



**HAL**  
open science

# Métabolisme hépatocytaire et insulino-résistance: Effets d'un régime enrichi en graisses et d'un nouvel antidiabétique " E008 "

Guillaume Vial

► **To cite this version:**

Guillaume Vial. Métabolisme hépatocytaire et insulino-résistance: Effets d'un régime enrichi en graisses et d'un nouvel antidiabétique " E008 ". Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00444169

**HAL Id: tel-00444169**

**<https://theses.hal.science/tel-00444169>**

Submitted on 6 Jan 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université Joseph Fourier - Grenoble 1**

**Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Année 2009**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**

**Discipline : Biologie**

**Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie**

présentée et soutenue publiquement le 13 novembre 2009  
par

**Guillaume VIAL**

---

---

**Métabolisme hépatocytaire et insulino-résistance :  
Effets d'un régime enrichi en graisses et d'un nouvel  
antidiabétique « E008 »**

---

---

**Directeur de thèse : Pr. Xavier Lerverve**

**JURY**

Dr. Gérard CABELLO	Rapporteur
Pr. Louis CASTEILLA	Examineur
Pr. Xavier LEVERVE	Directeur
Dr. Jennifer RIEUSSET	Examineur
Pr. Michel RIGOLET	Rapporteur
Dr. Nellie TALEUX	Examineur

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée – INSERM U884

# Remerciements

**Je tiens à vivement remercier :**

**M. le Professeur Xavier Lerverve** pour m'avoir accepté dans son laboratoire, au sein de son équipe et sous sa direction pour la réalisation de mon doctorat. Je mesure à peine la chance que j'ai eu d'effectuer ma thèse aux côtés de ce grand scientifique ou plutôt de ce grand Homme aux multiples casquettes. Son enthousiasme et son énergie débordante ont motivé les troupes « E008 » durant ces trois dernières années et ont guidé efficacement ces travaux de thèse. A ses côtés, j'ai beaucoup appris mais comme sa source de connaissances est intarissable, il me reste encore beaucoup à découvrir. J'espère ainsi que notre collaboration pourra perdurer avec toute la confiance qu'il m'a accordée durant ces années.

**M. le Professeur Michel Rigoulet** et **M. le Docteur Gérard Cabello** pour avoir accepté de rapporter sur ces travaux.

**Mme le Docteur Jennifer Rieusset** et **M. le Professeur Louis Casteilla** pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette étude en acceptant d'examiner ces travaux.

**Nellie Taleux** pour m'avoir pris sous son aile au début de ma thèse. Sportive, compétitrice par excellence et d'une efficacité remarquable, Nellie m'a « entraîné » pour aller toujours plus loin dans notre quête de connaissances. Ensemble, et avec notre regretté Roland, nous avons certes beaucoup dératé mais toujours dans la bonne ambiance et pour la bonne cause, dit-on. Le décès de Roland a fini de nous rapprocher et un an plus tard, j'espère vivement que notre amitié et unité resteront aussi fortes que ce qu'elles sont.

**Anne-Laure Borel**, cothésarde du clan « E008 » et excellent médecin, ses paroles, certes nombreuses, ont toujours suffi pour me guérir. Son soutien remarquable dans les moments difficiles a été un réconfort permanent pendant ces années passées ensemble. Tous deux à la recherche de la cible de E008, notre complicité au travail a contribué à forger une grande amitié. Je souhaite que celle-ci nous permette de poursuivre conjointement notre lutte contre le diabète malgré la distance qui devrait nous séparer quelques années.

**Cécile Cottet** pour nos récentes collaborations au microscope confocal, au cytomètre en flux mais aussi pour la relecture minutieuse de ce manuscrit et son soutien permanent.

**Dominique Detaille** qui de loin mais avec beaucoup d'attention a suivi et a contribué pleinement à la réalisation de ces travaux.

**Hervé Dubouchaud** pour l'apprentissage des techniques de PCR et de Western-Blots.

**Cindy Tellier** pour les soins qu'elle porte à nos animaux.

**Joelle Demaison** pour son aide au quotidien.

**Sarah Hamant** pour sa disponibilité en toute circonstance, son aide administrative et ses recherches de références introuvables.

**Les plus jeunes du LBFA : Fred, Laurent, Claire, Anna, Sacnicte, Séverine, Alex, Sandrine, Julie, Elodie, Rita** car la réalisation d'une thèse passe aussi par les bons moments partagés au laboratoire ou au-delà.

**Les plus sages : Luc Demaison** qui m'a fait intégrer le Laboratoire, **Cécile Batandier** pour ses conseils de spécialiste sur les ROS, **Eric Fontaine** pour ses discussions animées autour du PTP, **Uwe Schlattner** pour ses connaissances de l'AMPK, **Christiane Chauvin, Karine Couturier, Valérie Novel-Chaté, Gérard Larmurier, Régis Montmayeul et Nicole Lavanchy** pour la bonne ambiance de tous les jours.

Ces remerciements s'adressent également à **l'ensemble du personnel du laboratoire** car dans notre communauté, chacun a son rôle et contribue de près ou d'un peu plus loin aux travaux des autres.

J'aimerais également remercier et rendre hommage à mon ex-codirecteur de thèse, **Roland Favier** qui nous a quittés il y a un peu plus d'un an. Je n'oublierai jamais les longs moments que je partageais avec lui, pour discuter de sciences et réaliser bon nombre d'expériences. Roland m'a ainsi transmis une partie de son savoir, de ses astuces en tout genre et sa soif d'expérimenter. Sa pensée profondément intégrée de bon physiologiste guidait nos projets communs. J'espère seulement que les travaux que nous avons commencés ensemble et que j'ai dû terminer douloureusement en son absence, seront à la hauteur de ce qu'il espérait. Ses pipettes en mains me donnent beaucoup d'énergie pour faire la science qu'il aimait et lui rendre hommage à ma manière tout en espérant qu'il en soit fier.

Mes derniers remerciements, non les moindres, s'adressent à **ma famille**.

Je remercie tout particulièrement **mes parents** et **grands-parents** pour l'amour qu'ils m'ont porté et le goût de l'effort qu'ils m'ont transmis ; **ma sœur**, pour son soutien en tout genre sans lequel je n'aurais jamais fait ce parcours. Le chemin qu'elle a suivi en choisissant de devenir docteur aurait pu me dissuader, tant la rédaction d'une thèse de droit est longue et difficile. Au contraire, elle a su m'ouvrir la voie et surtout me montrer l'exemple pour aller jusqu'au bout en luttant d'arrache pied pour y parvenir. Merci enfin à **Marie-Laure**, qui m'épanouit dans mon autre vie, pour avoir accepté les sacrifices que j'ai dû faire pour mener à bien ces travaux, mais aussi pour avoir contribué à la relecture de ce manuscrit avec l'œil d'un futur médecin.

## Résumé :

### Métabolisme hépatocytaire et insulino-résistance : effets d'un régime enrichi en graisses et d'un nouvel antidiabétique « E008 »

Avec une prévalence en constante augmentation, le diabète de type II est devenu un réel enjeu de santé publique. Cette pathologie se caractérise par une hausse de la production hépatique de glucose, reflet d'une néoglucogenèse accrue qui évoluera en hyperglycémie chronique. Le foie est donc un tissu-cible privilégié pour lutter contre les déséquilibres du métabolisme glucidique. Une nouvelle drogue dérivée de la Metformine et dénuée d'effets secondaires, le E008, a été synthétisée par Merck-Santé pour normaliser la glycémie des sujets diabétiques. Le double objectif de notre travail a consisté à (i) étudier les modifications des flux métaboliques au niveau hépatique dans un modèle nutritionnel de rats développant un syndrome métabolique, (ii) analyser les effets de ce nouveau composé médicamenteux et tenter d'élucider ses mécanismes d'action. Le régime enrichi en graisses entraîne une hausse de la néoglucogenèse associée à des perturbations de la fonction mitochondriale : hausse des radicaux libres, inhibition de la respiration, variation du potentiel rédox. Un dénominateur commun à ces événements pourrait être une altération mutuelle de la composition des lipides membranaires et des quinones. L'administration du nouvel agent antidiabétique E008 à des rats sous régime gras permet de réduire leur production hépatique exacerbée de glucose, en modifiant le contrôle des voies métaboliques. De plus, il induit une inhibition subtile de la respiration cellulaire en agissant à la fois sur la chaîne respiratoire et sur le système phosphorylant (complexe I inhibé et expression réduite de l'ANT). Son action est également liée à une activation de la protéine kinase AMP dépendante (AMPK), par altération des rapports des nucléotides adényliques.

**Mots-clés :** Diabète de type II - Régime enrichi en graisses - Foie - Flux métaboliques - Néoglucogenèse - Hépatocytes - Mitochondries - Métabolisme énergétique.

## **Abstract:**

### **Hepatocytes Metabolism and Insulin Resistance: The Effects of a High-Fat Diet and a New Antidiabetic Compound “E008”**

With a steadily increasing prevalence, type II diabetes is becoming a major public health issue. This pathology is characterized by an increase of the hepatic glucose production, reflecting a raise of gluconeogenesis, which evolves into chronic hyperglycemia. Liver is thus a privileged target to fight against imbalances of glucose metabolism. A new drug derived from the Metformin and devoid of side effects, the E008, was synthesized by Merck-Santé to normalize blood glucose levels in diabetic patients. The dual objective of our work consisted in (i) studying liver metabolic fluxes in a nutritional rat model which exhibits a metabolic syndrome, and (ii) analysing the effects of this new compound while elucidating its mechanisms of action. Animals fed a high-fat diet have an increased gluconeogenesis, associated with disturbances of the mitochondrial function: increase of ROS production, inhibition of oxygen consumption and changes in redox potential. A common denominator in these events could be a mutual alteration of the composition of membrane lipids and quinones. On rats fed with a high-fat diet, E008 treatment decreases the hepatic glucose output by modifying metabolic control. Furthermore, it induces a subtle inhibition of cellular respiration while acting, at the same time, on the respiratory chain activity and phosphorylating system. (Inhibition of complex I and ANT reduced expression). Its action is also related to an activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), by modification of adenine nucleotides ratios.

**Key words:** Type II diabetes - High-fat diet - Liver - Metabolic Fluxes - Gluconeogenesis - Hepatocytes - Mitochondria - Energy Metabolism.

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
Inserm U884 - Université Joseph Fourier  
2280 rue de la Piscine  
BP 53  
38041 Grenoble cedex 9 - FRANCE

# Table des matières

Table des matières .....	7
Liste des abréviations .....	11
Liste des tableaux et figures .....	15
Avant-propos .....	19
Introduction .....	21
1 Insulinorésistance, diabète, foie et mitochondries .....	23
1.1 Généralités .....	23
1.2 Flux métaboliques hépatiques et insulinorésistance .....	27
1.3 Mitochondries et insulinorésistance .....	30
1.4 Traitements de l'insulinorésistance et des pathologies associées .....	34
1.5 AMPK et syndrome métabolique .....	37
2 Tour d'horizon du métabolisme hépatique .....	42
2.1 Généralités .....	42
2.2 L'oxydation des acides gras .....	43
2.2.1 Le contrôle entre l'approvisionnement et la carnitine-palmitoyl transférase .....	46
2.2.2 Le contrôle de la carnitine-palmitoyl transférase .....	46
2.2.3 Le contrôle sur les enzymes en aval de la carnitine-palmitoyl transférase et influence du potentiel rédox .....	47
2.3 Glycolyse et néoglucogenèse .....	48
2.3.1 Généralités .....	48
2.3.2 Les contrôles de la néoglucogenèse à court terme .....	50
2.3.3 Les contrôles à plus long terme de la néoglucogenèse .....	51
2.3.4 L'importance des précurseurs et le métabolisme du glycérol .....	51
2.4 Les transferts des équivalents réduits .....	53
2.4.1 La navette malate/aspartate .....	53
2.4.2 La navette G3P/DHAP .....	54
2.5 L'oxydation phosphorylante .....	55
2.5.1 La chaîne respiratoire .....	55
2.5.2 Le système phosphorylant .....	58
2.5.3 L'organisation supramoléculaire de l'oxydation phosphorylante .....	58
2.5.3.1 L'ATP synthatosome .....	59
2.5.3.2 Les respirasomes .....	59
2.5.4 Le contrôle intégré de l'oxydation phosphorylante .....	61
Procédures expérimentales .....	66
1 Hébergement, traitement et suivi des animaux .....	67
1.1 Etude 1 : Effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique .....	67
1.2 Etude 2 : Effets du traitement chronique par un nouvel antidiabétique « E008 » sur le métabolisme hépatique .....	69
1.3 Etude 3 : Etude des effets du composé E008 <i>in vitro</i> .....	70
2 Prélèvement et préparation du matériel biologique .....	70
2.1 Prélèvement de sang .....	70

2.2	Prélèvement tissulaire et estimation de la composition corporelle .....	70
2.3	Préparation d'hépatocytes isolés.....	71
2.3.1	Perfusion et isolement du foie .....	71
2.3.2	Analyse de la suspension cellulaire .....	73
2.3.2.1	Concentration.....	73
2.3.2.2	Viabilité .....	74
2.4	Techniques d'études et de mesures utilisées avec des hépatocytes isolés .....	74
2.4.1	Incubation.....	74
2.4.2	Traitement des prélèvements cellulaires.....	75
2.4.2.1	Congélation pour les analyses d'expression protéique .....	75
2.4.2.2	Fractionnement cellulaire.....	75
2.4.3	Périefusion .....	76
2.4.3.1	Description du système .....	77
2.4.3.2	Procédure .....	78
2.4.4	Dosages enzymatiques des métabolites extracellulaires.....	79
2.4.4.1	Glucose .....	80
2.4.4.2	Lactate.....	80
2.4.4.3	Pyruvate .....	81
2.4.4.4	Acétoacétate.....	81
2.4.4.5	B-hydroxybutyrate .....	81
2.5	Préparation de mitochondries isolées.....	82
2.5.1	Procédure d'isolement.....	82
2.5.2	Détermination de la concentration protéique de la préparation.....	82
2.6	Techniques d'études et de mesures utilisées sur mitochondries isolées .....	83
2.6.1	Oxygraphie .....	83
2.6.1.1	Principe .....	83
2.6.1.2	Procédure .....	83
2.6.2	Fluorimétrie : Mesure de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	85
2.6.2.1	Principe.....	85
2.6.2.2	Procédure .....	86
2.6.3	Mesure de la capacité de rétention calcique .....	88
2.6.3.1	Principe .....	88
2.6.3.2	Procédure .....	89
2.6.4	Détermination du rendement de l'oxydation phosphorylante : ATP/O .....	89
2.6.4.1	Principe.....	89
2.6.4.2	Procédure .....	90
2.7	Mesure d'activités enzymatiques.....	91
2.7.1	Mesure d'activités mitochondriales.....	91
2.7.1.1	Mesure de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire.....	91
2.7.1.2	Mesure de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire.....	92
2.7.1.3	Mesure de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire.....	92
2.7.1.4	Dosage de l'activité ATPase.....	93
2.7.1.5	Dosage de l'activité de la citrate synthase .....	93
2.7.1.6	Dosage de l'activité de la G3PDH mitochondriale .....	94
2.7.2	Mesure d'activités enzymatiques cytosoliques.....	95
2.7.2.1	Dosage de l'activité G3PDH cytosolique .....	95
2.7.2.2	Dosage de l'activité Glycérol Kinase.....	95
2.8	Analyses de la composition en cytochromes et en quinones des mitochondries.....	96
2.8.1	Détermination de la concentration en cytochromes.....	96
2.8.2	Détermination des concentrations de quinones et d' $\alpha$ -tocophérol.....	97
2.9	Analyse de la composition en acides gras du plasma, du foie et des mitochondries.....	97
2.10	Expressions protéiques.....	98
2.10.1	Préparation des échantillons .....	98
2.10.2	Electrophorèse sur gel SDS-PAGE .....	98
2.10.3	Transfert sur membrane de nitrocellulose .....	99

2.10.4	Saturation (ou blocage).....	99
2.10.5	Détection par immuno-marquage.....	100
2.10.6	Révélation par chimiluminescence.....	100
2.10.7	Analyse par densitométrie.....	100
2.11	Analyse de la transcription de gènes d'intérêt.....	101
2.11.1	Extraction des ARN totaux.....	101
2.11.2	La transcription inverse.....	102
2.11.3	RT-PCR : "Real-Time Polymerase Chain Reaction".....	102
<b>3</b>	<b>Statistiques.....</b>	<b>103</b>
	<b>Résultats et Discussion.....</b>	<b>104</b>
<b>1</b>	<b>Effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique ....</b>	<b>106</b>
1.1	Effets du régime sur la croissance, la dépense énergétique et la composition corporelle.....	106
1.2	Effets du régime sur les compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale.....	110
1.3	Effets du régime sur le fonctionnement mitochondrial.....	112
1.3.1	Le régime HFAT inhibe la respiration mitochondriale.....	112
1.3.2	Le régime HFAT n'affecte pas le rendement de l'oxydation phosphorylante.....	114
1.3.3	Le régime HFAT augmente la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	116
1.4	Effets du régime sur le fonctionnement hépatocytaire.....	120
1.4.1	Le régime HFAT modifie les flux hépatiques.....	120
1.4.2	Le régime HFAT affecte l'état rédox.....	125
1.4.3	Le régime HFAT modifie le contrôle des voies métaboliques.....	126
1.4.3.1	Le régime HFAT modifie la transcription de gènes clés du métabolisme.....	127
1.4.3.2	Le potentiel membranaire mitochondrial : point de contrôle du système.....	128
1.5	Conclusion et Discussion.....	132
<b>2</b>	<b>Effets du traitement E008 sur le métabolisme hépatique.....</b>	<b>136</b>
2.1	Effets du traitement E008 sur des rats sous régime standard.....	136
2.1.1	Effets du traitement sur la croissance, la dépense énergétique, la composition corporelle : toxicologie du produit.....	136
2.1.2	Effets du traitement E008 sur le fonctionnement mitochondrial.....	142
2.1.2.1	Effets du traitement sur la respiration mitochondriale.....	142
2.1.2.2	Effets du traitement E008 sur les compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale.....	146
2.1.2.3	Le traitement E008 inhibe la production mitochondriale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	147
2.1.2.4	Le traitement E008 augmente la capacité de rétention calcique.....	150
2.1.2.5	Effets du traitement E008 sur le rendement de l'oxydation-phosphorylante.....	152
2.1.3	Effets du traitement sur le fonctionnement hépatocytaire.....	156
2.1.3.1	E008 ne modifie pas la respiration cellulaire.....	156
2.1.3.2	E008 inhibe la néoglucogenèse.....	157
2.1.3.3	E008 n'affecte pas le potentiel rédox.....	160
2.1.3.4	Effets transcriptionnels du traitement E008.....	163
2.1.4	Synthèse.....	164
2.2	Effets du traitement E008 sur le modèle HFAT.....	166
2.2.1	Effets du traitement sur la croissance, le quotient respiratoire et la composition corporelle des animaux.....	166
2.2.2	Effets du traitement sur le fonctionnement hépatocytaire de rats sous régime hyper gras.....	170
2.2.2.1	Effets du traitement E008 sur la respiration cellulaire.....	170
2.2.2.2	Le traitement E008 inhibe la néoglucogenèse.....	171
2.2.2.3	Effets du traitement E008 sur le contrôle des flux métaboliques.....	173
2.3	Effets du traitement E008 sur les rats GK.....	184
2.3.1	Effets du traitement E008 sur la respiration cellulaire.....	185
2.3.2	Effets du traitement E008 sur les flux métaboliques.....	186

3	Effets de E008 sur le statut énergétique hépatique et l'activation de l'AMPK .....	190
3.1	Effets de E008 sur les concentrations cytosoliques des nucléotides adényliques .....	190
3.2	Effets de E008 sur les concentrations mitochondriales des nucléotides adényliques .....	193
3.3	Effets de E008 sur l'activation de l'AMPK .....	194
	Conclusions et perspectives .....	200
1	Conclusions .....	201
2	Perspectives .....	202
	Bibliographie .....	204
	Liste des publications et communications.....	224
1	Publications .....	225
2	Communications.....	226

# Liste des abréviations

$\Delta p$	force proton-motrice
$\Delta pH$	gradient de pH
$\Delta\psi$	gradient électrique
AcAc	Acétoacétate
ACC	Acétyl coA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléotide
ADP	Adénosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANT	Adénine nucléotide translocase
AQ9	Aquaporine 9
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinconique
BOH	$\beta$ -hydroxybutyrate
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CaMKK $\beta$	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-dependent protein kinase kinase $\beta$
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
C-I	Complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH-ubiquinone oxydoreductase)
C-II	Complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale (Succinate oxidase-ubiquinone reductase)
C-III	Complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ubiquinol-cytochrome c oxydoreductase)
C-IV	Complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cytochrome c oxydase)
CPT1	Carnitine palmitoyl transférase
DAG	Diacylglycérol
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacéone phosphate
DNP	2,4-dinitrophénol
DNTB	Dinitrothiobenzoïque
EC	Enzyme commission number
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis ( $\beta$ -amino-éthyl éther) tétra-acétique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ETF	Electron transfer flavoprotein

ETF-QO	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase
F1,6dP	Fructose 1,6 diphosphate
F6P	Fructose 6-phosphate
FA	Acides gras
FABP	Fatty acid binding protein
FAD <sup>+</sup>	Flavine adénine dinucléotide oxydée
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide réduite
FAT/CD36	Fatty acid translocase CD36
G3P	Glycérol 3-phosphate
G3PdH	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase
G3PdHc	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytosolique
G3PdHm	Glycérol 3-phosphate déshydrogénase mitochondriale
G6P	Glucose 6-phosphate
GLP1	Glucagon like peptide 1
HCDH	3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
HCl	Chlorure d'hydrogène
HRP	Horseradish peroxidase
IP	Intra-péritonéal
IR	Insulinorésistance
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus kinase
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogénophosphate de potassium
KCl	Chlorure de potassium
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihydrogénophosphate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
MOPS	Acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
mtTFA	Mitochondrial transcription factor (Tfam)
MUFA	Acides gras mono-insaturés
NaCl	Chlorure de sodium
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/ réduite
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NaHCO <sub>3</sub>	Hydrogénocarbonate de sodium
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NEFA	Acides gras non estérifiés
PAGE	Polyacrilamide gel electrophoresis
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Pyruvate carboxylase
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol

PEP	Phosphoénol pyruvate
PGC1	Peroxisome proliferator activate recepto coactivator 1
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Pyruvate kinase
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PSA	Persulfate d'ammonium
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNS	Reactive nitrogen species
RT-PCR	Real time polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Erreur standard à la moyenne
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylène-diamine
TG	Triglycérides
TMPD	N,N,N',N'-tetramethyl-p-phénylenediamine
UCP	Uncoupling protein
VDAC	Voltage dependent anion chanel

