP complex clusters laterally with other proteins into COPII-coated vesicles that bud from the ER.[55] Our studies showed that clustering of the SCAP/SREBP-1c complex is augmented with the overexpression of Sar1b that

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

recruits the heterodimeric protein Sec23/24. Accelerated movement of SREBP-1c would permit connection with genes in the nucleus with the induction of lipid and lipoprotein processing.

Previous studies reported that pre-CM transport vesicles are large COPII-containing vesicles that transport the developing CM from the ER to the Golgi.[24,25] Once detached from the ER membrane, the pre-CM transport vesicles dock and then fuse with the Golgi. In fact, the exit step of the pre-CM from the ER is the rate-limiting step in which dietary TG traverses the intestinal absorptive cell.[56,57] According to our data, it is reasonable to assume that the presence in abundance of Sar1b, the initiator of the COPII complex, facilitates the formation of the vesicles, their fusion with the Golgi, and lipoprotein trafficking.

Acknowledgments

The authors thank Schohraya Spahis for expert technical assistance and Dr Randy W. Schekman, Howard Hughes Medical Institute, Regents of the University of California, for providing Sar1b/a antibody.

Sources of Funding

This work was supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (MOP 10584) and the J.A. deSève Research Chair in nutrition.

Disclosures

None.

References

1. Ginsberg HN, Fisher EA. The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res*. 2009;50(suppl): S162–S166.
2. Mansbach CM, Gorelick F. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption: II: dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G645–G650.
3. Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J. Intestinal lipoprotein assembly. *Curr Opin Lipidol*. 2005;16:281–285.
4. Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci*. 2001;6:D299–D319.
5. Zoltowska M, Ziv E, Delvin E, Sinnett D, Kalman R, Garofalo C, Seidman E, Levy E. Cellular aspects of intestinal lipoprotein assembly in *Psammomys obesus*: a model of insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52:2539–2545.
6. Levy E, Chouraqui JP, Roy CC. Steatorrhea and disorders of chylomicron synthesis and secretion. *Pediatr Clin North Am*. 1988;35:53–67.
7. Cartwright IJ, Higgins JA. Direct evidence for a two-step assembly of ApoB48-containing lipoproteins in the lumen of the smooth endoplasmic reticulum of rabbit enterocytes. *J Biol Chem*. 2001;276:48048–48057.
8. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992;258:999–1001.
9. Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR, Eichenbaum-Voline S, Rudling M, Myrdal U, Annesi G, Naik S, Meadows N, Quattrone A, Islam SA, Naoumova RP, Angelin B, Infante R, Levy E, Roy CC, Freemont PS, Scott J, Shoulders CC. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet*. 2003;34:29–31.
10. Charcosset M, Sassolas A, Peretti N, Roy CC, Deslandres C, Sinnett D, Levy E, Lachaux A. Anderson or chylomicron retention disease: molecular impact of five mutations in the SAR1B gene on the structure and the functionality of Sar1b protein. *Mol Genet Metab*. 2008;93:74–84.
11. Antonny B, Schekman R. ER export: public transportation by the COPII coach. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:438–443.
12. Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 1994;77:895–907.
13. Barlowe C. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol*. 2003;13:295–300.
14. Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 1998;93:263–275.