**Numéro EC des enzymes rencontrées**

<b>Enzymes</b>	<b>EC Numbers</b>
ACC-alpha: Acetyl-CoA carboxylase 1	EC=6.4.1.2
ACC-beta: Acetyl-CoA carboxylase 2	EC=6.4.1.2
Adenylate kinase	EC=2.7.4.3
Aldolase	EC=2.1.2.13
AMPK: 5'-AMP-activated protein kinase	EC=2.7.11.1
Aspartate aminotransferase	EC=2.6.1.1
BDH: 3-hydroxybutyrate dehydrogénase	EC=1.1.1.30
C-I: NADH-ubiquinone oxydoreductase	EC=1.6.5.3
C-II: Succinate oxidase-ubiquinone reductase	EC=1.3.5.1
C-III: Ubiquinol-cytochrome c oxydoreductase	EC=1.10.2.2
C-IV: Cytochrome c oxydase	EC=1.9.3.1
Collagenase A type IV	EC=3.4.24.3
CPT1-L: Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform	EC=2.3.1.21
CS: Citrate synthase	EC=2.3.3.1
F1 ATPase: F1 portion of ATP synthase	EC=3.6.3.14
FABP1: fatty acid-binding protein 1	EC=2.6.1.1
Fructokinase	EC=2.7.1.4
Fructose-1.6-bisphosphatase	EC=3.1.3.11
Fructose-bisphosphate aldolase	EC=4.1.2.13
GK: Glycerol kinase	EC=2.7.1.30
Glucokinase	EC=2.7.1.2
Glucose-6-phosphatase	EC=3.1.3.9
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	EC=1.1.1.49
GPDH-C: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD <sup>+</sup> ], cytoplasmic	EC=1.1.1.8
GPDH-M: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	EC=1.1.5.3
HCDH: 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	EC=1.1.1.35
Hexokinase	EC=2.7.1.1
LCAD: Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	EC=1.3.99.13
LDH-A: L-lactate dehydrogenase	EC=1.1.1.27
L-PK: Pyruvate kinase.	EC=2.7.1.40
Malate dehydrogenase	EC=1.1.1.37
MCAD: Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	EC=1.3.99.3
PEPCK-C: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	EC=4.1.1.32
PFK: 6-phosphofructokinase	EC=2.7.1.11
PKC: Protein kinase C	EC=2.7.11.13
Proline Oxydase	EC=1.5.99.8
Pyruvate carboxylase	EC=6.4.1.1
Pyruvate dehydrogenase	EC=1.2.4.1
SCAD: Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	EC=1.3.99.2

# Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Modulateurs pharmacologiques et naturels de l'activité AMPK hépatique. ....	39
Tableau 2 : Composition des régimes. ....	68
Tableau 3 : Profil lipidique des régimes. ....	68
Tableau 4 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées. ....	85
Tableau 5 : Concentrations des substrats, inhibiteurs, sondes et étalon utilisés sur mitochondries isolées en fluorimétrie pour l'estimation de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	88
Tableau 6 : Séquences (5'-3') des amorces utilisées pour la RT-PCR. ....	103
Tableau 7 : Effets du régime HFAT sur le foie et les tissus adipeux. ....	109
Tableau 8 : Compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale de rats sous régimes standard ou hyper gras. ....	111
Tableau 9 : Effets du régime HFAT sur la consommation d'oxygène de mitochondries isolées de foie. ....	112
Tableau 10 : Effets du régime HFAT sur les complexes de la chaîne respiratoire et l'activité citrate synthase. ....	113
Tableau 11 : Effets du régime hyper gras sur le <i>pool</i> des quinones mitochondriales. ....	118
Tableau 12 : Effets du traitement E008 sur la masse corporelle et celle de différents organes clefs. ....	140
Tableau 13 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des animaux. ....	141
Tableau 14 : Effets du traitement E008 sur la consommation d'oxygène des mitochondries isolées de foie. ....	142
Tableau 15 : Effets du traitement E008 sur les complexes de la chaîne respiratoire et l'activité citrate synthase. ....	143
Tableau 16 : Compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale de rats sous traitement E008. ....	146
Tableau 17 : Effets du traitement E008 sur les activités enzymatiques GK, G3PdH et HCDH. ....	162
Tableau 18 : Effets du traitement E008 sur les masses corporelles, hépatiques et adipeuses de rats sous régime hyper gras. ....	169
Tableau 19 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des rats sous régime hyper gras. ....	169
Tableau 20 : Effets du traitement E008 sur les complexes de la chaîne respiratoire et les activités enzymatiques CS, GK, G3PdH et HCDH. ....	175
Tableau 21 : Effets du traitement E008 sur les concentrations mitochondriales des quinones et de l' $\alpha$ -tocophérol. ....	177
Tableau 22 : Effets du traitement sur les compositions lipidiques plasmatiques, hépatiques et mitochondriales de rats sous régime hyper gras. ....	181
Tableau 23 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des rats GK. ....	184
Tableau 24 : Effets du composé E008 sur les concentrations mitochondriales des nucléotides adényliques <i>in vitro</i> . ....	193

Figure 1 : Mécanisme hypothétique de lipotoxicité.....	25
Figure 2 : Mécanisme hypothétique de l'interaction entre insulino-résistance du tissu adipeux et développement de la stéatose hépatique.....	26
Figure 3 : Mécanisme d'inhibition du signal insulinique par les acides gras.....	28
Figure 4 : Anomalies de la morphologie mitochondriale hépatique de rats transgéniques Ren2, modèle d'hypertension et d'insulino-résistance.....	31
Figure 5 : Anomalies de la morphologie mitochondriale hépatique de rats sous régime enrichi en graisses.....	31
Figure 6 : Mécanisme hypothétique de développement de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique proposé par Pessayre en 2007.....	33
Figure 7 : Mécanisme d'activation de l'AMPK.....	38
Figure 8 : Oxydation des acides gras.....	44
Figure 9 : Voies de la céto-génèse hépatique.....	45
Figure 10 : Régulation de l'oxydation des acides gras à chaîne longue dans le foie.....	47
Figure 11 : Principales voies de contrôle de la néoglucogénèse et de la glycolyse dans le foie.....	49
Figure 12 : Métabolisme du glycérol et de l'octanoate.....	52
Figure 13 : Voie de transfert des équivalents réduits du cytosol vers la mitochondrie par la navette malate/aspartate.....	54
Figure 14 : Transferts des équivalents réduits du cytosol vers la mitochondrie par la voie du G3P.....	54
Figure 15 : Représentation schématique de l'oxydation phosphorylante.....	55
Figure 16 : Représentation schématique de la possible compétition de réduction sur le pool des quinones.....	57
Figure 17 : Différents modèles de l'organisation de l'oxydation phosphorylante.....	60
Figure 18 : Modèle d'organisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire « The string model ».....	61
Figure 19 : Structure et régulation de la cytochrome c oxydase.....	63
Figure 20 : perfusion du foie.....	72
Figure 21 : Séparation sur huile des compartiments cytosolique et mitochondrial.....	76
Figure 22 : Système de périfusion d'hépatocytes isolés.....	77
Figure 23 : Chambre de périfusion.....	78
Figure 24 : Représentation schématique des voies d'entrées des substrats et des cibles d'action de différents inhibiteurs utilisés pour l'étude de l'oxydation phosphorylante.....	84
Figure 25 : Représentation schématique de la mesure de production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par fluorimétrie.....	87
Figure 26 : Principe de mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante par la technique de l'hexokinase.....	90
Figure 27 : Dépense énergétique, quotient respiratoire, évolution de la masse corporelle et de la prise alimentaire chez le rat HFAT.....	107
Figure 28 : Effets du régime hyper gras sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.....	115
Figure 29 : Effets du régime hyper gras sur la production mitochondriale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	117
Figure 30 : Effets du régime HFAT sur la respiration cellulaire.....	121
Figure 31 : Effets du régime hyper gras sur les flux métaboliques hépatiques.....	122
Figure 32 : Effets du régime hyper gras sur l'état rédox.....	125
Figure 33 : Effets transcriptionnel du régime HFAT au niveau hépatique.....	127
Figure 34 : Effets du régime HFAT sur le potentiel membranaire mitochondrial.....	129

Figure 35 : Effets du régime hyper gras sur le système phosphorylant. ....	131
Figure 36 : Evolution des prises alimentaires et hydriques de rats témoins ou sous traitement E008. ....	137
Figure 37 : Evolution de la masse corporelle au cours de 3 semaines de traitement des rats Wistar. ....	137
Figure 38 : Dépense énergétique et quotient respiratoire de rats témoins ou sous traitement E008. ....	138
Figure 39 : Effets du traitement E008 sur la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	148
Figure 40 : Effets du traitement chronique E008 sur les capacités de rétention calcique mitochondriales. ....	150
Figure 41 : Effets du traitement E008 sur le rendement de l'oxydation phosphorylante. ....	152
Figure 42 : Effets du traitement E008 sur l'expression hépatique de l'isoforme 2 de l'ANT. ....	154
Figure 43 : Effets de 3 semaines de traitement E008 sur la respiration cellulaire. ....	156
Figure 44 : Effets du traitement E008 sur les flux métaboliques hépatiques. ....	158
Figure 45 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox. ....	161
Figure 46 : Effets du traitement E008 sur la transcription de certains gènes impliqués dans le métabolisme hépatique du glycérol et des acides gras. ....	163
Figure 47 : Evolution des prises alimentaires et hydriques des rats sous régime hyper gras associé ou non au traitement E008. ....	166
Figure 48 : Evolution de la masse corporelle au cours des 8 semaines de traitement des rats sous régime hyper gras. ....	167
Figure 49 : Quotient respiratoire de rats sous régime hyper gras associé ou non au traitement E008. ....	168
Figure 50 : Effets de 8 semaines de régime hyper gras associé ou non au traitement E008 sur la respiration cellulaire. ....	170
Figure 51 : Effets du traitement E008 sur les flux métaboliques hépatiques de rats sous régime hyper gras. ....	172
Figure 52 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox d'hépatocytes de rats sous régime hyper gras. ....	174
Figure 53 : Effets du traitement E008 sur le rendement par rapport à l'oxygène des mitochondries isolées de foie. ....	176
Figure 54 : Effets du traitement E008 sur l'expression hépatique de l'ANT-2. ....	179
Figure 55 : Effets du traitement E008 des rats sous régime hyper gras sur la transcription de gènes cibles. ....	180
Figure 56 : Effets de 3 semaines de traitement E008 des rats GK sur la respiration cellulaire. ....	185
Figure 57 : Effets du traitement E008 sur les flux métaboliques hépatiques des rats GK. ....	187
Figure 58 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox des hépatocytes de rats GK. ....	188
Figure 59 : Effets du composé E008 <i>in vitro</i> sur la concentration en ATP cytosolique. ....	190
Figure 60 : Effets du composé E008 <i>in vitro</i> sur la concentration en ADP cytosolique. ...	191
Figure 61 : Effets du composé E008 <i>in vitro</i> sur la concentration en AMP cytosolique. ...	192
Figure 62 : Effets du composé E008 sur les rapports des nucléotides adényliques <i>in vitro</i> . ....	192
Figure 63 : Effets de l'incubation des hépatocytes en présence de E008 sur l'état de phosphorylation de l'AMPK. ....	195

Figure 64 : Cinétique de l'activation de l'AMPK par incubation des hépatocytes en présence de E008 ou de Metformine. ....	196
Figure 65 : Effets de l'incubation des hépatocytes en présence de E008 sur l'état de phosphorylation de l'ACC. ....	197
Figure 66 : Effets de 3 semaines de traitement E008 sur l'expression des sous-unités $\alpha$ de l'AMPK. ....	198

# Avant-propos

« [...] c'est bien la vérité elle-même qui nous intéresse, et si nous la cherchons toujours, c'est parce que ce que nous en avons trouvé jusqu'à présent ne peut nous satisfaire. »

Claude Bernard

*Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, 1865*

Les maladies métaboliques induites par un manque d'activité physique et une alimentation riche en graisses et/ou en sucres raffinés, constituent aujourd'hui un problème de santé publique majeur. L'origine génétique et environnementale de ces affections paraît désormais incontestable. Toutefois, malgré des décennies de recherche scientifique active, les mécanismes qui conduisent à l'apparition des troubles métaboliques restent, encore aujourd'hui, partiellement incompris. Si l'insulinorésistance sous-tend le diabète de type 2, la diminution de l'utilisation du glucose au niveau musculaire ne peut à elle seule expliquer l'ensemble des dysrégulations métaboliques. En effet, il semble que des modifications du fonctionnement du foie participent également à la survenue de ces troubles. C'est dans ce contexte que s'inscrivent nos travaux de recherche qui ont consisté à étudier les troubles métaboliques hépatiques associés à l'insulinorésistance induite par un régime enrichi en graisses et à tenter d'élucider les mécanismes d'action d'un nouvel agent antidiabétique, le « E008 ».

La partie introductive de ce mémoire de thèse résume l'importance du foie, l'implication des mitochondries et de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans le développement des maladies métaboliques induit notamment par des régimes enrichis en graisses, mais également les traitements actuels pour lutter contre l'insulinorésistance. Puis, après la description des procédures expérimentales utilisées, sont exposés et discutés

les résultats obtenus en réponse à deux objectifs. Le premier a consisté à analyser les troubles métaboliques hépatiques dans un modèle nutritionnel animal d'insulinorésistance (Partie 1), le second, à étudier les effets d'un traitement chronique par le nouvel antidiabétique « E008 », développé et produit par Merck, afin de déterminer son mécanisme d'action (Parties 2 et 3).

Ces travaux ont été réalisés au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (Unité INSERM U884) à Grenoble. Ils constituent la synthèse de trois années d'études financées par Merck. La première partie de ces travaux, consacrée à l'étude des effets métaboliques hépatiques induits par un régime enrichi en graisses, a obtenu un prix de recherche aux Journées Francophones de Nutrition en 2008 et a ainsi pu bénéficier d'un important soutien financier, alloué par la société Fresenius Kabi sous l'égide de la SFNEP (Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme).

# **Introduction**

Partie 1 :  
Insulinorésistance, diabète, foie et  
mitochondries

# 1 Insulinorésistance, diabète, foie et mitochondries

## 1.1 Généralités

Les déséquilibres nutritionnels liés à une surcharge en matières grasses et/ou en sucres raffinés, associés au manque d'activité physique, sont de plus en plus fréquemment observés dans notre société. Ils conduisent à des dérèglements du métabolisme aboutissant à l'obésité et au diabète de type 2. De nos jours, ces maladies métaboliques constituent un réel problème de santé publique du fait de leur prévalence, dont l'augmentation dans les pays développés et en voie de développement, entraîne un accroissement du coût de prise en charge (Wild et al. 2004; Bringer et al. 2009). De plus, la multitude des complications associées à ces pathologies en font également une maladie à morbidité très élevée. L'histoire et la diversité des manifestations de ces maladies métaboliques ont généré une sémantique complexe et variée. Reaven en 1988 a regroupé sous le terme de syndrome X ou syndrome d'insulinorésistance un ensemble de facteurs de risques cardiovasculaires incluant résistance à l'insuline, hypertension artérielle et hypertriglycéridémie (Reaven 1997). Plus récemment, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a proposé le terme de « syndrome métabolique » qui peut être défini par la présence d'une intolérance au glucose ou d'un diabète de type 2 et/ou d'une résistance à l'insuline associée à au moins deux anomalies suivantes : pression artérielle supérieure à 160/90 mmHg, triglycéridémie supérieure à 1.7 mmol/L et/ou cholestérol HDL inférieur à 0.9 mmol/L, obésité androïde (rapport taille/hanches) >0.9 chez l'homme et >0.85 chez la femme, présence d'une microalbuminurie. Nous pouvons actuellement y associer la stéatose hépatique d'origine non alcoolique (NASH) (Yeh et al. 2007).

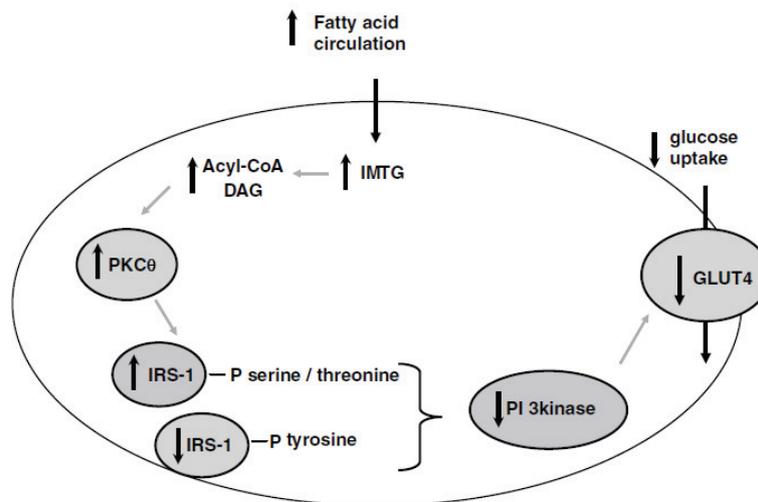
La résistance à l'insuline, caractérisée par un état de diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'hormone, est au premier plan dans le syndrome métabolique. L'insulinorésistance sous-tendrait ainsi les diverses pathologies liées au syndrome métabolique : diabète de type 2, hypertension artérielle, hypertriglycéridémie, apnées du sommeil, stéatose hépatique non alcoolique (NASH).

Le diabète de type 2 (ou diabète non insulino-dépendant (DNID)) est aujourd'hui considéré comme une « épidémie » mondiale. Sa prévalence a augmenté drastiquement durant les 20 dernières années et continue de croître. En France, elle approche les 4% en

2007 selon le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire de l'INVS (Institut de Veille Sanitaire). Ce chiffre est certainement sous-estimé par l'ignorance de beaucoup de personnes de l'existence de leur maladie du fait de la grande fréquence des formes asymptomatiques (Bringer, Fontaine et al. 2009). Le diabète de type 2 est une pathologie évolutive. Les trois anomalies sont un état d'insulinorésistance conduisant initialement à un hyperinsulinisme, une élévation de la production hépatique de glucose, puis à un déficit de sécrétion d'insuline. De ce fait, le stade ultime de la maladie nécessite le recours à l'insulinothérapie.

L'étiologie complexe de cette pathologie est encore discutée. Elle résulte à la fois de facteurs génétiques et environnementaux dont le surpoids lié à la sédentarité et à la surnutrition. L'histoire de l'humanité a fait que l'homme a dû survivre à des périodes de jeûnes successives. Selon l'hypothèse décrite par J.V. Neel (Neel 1999), les hommes auraient ainsi été sélectionnés pour leur aptitude à résister à ces privations de nourriture grâce à des gènes de survie « thrifty genes » qui leur confèrent un rendement élevé d'absorption des nutriments et de production énergétique. Aujourd'hui, l'abondance alimentaire associée au manque d'activité physique, font que ces génotypes d'homme « chasseur-cueilleur » seraient particulièrement mal adaptés au mode de vie actuel. Ces gènes constitueraient une prédisposition au développement de l'obésité et du diabète de type 2. A l'inverse, d'autres auteurs pensent que le développement de l'obésité suite aux changements brutaux de sociétés est un mécanisme de protection et d'adaptation à l'environnement induit par ces mêmes gènes. Les conditions environnementales (alimentation et activité physique) sont finalement déterminantes dans le développement de cette pathologie, mais un fond génétique propice doit également être pris en considération (Zimmet et al. 2001; Diamond 2003).

L'insulinorésistance des différents tissus de l'organisme est responsable à terme de l'altération de leur fonction respective. Les muscles squelettiques d'individus insulinorésistants présentent une diminution de l'utilisation des acides gras liée à l'accumulation intracellulaire de triglycérides. Un cercle vicieux s'installe alors, car l'activation de la voie des PKC (protéine kinase C) accroît la résistance à l'insuline (Figure 1) (Russell 2004).

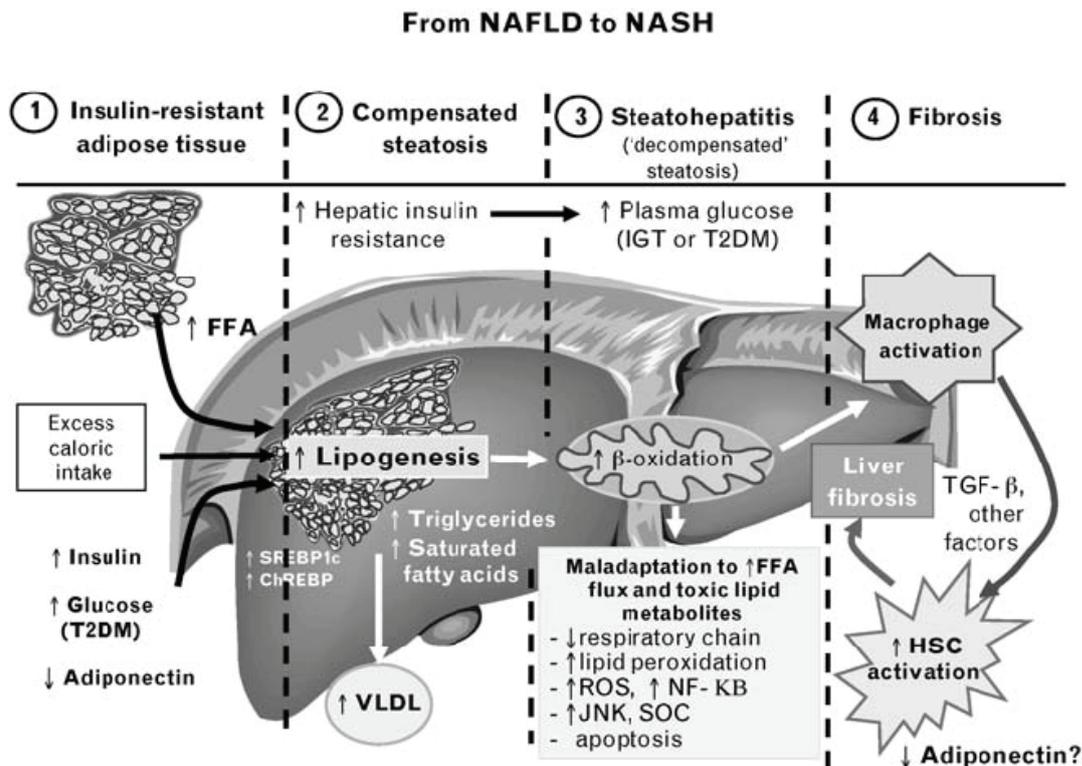


**Figure 1 : Mécanisme hypothétique de lipotoxicité.**

Elevated levels of free fatty acids and IMTGs results in increases in long-chain acyl-CoA and DAG. The synthesis of DAG, a metabolite of IMTG hydrolysis, can activate PKC which in turn phosphorylates IRS-1 on the serine/threonine site. As a result, the tyrosine phosphorylation of IRS-1 is inhibited, which further inhibits downstream, PI3-kinase activity and insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane. The reduction in GLUT4 translocation would reduce the uptake of circulating glucose and therefore present a resistance to insulin. IMTGs, intramyocellular triglycerides; DAG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; IRS-1, insulin receptor substrate-1; PI3-kinase, phosphatidylinositol 3-kinase; GLUT4, glucose transporter-4. Russell, A. P. (2004). "Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4: S66-71 (Russell 2004).

L'origine de l'insulinorésistance au niveau musculaire fait encore débat, mais elle est sans doute liée à une diminution de la  $\beta$ -oxydation, à une baisse de la densité mitochondriale et à un défaut de la voie de signalisation insulínique.

Le tissu adipeux joue également un rôle majeur dans l'insulinorésistance en sécrétant des molécules « signales » dont le Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) et l'adiponectine qui modifient le métabolisme énergétique dans son ensemble. La résistance à l'insuline du tissu adipeux blanc provoque, par un défaut du signal insulínique, une diminution de la lipogénèse. Les acides gras excédentaires sont alors stockés préférentiellement dans le muscle et le foie. Cette accumulation ectopique de graisse dans ces organes aggrave à son tour la situation en induisant des mécanismes inflammatoires et une altération de leur fonction. Au niveau du foie, cette accumulation de graisse conduit à la stéatose non-alcoolique (Cusi 2009).



**Figure 2 : Mécanisme hypothétique de l'interaction entre insulino-résistance du tissu adipeux et développement de la stéatose hépatique.**

(1) Insulin-resistant adipose tissue: in the setting of metabolic syndrome and/or T2DM, elevated rates of lipolysis/plasma FFA from insulin-resistant adipose tissue combined with hyperinsulinemia and hyperglycemia stimulate excessive hepatic triglyceride synthesis and the formation of toxic saturated fatty acids; (2) Compensated steatosis: steatosis in turn may: exacerbate hepatic insulin resistance, stimulate VLDL secretion, and increase mitochondrial beta-oxidation. If a new steady state is achieved, only benign steatosis and/or dyslipidemia (high triglyceride, low HDL-C) takes place; (3) Steatohepatitis: if mitochondrial function cannot adapt to the increased FFA flux and respiratory oxidation collapses, lipid-derived toxic metabolites activate inflammatory pathways and hepatocyte lipotoxicity with stimulation of chronic necrosis and inflammation; (4) Fibrosis: the magnitude of the cross-talk between hepatocytes, macrophages, and HSCs determines the degree of the fibrogenic response and potential progression to cirrhosis. In his setting, low plasma adiponectin levels are believed to promote steatosis and fibrosis by allowing unchecked triglyceride synthesis and activation of HSCs, respectively. FFA, free fatty acid; HDL-C, high-density lipoprotein-C; HSC, hepatic stellate cell; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; T2DM, type 2 diabetes mellitus. Cusi, K. (2009). "Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 16(2): 141-9 (Cusi 2009).

L'insulino-résistance hépatique a des conséquences majeures qui se répercutent au niveau systémique. La production hépatique de glucose est accrue ainsi que la synthèse des VLDL (Very Low Density Lipoprotein). La glycémie à jeun est alors augmentée et traduit l'installation du diabète de type 2. De nombreuses perturbations des flux métaboliques au niveau hépatique apparaissent alors. L'accumulation de graisse provoquant un statut inflammatoire est sans doute responsable du développement de la stéatose hépatique non-alcoolique mais l'origine du déclenchement de ce phénomène reste à déterminer. (Figure 2).

### ***1.2 Flux métaboliques hépatiques et insulino-résistance***

L'insulino-résistance est responsable d'importantes modifications des flux métaboliques. Au niveau hépatique on retiendra principalement une élévation de la production hépatique de glucose. Ce phénomène, responsable de l'hyperglycémie des diabétiques de type 2, résulte de l'augmentation du flux de la voie de la néoglucogénèse (DeFronzo et al. 1989; Boden et al. 2005). En effet, l'auto-régulation hépatique entre les différents flux, de la glycolyse, de la néoglucogénèse, de la glycogénolyse ou de la glycogénèse, est altérée par l'insulino-résistance.

L'insulino-résistance augmente la production hépatique de glucose en diminuant la capacité de l'insuline à inhiber la glycogénolyse et la néoglucogénèse. L'altération du signal insulinique n'est pas la seule cause des modifications des flux puisque les acides gras libres contribuent également à augmenter la production hépatique de glucose en activant la néoglucogénèse par un effet allostérique à la fois sur la glucose-6-phosphatase et la glucokinase. En effet, les acyl-CoA seraient capables d'activer la glucose-6-phosphatase et inhiberaient la translocation et l'activité de la glucokinase (Lam et al. 2003). Par ailleurs, l'hyper-glucagonémie observée chez de nombreux diabétiques pourrait également expliquer l'augmentation de production hépatique de glucose par des effets transcriptionnels sur les enzymes de la voie de la néoglucogénèse (Cf partie 2 de l'introduction, métabolisme du glucose) (Dunning et al. 2007).

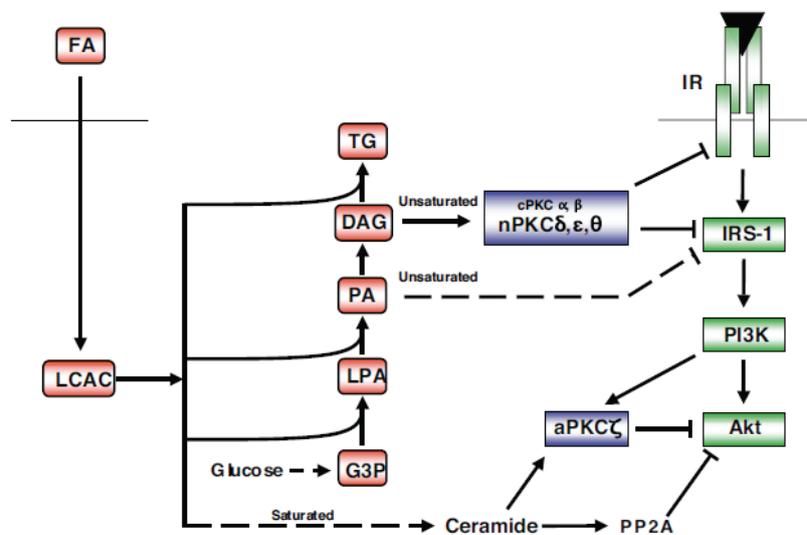
Les mécanismes moléculaires conduisant à l'insulino-résistance et à l'augmentation de la production hépatique de glucose ne sont que partiellement décrits. Différentes hypothèses sont avancées dans plusieurs directions :

Le nombre de récepteurs à l'insuline présents sur la surface cellulaire serait diminué par une dégradation accrue des récepteurs à l'insuline associés à l'hormone. L'activation de tyrosine-phosphatases (PTP1B et LAR) a également été proposée car elle serait responsable de la désactivation des récepteurs à l'insuline et des protéines IRS (Basciano et al. 2009).

De la même manière, l'activation de kinases de stress comme Jun kinase et IKK $\beta$  kinase par la voie NF $\kappa$ B contribue à réduire le signal insulinique en phosphorylant les

protéines IRS sur les serines 307 et 312. L'activation de ces protéines de stress est certainement liée à l'état d'inflammation de bas grade qui survient lors de la mise en place de l'insulinorésistance, état caractérisé par l'élévation des concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires dont le TNF $\alpha$  et l'IL-6 (Bastard et al. 2006; Shoelson et al. 2007). L'origine de ce stress serait une élévation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries. Le rôle de ces organites est détaillé dans la partie suivante qui leur est consacrée (page 30).

Les acides gras agiraient par le biais des DAGs (diacylglycérols) dont l'accumulation intracellulaire provoque une activation des PKC. Celles-ci interagissent avec une multitude de signaux de transduction intracellulaire mais la cible privilégiée de ces kinases est la sous-unité  $\beta$  de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline. Ainsi, en inhibant l'autophosphorylation de ce récepteur ce phénomène s'oppose à la transduction du signal insulinique (Idris et al. 2001; Schmitz-Peiffer et al. 2008).



**Figure 3 : Mécanisme d'inhibition du signal insulinique par les acides gras.**

Lipid oversupply leads to the generation of distinct intracellular mediators of insulin resistance. Fatty acids entering the cell are activated by the formation of LCAC. Saturated fatty acid favors ceramide accumulation due to the requirement for palmitate during de novo synthesis, which in turn leads to the inhibition of Akt, in part due to aPKC $\zeta$  action. In contrast, DAG species derived from unsaturated fatty acids favor nPKC activation and inhibition at the level of the insulin receptor (IR), or IRS-1. In addition, another unsaturated fatty acid-derived species, dilinoleoyl-phosphatidic acid (PA), can reduce IRS-1 tyrosine phosphorylation in a PKC-independent manner (49). G3P, glycerol 3-phosphate; LPA, lysophosphatidic acid; TG, triglyceride. See text for further details. Schmitz-Peiffer, C. and T. J. Biden (2008). "Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes." *Diabetes* 57(7): 1774-83 (Schmitz-Peiffer et Biden 2008).

En condition d'insulinorésistance, des modifications profondes des flux métaboliques sont observées : les voies métaboliques catalytiques semblent être inhibées alors que les voies anaboliques seraient activées. L'enzyme clef qui est au cœur des régulations métaboliques, et responsable de l'orientation globale des flux, est l'AMP-activated protein kinase (AMPK). Des modifications de son activité seraient alors responsables des perturbations des flux métaboliques observées dans cette pathologie (Cf partie 1.5 page 37).

Selon la disponibilité des substrats ou en fonction des conditions nutritionnelles des animaux, les modifications des flux métaboliques induites par l'insulinorésistance ne sont pas identiques. Chez le sujet sain, à jeun, la voie de la  $\beta$ -oxydation est majoritaire. Celle-ci est réduite chez le sujet insulinorésistant. A l'état nourri, ou en période postprandiale, l'utilisation du glucose est dominante sous l'influence de l'insuline. La transition entre l'utilisation des lipides et celle des glucides est normalement rapide. Le quotient respiratoire des individus passe ainsi d'environ 0.7 à jeun à 1 en période postprandiale. La capacité d'alterner entre l'utilisation des lipides et des glucides est appelée « flexibilité métabolique » par certains auteurs (Storlien et al. 2004; Nunn et al. 2009). Les individus insulinorésistants ont perdu cette flexibilité métabolique. En effet, la disponibilité des substrats est altérée par le taux élevé d'acides gras libres circulant et l'hyperglycémie chronique à l'état nourri ou à jeun. L'augmentation physiologique de la lipolyse à jeun n'est pas inhibée en période postprandiale par défaut du signal insulinique, d'où une élévation de la concentration plasmatique d'acides gras libres qui par la même favorise la production hépatique de glucose. Le quotient respiratoire des sujets insulinorésistants est donc relativement stable quel que soit leur état nutritionnel (Galgani et al. 2008).

A ce jour, l'origine des dysfonctionnements hépatiques qui surviennent avec l'insulinorésistance n'est pas totalement élucidée. Toutefois, une altération du fonctionnement mitochondrial est probable.

### 1.3 Mitochondries et insulino-résistance

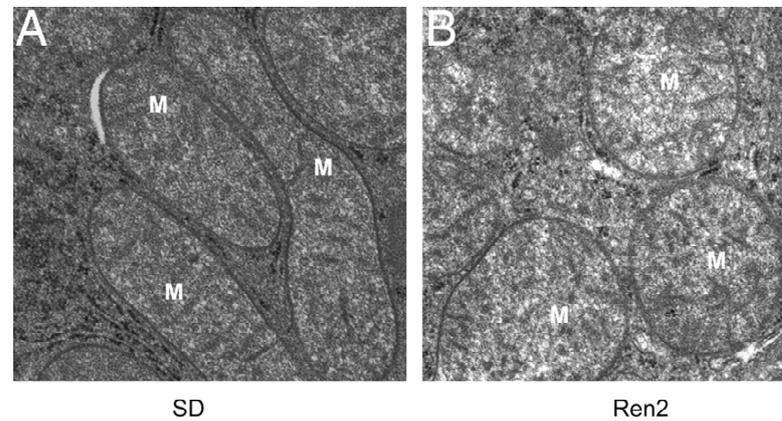
Les régulations métaboliques dépendent fortement des mitochondries qui jouent un rôle capital dans l'homéostasie énergétique. Or, de nombreuses études ont montré des relations étroites entre les dysfonctionnements mitochondriaux et l'insulino-résistance, que ce soit au niveau musculaire (Krssak et al. 1999; Befroy et al. 2007; Mogensen et al. 2007) ou hépatique mais également dans le tissu adipeux, les vaisseaux et le pancréas (Brownlee 2005; Wiederkehr et al. 2006; Ashrafian et al. 2007; Nisoli et al. 2007). Il est ainsi probable que les dysfonctionnements mitochondriaux soient responsables de la survenue de l'insulino-résistance et des perturbations métaboliques qui s'en suivent. Seulement, l'origine de ces troubles anime encore les débats.

Les facteurs génétiques en lien avec l'expression des gènes codants pour les protéines de l'oxydation phosphorylante sont avancés par plusieurs auteurs. Petersen a suggéré en 2004 que les dysfonctionnements mitochondriaux impliqués dans la survenue de l'insulino-résistance étaient héréditaires (Petersen et al. 2004). En effet, il a montré que des individus apparentés à des patients diabétiques de type 2 présentaient un défaut d'utilisation du glucose par rapport à des sujets sains appariés. Par ailleurs, puisque le génome mitochondrial est particulièrement affecté par les radicaux libres produits au sein des mitochondries, des mutations sont susceptibles d'apparaître au cours du temps sur ce génome particulier et affecteraient ainsi l'expression de certains gènes mitochondriaux. L'hypothèse d'un dysfonctionnement mitochondrial induit par des modifications d'expression génique est également soutenue par des études réalisées par Mootha et Soyala sur des biopsies musculaires humaines de patients insulino-résistants, qui montrent une altération de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Mootha et al. 2003; Soyala et al. 2006). Par contre, la seule étude réalisée sur biopsie humaine hépatique, révèle une surexpression des gènes impliqués dans l'oxydation phosphorylante (Takamura et al. 2008).

Chez le sujet insulino-résistant, diabétique de type 2 et/ou obèse, le nombre et la morphologie des mitochondries semblent altérés. Selon le tissu analysé, ces observations sont variées.

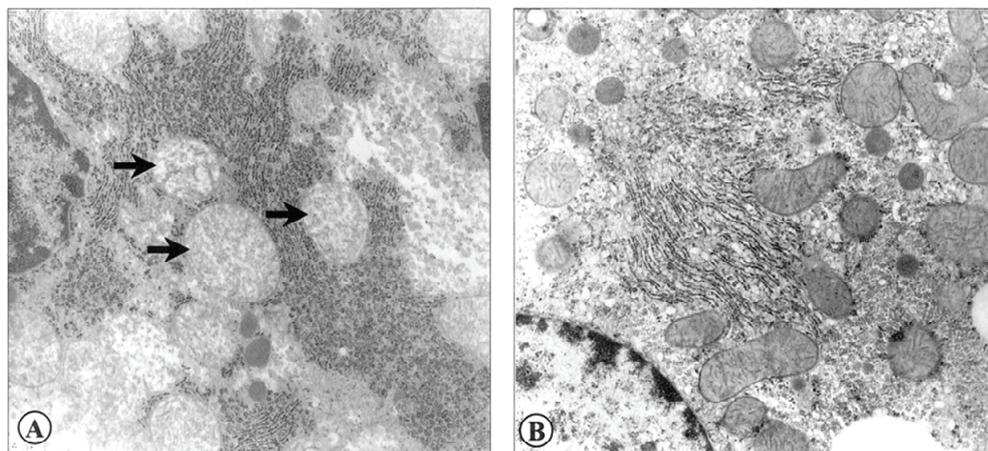
Dans un modèle de rats insulino-résistants, suite à la stimulation du récepteur de type 1 à l'angiotensine, Kim et al. ont observé des modifications de la morphologie des mitochondries (Figure 4) (Kim et al. 2008). D'autres auteurs ont fait le même constat sur

des rats soumis à un régime enrichi en graisses et développant une NASH (Figure 5) (Lieber et al. 2004).



**Figure 4 : Anomalies de la morphologie mitochondriale hépatique de rats transgéniques Ren2, modèle d'hypertension et d'insulinorésistance.**

Mitochondrial abnormality in the liver of transgenic Ren2 male rat at 12 weeks of age. A, The normal hepatic mitochondrial morphology in the Sprague–Dawley control male rat model at 12 weeks of age. B, Mitochondrial abnormality in morphology in the 12-week-old transgenic Ren2 male rat model of hypertension and insulin resistance. Note the swollen and decreased matrix density by transmission electronic microscopy. Magnification, 25 000 (Kim et al. 2008).



**Figure 5 : Anomalies de la morphologie mitochondriale hépatique de rats sous régime enrichi en graisses.**

Electron microscopy of hepatic mitochondria. Mitochondria in the rats fed the high-fat diet ad libitum (A) showed degenerative changes with rarefied matrix and loss of cristae (arrows). These changes were prominent in most of the mitochondria in the rats fed the high-fat diet but were rare in the mitochondria in the rats fed the standard diet ad libitum (B). The magnification is x25 000 (Lieber et al. 2004).

Ces observations renforcent non seulement l'existence de l'association entre des altérations de la fonction mitochondriale et l'insulinorésistance, mais aussi l'importance de la structure et de l'organisation mitochondriale dans le fonctionnement de ces organites.

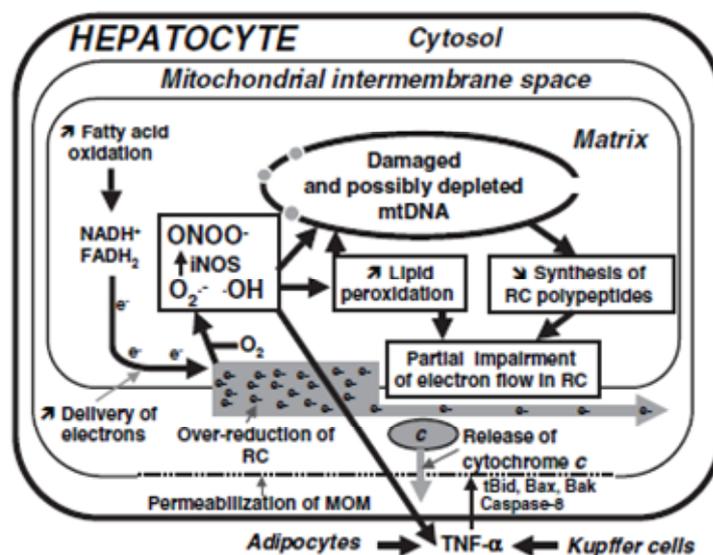
Une diminution de l'expression de PGC1- $\alpha$ , facteur de transcription contrôlant la biogenèse mitochondriale, liée à une sous expression de l'AMPK, serait responsable de la réduction du nombre de mitochondries (Patti et al. 2003). Toutefois, la simple diminution de biogenèse mitochondriale, ne suffit pas à expliquer la totalité des dysfonctionnements mitochondriaux observés dans cette pathologie (Morino et al. 2005). Des anomalies de fonctionnement internes aux mitochondries, diminuant leur respiration et la production d'ATP, sont également à prendre en considération (Perez-Carreras et al. 2003).

Le stress oxydant généré principalement par les mitochondries semble être à l'origine de ces dérèglements. En effet, certains auteurs proposent qu'une élévation de la fourniture en électrons de la chaîne respiratoire soit responsable de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène du fait d'un défaut de consommation du potentiel mitochondrial par diminution de la demande en ATP. Cet accroissement de la production d'espèces réactives de l'oxygène altérerait l'ADN, les protéines, les lipides membranaires aboutissant aux dysfonctionnements mitochondriaux. Avec l'âge, le cumul de ces altérations conduirait au développement de l'insulinorésistance car la diminution des capacités oxydatives au niveau musculaire et hépatique favorise l'accumulation intracellulaire de lipides, elle-même responsable du développement de cette pathologie.

Dans le foie, des études montrent qu'une diminution de la  $\beta$ -oxydation induirait une accumulation intracellulaire de lipides et de DAG qui serait à l'origine de l'activation de la voie PKC et par conséquent de l'inhibition du signal insulinaire (Zhang et al. 2007).

Au contraire, d'autres arguments soutiennent une augmentation de la voie d'oxydation des acides gras dans les hépatocytes qui conduit au développement de l'insulinorésistance et à la stéatose hépatique (Pessayre et al. 2004; Pessayre 2007). Pessayre propose ainsi un mécanisme adaptatif des hépatocytes évitant une accumulation trop massive des acides gras et des triglycérides intracellulaires. La  $\beta$ -oxydation serait activée par l'augmentation de la disponibilité en acides gras, par la diminution de la sensibilité de la CPT1 à son inhibition par le malonyl-CoA (Cook et al. 1987) et par l'activation de PPAR- $\alpha$ . Un cercle vicieux s'installerait alors, car l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation accroît la production d'équivalents réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) et la fourniture

d'électrons à la chaîne respiratoire alors que la demande en ATP n'est pas augmentée. Ainsi, le déséquilibre du système de l'oxydation phosphorylante favorise la production d'espèces réactives de l'oxygène causant à leur tour des dommages mitochondriaux et cellulaires. Les capacités oxydatives s'altèrent, la production de ROS s'élève et le déséquilibre s'installe. Au final, la production excessive de radicaux libres activerait les protéines de stress comme les sérine-thréonine-kinases (Jun kinase et  $\text{IKK}\beta$ ) qui sont capables de réduire la transduction du signal insulinique en phosphorylant les sérines 307 et 312 des protéines IRS.



**Figure 6 : Mécanisme hypothétique de développement de l'insulinorésistance et de la stéatose hépatique proposé par Pessayre en 2007.**

Several vicious cycles may cause hepatic mitochondrial dysfunction in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Adipocytes, Kupffer cells and hepatocytes secrete tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in NASH. The TNF- $\alpha$  acts on its receptor to trigger caspase-8 activation, Bid truncation, Bax translocation to mitochondria and its association with Bak, to permeabilize the mitochondrial outer membrane (MOM), and partially release cytochrome c from mitochondria, thus partially hampering electron flow in the respiratory chain (RC). Concomitantly, the increased  $\beta$ -oxidation rate increases the formation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH) and reduced flavine-adenine dinucleotide (FADH<sub>2</sub>) and the delivery of electrons to the RC. The imbalance between an increased delivery of electrons to the RC and a partial block in the outflow of electrons from the RC causes the accumulation of electrons in the RC. Overly reduced RC components react with oxygen to form the superoxide anion radical, hydrogen peroxide, the hydroxyl radical, and also peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) in the presence of induced levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS). These reactive species can cause oxidative lesions in mtDNA and may deplete mtDNA, which may decrease the synthesis of mtDNA-encoded RC polypeptides, thus further blocking electron flow in the RC, and further increasing mitochondrial ROS formation. Mitochondrial ROS may also damage mitochondrial cardiolipin, and may release reactive lipid peroxidation products, which react with both mtDNA and cytochrome c oxidase, to further block electron flow in the respiratory chain and further increase mitochondrial ROS formation. Pessayre, D. (2007). "Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol Hepatol 22 Suppl 1: S20-7 (Pessayre 2007).

Finale­ment, l'analyse de l'ensemble de la littérature ne nous permet pas de trancher entre un dysfonctionnement mitochondrial inné (prédisposition gé­né­ti­que) ou acquis (modification d'expression et de fonction de protéines mitochondriales), quantitatif ou qualitatif (diminution du nombre ou de la fonction des mitochondries). Par contre, il est à ce jour évident que l'altération de la fonction mitochondriale fasse partie intégrante de la physiopathologie de l'insulinorésistance, qu'elle en soit la cause ou la conséquence.

### ***1.4 Traitements de l'insulinorésistance et des pathologies associées***

Dans cette partie, nous nous limiterons principalement aux descriptifs des traitements impliquant les mitochondries et la fonction hépatique.

Avant d'avoir recours à des traitements pharmacologiques, la première indication est la pratique d'activité physique régulière et une amélioration de l'alimentation avec diminution de l'apport calorique et de la fraction d'acides gras saturés. La diète et l'exercice, par divers mécanismes permettent d'améliorer considérablement la sensibilité à l'insuline et les troubles qui lui sont associés (van der Heijden et al. 2009). L'activation de l'AMPK permet de récapituler la multitude des effets observés par cette stratégie de lutte contre l'insulinorésistance. Elle favorise la biogenèse mitochondriale en activant le facteur de transcription PGC1- $\alpha$ , active les voies cataboliques et inhibe les voies anaboliques. L'augmentation de l'oxydation des acides gras abaisse leur concentration plasmatique puis l'accumulation intracellulaire de leurs dérivés et lève ainsi les mécanismes de lipotoxicité. L'efficacité de cette thérapie n'est pas réduite au tissu musculaire puisqu'une amélioration de l'insulinosensibilité est également observée dans le foie (Kirwan et al. 2009).

L'action de plusieurs traitements pharmacologiques utilisés pour lutter contre l'insulinorésistance passe également par l'activation de l'AMPK. Toutefois, la cible directe de ces médicaments n'est pas nécessairement l'AMPK elle-même, mais est d'abord en relation avec les mitochondries.