15. Nakano A, Muramatsu M. A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. 1989;109:2677–2691.
16. Bednarek SY, Orci L, Schekman R. Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol*. 1996;6:468–473.
17. Oka T, Nakano A. Inhibition of GTP hydrolysis by Sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the ER-to-Golgi transport in yeast. *J Cell Biol*. 1994;124:425–434.
18. Bielli A, Haney CJ, Gabreski G, Watkins SC, Bannykh SI, Aridor M. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *J Cell Biol*. 2005;171:919–924.
19. Barlowe C, d'Enfert C, Schekman R. Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1993;268: 873–879.
20. Yoshihisa T, Barlowe C, Schekman R. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*. 1993;259:1466–1468.
21. Ong YS, Tang BL, Loo LS, Hong W. p125A exists as part of the mammalian Sec13/Sec31 COPII subcomplex to facilitate ER-Golgi transport. *J Cell Biol*. 2010;190:331–345.
22. Kumar NS, Mansbach CM. Prechylomicron transport vesicle: isolation and partial characterization. *Am J Physiol*. 1999;276:G378–G386.
23. Neeli I, Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Lagakos WS, Binas B, Gheyi T, Storch J, Mansbach CM. Liver fatty acid-binding protein initiates budding of pre-chylomicron transport vesicles from intestinal endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2007;282:17974–17984.
24. Siddiqi SA, Gorelick FS, Mahan JT, Mansbach CM. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci*. 2003;116:415–427.
25. Siddiqi SA, Siddiqi S, Mahan J, Peggs K, Gorelick FS, Mansbach CM. The identification of a novel endoplasmic reticulum to Golgi SNARE complex used by the prechylomicron transport vesicle. *J Biol Chem*. 2006;281:20974–20982.
26. Siddiqi SA, Mahan J, Siddiqi S, Gorelick FS, Mansbach CM. Vesicle-associated membrane protein 7 is expressed in intestinal ER. *J Cell Sci*. 2006;119:943–950.
27. Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, Seidman E, Brochu P, Vohl MC, Labarge S, Bouvier R, Samson-Bouma ME, Charcosset M, Lachaux A, Levy E. Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Mol Genet Metab*. 2009;97:136–142.
28. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M, Roy CC. Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res*. 1987;28:1263–1274.
29. Levy E, Roy CC, Goldstein R, Bar-On H, Ziv E. Metabolic fate of chylomicrons obtained from rats maintained on diets varying in fatty acid composition. *J Am Coll Nutr*. 1991;10:69–78.
30. Roy CC, Levy E, Green PH, Sniderman A, Letarte J, Buts JP, Orquin J, Brochu P, Weber AM, Morin CL. Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B: chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1987;92:390–399.
31. Hussain MM, Shi J, Dreizen P. Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J Lipid Res*. 2003;44:22–32.
32. Mitchell DM, Zhou M, Pariyarath R, Wang H, Aitchison JD, Ginsberg HN, Fisher EA. Apoprotein B100 has a prolonged interaction with the translocon during which its lipidation and translocation change from dependence on the microsomal triglyceride transfer protein to independence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14733–14738.
33. Zhou M, Fisher EA, Ginsberg HN. Regulated co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100: a new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J Biol Chem*. 1998;273:24649–24653.
34. Gusarova V, Caplan AJ, Brodsky JL, Fisher EA. Apoprotein B degradation is promoted by the molecular chaperones hsp90 and hsp70. *J Biol Chem*. 2001;276:24891–24900.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