La Metformine, de la famille des biguanides, est le médicament actuellement le plus utilisé pour lutter contre ces pathologies. Bien que son efficacité soit clairement validée depuis 40 ans, les mécanismes d'action de ce composé ne sont pas totalement élucidés. L'action principale de ce biguanide est probablement due à une réduction de la production hépatique de glucose. Elle survient suite à l'activation de l'AMPK par un

mécanisme encore incertain à ce jour. Néanmoins, de nombreuses études proposent une inhibition de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Celle-ci diminuerait la production d'ATP et augmenterait, suite à l'activité de l'adénylate-kinase, la concentration d'AMP. Ce changement de proportion des nucléotides adényliques, suite au déficit énergétique, activerait l'AMPK (El-Mir et al. 2000; Owen et al. 2000; Brunmair et al. 2004). Comme décrit plus en détail dans la partie AMPK et syndrome métabolique, l'activation de l'AMPK au niveau hépatique diminue l'expression de deux enzymes de la néoglucogenèse : la PEPCK et la glucose-6-phosphatase, responsables de la diminution d'intensité de cette voie. En phosphorylant l'ACC, l'AMPK inhibe l'activité de cette protéine et diminue ainsi la production de malonyl-CoA. La diminution de concentration de ce composé favorise alors l'oxydation des acides gras en levant son inhibition sur la CPT-1. L'inhibition du complexe I par la Metformine, en lien étroit avec son effet inhibiteur de l'ouverture du pore de transition de perméabilité (Guigas et al. 2004) et le déclenchement de la mort cellulaire, joue un rôle essentiel dans les effets bénéfiques observés dans le traitement des NASH. Par ailleurs, une étude relativement récente, réalisée sur souris KO hépatique LKB1, a mis en évidence la nécessité de cette protéine kinase dans l'action de la Metformine. En effet, la suppression de la phosphorylation de l'AMPK par LKB1 empêche la Metformine d'agir. Une voie d'activation de l'AMPK stimulée par la Metformine *via* LKB1 a ainsi été validée. L'activation de l'AMPK par diminution de la concentration en ATP et augmentation de celle d'AMP suite à l'inhibition du complexe I, nécessiterait également une phosphorylation de l'AMPK par LKB1 (Shaw et al. 2005). Cependant, plusieurs travaux ont montré que la Metformine pouvait activer l'AMPK sans affecter les rapports des nucléotides adényliques (Fryer et al. 2002; Hawley et al. 2002). Finalement, Zou en 2004 a montré que l'activation de l'AMPK par LKB1 est dépendante de l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'azote (RNS : reactive nitrogen species) suite à l'inhibition du complexe I (Zou et al. 2004).

La seconde classe de médicaments classiquement utilisée pour lutter contre l'insulinorésistance regroupe les thiazolidinediones. Comme les biguanides, elles seraient capables d'agir au niveau hépatique en modifiant la fonction mitochondriale et l'activité de l'AMPK. Toutefois, les mécanismes d'action des thiazolidinediones ne sont que partiellement élucidés. Ce sont des ligands des PPAR $\gamma$ , qui agissent ainsi en modifiant l'expression d'une multitude de gènes du métabolisme (Spiegelman 1998; Desvergne et al.

1999). Puisque les PPAR $\gamma$  s'expriment fortement dans le tissu adipeux, leur principale action semble passer par l'augmentation de la synthèse des triglycérides dans les adipocytes. Ainsi, en diminuant la concentration d'acides gras plasmatique, les thiazolidinediones seraient capables de limiter l'insulinorésistance au niveau musculaire et hépatique (Samuel et al. 2004; Ravikumar et al. 2008). De plus, dans le foie et le muscle, une inhibition de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire (Brunmair, Staniek et al. 2004) ainsi qu'une activation de l'AMPK par ces composés ont été mises en évidence par certains auteurs (Fryer, Parbu-Patel et al. 2002; Saha et al. 2004), mais ces données restent débattues. Les effets métaboliques et insulinosensibilisateurs des thiazolidinediones *via* l'activation de l'AMPK au niveau hépatique, pourraient être la résultante de modifications de sécrétion d'adiponectine puisque l'activation de l'AMPK induite par ces composés est réduite dans les souris KO pour l'adiponectine (Nawrocki et al. 2006). En outre, la cible mitochondriale des thiazolidinediones ne fait plus de doute car Colca a montré en 2004, que le Pioglitazone se fixe à une protéine de la membrane interne mitochondriale (« MitoNEET ») qui pourrait interagir avec les protéines de l'oxydation phosphorylante (Colca et al. 2004; Wiley et al. 2007). L'inhibition du complexe I et l'activation de l'AMPK par ce type de molécule pourraient donc être liées à cette interaction.

A une moindre échelle, les fibrates, ligands des PPAR $\alpha$ , sont également utilisés pour lutter contre les NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) associées à l'insulinorésistance. Ils augmentent l'oxydation des acides gras au niveau hépatique en diminuant la concentration de triglycérides par stimulation de la respiration mitochondriale (Nagai et al. 2002).

Récemment, la médecine traditionnelle chinoise a fait émerger une nouvelle molécule insulinosensibilisatrice : la Berbérine, extraite d'une plante : le *Coptis chinensis*. Cette molécule, comme les biguanides et les thiazolidinediones, serait susceptible d'inhiber l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'activer l'AMPK (Turner et al. 2008). Au niveau hépatique, elle modifierait l'expression relative des PPAR  $\alpha/\delta/\gamma$  (Zhou et al. 2008).

Ces dernières années, l'industrie pharmaceutique Merck a développé un nouveau composé le « E008 » appartenant à une nouvelle classe d'antidiabétiques. Cette molécule, aux propriétés très intéressantes pour lutter contre l'insulinorésistance, a passé avec succès

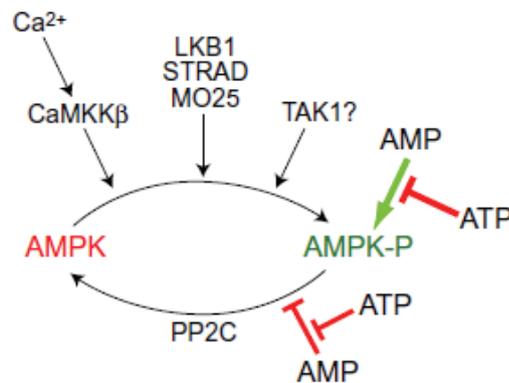
les phases précliniques et cliniques de développement et est actuellement en essai de phase 2 (communication personnelle Merck).

Notre collaboration avec l'industrie pharmaceutique a pour objectif d'élucider les mécanismes d'action de ce composé prometteur en se focalisant sur ses effets au niveau hépatique.

Finalement, comme discuté précédemment avec la Metformine, les deux classes d'agents thérapeutiques (biguanides et thiazolidinediones) les plus utilisées à ce jour pour lutter contre l'insulinorésistance, ainsi que de nouvelles drogues antidiabétiques développées actuellement, agissent sur la mitochondrie. Ces organites sont donc la cible privilégiée pour lutter contre cette pathologie.

### **1.5 AMPK et syndrome métabolique**

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est une sérine thréonine kinase constituée d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ . Elle est actuellement considérée comme la jauge métabolique et le point de convergence entre les régulateurs systémiques et le statut énergétique cellulaire. Son activité est régulée par sa phosphorylation sur la Thr<sup>172</sup> mais également par un effet allostérique de l'AMP. Son activation est généralement induite par un stress énergétique, c'est-à-dire par une déplétion en ATP quelle que soit son origine, ou par une élévation de la concentration intracellulaire de calcium. L'élévation de la production d'AMP à partir d'ADP par l'adénylate kinase permet à l'AMP d'exercer son action allostérique sur l'AMPK. L'activation de l'AMPK par sa phosphorylation est induite par l'action de différentes kinases, elles-mêmes activées par différents stimuli. Par exemple, l'élévation de la concentration intracellulaire de calcium active la CaMKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante protéine kinase kinase  $\beta$ ) (Woods et al. 2005) et une augmentation du rapport AMP/ATP tout comme la Metformine active la protéine kinase LKB1. Des petites molécules se fixant directement sur l'AMPK participeraient également à son activation. (Zhang et al. 2009).



**Figure 7 : Mécanisme d'activation de l'AMPK.**

Regulation of AMPK by AMP, ATP and upstream kinases: While CaMKKb is switched on by a rise in cytosolic Ca<sup>2+</sup>, the LKB1:STRAD:MO25 complex appears to be constitutively active and phosphorylates AMPK constantly. However, under basal conditions the phosphate is immediately removed by PP2C. A rise in the cellular AMP:ATP ratio inhibits dephosphorylation, switching AMPK to the phosphorylated form, which is also allosterically activated by the increase in AMP:ATP ratio. The physiological significance of activation by TAK1 remains uncertain at present. D.G. Hardie / FEBS Letters 582 (2008) 81–89 (Hardie 2008).

Au niveau hépatique, l'activation de l'AMPK a pour conséquence d'inhiber les voies métaboliques consommatrices d'énergie et favorise les voies cataboliques génératrices d'ATP. Cette enzyme, chef d'orchestre du métabolisme, est en effet capable de modifier l'activité et/ou l'expression de certaines enzymes du métabolisme contrôlant ainsi le métabolisme à plus ou moins long terme (Assifi et al. 2005).

Au niveau musculaire, elle agit sur l'expression de PGC1- $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  co-Activator 1 $\alpha$ ) qui contrôle la biogenèse mitochondriale (Suwa et al. 2006). Physiologiquement, l'AMPK est aussi activée par des hormones (adiponectine, leptine, ghreline, résistine, glucocorticoïdes (Viollet et al. 2009)). Elle joue également un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire par ses effets au niveau de l'hypothalamus. Ainsi, le niveau d'activité de l'AMPK, par ses effets pléiotropes, serait déterminant pour la survenue du syndrome métabolique. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une corrélation forte entre un niveau faible d'activité de l'AMPK et l'existence de troubles métaboliques liés à l'insulinorésistance (Lee et al. 2005; Luo et al. 2005; Martin et al. 2006). L'AMPK est ainsi une cible privilégiée pour les thérapies visant à améliorer le syndrome métabolique. Certaines stratégies de traitement déjà utilisées pour lutter contre les pathologies associées au syndrome métabolique sont connues pour moduler l'activité de l'AMPK (restriction calorique, exercices, thiazolidinediones et Metformine, AICAR, composé A-769662, poly phénol (Viollet, Guigas et al. 2009)).

Molécule/compound	References
<b>Activation</b>	
A-769662	Goransson <i>et al.</i> (2007)
AICAR	Corton <i>et al.</i> (1995)
Metformin	Zhou <i>et al.</i> (2001)
Thiazolidinediones	Fryer <i>et al.</i> (2002), Saha <i>et al.</i> (2004)
Adiponectin	Yamauchi <i>et al.</i> (2002)
Glucocorticoids	Christ-Crain <i>et al.</i> (2008)
Betaine	Song <i>et al.</i> (2007)
Berberine	Lee <i>et al.</i> (2006)
Bitter melon	Tan <i>et al.</i> (2008)
Combretastatin A4	Zhang <i>et al.</i> (2008)
Epigallocatechin-3- gallate	Collins <i>et al.</i> (2007)
Galegine	Mooney <i>et al.</i> (2008)
Ginseng	Park <i>et al.</i> (2008)
Resveratrol	Zang <i>et al.</i> (2006)
Oltipraz	Bae <i>et al.</i> (2007)
<b>Inhibition</b>	
Ghrelin	Barazzoni <i>et al.</i> (2005), Kola <i>et al.</i> (2005)
Endocannabinoids	Kola <i>et al.</i> (2005)
Resistin	Banerjee <i>et al.</i> (2004)

**Tableau 1 : Modulateurs pharmacologiques et naturels de l'activité AMPK hépatique.**

(Viollet, Guigas et al. 2009).

Le développement de molécules thérapeutiques visant à contrôler l'activité de cette enzyme anime ainsi de nombreuses recherches. Des modifications de son activité au niveau hépatique pourraient permettre de contrôler le métabolisme des lipides et les dépôts lipidiques ectopiques. L'AMPK est capable de phosphoryler plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Nous citerons, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) et l'acétyl CoA carboxylase (ACC) deux enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras respectivement. Foretz, Leclerc et Woods ont montré successivement que l'activation de l'AMPK inhibe l'expression de gènes impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse (Foretz et al. 1998; Leclerc et al. 1998; Woods et al. 2000; Leclerc et al. 2001; Foretz et al. 2005). Cet effet serait attribué à la diminution de l'expression de deux facteurs de transcriptions : sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP1c) et carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) (Foretz, Ancellin et al. 2005).

L'ACC est une enzyme fortement contrôlante dans la synthèse du malonyl-CoA. Ce composé est à la fois un précurseur dans la synthèse des acides gras et un inhibiteur allostérique de l'oxydation des acides gras par son action inhibitrice sur la carnitine-palmitoyl-transférase-1. De ce fait, l'inhibition de l'activité de l'ACC par l'AMPK aurait pour conséquence non seulement de diminuer la synthèse des acides gras, mais également de favoriser leur oxydation (Velasco et al. 1997; Brusq et al. 2006).

La production hépatique de glucose serait également modifiée par une activation de l'AMPK. En effet, il a été montré par l'expression d'une forme d'AMPK constitutivement active ou par l'infusion d'AICAR, que l'expression d'enzyme de la voie de la néoglucogénèse (PECK et G6Pase) était réduite dans les hépatocytes et contribuait ainsi à réduire la production hépatique de glucose (Foretz, Ancellin et al. 2005; Viana et al. 2006; Viollet et al. 2009).

Par ailleurs, la biogenèse mitochondriale pourrait aussi être modifiée par un changement d'activité de l'AMPK. En effet, si comme dans le muscle, l'AMPK est capable d'activer PGC1- $\alpha$ , alors la densité mitochondriale hépatique serait altérée et pourrait perturber l'ensemble du métabolisme (Jager et al. 2007).

Partie 2 :  
Tour d'horizon du métabolisme hépatique

## 2 Tour d'horizon du métabolisme hépatique

### 2.1 Généralités

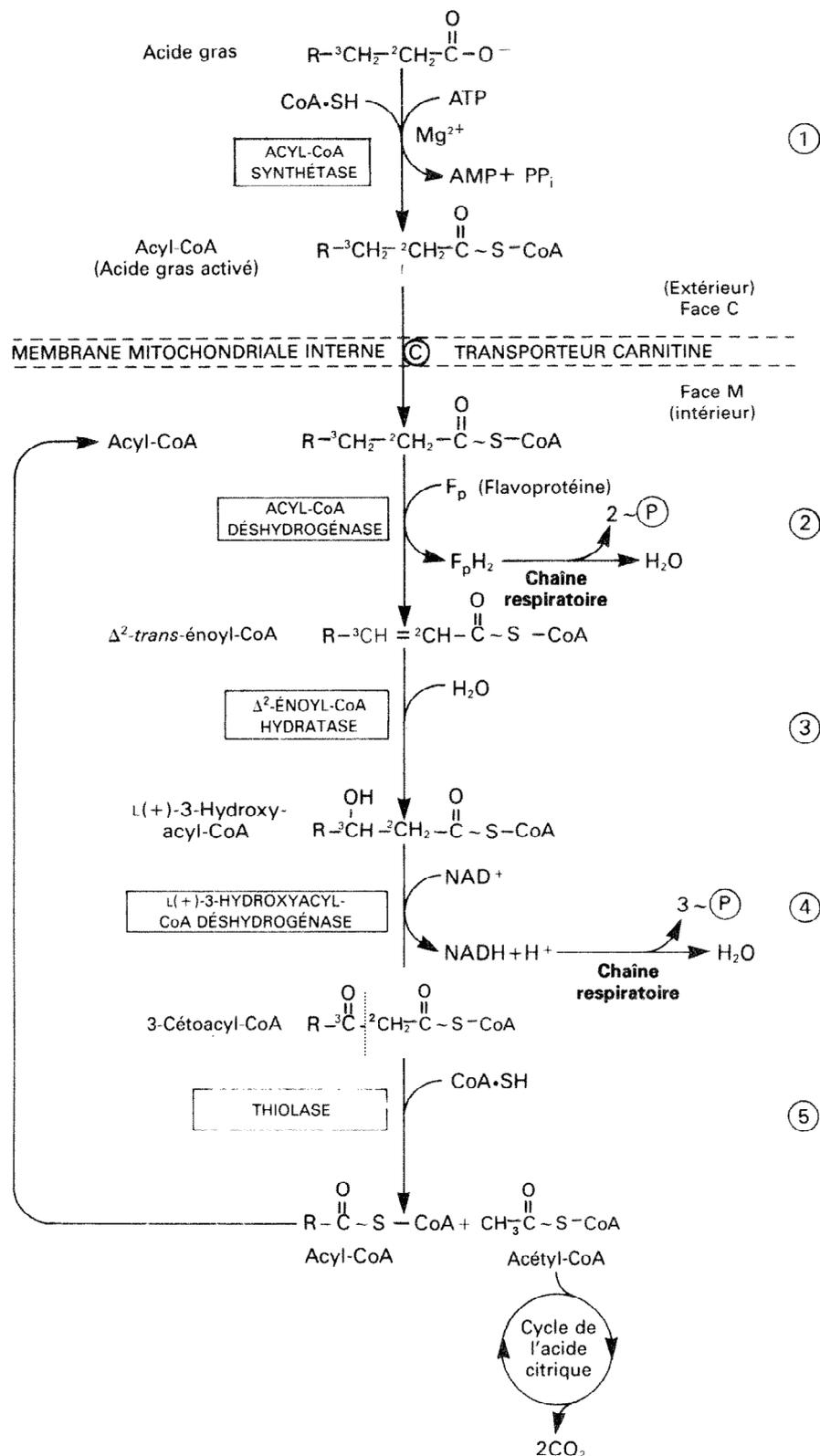
Le métabolisme énergétique est supporté essentiellement par l'oxydation de deux types de substrats : les lipides et les hydrates de carbone. En effet, le métabolisme des acides aminés diffère peu de celui des hydrates de carbone. Après désamination, les acides aminés entrent directement dans la voie des hydrates de carbone. De ce fait, peu d'études, dont la nôtre, s'intéressent directement à l'oxydation des acides aminés. Toutefois, le métabolisme de la proline, acide aminé cyclique particulier, reste spécifique et différent des autres. La proline oxydase ou déshydrogénase est en effet nécessaire à son oxydation. Seulement, le flux métabolique engendré par cette enzyme est très faible et nous ne nous intéresserons pas ou peu à celui-ci. Le métabolisme des lipides et celui des hydrates de carbone révèlent un certain nombre de similarités mais également beaucoup de différences qui expliquent certainement le maintien de ces voies énergétiques au cours de l'évolution. Le choix du type de substrats utilisé par les cellules de mammifères est une stratégie essentielle à la survie des individus qui est guidée par une multitude de paramètres. Ces régulations sont très différentes lorsqu'on considère une cellule ou un organisme. *In vitro*, c'est-à-dire sur cellules isolées (hépatocytes), l'utilisation des acides gras (octanoate) est préférentielle à celle des hydrates de carbone (glucose) lorsque les deux types de substrats sont fournis simultanément. En effet, l'oxydation du pyruvate est inhibée par un rétrocontrôle de la  $\beta$ -oxydation. L'acétyl-CoA produit en grande quantité par l'oxydation des lipides provoque une puissante inhibition de la pyruvate déshydrogénase (Kerbey et al. 1976; Sumegi et al. 1985). Par contre, *in vivo*, lorsque les deux types de substrats sont disponibles, l'oxydation des hydrates de carbone est privilégiée, alors que les lipides sont dirigés vers le stockage par l'élévation de l'insulinémie (Cahill et al. 1968). Les observations faites *in vitro* ou *in vivo* sont ainsi opposées. Il faut donc toujours prendre avec beaucoup de précautions les données obtenues *in vitro* avant de les extrapoler au niveau des organismes. Il s'agit de définir précisément le système considéré sans oublier que toute règle a ses exceptions. Nous tenterons donc de décrire la situation la plus générale, ou celle qui concerne notre étude, avec toutes les limites que cela entraîne.

Historiquement, les premiers biochimistes ont proposé que le métabolisme soit contrôlé par une étape limitante, c'est-à-dire une étape dont la vitesse est la plus lente dans la voie métabolique considérée. C'est cette réaction qui imposerait alors sa vitesse à la totalité de la voie (Blackman en 1905). Cette approche du contrôle des voies métaboliques à partir d'études menées *in vitro* était restreinte aux activités enzymatiques isolées en considérant leurs régulations allostériques, mais ne pouvait s'appliquer à des systèmes plus complexes. Dans les années 1970, avec le développement des mathématiques puis de l'informatique, s'est développée l'analyse du contrôle métabolique (Kacser et al. 1973; Heinrich et al. 1975). Cette nouvelle approche consiste à analyser le rôle de chaque étape enzymatique dans une voie métabolique. Elle permet de définir des coefficients de contrôle et d'élasticité. Le coefficient de contrôle détermine l'influence d'une étape sur le flux global alors que le coefficient d'élasticité porte sur une seule partie de la voie et détermine l'impact d'un effecteur sur une étape.

Cette façon d'aborder l'analyse des voies métaboliques permet de considérer les relations entre les voies en tenant compte de leur organisation. Elle a été appliquée à l'analyse de l'oxydation phosphorylante puis à la néoglucogenèse (Groen et al. 1982; Tager et al. 1983; Groen et al. 1986). A ce jour, ces approches, associées aux volontés des biologistes d'intégrer le maximum de paramètres contrôlants, ont donné naissance à une théorie émergente qu'est la biologie systémique intégrative. Cette façon d'aborder les régulations et les contrôles des systèmes s'efforce de considérer un maximum de paramètres à l'opposé d'une vision réductionniste afin de s'approcher au mieux de la réalité.

## 2.2 *L'oxydation des acides gras*

L'oxydation des acides gras se déroule dans la matrice mitochondriale, hormis l'initiation de l'oxydation des acides gras poly-insaturés et à très longue chaîne qui a lieu dans les peroxysomes avant de se poursuivre dans les mitochondries. Cette voie permet de retirer deux carbones à l'acide gras en cours d'oxydation, à chaque cycle.



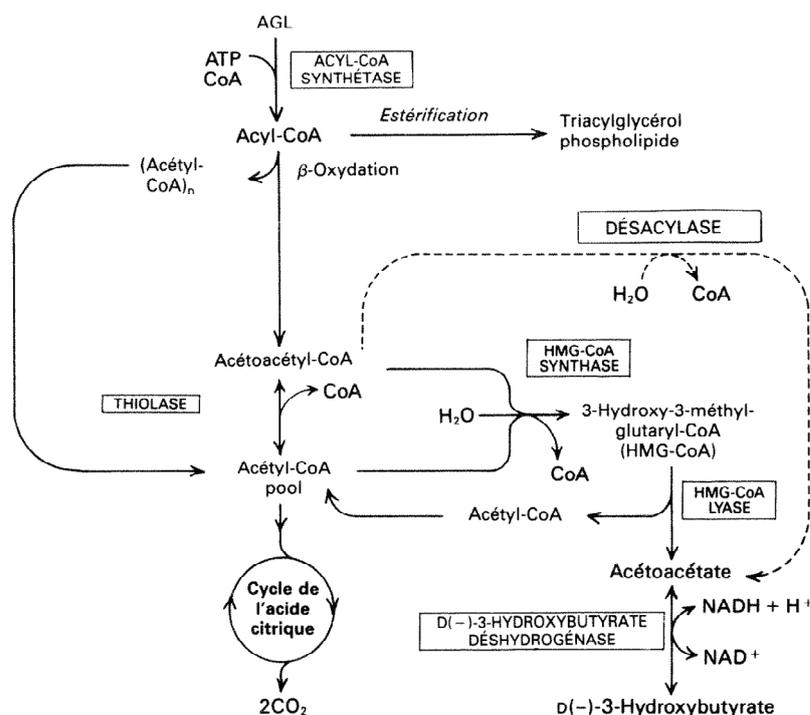
**Figure 8 : Oxydation des acides gras.**

Les réactions 2 à 5 forment le cycle de l'acyl-CoA à longue chaîne. Un acétyl-CoA est coupé par une thiolase, à chaque tour de cycle. Quand le radical acyle ne comporte plus que quatre atomes de carbone, deux molécules d'acétyl-CoA sont formées dans la réaction 5. Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray et al. 1993).