35. Hicke L, Yoshihisa T, Schekman R. Sec23p and a novel 105-kDa protein function as a multimeric complex to promote vesicle budding and protein transport from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 1992;3: 667–676.
36. Salama NR, Yeung T, Schekman RW. The Sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the ER with purified cytosolic proteins. *EMBO J*. 1993;12:4073–4082.
37. Mossessova E, Bickford LC, Goldberg J. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*. 2003;114:483–495.
38. Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. 2003;114:497–509.
39. Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R. COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*. 1998;391: 187–190.
40. Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*. 2001;3: 531–537.
41. Bouma ME, Infante R, Jos J, Schmitz J. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1988;94:554–556.
42. Peretti N, Sassolas A, Roy CC, Deslandres C, Charcosset M, Castagnetti J, Pugnet-Chardon L, Moulin P, Labarge S, Bouthillier L, Lachaux A, Levy E. Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:24.
43. Georges A, Bonneau J, Bonnefont-Rousselot D, Champigneulle J, Rabes JP, Abifadel M, Aparicio T, Guenedet JC, Bruckert E, Boileau C, Morali A, Varret M, Aggerbeck LP, Samson-Bouma ME. Molecular analysis and intestinal expression of SAR1 genes and proteins in Anderson's disease (chylomicron retention disease). *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:1.
44. Aridor M, Bannykh SI, Rowe T, Balch WE. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Cell Biol*. 1995;131:875–893.
45. Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:87–123.
46. Barlowe C, Schekman R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*. 1993; 365:347–349.
47. Huang M, Weissman JT, Beraud-Dufour S, Luan P, Wang C, Chen W, Aridor M, Wilson IA, Balch WE. Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 A resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol*. 2001;155:937–948.
48. Bi X, Corpina RA, Goldberg J. Structure of the Sec23/24-Sar1 prebudding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*. 2002;419:271–277.
49. Shimoi W, Ezawa I, Nakamoto K, Uesaki S, Gabreski G, Aridor M, Yamamoto A, Nagahama M, Tagaya M, Tani K. p125 is localized in endoplasmic reticulum exit sites and involved in their organization. *J Biol Chem*. 2005;280:10141–10148.
50. Nakajima K, Sonoda H, Mizoguchi T, Aoki J, Arai H, Nagahama M, Tagaya M, Tani K. A novel phospholipase A1 with sequence homology to a mammalian Sec23p-interacting protein, p125. *J Biol Chem*. 2002; 277:11329–11335.
51. Mizoguchi T, Nakajima K, Hatsuzawa K, Nagahama M, Hauri HP, Tagaya M, Tani K. Determination of functional regions of p125, a novel mammalian Sec23p-interacting protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:144–149.
52. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1993;75:187–197.
53. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. 1997;89:331–340.
54. Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Identification of complexes between the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and SREBP cleavage-activating protein. *J Biol Chem*. 1997;272:20213–20221.
55. Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S, Goldstein JL, Brown MS. Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11235–11240.
56. Mansbach CM, Nevin P. Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *J Lipid Res*. 1998;39:963–968.
57. Mansbach CM, Dowell R. Effect of increasing lipid loads on the ability of the endoplasmic reticulum to transport lipid to the Golgi. *J Lipid Res*. 2000;41:605–612.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology
JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION
FIRST PROOF ONLY

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

SUPPLEMENT MATERIAL

Cell culture

The human epithelial colorectal adenocarcinoma Caco-2/15 cell line was obtained from Dr. JF Beaulieu (Department of Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada). Briefly, Caco-2/15 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (WISENT BIOCENTER, CA) containing 1% penicillin-streptomycin and 1% Modified Eagle's Medium nonessential amino acids (WISENT BIOCENTER, CA) 1% sodium pyruvate (SIGMA ALDRICH INC.), 1% glutamax (GIBCO BRL), and supplemented with 10% decomplemented fetal bovine serum (Flow, McLean, VA). For experiments, cells were plated at a density of $1x10^6$ cells/well on six-well polycarbonate Transwell filter inserts plates (Costar, Cambridge, MA), permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayer. Cells were cultured for 14 days to fully differentiate for optimal lipid synthesis.[1, 2] The medium was refreshed every 48 h.

Establishment of Sar1b/GTPase and stable GFP overexpression in Caco-2/15 cell line

The blunt-end PCR fragment encoding *Sar1b/GTPase* gene was amplified from the Human cDNA clone SC114457 (Origene Technologies, Inc., Rockville, MD) with ATGTCCTTCATATTTG as forward primer and CAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCATCAATGTTACTGTGCCAT containing *myc* epitope as reverse primer and TOPO Cloned into pLenti6/V5-D-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA 92008) to create an expression construct. The pLenti6/V5-D-TOPO expression plasmid of *Sar1b/GTPase* and the ViraPower Packaging

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Mix were then cotransfected, using the well known calcium phosphate method, into the 293FT cell line to produce lentivirus. The produced lentiviral stock was used to transduce the mammalian Caco-2/15 cell line. RT-PCR and Western blot assays for transient expression of the recombinant protein were carried on and generation of stable cell line were done using Blasticidin selection at a concentration of 1 μg/ml. Control Mock cells were obtained by infection with GFP lentivirus (kindly provided by Dr Jean-François Beaulieu, University of Sherbrooke) harbouring the same features as the pLenti6/V5-D-TOPO system.