Dans le foie, l'oxydation des acides gras produit ainsi des acétyl-CoA qui fournissent le cycle de Krebs ou des corps cétoniques (acétoacétate (AcAc) et  $\beta$ -hydroxybutyrate (BOH)) si le taux d'oxydation des acides gras est élevé (Figure 9). Les corps cétoniques sont ensuite exportés et servent de substrat énergétique à d'autres tissus en condition de jeûne.

La  $\beta$ -oxydation produit des équivalents réduits sous forme de NADH et de  $\text{ETFH}_2/\text{FADH}_2$ . Elle est une source majeure d'ATP.

Le foie étant doté d'activités enzymatiques particulières, la cétogenèse produit principalement des corps cétoniques, ce qui nous permet d'évaluer l'intensité de la  $\beta$ -oxydation en dosant les corps cétoniques avec une bonne approximation.



**Figure 9 : Voies de la cétogenèse hépatique.**

Acides gras libres (AGL), 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG). Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray, Granner et al. 1993).

Le contrôle de l'oxydation hépatique des acides gras s'exerce à différents niveaux : par son approvisionnement, par la carnitine-palmitoyl transférase, par quelques enzymes de la  $\beta$ -oxydation et par le potentiel rédox.

### **2.2.1 Le contrôle entre l'approvisionnement et la carnitine-palmitoyl transférase**

Le premier contrôle qui s'exerce sur la  $\beta$ -oxydation est celui de l'approvisionnement en acides gras. La vitesse de cette voie dépend de la teneur plasmatique d'acides gras libres. Il y a donc un contrôle par l'intensité de la lipolyse et l'état nutritionnel. Ensuite, le transport des acides gras non estérifiés (NEFA) est réalisé par des protéines appelées Fatty Acid Binding Protein (FAPB) ou la fatty acid translocase (FAT/CD36) dont le contrôle exercé est encore beaucoup discuté (Eaton 2002).

Dans la cellule, les acides gras sont activés par l'acyl-CoA synthétase lors d'une réaction endergonique qui consomme une molécule d'ATP. Cette réaction dépend ainsi du potentiel phosphate. Une fois activés, les acyl-CoA peuvent être oxydés ou estérifiés. L'existence d'une compartimentalisation de différentes isoformes des acyl-CoA synthétases serait responsable de l'orientation vers les différentes voies (Lewin et al. 2001). Le contact entre une de ces isoformes et la CPT1 favoriserait ainsi une canalisation vers la mitochondrie évitant par là une accumulation cytosolique des acyl-CoA qui pourrait être responsable d'un rétrocontrôle négatif (Hoppel et al. 2001).

### **2.2.2 Le contrôle de la carnitine-palmitoyl transférase**

L'activité de la carnitine-palmitoyl transférase 1 (CPT1), qui transfère les acyl-CoA dans la matrice mitochondriale, contrôle principalement le flux de la  $\beta$ -oxydation. L'activité de ce transporteur est régulée par plusieurs effecteurs. Citons parmi eux le malonyl-CoA qui inhibe son activité par un effet allostérique. Puisque la concentration de malonyl-CoA est dépendante de l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), elle-même sous le contrôle de l'AMPK, cette dernière est ainsi capable de modifier l'intensité de la  $\beta$ -oxydation. L'analyse du contrôle, centrée sur cette activité, montre également qu'elle joue un rôle important (New et al. 1999). Notons par contre que l'oxydation des acides gras à chaîne courte ne dépend pas de cette activité enzymatique.

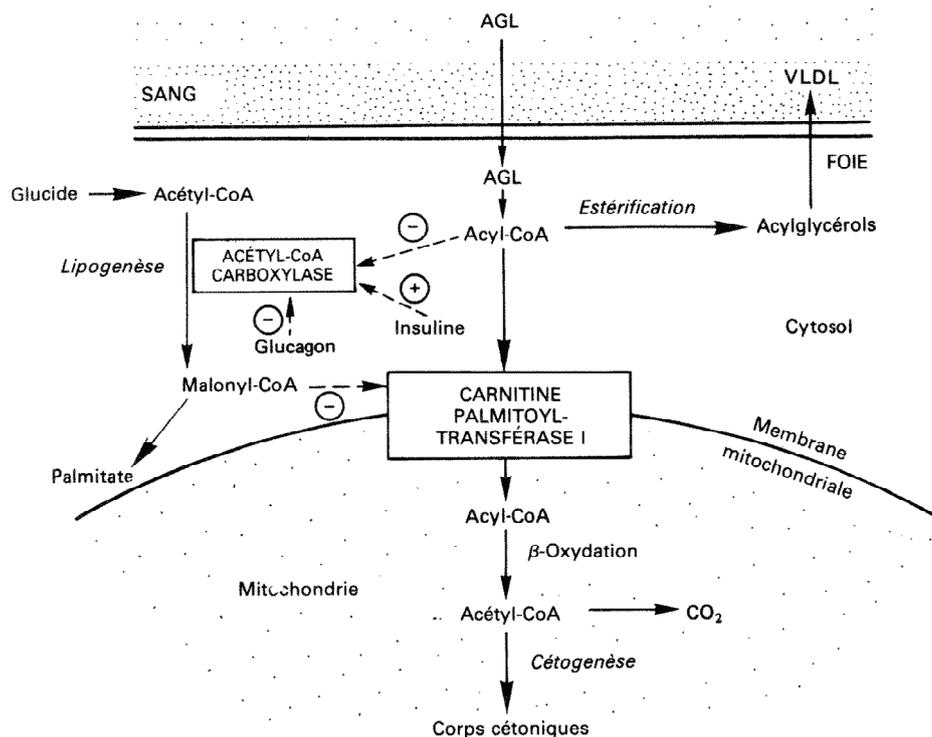


Figure 10 : Régulation de l'oxydation des acides gras à chaîne longue dans le foie.

Acides gras libres (AGL), lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Les effets régulateurs sont représentés par les symboles + ou - et des flèches en pointillés. Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray, Granner et al. 1993).

### 2.2.3 Le contrôle sur les enzymes en aval de la carnitine-palmitoyl transférase et influence du potentiel rédox

Les étapes en amont de la CPT1 sont principalement inhibées par le produit auquel elles aboutissent (acétyl-CoA). Un certain rétrocontrôle existe ainsi sur plusieurs enzymes.

Comme décrit dans la première figure, l'oxydation des acides gras produit des cofacteurs réduits sous forme de flavoprotéines réduites et de NADH. De ce fait, le potentiel rédox mitochondrial contrôle ces étapes enzymatiques catalysées respectivement par l'acyl-CoA déshydrogénase et la L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Le niveau rédox des ETF (Electron Transfert Flavoprotein) est connu pour être particulièrement contrôlant sur l'intensité de la  $\beta$ -oxydation (Kunz et al. 1991). Ceci peut s'expliquer par le fait que certaines déshydrogénases fournissent directement leurs électrons aux ETF (Simkovic et al. 2004) (Cf. partie 2.5). Le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> semble influencer également l'intensité de cette voie. De plus, la relation non linéaire entre les changements

de ce rapport et l'intensité de l'oxydation des acides gras témoigne de l'interaction entre l'activité du complexe I et cette voie métabolique. Puisque les différents composés intermédiaires entre les acyl-CoA et les acétyl-CoA sont présents en très faible quantité au sein des cellules, une compartimentation de cette voie est fort probable (Liang et al. 2001).

### **2.3 Glycolyse et néoglucogenèse**

#### **2.3.1 Généralités**

Ces deux voies métaboliques sont intriquées et sont donc finement régulées car elles fonctionnent globalement en sens opposés dans les hépatocytes.

La glycolyse est la voie principale d'utilisation du glucose (ou du glycogène). Elle se déroule dans le cytosol de toutes les cellules de mammifères. Cette voie a la particularité de pouvoir fonctionner en anaérobie en régénérant les équivalents oxydés grâce à la réduction du pyruvate en lactate. Le contrôle de la glycolyse a lieu principalement sur 3 enzymes catalysant des réactions de non-équilibre (exergoniques). Ce sont les réactions de phosphorylation réalisées par l'hexokinase (ou glucokinase), la phosphofructokinase et la pyruvate kinase. Ces réactions, qui rendent la voie irréversible, sont contournées dans les hépatocytes pour constituer la voie de la néoglucogenèse.

La néoglucogenèse est une voie capitale dans le foie qui permet à cet organe de maintenir la glycémie des mammifères à un niveau constant. Un équipement enzymatique particulier, présent uniquement dans le foie (et le rein), permet à partir de différents précurseurs de produire du glucose. Ces enzymes particulières sont la phosphoénolpyruvate carboxylase, la fructose-1,6-bisphosphatase et la glucose-6-phosphatase. L'existence, au sein d'une même cellule, d'enzymes catalysant une réaction et son contraire induit des cycles futiles dont la régulation doit être très fine mais qui permet une adaptation très précise et rapide.

Différents types de contrôles s'exercent ainsi sur cette voie. Nous les avons classés en deux catégories : les contrôles à court terme et ceux à plus long terme.

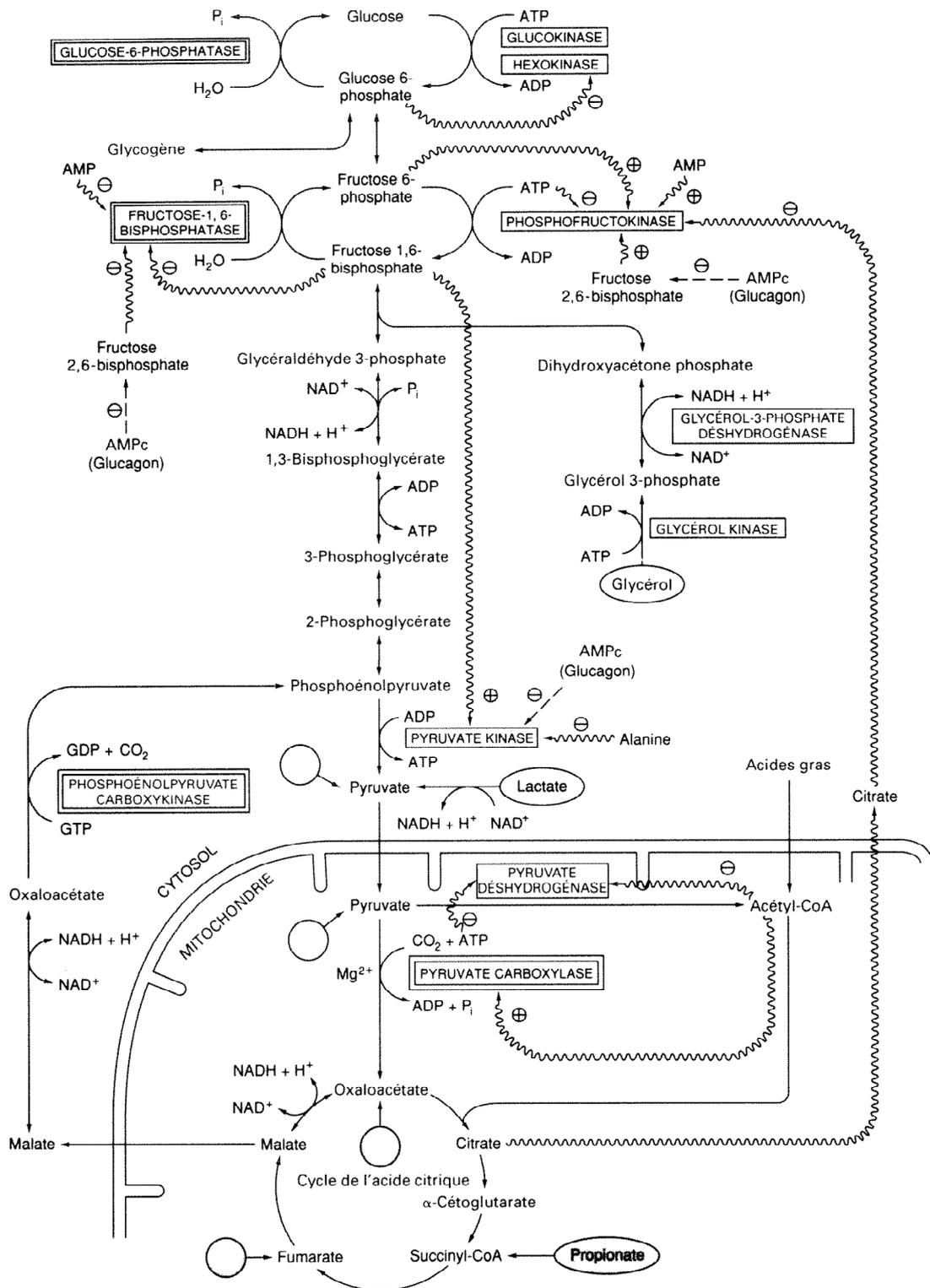


Figure 11 : Principales voies de contrôle de la néoglucogénèse et de la glycolyse dans le foie.

Les enzymes clés de la néoglucogénèse sont encadrées d'un double trait. Les flèches ondulées représentent des régulations allostériques, celles en pointillés des régulations par phosphorylation covalente réversible. Les cercles vides représentent des voies d'entrée des acides aminés glucoformateurs après transamination. Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray, Granner et al. 1993).

### 2.3.2 Les contrôles de la néoglucogenèse à court terme

Comme décrit précédemment, la voie de la glycolyse et celle de la néoglucogenèse sont étroitement liées et le flux global dans un sens ou dans l'autre est contrôlé par les réactions enzymatiques irréversibles de la glycolyse détournées par d'autres (de la néoglucogenèse), en sens inverse, par couplage enzymatique. Les trois cycles futiles, existant dans les hépatocytes, sont contrôlés principalement grâce aux hormones pancréatiques suite à des modifications covalentes par phosphorylation.

La néoglucogenèse, consommatrice d'ATP et *a fortiori* d'équivalents réduits, est également contrôlée par les potentiels phosphate et rédox. Une augmentation du rapport ATP/ADP oriente ainsi le flux vers la néoglucogenèse. Le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> influence le flux gluconéogénique à plusieurs niveaux (Glycérol-3-phosphate déshydrogénase et malate déshydrogénase). L'activité mitochondriale, par l'effet allostérique du citrate sur la phosphofructokinase, régule le cycle entre fructose 6-phosphate et fructose 1,6-bisphosphate, alors que l'effet de l'acétyl-CoA contrôle la pyruvate carboxylase et la pyruvate déshydrogénase. Ces contrôles permettent d'établir un lien entre l'oxydation des acides gras et les voies de la glycolyse ou de la néoglucogenèse.

L'oxydation des acides gras a des effets différents sur la néoglucogenèse selon leur nature. L'oxydation des acides gras à chaîne longue ou moyenne provoque une augmentation du flux de la néoglucogenèse alors que l'oxydation des acides gras à chaîne courte induit une inhibition de la même voie, leur entrée dans la mitochondrie étant contrôlée ou non par la carnitine-palmitoyl transférase (Cf. partie 2.2).

Par ailleurs, un niveau de complexité supérieur s'ajoute à la régulation du métabolisme des hydrates de carbones puisque l'existence d'une microcompartmentation des enzymes de la glycolyse et de la néoglucogenèse a été mise en évidence (al-Habori 1995). A ce jour, nous ne pouvons plus nous affranchir de l'existence d'une telle canalisation des substrats qui conditionne l'orientation des flux de chaque voie métabolique. En effet, une multitude d'interactions sont maintenant démontrées entre des déshydrogénases du cycle de Krebs et des complexes de la chaîne respiratoire (Porpaczy et al. 1987), entre la citrate synthase et la malate déshydrogénase (Morgunov et al. 1998) ou entre des enzymes de la  $\beta$ -oxydation et les ETF (Simkovic et Frerman 2004) (Cf. partie 2.5).

### 2.3.3 Les contrôles à plus long terme de la néoglucogenèse

*In vivo*, la néoglucogenèse est régulée par l'expression de plusieurs enzymes de la voie de la glycolyse et de la néoglucogenèse selon l'état nutritionnel des organismes.

En période de jeûne, l'expression des enzymes de la néoglucogenèse est activée alors que celle de la glycolyse est inhibée (Pilkis et al. 1992). Cette régulation transcriptionnelle se fait par des facteurs de transcription. Nous citerons « Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 $\alpha$  » (PGC1- $\alpha$ ) qui augmente l'expression des gènes gluconéogéniques lors d'une période de jeûne (Yoon et al. 2001) ou encore « Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 » (SREBP-1) et « Carbohydrate Response Element Binding Protein » (ChREBP).

### 2.3.4 L'importance des précurseurs et le métabolisme du glycérol

Selon les précurseurs non glucidiques présents et aptes à fournir la néoglucogenèse, le contrôle de la voie est différent. *In vivo*, ce contrôle s'exerce par exemple par l'intensité de la lipolyse, qui fournit du glycérol et des acides gras, ou par l'intensité de la glycolyse musculaire fournisseur de lactate.

Dans notre système de périfusion d'hépatocytes isolés, la quantité de substrats fournis oriente directement les voies. L'approvisionnement en substrats glucoformateurs stimule la néoglucogenèse. Par contre, selon le substrat métabolisé, les contrôles sur son utilisation seront différents.

Puisque nous avons utilisé du glycérol et de l'octanoate dans nos études, voici en résumé, comment s'organise leur oxydation.

Le glycérol est principalement fourni *in vivo* par l'hydrolyse des triglycérides dans le tissu adipeux. Sa pénétration dans les cellules est facilitée par un transporteur de la famille des aquaporines : AQ9. Dès son entrée, un contrôle est exercé sur cette voie car l'expression de l'AQ9 est stimulée par le glucagon (Caperna et al. 2007). Il produit après phosphorylation du glycérol-3-phosphate (G3P), puis du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) qui est un carrefour métabolique. Ce métabolite a en effet la possibilité de se diriger soit vers la production de glucose (néoglucogenèse), soit vers celle du pyruvate et

du lactate (glycolyse). L'utilisation du glycérol nous permet ainsi d'estimer l'intensité des deux voies.

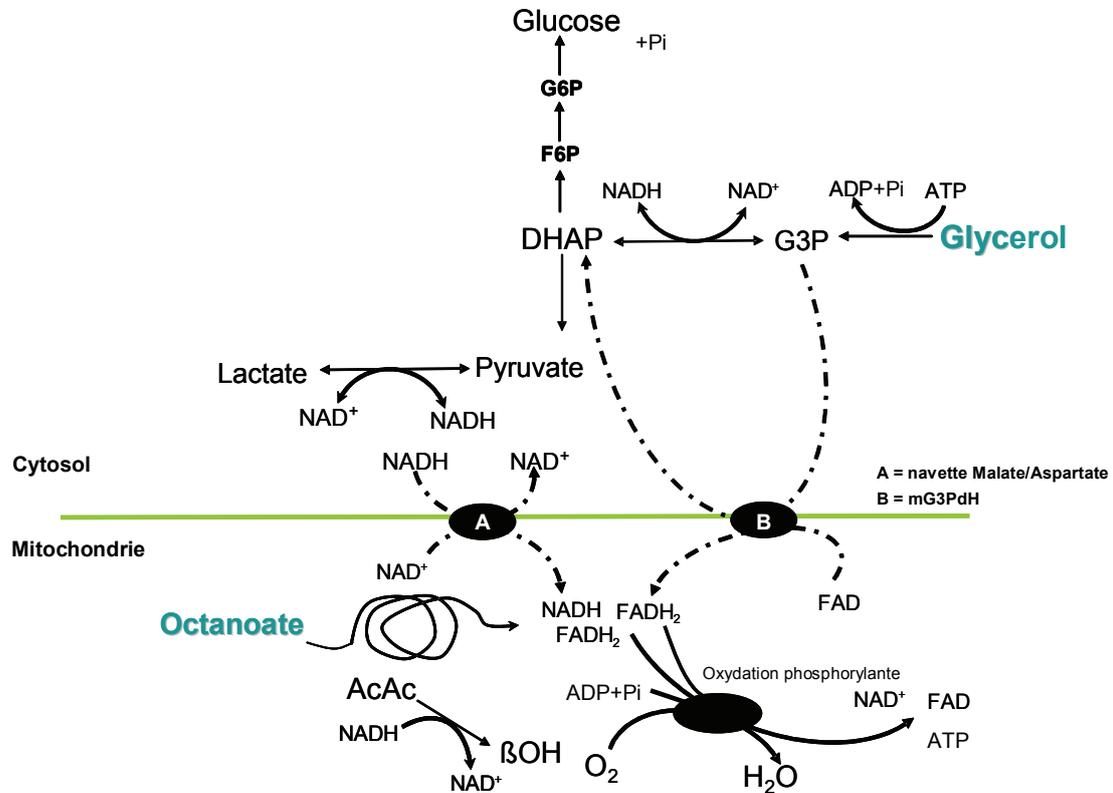


Figure 12 : Métabolisme du glycérol et de l'octanoate.

La glycérol kinase est également contrôlante. Cette enzyme est inhibée par l'ADP et l'AMP. L'ATP active la glycérol kinase mais seulement lorsque la concentration en substrat (glycérol) est également forte (Robinson et al. 1969). Ainsi, le rapport des nucléotides ATP/ADP ou ATP/AMP serait contrôlant sur cette activité enzymatique. Il est également connu que la glycérol kinase peut s'associer à d'autres protéines notamment au VDAC (Voltage Dependent Anion Chanel) (Fiek et al. 1982; Ostlund et al. 1983). Cette association dynamique, en compétition avec la glucokinase, serait fonction de l'intensité de l'oxydation phosphorylante. Le produit formé (G3P) favoriserait le détachement de la glycérol kinase du complexe. Ces données de la littérature confirment à nouveau l'existence d'une compartimentation permettant un contrôle finement régulé par la proximité entre le site d'utilisation de l'ATP nécessaire à la phosphorylation du glycérol et

la production d'ATP par la chaîne respiratoire. Cette dynamique de structure serait contrôlée par le niveau énergétique cellulaire (Knoll et al. 1983).

Le G3P formé est ensuite déshydrogéné par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique (cG3PdH) ou mitochondriale (mG3PdH). L'enzyme cytosolique utilise comme cofacteur le couple rédox NAD/NADH. L'isoforme mitochondriale est couplée au FAD et produit donc du FADH<sub>2</sub>. L'activité de l'enzyme mitochondriale est très faible dans le foie. Toutefois, son expression est très rapidement augmentée par une exposition au froid ou par les hormones thyroïdiennes (Lee et al. 1965; Bobyleva et al. 2000). Une activité élevée de cette isoforme produit des espèces radicalaires et de la chaleur.

La glycolyse produit des équivalents réduits au niveau cytosolique. Seulement, pour aboutir à la synthèse d'ATP, ceux-ci doivent être dirigés vers les mitochondries. La membrane interne mitochondriale étant imperméable à ces molécules, il existe des systèmes de transfert, appelés navettes, qui importent l'énergie d'oxydo-réduction dans les mitochondries.