Immunoblotting analysis

To assess the presence of various proteins and evaluate their mass, Caco-2/15 cells were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously.[3] Proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β-mercaptoethanol, separated on a 4–20% gradient SDS-PAGE, and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked with defatted milk proteins followed by the addition of primary antibodies directed against the targeted proteins. The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Even if identical protein amounts of tissue homogenates were applied, the β-actin protein was used to confirm equal loading on SDS-PAGE. Blots were developed and the mass of the various proteins was quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and software.

The following dilutions of antibodies were used : mouse anti-myc (Santa Cruz, Biotechnology, Inc.), 1/1000; mouse anti-human villin (BD Transduction Laboratories),

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

1/2000; mouse anti-β-actin (SIGMA ALDRICH), 1/10000; mouse anti-human sucrase (kindly provided by Dr J-F Beaulieu, University of Sherbrooke), 1/20; anti-mouse IgG-POD/anti-rabbit IgG-POD (Roche Diagnostics, Indianapolis), 1/10000; rabbit anti-Sec12 (Novus Biologicals, Littleton, CO), 1/1000; rabbit anti-p125A (Novus Biologicals, Littleton, CO), 1/3000; rabbit anti Sec13 (Abcam, San Francisco, CA), 1/5000; chicken anti Sec23 (Abcam), 1/500; rabbit anti-Sec24 (Abcam), 1/2000; rabbit anti-Sec31 (Abcam), 1/500; rabbit anti-SCAP (Abcam), 1/500; rabbit ant-SREBP-1c (Abcam), 1/1000.

Quantitative Real-Time (RT)-PCR

Experiments for mRNA quantification as well as for GAPDH (as a control gene) were performed using the GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies). Approximately 30–40 cycles of amplification were used at 95^0C for 30 s, 58^0C for 30 s, and 72^0C for 30 s. Amplicons were visualized on standard ethidium bromide-stained agarose gels. Under these experimental conditions relative to RT-PCR, 32–35 cycles corresponded to the linear portion of the exponential phase.

Quantitative RT-PCRs were performed using Quantitect SYBR Green kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI Prism® 7000 Sequence Detection System. The cycling was as follows: 95^0C 10 min, for 1 cycle; 950C 15 s, 60^0C 30 s, 72^0C 30 s for 40 cycles and 72^0C 10 min for 1 cycle. Data was analysed the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.[4] The primers used for either RT-PCR or Quantitative PCR are: Sar1b/GTPase (5'-AGGTTGCGAGAGATGTTTGG-3' and 5'- ATCAATGTACTGTGCCAT-3'); GAPDH (5'- AGAAGGCTGGGGCTCATT-3' and 5'- GGGCCATCCACAGTCTTCT-3').

Measurement of lipid synthesis and secretion

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Lipid synthesis and secretion were assayed as previously described.[2, 5, 6] Briefly, radiolabeled [^{14}C]-oleic acid (sp act, 53 mCi/mmol; Amersham, Oakville, ON, Canada) was added to unlabeled oleic acid and then solubilized in fatty acid-free bovine serum albumin [BSA/oleic acid, 1:5 (mol:mol)] containing 0.3 mM monoolein, 4.8 mM taurocholate and 0.5 mM lyso-phosphatidylcholin. The final oleic acid concentration was 0.7 mM (0.45 μCi)/well. Cells were first washed with phosphate-buffered saline (PBS) (GIBCO), and the [^{14}C]-oleic acid-containing medium was added to the upper compartment. At the end of a 24-h incubation period, cells were washed, and then scraped with a rubber policeman in a PBS solution containing antiproteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, EDTA, aminocaproic acid, chloramphenicol, leupeptin, glutathione, benzamidine, dithiothreitol, sodium azide, and Trasylol, all at a final concentration of 1 mM). An aliquot was taken for lipid extraction by standard methods[2, 5, 6] in the presence of unlabeled carrier [phospholipids, triglyceride and cholesteryl ester].

The various lipid classes synthesized from [^{14}C]-oleic acid were then separated by thin-layer chromatography (TLC) using the solvent mixture of hexane, ether, and acetic acid (80:20:3, vol:vol:vol), as previously described.[2, 5, 6] The area corresponding to each lipid was scratched off the TLC plates, and the silica powder was placed in a scintillation vial with Ready Safe counting fluid (Beckman, Fullerton, CA). Radioactivity was then measured by scintillation counting (LS 5000 TD, Beckman). Cell protein was quantified by the Bradford method and results were expressed as disintegrations per dpm per milligram of cell protein. Lipid secreted in the basolateral compartment was analyzed and

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

quantified, as described above, after centrifugation (2,000 rpm for 30 min at 4°C) to remove cell debris.

Cholesterol biogenesis was evaluated employing [^{14}C]-acetate as precursor (53.9 Ci/mmol) after a 24-h incubation period. Separation of the cholesterol fraction was performed by TLC.

De novo apolipoprotein (apo) synthesis

The effect of Sar1b/GTPase protein overexpression (Sar1b$^{+/+}$) protein on newly synthesized and secreted apos (A-I, A-IV, B-48, B-100, and E) was assessed as described previously.[2, 5, 6] To first induce apo synthesis, cells were incubated apically with unlabeled oleic acid bound to albumin in serum-free medium, 24 h before [^{35}S]-methionine incubation. The concentration of the unlabeled lipid was equivalent to the labeled substrate described above. After 24-h incubation, cells as well as the outer chambers were rinsed twice with PBS (GIBCO). The apical compartment was replaced with 1.5 ml of methionine-free medium containing the unlabeled substrate and 100 μCi/ml [^{35}S]-methionine (Amersham Life Sciences, 50 mCi/mmol). After incubation for 24 h at 37°C with 5% CO_2, the medium from the basolateral compartment was collected. Cells were scraped off the inserts in the cell lysis buffer, as described above. The medium and cell lysates were supplemented with the antiprotease cocktail. To assay a considerable amount of *de novo* apo synthesis, the material from two wells was pooled.

Immunoprecipitation of apolipoproteins

The basolateral medium and cell lysates were first supplemented with unlabeled methionine to act as a carrier (final concentration, 0.1 mM). Immunoprecipitation was performed in the presence of excess polyclonal antibodies to human apos (Boehringer

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Mannheim) at 4°C overnight.[2] Samples were then washed with Nonidet P-40 (0.05%). They were subsequently centrifuged and resuspended in sample buffer (1.2% SDS,12% glycerol, 60 mM Tris, pH 7.3, 1.2% β-mercaptoethanol, and 0.003% bromophenol blue) and analyzed by a linear 4–15% polyacrylamide gradient preceded by a 3% stacking gel. High Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Life Sciences) was run in the same conditions. Gels were sectioned into 2-mm slices and counted after an overnight incubation with 1 ml of Beckman tissue solubilizer (0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Organic, Beckman). Results for each apo studied were expressed as dpm/mg protein to assess the specific effect of $Sar1b^{+/+}$ on apo synthesis and secretion.

Lipid carrier

Blood was drawn 3 h after the oral intake of a fat meal by a human volunteer, and postprandial plasma was prepared to serve as a carrier for the lipoproteins synthesized by Caco-2/15 cells. The TG-enriched plasma was incubated at 56°C for 1 h to inactivate enzymatic activity in the presence of antiproteases.