## ***2.4 Les transferts des équivalents réduits***

### **2.4.1 La navette malate/aspartate**

Il s'agit de la principale navette des équivalents réduits au niveau hépatique. Le NADH cytosolique réduit l'oxaloacétate pour former du malate. Celui-ci pénètre dans la matrice mitochondriale en échange d' $\alpha$ -cétoglutarate grâce à un transporteur spécifique. La malate déshydrogénase mitochondriale régénère du NADH à partir de la conversion du glutamate en oxaloacétate. Ce dernier est transformé en aspartate et permet la synthèse d' $\alpha$ -cétoglutarate à partir de glutamate. L'aspartate est exporté dans le cytosol en échange de glutamate avec transfert d'un proton dans la matrice. Cette étape semble être la plus contrôlante. Elle dépend du potentiel de membrane.

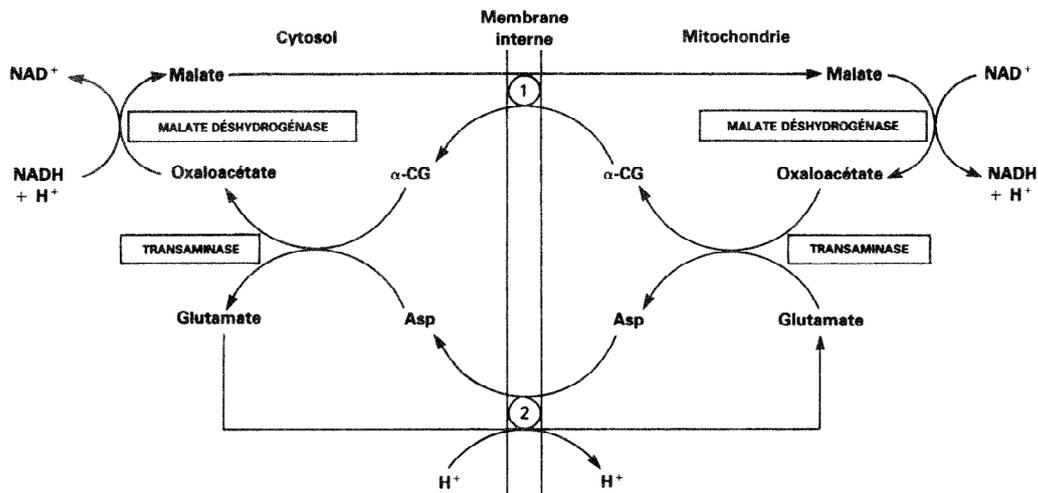


Figure 13 : Voie de transfert des équivalents réduits du cytosol vers la mitochondrie par la navette malate/aspartate.

1 : transporteur  $\alpha$ -cétooglutarate/malate

2 : transporteur aspartate/glutamate

Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray, Granner et al. 1993).

#### 2.4.2 La navette G3P/DHAP

La navette G3P/DHAP fonctionne sur le même principe que la navette malate/aspartate. Par contre la navette G3P/DHAP n'est pas réversible. Elle est constituée par le couplage entre la G3PdH cytosolique et la G3PdH mitochondriale.

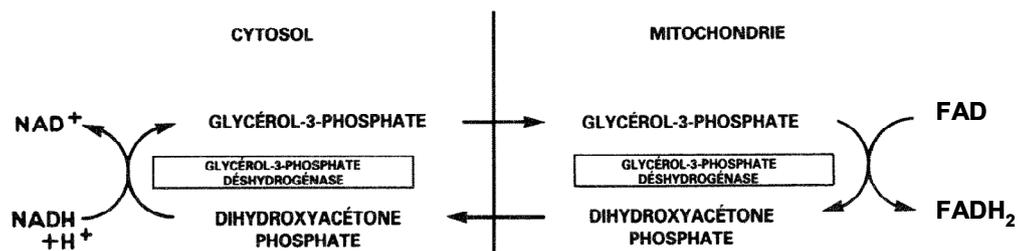


Figure 14 : Transferts des équivalents réduits du cytosol vers la mitochondrie par la voie du G3P.

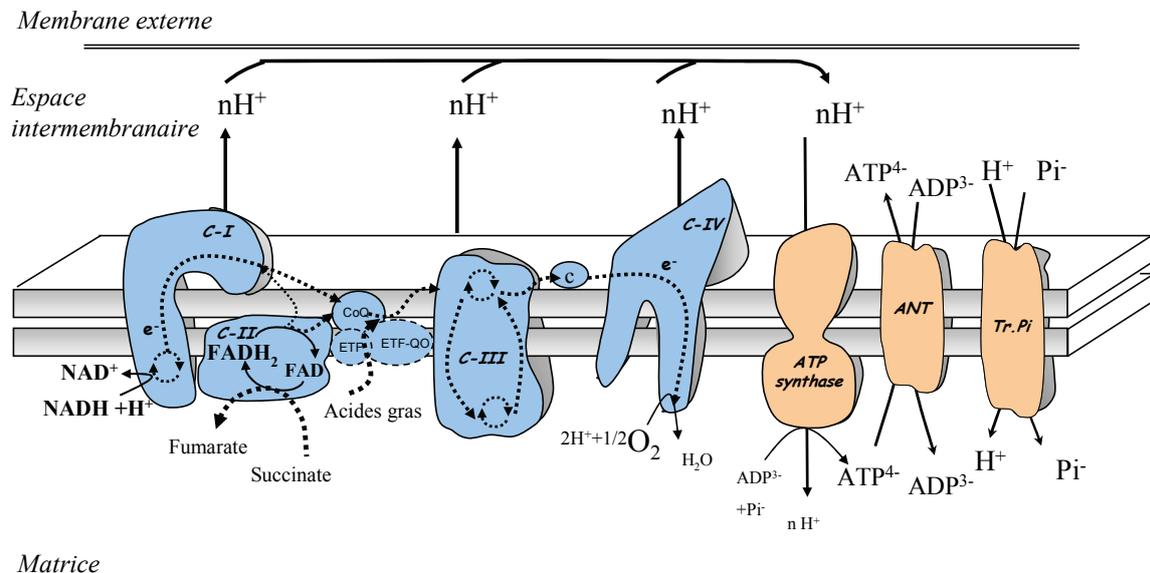
Extrait du Précis de biochimie de Harper (Murray, Granner et al. 1993).

Cette voie est minoritaire dans le foie du fait de l'expression réduite de l'isoforme mitochondriale de la G3PdH.

## 2.5 L'oxydation phosphorylante

L'oxydation phosphorylante est l'ensemble des réactions membranaires qui, en utilisant l'énergie contenue dans les équivalents réduits, provenant de l'oxydation des différents substrats, permet la synthèse d'ATP.

L'oxydation phosphorylante se déroule au sein de la membrane interne mitochondriale qui contient les éléments nécessaires à l'oxydation (chaîne respiratoire) et à la phosphorylation (système phosphorylant). Le couplage entre les deux systèmes s'explique par la théorie chimiosmotique décrite par Peter Mitchell dans les années 1960 (Mitchell 1961).



**Figure 15 : Représentation schématique de l'oxydation phosphorylante.**

C-(Complexe), CoQ (Coenzyme Q), ETF/ETF-QO (Electron Transfer Flavoprotein-ubiquinone /oxidoreductase), ANT (Adenine Nucleotide Translocase), c (Cytochrome c), Tr.Pi (transporteur du phosphate).

### 2.5.1 La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes auxquels nous ajouterons les quinones, le cytochrome c et les ETF/ETF-QO.

**Le complexe I** (NADH-ubiquinone oxydoréductase) est le plus important par sa complexité avec une composition qui n'est, encore à ce jour, que partiellement élucidée. Il serait composé d'environ 40 à 50 sous-unités différentes. Ce complexe oxyde le NADH au niveau matriciel, transfère des protons vers l'espace inter-membranaire et réduit les quinones. La formation et la stabilité de ce complexe constitué de plusieurs modules pourrait également participer à la régulation de l'activité NADH-Coenzyme Q oxydoréductase (Lazarou et al. 2009). De plus, ce complexe serait capable de s'associer à des déshydrogénases (du cycle de Krebs et de la  $\beta$ -oxydation) et créerait ainsi une micro compartimentation (Sumegi et al. 1984; Fukushima et al. 1989). Cette organisation supramoléculaire est détaillée dans la partie consacrée à ces phénomènes.

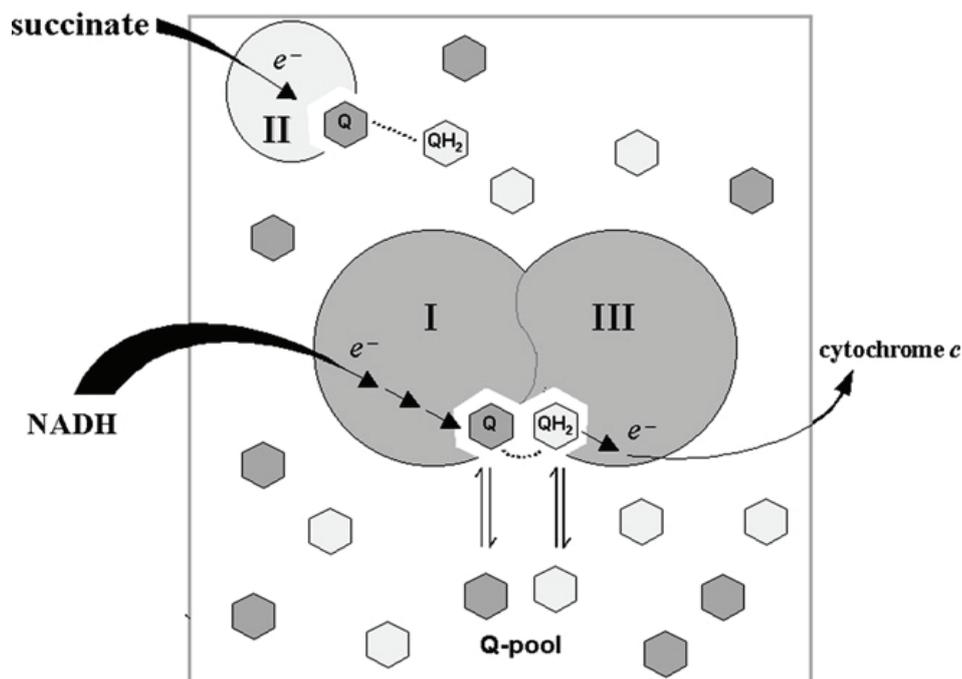
**Le complexe II** (succinate-ubiquinone oxydoréductase) oxyde le succinate pour former du fumarate et réduit les ubiquinones. L'activité de ce complexe fait partie des activités enzymatiques du cycle de Krebs. Doté de plusieurs centres FeS, de FAD et de cytochrome b, il ne transfère pas de proton vers l'espace inter-membranaire, mais fournit des électrons au *pool* des quinones.

**ETF/ETF-Q oxydoréductase** : l'« Electron Transfert Flavoprotein ubiquinone oxidoreductase » est une enzyme qui permet le transfert des électrons provenant de déshydrogénases particulières (Acyl-CoA déshydrogénase à chaîne courte, longue ou moyenne, ou glycérol-3-phosphate déshydrogénase), *via* des ETF, aux quinones (Frerman 1987; Frerman 1988). Actuellement environ onze déshydrogénases mitochondriales à flavo-protéines sont connues (Simkovic et Frerman 2004). Les ETF sont donc le point d'entrée des équivalents réduits en provenance de neuf acyl-CoA déshydrogénases et de deux N-méthyl déshydrogénases dans la chaîne respiratoire. Le *pool* des quinones serait ainsi un carrefour pour les électrons dérivant des complexes I et II ou des ETF (Frerman 1987).

**Les quinones** : au sein de la chaîne respiratoire se trouvent deux types de quinones qui transfèrent les électrons entre les complexes I, II, les ETF-QO et le complexe III. Ce sont les coenzymes  $Q_9$  et  $Q_{10}$  encore appelées ubiquinones. Chez le rat, on trouve principalement de la  $Q_9$  (Lenaz et al. 2007). Les coenzymes existent sous différents états rédox : entièrement oxydé (ubiquinone), semiquinone (ubisemiquinone) et entièrement

réduit (ubiquinol). Ces molécules sont très hydrophobes. Elles sont présentes dans toutes les membranes cellulaires. En plus de leurs rôles de transfert d'électrons dans les mitochondries, elles régulent aussi l'ouverture du PTP, et activent des protéines découplantes (Turunen et al. 2004). En participant à la production et/ou à l'élimination des radicaux libres, ces molécules pourraient jouer un rôle dans la signalisation cellulaire en modifiant l'expression de facteurs de transcription sensibles aux radicaux libres comme NF $\kappa$ B.

Les quinones seraient organisées en *pool* et participeraient à la formation des supercomplexes. De ce fait, une compétition a lieu entre l'oxydation des quinones par le complexe I ou par le complexe II et les ETF. Cette compartimentation ou organisation dynamique autour des quinones pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la respiration mitochondriale et des flux métaboliques qui en dépendent (Benard et al. 2008).



**Figure 16 : Représentation schématique de la possible compétition de réduction sur le pool des quinones.**

Possible mechanism for the dissociation equilibrium of the bound inter-complex quinone with the CoQ pool. Kinetic evidence for intermediate channelling in the I–III super-complex requires the dissociation rate constants of ubiquinone and ubiquinol to be considerably slower than the rates of electron transfer *via* the same quinone molecules bound to the super-complex. Quinone interactions with Complex II are assumed to follow pool behaviour. Lenaz, G., R. Fato, et al. (2007). "The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport." *Mitochondrion* 7 Suppl: S8-33 (Lenaz, Fato et al. 2007).

**Le complexe III** ou bc1 complexe (ubiquinole-cytochrome c oxydoréductase) transfère les électrons des ubiquinoles aux cytochromes c. Ce complexe est donc commun à toutes les voies d'oxydation. Le transfert des électrons au travers du complexe III permet un transfert vectoriel de protons vers l'espace inter-membranaire.

**Le cytochrome c** est un transporteur d'électrons entre les complexes III et IV. C'est une petite protéine qui contient un hème (groupe prosthétique) renfermant un atome de fer.

**Le complexe IV** (cytochrome oxydase) oxyde les cytochromes c et réduit l'oxygène en eau. Les cytochromes a et a<sub>3</sub>, contenus dans ce complexe, participent au transfert des électrons qui est couplé à l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire.

### 2.5.2 Le système phosphorylant

Le système phosphorylant est composé de deux transporteurs et d'un complexe multienzymatique permettant la synthèse de l'ATP. Un transporteur (Tr.Pi) permet l'entrée du phosphate inorganique dans la matrice par couplage avec une entrée de protons. L'adénine nucléotide translocase (ANT) transporte l'ATP produit dans la matrice vers l'espace inter-membranaire avec échange d'ADP.

L'ATP synthase (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPase) utilise l'énergie du gradient de protons pour synthétiser de l'ATP. Puisque cette enzyme est réversible, elle peut également hydrolyser de l'ATP pour maintenir le gradient de protons dans certaines situations.

### 2.5.3 L'organisation supramoléculaire de l'oxydation phosphorylante

Des études de plus en plus nombreuses montrent actuellement l'existence d'une micro-compartmentation des voies métaboliques et de l'oxydation phosphorylante. La formation de ces structures supramoléculaires permettrait un transfert des métabolites entre les enzymes en évitant leur dilution. Cette organisation serait la réponse biologique

adaptative permettant une certaine indépendance de la voie considérée, évitant la multitude d'étapes contrôlantes, tout en conservant une coordination nécessaire avec les autres voies.

A ce jour, une telle organisation a été démontrée pour la voie glycolytique qui fournirait préférentiellement l'ATP produit aux pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (Lynch et al. 1987), pour des enzymes de la  $\beta$ -oxydation et du cycle de Krebs (Velot et al. 1997; Ovadi et al. 2000). Des interactions marquées entre la citrate synthase et la malate déshydrogénase mais également entre la NAD-dépendante Isocitrate déshydrogénase, le complexe des  $\alpha$ -ketoglutarate déshydrogénases et le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoreductase) sont clairement établies (Porpaczy, Sumegi et al. 1987; Morgunov et Srere 1998). Celles-ci renforcent les hypothèses émises sur l'existence d'un contrôle réalisé par le complexe I sur l'activité de multiples déshydrogénases. Ce type d'enzymes des différentes voies serait ainsi très proche des systèmes de l'oxydation phosphorylante. L'organisation de cette dernière semble être la plus marquée et constitue l'exemple de canalisation ou de micro-compartmentation que nous décrivons avec plus de détails.

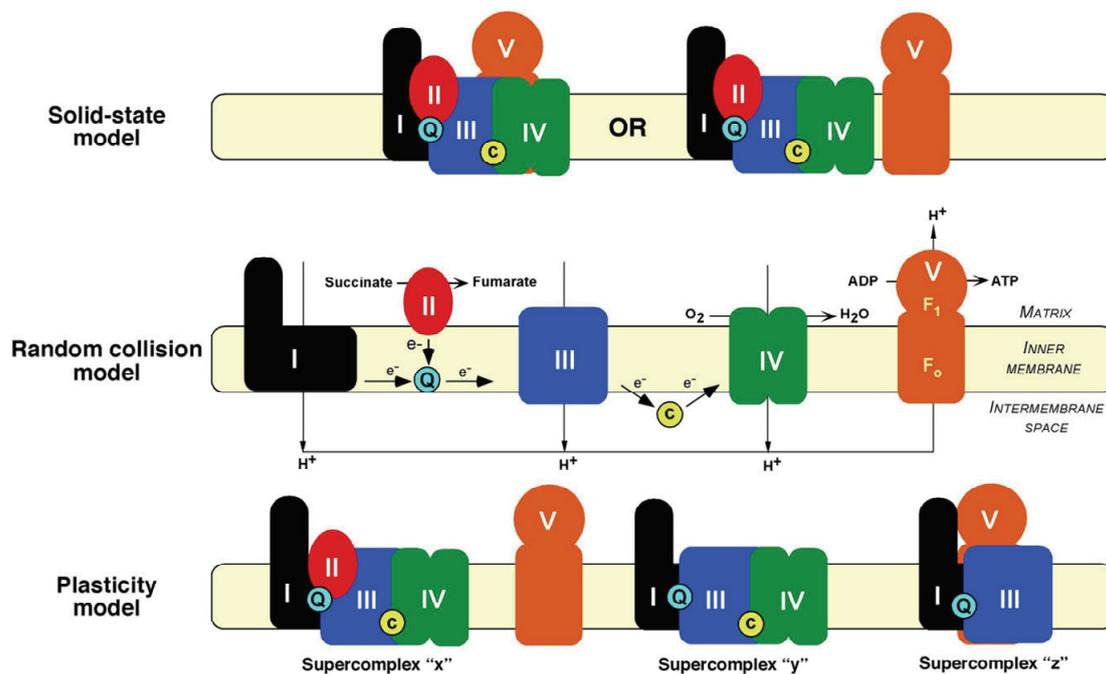
### 2.5.3.1 L'ATP synthatosome

Ko et al en 2003 ont montré l'existence d'une structure multiprotéique formée de l'association de l'ATP synthase, du transporteur du phosphate et de l'adénine nucléotide translocase (Ko et al. 2003). Cet assemblage a même été observé en microscopie électronique et son organisation commence à être décrite (Chen et al. 2004), ainsi que des interactions entre cette structure multi-protéique et les respirasomes (Wittig et al. 2009).

### 2.5.3.2 Les respirasomes

Deux théories s'affrontent mais ne sont pas totalement incompatibles concernant l'organisation des complexes dans la chaîne respiratoire. La théorie dite de collision dans un modèle fluide, propose une diffusion latérale des complexes dans la membrane interne mitochondriale et un transfert des électrons lors de collisions entre eux (Hackenbrock et al. 1986). Dans un tel système, la fluidité membranaire ainsi que le hasard de collision entre les complexes contrôleraient le flux d'électrons. La théorie dite du modèle solide décrit des interactions stables entre les complexes, qui favoriseraient le transfert des électrons et des

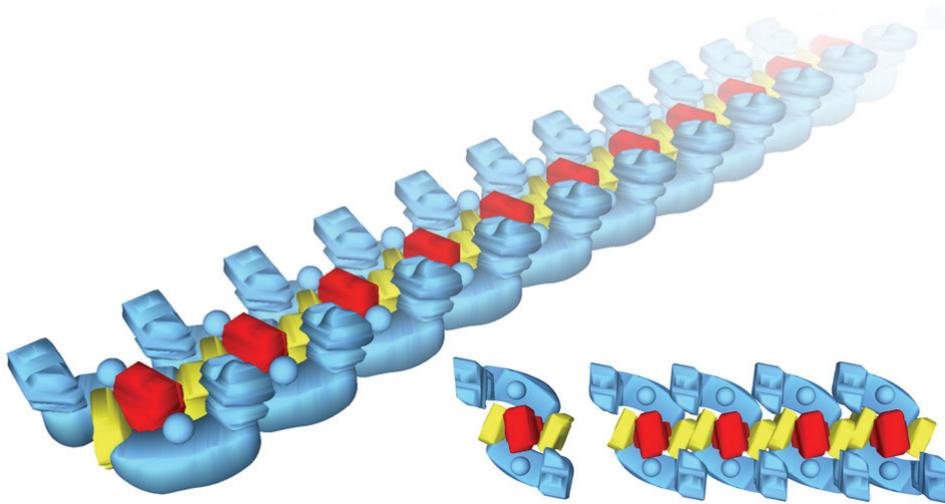
substrats entre les complexes de la chaîne respiratoire (Chance et al. 1955). Ceci éviterait une dilution des intermédiaires métabolites et la formation d'espèces radicalaires. Cette théorie est de plus en plus renforcée par les techniques de biologie moléculaire (Schagger 2002; Schagger et al. 2004; Wittig et al. 2007). Néanmoins, la formation initiale des supercomplexes pourrait être dépendante de la théorie de collision. Un modèle intermédiaire dit « plasticity model » décrit par Acin-Perez serait le plus consensuel (Acin-Perez et al. 2008).



**Figure 17 : Différents modèles de l'organisation de l'oxydation phosphorylante.**

Représentation schématique des différents modèles d'organisation de l'oxydation phosphorylante : les modèles classiques fluide et solide et le modèle dérivé dit de plasticité (Schon et al. 2009).

Récemment, Bultema a été plus loin en proposant un assemblage des supercomplexes entre eux formant ainsi une chaîne : « The respiratory string » (Bultema et al. 2009).



**Figure 18 : Modèle d'organisation des supercomplexes de la chaîne respiratoire « The string model ».**

A schematic model on scale of the organization of respiratory chain complexes into respiratory string. The basic unit consists of two copies of complex I (blue), one copy of complex III<sub>2</sub> (red), and two copies of complex IV (yellow). Association of basic units into a string is mediated by complex IV, which interacts with a neighboring complex IV through a dimeric interface found in the X-ray structure [33]. The model was created using a free version of Google SketchUp software. J.B. Bultema et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1787 (2009) 60–67 (Bultema, Braun et al. 2009).

En admettant ce modèle, il semble que chez les mammifères, des associations entre certains complexes de la chaîne respiratoire soient favorisées plutôt que d'autres. Le complexe I serait parfois associé au complexe III, lui-même associé ou non au complexe IV (Schagger 2002). Il existerait également des supercomplexes formés par l'assemblage de chaque type de complexes avec des stoechiométries variables (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). Schagger a même montré que l'association des complexes entre eux était dépendante du type de substrat présent dans le milieu de culture (Schagger et al. 2000). A ces complexes viennent s'associer des quinones. Différents *pools* seraient présents dans la membrane interne mitochondriale : certains seraient mobiles entre les complexes et d'autres plus fixes associés à des supercomplexes particuliers.