Isolation of lipoproteins

For the determination of secreted lipoproteins, Caco-2 /15 cells were incubated with the lipid substrate as described above. The medium supplemented with antiproteases (as described above) was first mixed with a plasma lipid carrier (4:1, vol:vol) to efficiently isolate *de novo* lipoproteins synthesized. The lipoproteins were then isolated by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrigfuge (Beckman). Briefly, chylomicrons were isolated after ultracentrifugation (25,000 rpm for 40 min). Very low-density lipoprotein (1.006 g/ml) and low-density lipoprotein (LDL, 1.063 g/ml) were

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

separated by spinning at 100,000 rpm for 2.30 h with a tabletop ultracentrifuge 100.4 rotor at 4°C. The high-density lipoprotein fraction was obtained by adjusting the LDL infranatant to density at 1.21 g/ml and centrifuging for 6.5 h at 100,000 rpm. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl and 0.001 M EDTA, pH 7.0, at 4°C for 24 h.

Microsomal triglyceride transfer protein activity assay (MTP)

The MTP activity assay was performed on differentiated Caco-2/15 cells as described previously.[1, 5] Cells were plated at a density of $1x10^6$cells in 10 cm^2 plates in the same culture medium as above and differentiated for a period of 14 days. After collection, cells were resuspended in 10 mM phosphate-buffer containing 10 mg/ml saponin, 10 ug/ml of leupeptin and aprotinin and 1 ug/ml of pepstatin A. Cells were then centrifuged for 1 hour at 70000 rpm using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman). Microsomal fraction was purified using a DEAE-cellulose (DE52-Whatman, Clifton, NJ) and eluted with a volume of 10 mM phosphate-buffer containing 220 mM NaCl. Microsomes were concentrated with a Centricon® cartridge (Millipore) at 5000 rpm for 25 minutes. MTP transfer activity was then measured by assessing radioactivity transfer between donor and acceptor unilamellar vesicles. The vesicles were prepared by mixing in 250 uL of chloroform the appropriate amounts of lipids. The donor vesicle contained, per assay, 4 nmol of 100 mg/mL phosphatidylcholine (Sigma), 0.33 nmol of 2 mg/mL cardiolipin (Sigma), 0.024 nmol of [^{3}H]-trioleylglycerol (Amersham Biosciences), 0.01% BHT (Sigma) while the acceptor vesicle comprised 24 nmol of 100 mg/mL phosphatidylcholine, 0.048 nmol of trioleylglycerol, ~4000 cpm of [^{14}C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine ([^{14}C]-DPPC; Amersham) and 0.01% BHT. The vesicles were then

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

evaporated under a nitrogen stream, resuspended in a 15:35 buffer (15 mM Tris/HCl, pH 7.4, 35 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM NaN_3) containing 0.5% of free fatty acid-BSA and sonicated. Two different amounts of microsomal protein (5000 and 10000 ng) were incubated with 5 uL of each vesicle in 100 uL of 15:35 buffer without BSA and incubated for 1 h at 37°C. The transfer reaction was stopped by the addition of 400 µL of ice-cold 15:35 buffer with BSA. The donor vesicles were removed from the mixture by adsorption onto DEAE-cellulose at pH 7.4. The supernatant was collected after two centrifugations at 13000 g to ensure the complete removal of the donor vesicles-cellulose complex. The supernatant was then transferred to glass vials and radioactivity determined. Blank assay characterized by the incubation of both vesicles without protein served to determine the spontaneous exchange of radioactivity between the vesicles and was used to correct the percentage of lipid transfer. The ratio of [^{3}H]-trioleylglycerol on [^{14}C]-dipalmitoyl phosphatidylcholine was calculated, and the percentage lipid transfer was derived from the increase in this ratio.

Monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity assays

Differentiated Caco-2/15 cells were lysed in a buffer containing 50 mM Hepes, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 50 mM NaF and 1 mM PMSF. MGAT and DGAT activities were assessed by measuring the incorporation of [^{14}C] into diacylglycerol or TG following the incubation of 50 µM 2-oleoylglycerol or 250 µM 1,2-dioleoyl-sn-glycerol (both from Sigma) and 15-25 µM [^{14}C]-palmitoyl-CoA (Amersham) in the presence of 15-25 µM cold palmitoyl-CoA (Sigma). Total lysates (25 µg) were incubated with the substrates in 100 mM Tris-HCl with 1 mg/mL BSA and 1 mM DTT (MGAT) or 16 mM $MgCl_2$

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

(DGAT) for 5 min at 23°C. After lipid extraction, lipid fractions were separated on TLC plates using the solvent mixture: hexane:ether:acetic acid, 60:40:4 (vol:vol:vol) .

Process specificity

To determine the specificity of Sar1b, the transport of various nutrients such as 2-deoxy-D-[1-^{3}H]-glucose, L-[3H]-glutamine and ^{45}Calcium was examined. Transport was performed in differentiated Caco-2/15 cells that were serum starved 24 h prior to experiments. Measurements for 2-deoxy-D-[1-^{3}H]-glucose (1 mM), L-[3H]-glutamine (0.5 mM) and ^{45}Calcium (0.5 mM) was carried out for 10 min, 30 and 60 min. Cells were then washed three times each with ice-cold saline homogenized and counted in liquid-scintillation spectrometry.

Preparation of microsomes

Intestinal specimens were rinsed and homogenized (25%, w/v) in 0.25 M sucrose in buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 25 mM KCl) containing protease inhibitors (10 μg/ml leupeptin, 10 μg aprotinin, 1 μg/ml pepstatin, 1 μg/ml antipain, and 25 mM4-aminophenyl-methanesulfonyl fluoride) using a polytron (Brinkmann Instruments) at a setting of 1 (30 s) and centrifuged for 15 min at 12,000 *g* at 4°C to prepare microsome fractions, a technique described earlier.[1, 7] The supernatant fraction was then centrifuged for 60 min at 100,000 *g*. The pellet was centrifuged for 60 min at 4°C. The washed microsomal pellets were quick frozen and stored at –80°C for later use.

Data analysis

To assess differences in the parameters studied, data were statistically analysed Student's two tailed *t*-test. A p value <0.05 was considered statistically significant.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Table I: Presence and absence of proteins in endoplasmic reticulum-derived vesicles

Classes of proteins tested	Detected proteins	Undetected proteins
Apolipoproteins	B-48	A-I, A-IV, E
COPII components	Sar1b, Sec12, Sec23, Sec 24	Sar1a, Sec13, Sec31
Fatty acid binding proteins	L-FABP	M-FABP, I-FABP
Cholesterol transporters	CD36	SR-BI, NPC1L1
Miscellaneous	p125A, SCAP, SREBP-1c	PPARγ

Endoplasmic reticulum-derived vesicles were isolated from $Sar1b^{+/+}$ cells. Protein content was assessed by testing various classes using Western blotting.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

REFERENCES

1. Levy E, Stan S, Delvin E, Menard D, Shoulders C, Garofalo C, Slight I, Seidman E, Mayer G, Bendayan M. Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons. *J Biol Chem*. 2002;277:16470-16477.
2. Grenier E, Maupas FS, Beaulieu JF, Seidman E, Delvin E, Sane A, Tremblay E, Garofalo C, Levy E. Effect of retinoic acid on cell proliferation and differentiation as well as on lipid synthesis, lipoprotein secretion, and apolipoprotein biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G1178-G1189.
3. Marcil V, Seidman E, Sinnett D, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF, Menard D, Precourt LP, Amre D, Levy E. Modification in oxidative stress, inflammation and lipoprotein assembly in response to hepatocyte nuclear factor 4 alpha knockdown in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2010; 285:40448-40460.
4. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
5. Levy E, Menard D, Delvin E, Stan S, Mitchell G, Lambert M, Ziv E, Feoli-Fonseca JC, Seidman E. The polymorphism at codon 54 of the FABP2 gene increases fat absorption in human intestinal explants. *J Biol Chem*. 2001;276:39679-39684.
6. Spalinger JH, Seidman EG, Lepage G, Menard D, Gavino V, Levy E. Uptake and metabolism of structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol*. 1998;275:G652-G659.
7. Levy E, Trudel K, Bendayan M, Seidman E, Delvin E, Elchebly M, Lavoie JC, Precourt LP, Amre D, Sinnett D. Biological role, protein expression, subcellular