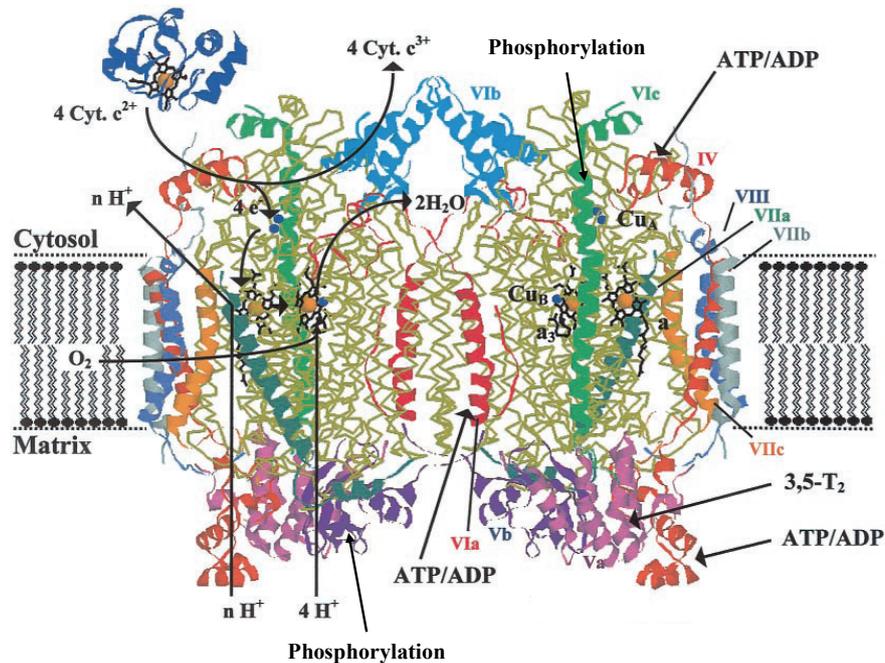
Ainsi, nous pouvons admettre que des régulations des flux métaboliques puissent être contrôlées par l'arrangement et la stabilité des supercomplexes.

#### 2.5.4 Le contrôle intégré de l'oxydation phosphorylante

Devant cette complexité grandissante de l'oxydation phosphorylante, la recherche de l'étape contrôlante n'a toujours pas abouti. Au début des années 1950, les premières

analyses d'activité de la chaîne respiratoire avaient montré que la respiration mitochondriale était dépendante des concentrations d'ADP et de Pi. Chance et Williams avaient ainsi émis l'hypothèse d'un contrôle cinétique de la respiration par la disponibilité en ADP. Plus tard, Klingenberg dans les années 1960, puis Erecinska dans les années 1980 avaient proposé que les réactions de l'oxydation phosphorylante, à l'exception de celle catalysée par la cytochrome oxydase, soient proches de l'équilibre thermodynamique. La recherche d'une étape irréversible, sous contrôle cinétique, qui limiterait ainsi l'ensemble de la chaîne, a ensuite fait l'objet de nombreux travaux. Ces études ont proposé deux étapes probablement contrôlantes : la réaction catalysée par la cytochrome oxydase et le transport des nucléotides adényliques.

- **La réaction catalysée par la cytochrome oxydase** : la vitesse de cette réaction est sous la dépendance des concentrations d'ATP, d'ADP et de Pi (*ie* potentiel phosphate) mais également sous l'influence du pH (Brown 1992; Kadenbach et al. 2000). Sur la sous-unité IV et certainement sur la sous-unité I de la cytochrome oxydase se trouvent des sites de régulation allostérique par l'ATP ou l'ADP. La fixation de l'ATP diminue le transfert des électrons entre le cytochrome c et la protéine (Lin et al. 1995; Arnold et al. 1999; Kadenbach et al. 1999). Selon le rapport ATP/ADP un changement de stoechiométrie a été observé entre le transfert d'électrons et de protons dans certaines espèces (Frank et al. 1996; Huttemann et al. 2000). L'existence de plusieurs sites de phosphorylation réversible sur la cytochrome oxydase a également été démontrée. Certaines de ces phosphorylations seraient sous la dépendance de la voie cAMP et sont rendues réversibles par des phosphatases (Steenaaert et al. 1997; Bender et al. 2000; Helling et al. 2008; Lee et al. 2009). La phosphorylation de la tyrosine<sup>304</sup> aurait une action inhibitrice (Lee et al. 2005).



**Figure 19 : Structure et régulation de la cytochrome c oxydase.**

Crystal structure of the dimeric cytochrome c oxidase from bovine heart [15], as located in the inner mitochondrial membrane bilayer. On the cytosolic side, the crystal structure of a cytochrome c molecule (Cyt c) is shown in dark blue ribbons. The crystallographic data were obtained from Protein Data Brookhaven (COX.pdb; 1HRC) and were processed by the RasMol 2.6 program. Marked in yellow backbone are subunits I, II and III, the nuclear coded subunits are shown as ribbons in the indicated colour. The hemes c, a, and a<sub>3</sub> are indicated in black; the iron atoms in orange; and CuA and CuB in blue. On the left monomer, the chemical reaction is indicated schematically. On the right monomer, the nuclear-coded subunits are denoted, and the binding sites for the regulatory compounds ATP or ADP and 3,5-diiodothyronine (3,5-T<sub>2</sub>) are indicated. Kadenbach, B., M. Huttemann, et al. (2000). "Mitochondrial energy metabolism is regulated *via* nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase." *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 211-21 (Kadenbach, Huttemann et al. 2000).

- **Le transport des nucléotides adényliques par l'ANT** : la vitesse du transport des nucléotides adényliques semble contrôler l'activité de la chaîne respiratoire à un certain degré. En effet, l'inhibition de ce transport provoque un ralentissement quasi proportionnel de la respiration mitochondriale (Kunz et al. 1981). En 1982 et 1983, l'équipe de Tager montre finalement que le contrôle de l'ANT sur le flux respiratoire approche seulement 25% (Duszynski et al. 1982; Tager, Wanders et al. 1983).

L'analyse du contrôle appliquée à l'oxydation phosphorylante dans les années 1980 a montré que le contrôle n'était pas basé sur une seule étape mais distribué sur l'ensemble de la voie (Groen, Wanders et al. 1982). La complexité du contrôle ne s'arrête pas ici, puisque les mêmes auteurs ont mis en évidence que les coefficients de contrôle dépendent de l'état stationnaire considéré, c'est-à-dire de l'intensité de la respiration. A l'état 4 de la respiration mitochondriale, soit en l'absence de phosphorylation, le contrôle serait exercé

par la rentrée passive des protons à travers la membrane interne mitochondriale et par la chaîne respiratoire (Brand et al. 1988). A l'état 3 de la respiration en présence de succinate, (*ie* lorsque le *turnover* de l'ATP est maximal) le contrôle s'exercerait par le transporteur des nucléotides adényliques et la cytochrome oxydase. Entre ces deux conditions extrêmes, soit en situation physiologique, le flux serait contrôlé par une multitude de paramètres que sont principalement : la consommation d'ATP, le transport des nucléotides, l'activité des déshydrogénases associée à la fourniture en substrats et en équivalents réduits, et enfin les fuites membranaires (Groen, Wanders et al. 1982; Tager, Wanders et al. 1983).

Dans les années 1990, certains auteurs ont mis en évidence un contrôle plus intégré de l'oxydation phosphorylante : le contrôle par le volume mitochondrial (Devin et al. 1996; Devin et al. 1997). Ils ont ainsi montré qu'un changement de volume matriciel, induit indirectement par une stimulation hormonale (glucagon, vasopressine) ou directement par une modification d'osmolarité du milieu d'incubation des mitochondries, changeait l'activité de la phosphorylation oxydative.

Par ailleurs, l'activité enzymatique de la cytochrome oxydase, tout comme celle de l'ANT et dans une moindre mesure celle des autres complexes du système de l'oxydation phosphorylante, sont régulées par l'environnement lipidique qui les entoure (Streicher-Scott et al. 1994; Klingenberg 2008). Dès les années 1980, il a en effet été montré que des modifications de la composition membranaire mitochondriale induite par des régimes spéciaux, affectaient la fonction mitochondriale (Fry et al. 1980; Daum 1985). Ainsi, l'enrichissement des régimes des animaux en huile de noix de coco, ou de sardine, ou le changement de concentration ou de proportion en acides gras n-3/n-6, modifient l'activité de la cytochrome oxydase, de l'ATP synthase et de l'ANT (Yamaoka et al. 1988; Hoch 1992; Fontaine et al. 1996; Gil-Villarino et al. 1999; Nogueira et al. 2001; Nogueira et al. 2001; Quiles et al. 2001; Gerson et al. 2008; Klingenberg 2008). Ces enzymes semblent particulièrement sensibles à l'environnement moléculaire qui les entoure, c'est-à-dire à la rigidité ou à la fluidité membranaire (proportion d'acides gras insaturés/saturés, cholestérol et longueur des acides gras composant les phospholipides). Le micro-environnement créé par les cardiolipines et les phospholipides environnant les enzymes de l'oxydation phosphorylante, jouent ainsi un rôle majeur dans le contrôle de l'activité mitochondriale. De ce fait, la composition lipidique des membranes mitochondriales contribue pleinement au contrôle de l'oxydation phosphorylante.

L'organisation supramoléculaire de l'oxydation phosphorylante ajoute encore un niveau de complexité. Cette dernière étant capable d'orienter fortement les voies métaboliques par l'existence du réseau métabolique. Or aujourd'hui, nous ne sommes pas en mesure de prédire les niveaux de contrôle existant dans cette organisation. Des modèles mathématiques commencent seulement à être développés pour tenter d'intégrer ces paramètres.

L'oxydation phosphorylante est elle-même sous le contrôle de plusieurs paramètres. Elle dépend des forces qui s'exercent sur elle en amont (le potentiel rédox) et de celles qui s'exercent en aval (le potentiel phosphate). Chacune d'elles est également sous l'influence d'autres paramètres : l'apport en substrats et la consommation d'ATP. Dans un tel contexte, l'analyse de l'influence d'un paramètre sur les autres se complique et seule l'analyse des contrôles, appliquée à chaque paramètre, pourrait répondre à cette question. Dans notre cas et selon le système utilisé (mitochondries isolées ou sur hépatocytes isolés (en conditions saturantes ou non en substrats)), les contrôles sont différents d'une étude à l'autre. Ainsi, nous nous efforcerons de décrire au mieux le système utilisé pour intégrer les contrôles à considérer dont dépend ensuite l'analyse des résultats.

# **Procédures expérimentales**

L'ensemble des études réalisées sur animaux a été exécuté en respectant les bonnes pratiques de laboratoire, en se souciant constamment du bien-être animal, ceci en ayant obtenu l'habilitation à l'expérimentation animale de niveau 1 dès le début de ma thèse. Les animaux utilisés provenaient de l'animalerie du laboratoire.

## **1 Hébergement, traitement et suivi des animaux**

Les rats de souches Wistar ou Goto-Kakizaki (GK) ont été élevés dans l'animalerie du laboratoire, où la température et l'hygrométrie sont maintenues constantes à 23°C et 50% respectivement. La luminosité de la pièce est également contrôlée avec un cycle de 12h de lumière et 12h d'obscurité.

Pour l'ensemble des expérimentations, nous avons préférentiellement choisi des rats mâles afin d'éviter toutes perturbations du métabolisme induites par des changements hormonaux.

Les animaux ont été nourris *ad libitum* avec un régime commercial standard A03 (régime de croissance) (Safe, Gannat, France) et de l'eau à volonté, du sevrage jusqu'à 8 semaines. A cet âge, les animaux ont été séparés, puis alimentés avec des régimes particuliers selon les différentes études.

### ***1.1 Etude 1 : Effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique***

Les animaux ont été répartis aléatoirement à l'âge de huit semaines dans deux groupes différents et placés dans des cages individuelles. Les animaux du premier groupe (CHO) ont reçu une alimentation à base d'hydrates de carbone avec un régime commercial A04 (régime d'entretien) (Safe, Gannat, France), les animaux du second ont suivi un régime hyper gras (« High Fat » : HFAT) à base de lard (Safe, Gannat, France).

	CHO	HFAT
Protéines (g/100g)	16.1	31.5
Lipides (g/100g)	3.1	54.4
Glucides (g/100g)	60	7
Calories (kcal/kg)	2900	6140

**Tableau 2 : Composition des régimes.**

La quantité de protéines a été doublée dans le régime HFAT afin de compenser la plus faible masse de nourriture ingérée du fait de la densité énergétique supérieure du régime HFAT.

AG %	CHO	HFAT
14 :0	0.6	1.3
16 :1 n-9	0.1	0.3
16 :1 n-7	0.6	2.3
16 :0	19.6	23.1
18 :3 n-6	nd	nd
18 :3 n-3	4.2	1.2
18 :2 n-6	50.8	13.7
18 :1 n-9	1.2	39.6
18 :1 n-7	15.5	3.4
18 :0	1.9	11.8
20 :5 n-3	0.7	nd
20 :4 n-6	0.2	0.2
20 :3 n-6	nd	0.1
20 :3 n-3	nd	0.1
20 :1 n-9	1.0	0.8
20 :1 n-7	nd	nd
20 :0	0.2	0.2
22 :6 n-3	1.1	nd
22 :5 n-3	0.2	0.1
22 :5	nd	nd
22 :4 n-6	nd	0.1
<b>somme (n-3) %</b>	<b>6.2</b>	<b>1.4</b>
<b>somme (n-6) %</b>	<b>51.0</b>	<b>14.1</b>
<b>(n-3)/(n-6)</b>	<b>0.12</b>	<b>0.10</b>
<b>Somme MUFA %</b>	<b>18.4</b>	<b>46.4</b>
<b>saturated fatty acid %</b>	<b>22.3</b>	<b>36.4</b>
<b>Total AG g/100g food</b>	<b>3.1</b>	<b>54.4</b>

**Tableau 3 : Profil lipidique des régimes.**

Composition en acides gras exprimée en pourcentage relatif. nd : non détectable (Données Safe, Gannat, France)

La durée des régimes était de 8 semaines avant le sacrifice des animaux. Pendant cette période, les rats ainsi que la quantité de nourriture ingérée ont été pesés deux fois par semaine.

Les rats ont également été placés dans des cages calorimétriques individuelles deux jours durant la dernière semaine de régime. La dépense énergétique (EE) ainsi que le quotient respiratoire (RQ) ont ainsi pu être calculés grâce à l'analyse de la consommation d'oxygène et de la production de CO<sub>2</sub>. Les flux d'oxygène (VO<sub>2</sub>) et de dioxyde de carbone (VCO<sub>2</sub>) dans le circuit ouvert du système ont été réalisés à l'aide d'un analyseur de gaz (LE 405, Panlab-Bioseb). Ces mesures ont été possibles grâce au maintien du flux d'air dans le système par une pompe à gaz et un débitmètre placés sur le circuit (Panlab-Bioseb). Les données ont été collectées par un ordinateur assisté du programme Metabolism Calculation Software, Version 2.0.2. Le calcul de la dépense énergétique a été effectué en utilisant la formule suivante :

$$EE = (3.815 + 1.232 \times VO_2/VCO_2) \times VO_2 \times 1.44$$

Elle est exprimée en kcal.day<sup>-1</sup>.body weight<sup>0.75</sup> afin de la rapporter à la masse métabolique qui correspond à la masse du rat à l'exposant 0.75.

### ***1.2 Etude 2 : Effets du traitement chronique par un nouvel antidiabétique « E008 » sur le métabolisme hépatique***

Comme pour l'étude précédente, des rats mâles Wistar âgés de huit semaines ont été répartis aléatoirement en quatre groupes.

Les animaux du premier groupe nommé « CHO » ont reçu un régime commercial standard A04 à base d'hydrates de carbone pendant 8 semaines. Les animaux du second groupe (CHO E008) ont suivi le même régime mais ont reçu le traitement chronique oral antidiabétique avec le nouveau composé EMD387008 (E008). Pour cela, le composé a été dissout à une dose de 1 mg/ml dans l'eau de boisson. Les rats ingérant en moyenne 50 ml/kg de masse corporelle, ont reçu un traitement d'environ 50 mg/kg. Cette dose permet d'obtenir des concentrations plasmatiques thérapeutiques de l'ordre de 5 µg/ml (informations Merck).

Les animaux des deux autres groupes (HFAT/HFAT E008) ont suivi le régime hyper gras de l'étude précédente. Le composé E008 a été additionné dans l'eau de boisson

des animaux du groupe « HFAT E008 » afin d'obtenir un traitement chronique à une dose de 50 mg/kg/J pendant 56 jours.

A ces quatre groupes de rats Wistar, viennent se joindre deux groupes de rats de souche Goto-Kakisaki (GK et GK E008). Les animaux des deux groupes ont été nourris avec un régime standard A04. Les rats du groupe GK E008 ont reçu le traitement chronique avec le nouveau composé pendant une durée de 8 semaines.

Certains des animaux de cette étude ont été placés en fin de traitement dans les cages calorimétriques afin d'analyser leur dépense énergétique et leur quotient respiratoire, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude 1 (voir méthode de l'étude 1).

### ***1.3 Etude 3 : Etude des effets du composé E008 in vitro***

Les études menées *in vitro* ont été réalisées en utilisant du matériel biologique provenant d'animaux « standards » c'est-à-dire des rats mâles Wistar sous régime A04 n'ayant subi aucun traitement donc semblables à ceux du groupe témoin (CHO).

## **2 Prélèvement et préparation du matériel biologique**

### ***2.1 Prélèvement de sang***

Le sang a été recueilli, après décapitation du rat, dans des tubes contenant de l'EDTA. Après une légère agitation, les tubes ont reposé sur glace pendant 45 min avant d'être centrifugés à 3000 g pendant 10 min. Le plasma a ensuite été récupéré, aliquoté et conservé à -80°C pour les analyses biologiques ultérieures.

### ***2.2 Prélèvement tissulaire et estimation de la composition corporelle***

Après décapitation, la cavité abdominale du rat a été rapidement ouverte. Le foie a été extrait et pesé. Un bout du lobe droit a été prélevé et congelé immédiatement dans l'azote liquide (prélèvement réalisé et conservé à -80°C pour les analyses biochimiques,

RT-PCR et Western Blot ultérieures). Le reste de cet organe a été utilisé pour l'extraction des mitochondries.

Les tissus adipeux rétropéritonéal et épидидymal gauches ainsi que l'ensemble du mésentérique ont été disséqués et pesés.

### **2.3 Préparation d'hépatocytes isolés**

Les animaux ont été mis à jeun 24 h avant le début de l'expérimentation mais avec accès *ad libitum* à leur boisson.

La préparation a été réalisée selon la technique d'isolement décrite en 1969 par Berry and Friend (Berry et al. 1969) et modifiée par Groen et al en 1983 (Groen et al. 1983). Cette technique permet d'obtenir une population d'hépatocytes homogène et viable à environ 85%, en ayant éliminé les cellules parenchymateuses, les cellules de Kupffer et les cellules vasculaires.

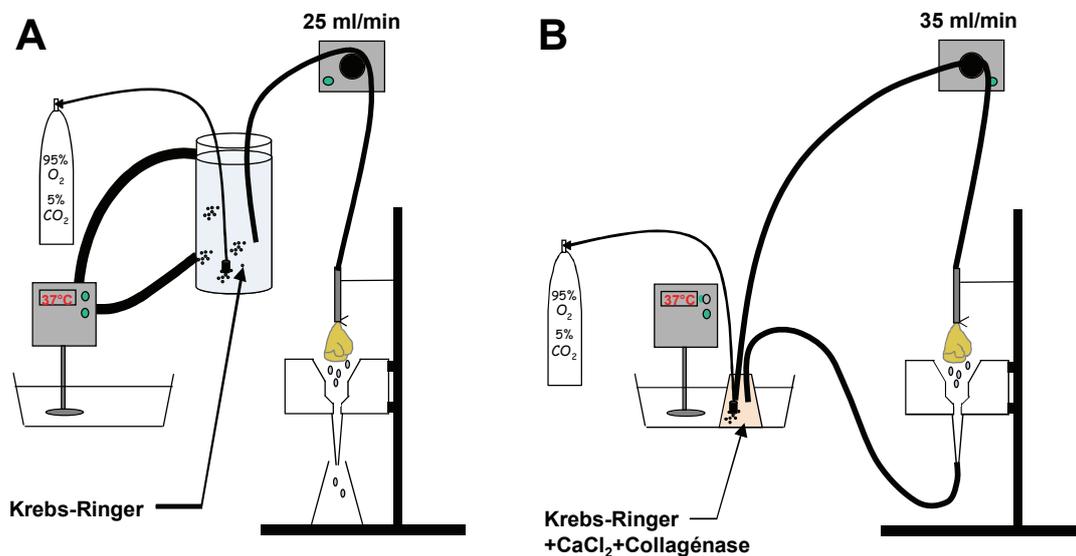
#### **2.3.1 Perfusion et isolement du foie**

Les rats, à jeun depuis la veille, sont anesthésiés par injection *intra-péritonéale* de pentobarbital sodique (128 mg/kg). Après laparotomie médiane, un fil de soie est placé sous la veine cave inférieure, au dessus de la veine rénale droite.

Afin d'éviter la formation de thrombus, 500 U.I d'héparine diluées dans du liquide de Krebs (NaCl 119.8 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, pH=7.4, T°37°C) sont injectées dans la veine cave inférieure. La veine porte, cathétérisée permet la perfusion antérograde du foie par un Krebs-Ringer (NaCl 119.8 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM thermostaté à 37°C et saturé par du carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>)) à un débit de 25 ml/min. Les vaisseaux pelviens sont rapidement sectionnés afin d'ouvrir le circuit de perfusion et ainsi éviter une élévation de la pression hépatique. Cette étape d'environ 2 minutes permet d'éliminer les hématies contenues dans le foie et d'éviter la formation de caillots. Après décoloration complète du foie, une thoracotomie est pratiquée et un fil est placé autour de la veine cave sus-hépatique entre le cœur et le diaphragme. Une incision dans l'oreillette droite permet de placer une canule dans la veine cave inférieure sus-hépatique. Le cathéter de la veine porte est retiré et la perfusion du foie est alors réalisée par la veine sus-hépatique dans le

sens rétrograde. Les ligatures placées préalablement sur la veine cave inférieure et sur la veine sus-hépatique sont ensuite serrées. Ceci permet de perfuser le foie sous une pression convenable et de le solidariser à la canule pour l'extraire du corps de l'animal. Une dissection minutieuse autour du foie permet d'isoler l'organe et de le fixer sur une potence (Figure 20 A).

Cette perfusion du foie pendant 20 minutes avec un Krebs dépourvu de calcium, a pour but d'altérer les jonctions intercellulaires calcium-dépendantes. Ensuite, une perfusion en circuit fermé, de 15 minutes, à un débit de 35 ml/min, avec une solution de Krebs-Ringer supplémentée en  $\text{CaCl}_2$  (1.3 mM) et en collagénase A de type IV (0.25mg/ml), permet une digestion complète du foie (Figure 20 B).



**Figure 20 : perfusion du foie.**

Après extraction du foie hors du corps de l'animal, le foie est placé sur une potence et perfusé à un débit de 25 ml/min par un Krebs-Ringer ( $\text{NaCl}$  119.8 mM,  $\text{KCl}$  4.8 mM,  $\text{MgSO}_4$  2.46 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  24 mM,  $\text{pH} = 7.4$ ,  $T^\circ 37^\circ\text{C}$ ) (A). Ensuite la perfusion est réalisée en circuit fermé avec le même Krebs mais complétement en calcium et collagénase (B).