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

localization, and oxidative stress response of paraoxonase 2 in the intestine of humans and rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G1252-G1261.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure I **Cell integrity following Cao-2/15 cell transduction.** A series of studies were undertaken to determine whether the molecular manipulation procedure modified cell growth, differentiation and viability. The expression of villin (A) and sucrase (B), sensitive markers of cell differentiation, was not affected by lentivirus infection. Furthermore, no significant changes were noted in transepithelial resistance that represents an established measure of cellular monolayer integrity and stands for a qualitative assessment of the paracellular pathway aperture (C). Finally, cell viability by trypan blue exclusion was also assessed and was uniformly >98% (data not shown). All these parameters allowed us to conclude that Cao-2/15 cell transduction was not cytotoxic to Caco-2/15 cells and did not disrupt cell differentiation and viability as well as cell and membrane integrity. Results represent the means ± SEM of n=3 independent experiments.

Figure II **Impact of Sar1b overexpression on lipid esterification**. Following transduction with lentivirus-*Sar1b*-GFP and 14-d differentiation, Caco-2/15 cells were incubated with [^{14}C]-oleic acid for 20 h at 37°C. Lipids from cell homogenates and basolateral media were extracted with chloroform-methanol (2:1), separated by TLC and quantitated as described in MATERIALS AND METHODS. Results for, phospholipids (A) and cholesteryl ester (B) are expressed as dpm/mg cell protein, and values

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

represent means ± SEM of 6 separate experiments. *P<0.001, **P<0.0002, ***P<0.0001 vs control Mock cells.

Figure III **Influence of Sar1b overexpression on apolipoprotein biosynthesis and secretion in Caco-2/15 cells**. Following transduction with lentivirus-*Sar1b*-GFP and 14-d differentiation, Caco-2/15 cells were incubated with [^{35}S]-methionine in the apical compartment for 20 hours. Thereafter, cell homogenates and basolateral media were incubated overnight with a mixture of antibodies against apo B-100 (A), apo A-IV (B) and apo E (C) and Protein A/G agarose beads. The immune complexes were then thoroughly washed and analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis, gels were stained in Coomassie Blue and bands corresponding to each apo were excised and counted for the radioactivity incorporated. Data were analyzed as dpm/mg of total protein and represent means ± SEM for six independent experiments. *P<0.0001 vs control Mock cells.

Figure IV **Impact of Sar1b overexpression on monoacylglycerol acyltransferase (MGAT) and diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activities in Caco-2/15 cells.** Following transduction with lentivirus-*Sar1b*-GFP and 14-d differentiation, Caco-2/15 cells were differentiated for a period of 14 days and microsomes were prepared and assayed for the two enzymes. Data were expressed as µmol/min/mg protein and represent the means ± SEM for n=6 independent experiments. *P<0.001, **P<0.003 vs control Mock cells.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011

Figure V **Sar1a protein status in Caco-2/15 cells overexpressing Sar1b.** Sar1b gene expression was forced as described in Materials and Methods. Thereafter, cellular proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted for Sar1a and β-actin. Representative immunoblots are documented.

Downloaded from http://atvb.ahajournals.org/ at McGill University Libraries on September 6, 2011