Au terme de ces perfusions, le foie est disséqué afin de retirer les structures vasculaires, le diaphragme et le rein droit encore présents. Il est placé dans un béccher et la capsule hépatique de Glisson est rapidement détruite à l'aide de plusieurs coups de ciseaux libérant ainsi les hépatocytes. Environ 15 ml de solution de la deuxième perfusion sont ajoutés. Cette suspension est alors homogénéisée délicatement et saturée en carbogène pendant 2 minutes. Elle est ensuite filtrée grossièrement afin d'éliminer les fragments non

digérés et répartie dans 3 tubes à centrifugation. Ces tubes sont centrifugés à 54 g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant la collagénase et les débris cellulaires, est éliminé et les culots d'hépatocytes sont remis en suspension dans un liquide de Krebs (NaCl 119.8 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, pH 7.4) à 4°C.

Une deuxième centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions. Les culots obtenus sont à nouveau remis en suspension dans la même solution mais supplémentée en albumine (BSA) 1% (m/v) puis regroupés. Une troisième centrifugation identique aux précédentes est réalisée et permet d'obtenir un culot d'hépatocytes relativement purifiés. Finalement le culot est remis en suspension dans 15 ml de la solution utilisée précédemment et filtrée. Cette suspension est à nouveau saturée 2 minutes en carbogène et laissée au repos à 4°C pendant 1 heure avant utilisation.

### 2.3.2 Analyse de la suspension cellulaire

#### 2.3.2.1 Concentration

La quantité de cellules ainsi obtenue est évaluée par la pesée d'un culot d'hépatocytes obtenu après centrifugation (2 minutes à 8000 g) de 250 µl de la suspension cellulaire. En admettant que les cellules soient composées à 75% d'eau, la masse du culot exprimée en mg correspond à la concentration d'hépatocytes en mg/ml. Cette évaluation permet d'avoir une valeur immédiate de la concentration cellulaire avec une précision de l'ordre de 5% (Berry et Friend 1969).

Un poids sec final est également obtenu par la différence de masse mesurée après dessiccation de 500 µl de suspension cellulaire et du même volume de solution ayant servi à la remise en suspension des hépatocytes lors de la dernière centrifugation.

Lorsque les hépatocytes sont utilisés en périfusion ou en incubation, la mesure du poids sec est estimée à ce moment. Pour cela, trois aliquots de 1ml de suspension cellulaire sont prélevés dans les chambres ou les pots. Deux prélèvements de solution de perfusion sont également réalisés. Ces échantillons sont placés à l'étuve pendant 24 heures à 100°C. Les poids secs sont ensuite estimés par la différence de masse entre les prélèvements cellulaires et la solution de suspension. La masse ainsi obtenue correspond au poids sec de

cellules. Les résultats obtenus à partir d'hépatocytes seront donc exprimés le plus souvent par g de poids sec d'hépatocytes (g (PS) ou g dry cells). Selon Berry et Friend (Berry et Friend 1969), 1 mg de poids sec d'hépatocytes isolés à partir de foie de rat à jeun contient 465000 cellules.

### 2.3.2.2 Viabilité

La viabilité de la suspension cellulaire obtenue est évaluée par un test au bleu Trypan. Pour cela 10 µl de la suspension d'hépatocytes sont dilués cent fois et incubés en présence de bleu Trypan 2 mM pendant 1 minute avant observation sur lame de Malassez au microscope photonique. Les cellules intactes présentent une forme régulière avec une membrane plasmique intègre et excluent ainsi le bleu Trypan. Les hépatocytes altérés ont perdu leur intégrité membranaire, ainsi les cellules mortes sont colorées en bleu. Cette rapide observation permet de connaître immédiatement la viabilité de notre suspension et de s'assurer de travailler avec un minimum de 85% de cellules viables.

## ***2.4 Techniques d'études et de mesures utilisées avec des hépatocytes isolés***

### **2.4.1 Incubation**

Les hépatocytes isolés, selon la technique précédemment décrite, sont placés dans un incubateur à 37°C, agités, dilués à une concentration de 10 mg/ml dans du liquide de Krebs (NaCl 119.8 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, pH 7.4) saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Ils sont incubés avec le couple de substrats : lactate + pyruvate (20/2 mM respectivement) sans drogue (condition témoin) ou en présence du composé EMD 387008 ou de Metformine à différentes concentrations (10<sup>-3</sup>, 5.10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup>M).

Des échantillons de suspension cellulaire sont prélevés à différents temps et utilisés pour différents dosages, tel que celui des nucléotides adényliques après fractionnement cellulaire, ou pour des analyses biochimiques comme la réalisation des Western blots.

### 2.4.2 Traitement des prélèvements cellulaires

#### 2.4.2.1 Congélation pour les analyses d'expression protéique

La suspension cellulaire est immédiatement centrifugée quelques secondes, le surnageant éliminé et le culot d'hépatocytes plongé dans l'azote liquide. Ces échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'aux analyses en Western blot.

#### 2.4.2.2 Fractionnement cellulaire

La séparation des compartiments cytosolique et mitochondrial a été réalisée par fractionnement cellulaire selon le protocole décrit par Zuurendonk (Zuurendonk et al. 1979). Cette technique consiste à dégrader spécifiquement la membrane plasmique des cellules par la digitonine, puis à centrifuger ces dernières au travers d'une couche d'huile de silicone. Pour cela, après 30 minutes d'incubation, un aliquot de suspension cellulaire (8mg) a été déposé dans un microtube de 2 ml contenant successivement du fond du tube vers le haut (Figure 21):

250 µl d'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub> 10% m/v + EDTA 25 mM)

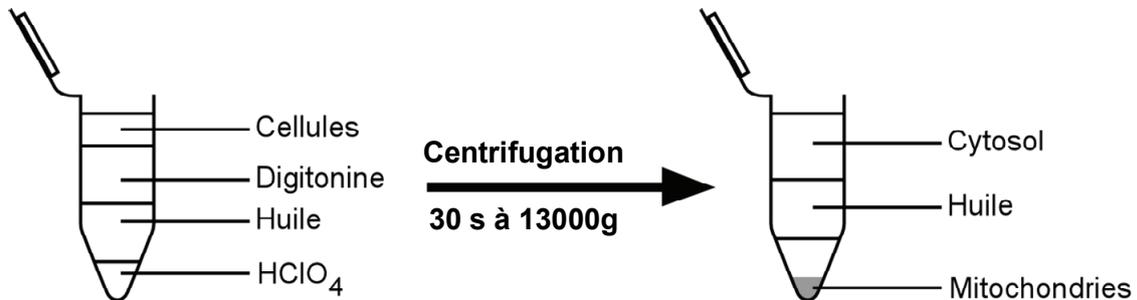
800 µl d'huile de silicone d'une viscosité de 200 centipoises (Wacker 200)

800 µl de solution de digitonine (2.46 mg/ml) diluée à chaud dans un tampon composé de 0.25 mM de saccharose, 0.3 mM EDTA et 20 mM MOPS, pH = 7.2.

Le tube a été incubé 20 secondes à 4°C avant d'être centrifugé 30 secondes à 13000g. Les mitochondries traversent la couche d'huile et sont précipitées dans l'HClO<sub>4</sub> présent au fond du tube. Le surnageant (800 µl) a été récupéré et précipité dans 40 µl d'acide perchlorique à 65% m/v, puis centrifugé 5 minutes à 13000g. Ce second surnageant (700 µl) est récupéré et neutralisé avec un mélange de KOH 2M et MOPS 0.3 M. Cette fraction correspondant au compartiment cytosolique a été conservée à -20°C jusqu'à son analyse.

Le compartiment mitochondrial contenu dans la couche inférieure d'acide perchlorique du tube a été remis en suspension minutieusement sous l'huile. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13000g a été réalisée afin de sédimenter les débris membranaires. La fraction mitochondriale solubilisée dans l'acide (200 µl) a été récupérée

par un pipetage délicat sous l'huile, neutralisée avec le mélange KOH 2 M / MOPS 0.3 M et conservée à - 20°C jusqu'aux analyses.



**Figure 21 : Séparation sur huile des compartiments cytosolique et mitochondrial.**

### 2.4.3 Périfusion

Cette technique décrite par Van der Meer et Tager en 1976 puis modifiée par Groen et al (Groen, Vervoorn et al. 1983) est plus complexe à mettre en œuvre par rapport à l'incubation, mais a l'avantage de permettre l'atteinte d'états stationnaires métaboliques. En effet, dans ce système, les cellules reçoivent un flux permanent de liquide de périfusion avec des concentrations stables et non saturantes de substrats. Ceci permet de travailler dans des conditions plus physiologiques, avec de faibles concentrations de substrats tout en évitant l'accumulation des produits formés.

2.4.3.1 Description du système

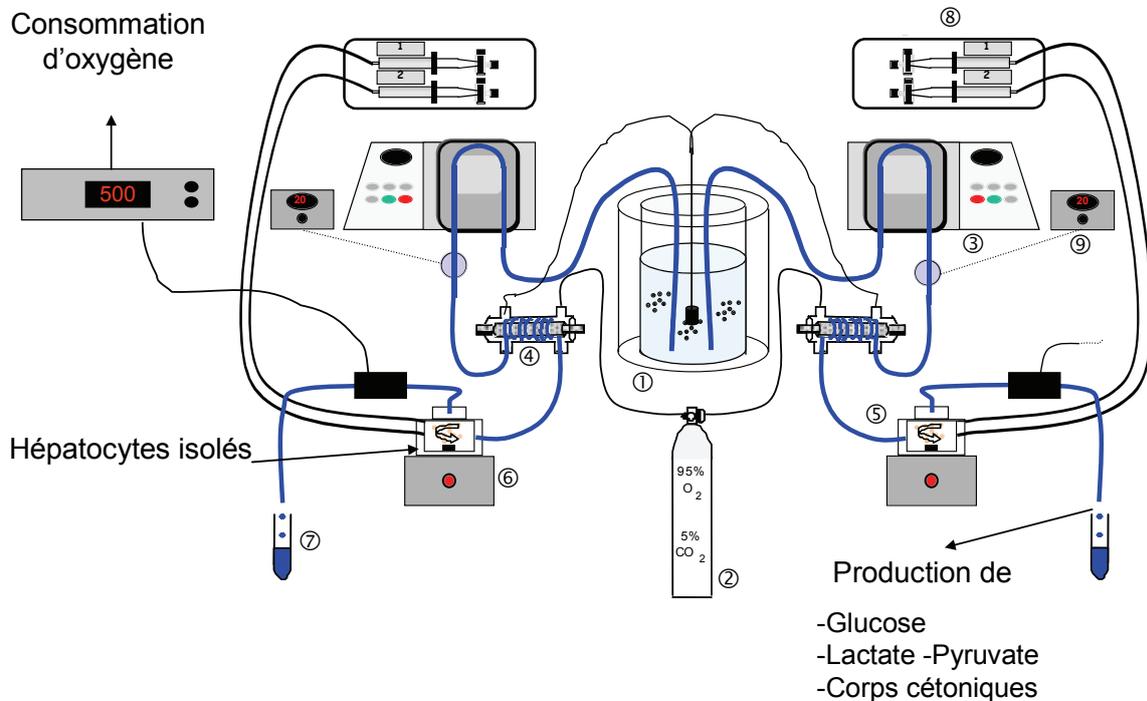


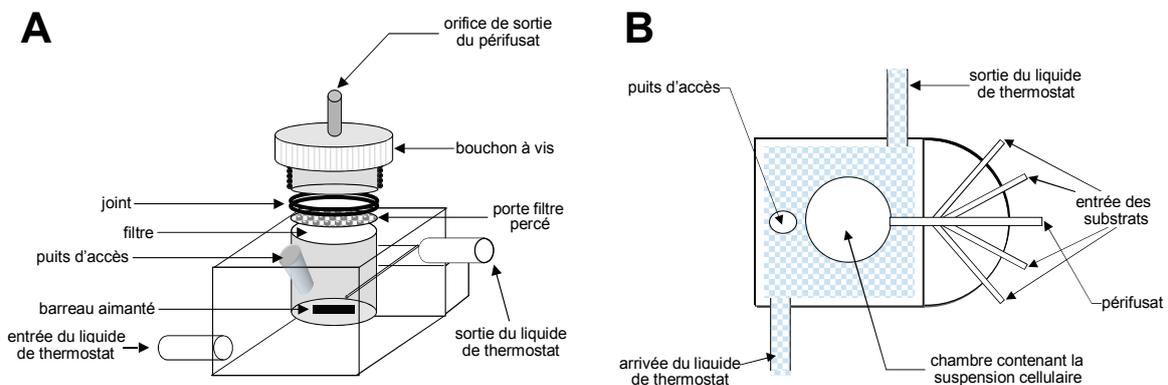
Figure 22 : Système de perfusion d'hépatocytes isolés.

1 : cuve thermostatée contenant le milieu de perfusion, 2 : mélange de carbogène oxygénant le milieu de perfusion au niveau de la cuve centrale et au niveau des poumons de réoxygénation, 3 : pompe péristaltique, 4 : poumon de réoxygénation, 5 : chambre de perfusion, 6 : agitateur magnétique, 7 : recueil du perfusat, 8 : pousse-seringue, 9 : capteur de pression.

Le système de perfusion est composé de deux chambres d'incubation de 15 ml thermostatées à 37°C et agitées où sont placées les cellules (Figure 22). Elles sont alimentées continuellement en liquide de Krebs (NaCl 119.8 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 2.46 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, pH 7.4) à un débit de 5 ml/min grâce à deux pompes péristaltiques. Ce Krebs provenant du réservoir central est réoxygéné juste avant son entrée dans les chambres en passant au travers d'un système appelé « poumon de réoxygénation ». Dans ce dispositif thermostaté à 37°C et alimenté en carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>), le liquide de perfusion circule dans une tubulure en silastic, dont la paroi très fine permet les échanges gazeux. Ainsi, au sortir de ce système, c'est-à-dire juste avant son entrée dans les chambres de perfusion, le milieu est précisément à

37°C et saturé en gaz. Il contient dans ces conditions environ 1 mM d'oxygène sous forme dissoute. Le tampon composé du bicarbonate du liquide de Krebs et d'acide carbonique permet ainsi de stabiliser le pH à 7.4

Les cellules sont maintenues dans les chambres grâce à un filtre en cellulose de 12 µm de porosité (Schleicher et Schuell) placé sur le bouchon des chambres par lequel s'écoule le périfusat (Figure 23). Quatre autres entrées dans les chambres permettent de délivrer les différents substrats à l'aide de pousse-seringues (Vial Medical Program 2IEC). Un puits d'accès aux chambres permet de déposer les hépatocytes en début d'expérience et de réaliser des prélèvements cellulaires à tout instant. Les cellules sont maintenues en suspension dans les chambres à l'aide d'un agitateur magnétique.



**Figure 23 : Chambre de périfusion.**

A : vue générale, B :vue supérieure

Un capteur de pression placé en amont des chambres de périfusion permet de suivre l'évolution de la pression de périfusion. Ce paramètre témoigne d'un éventuel colmatage du filtre par des cellules mortes. Il doit être contrôlé tout au long de l'expérimentation afin d'éviter une surpression dans le système qui témoignerait éventuellement d'une mortalité cellulaire.

### 2.4.3.2 Procédure

Après 30 minutes de stabilisation du système, 200 mg d'hépatocytes (de poids sec évalués par la mesure du poids frais (Berry et Friend 1969) sont déposés dans la chambre de périfusion. La périfusion commence par 40 minutes de stabilisation sans substrat.

Ensuite, les substrats (glycérol et octanoate) sont apportés *via* les pousse-seringues à des concentrations variables. L'état stable métabolique des cellules est atteint en 20 minutes. A ce moment, les prélèvements de périfusats (3 fois 5 ml) sont réalisés. Ils sont placés dans la glace avant d'être chauffés pendant 10 minutes à 80°C pour dénaturer les protéines et centrifugés 10 minutes à 3000 g.

Le dosage des métabolites est réalisé dans les 2 heures suivantes. En fin de périfusion, 3 fois 1 ml de suspension hépatocytaire est prélevé pour évaluer le poids sec final réellement présent dans les chambres.

### 2.4.4 Dosages enzymatiques des métabolites extracellulaires

Les dosages des métabolites (glucose, lactate, pyruvate et corps cétoniques) ont été réalisés par les méthodes enzymatiques décrites par Bergmeyer (Bergmeyer 1974). Elles reposent toutes sur la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup> ou inversement. Les réactions sont donc suivies par des variations d'absorbance à 340 nm et les concentrations déduites de la loi de Lambert-Beer.

Selon cette loi :

$$A = \epsilon.l.C$$

Où A correspond à l'absorbance,  $\epsilon$  au coefficient d'extinction molaire du NADH ( $=6.22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), l à la longueur du trajet optique en cm et C à la concentration molaire en NADH.

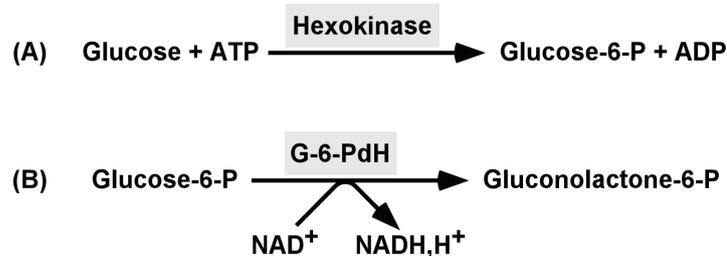
Chaque dosage a été réalisé en triplicata pour chacun des prélèvements.

Le dosage est effectué en mélangeant 1 ml de périfusat à 1 ml de milieu réactionnel spécifique du métabolite à doser. Une première lecture d'absorbance à 340 nm est réalisée et correspond au blanc de l'échantillon. Une quantité d'enzyme est ajoutée dans la cuve et agitée. Après un temps d'incubation spécifique à chaque dosage, une deuxième lecture est effectuée. La concentration du métabolite est alors calculée à partir de cette variation d'absorbance en tenant compte de tous les facteurs de dilution de l'échantillon.

Les réactions enzymatiques et les milieux réactionnels spécifiques de chaque dosage sont décrits dans les paragraphes suivants.

### 2.4.4.1 Glucose

Ce dosage est basé sur les réactions suivantes :

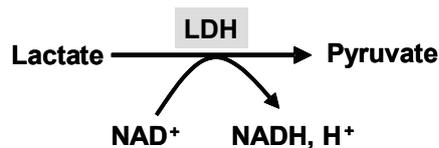


Le milieu réactionnel est composé de 0.5 mM de  $\text{NAD}^+$ , 0.625 mM d'ATP, 0.125 U/ml de G6PdH, 0.2 M de TRA-HCl, 7.5 mM  $\text{MgCl}_2$  et de 3.75 mM EDTA pH 7.4.

0.6 U d'hexokinase (EC : 2.7.1.1) est ajoutée dans chaque cuve qui est ensuite incubée une heure avant la deuxième lecture.

### 2.4.4.2 Lactate

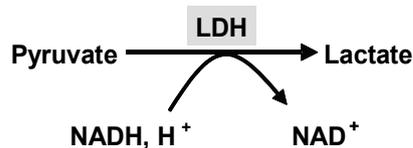
Le dosage est basé sur la réaction suivante :



Le milieu réactionnel est composé de 0.75 mM de  $\text{NAD}^+$ , 0.4 M de monohydrate d'hydrazine et de 0.4 mM de glycine (pH 9). L'enzyme utilisée est la lactate déshydrogénase (LDH, EC : 1.1.1.27) 5 U par cuve avec une incubation de 90 minutes.

### 2.4.4.3 Pyruvate

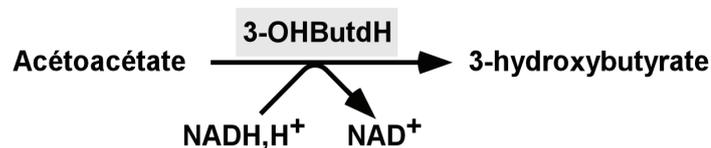
Ce dosage est basé sur la même réaction que celui du lactate mais en sens inverse.



Le milieu réactionnel est composé de NADH 0.2 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M pH 7.4). La LDH (EC : 1.1.1.27, 1.5 U/cuve) catalyse cette réaction. La deuxième lecture est réalisée 15 minutes plus tard.

### 2.4.4.4 Acétoacétate

Le dosage se base sur la réaction qui suit :



Le milieu réactionnel est semblable à celui utilisé pour le dosage du pyruvate. L'enzyme utilisée est la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (3-OHButdH, EC : 1.1.1.30) 24 mU/cuve. 30 minutes sont nécessaires avant la deuxième lecture.

### 2.4.4.5 B-hydroxybutyrate

Le dosage est basé sur la même réaction que le dosage de l'acétoacétate mais en sens inverse. Le milieu de dosage est identique à celui du dosage du lactate. La 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (3-OHButdH, EC : 1.1.1.30) 80 mU/cuve catalyse la réaction. La deuxième lecture est effectuée 45 minutes plus tard.

### **2.5 Préparation de mitochondries isolées**

Les mitochondries ont été isolées à partir de foies de rats ayant suivi les protocoles de traitement et de régimes particuliers décrits précédemment.

La procédure d'isolement des mitochondries repose sur une technique de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle décrite par Hogeboom (Hogeboom et al. 1948; Hogeboom et al. 1955).

#### **2.5.1 Procédure d'isolement**

L'isolement est réalisé en chambre froide à 4°C. Après décapitation du rat et laparotomie médiane, le foie est rapidement prélevé et plongé dans un tampon d'homogénéisation (250 mM saccharose, 20 mM tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.4) maintenu à 4°C dans la glace. Il est rapidement découpé en petits morceaux qui sont rincés 2 fois avec le même tampon afin d'éliminer les hématies. Ces fragments sont homogénéisés à l'aide d'un Potter en verre. L'homogénat obtenu est centrifugé 10 minutes à 800 g et à 4°C. Cette première centrifugation sédimente les débris cellulaires. Le surnageant, contenant les mitochondries, est récupéré et centrifugé 10 minutes à 8000 g. Le surnageant est éliminé et le culot de mitochondries est remis délicatement en suspension dans du tampon d'homogénéisation. Une dernière centrifugation dans les mêmes conditions est alors effectuée. Le surnageant est à nouveau éliminé et le culot remis en suspension dans 500 µl de tampon stock (250 mM saccharose, 10 mM tris-HCl, 0.1 mM EGTA, pH 7.4).

Les mitochondries sont conservées dans la glace pour les expériences réalisées dans les heures suivantes (oxygraphie et mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène) puis congelées à -80°C pour les dosages biochimiques.

#### **2.5.2 Détermination de la concentration protéique de la préparation**

La concentration en protéines de la suspension de mitochondries a été déterminée par la méthode de Pierce à l'aide du kit « BCA Protein Assay ». Ce dosage colorimétrique est basé sur la réduction du  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines en milieu alcalin. L'interaction rapide de ce cation avec l'acide bicinonique, donnant une coloration bleue, une lecture à 562 nm au spectrophotomètre au bout de 30 minutes d'incubation à 37°C, permet d'estimer

la concentration en protéines. Ce dosage a été effectué en microplaque de 96 puits. L'échantillon de mitochondries, dilué 100 fois dans l'eau a été comparé à une gamme de concentrations de BSA délipidée.

### **2.6 Techniques d'études et de mesures utilisées sur mitochondries isolées**

#### **2.6.1 Oxygraphie**

##### 2.6.1.1 Principe

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est mesurée dans un oxygraphe (Hansatech Instrument). Cet appareil est constitué d'une chambre thermostatée et agitée munie d'une électrode de Clark (Clark, 1956). Celle-ci est composée d'une cathode en platine polarisée à -0.7 Volts et d'une anode en argent au contact d'une solution de KCl à demi-saturée. Elle est séparée de la chambre de mesure par une membrane en téflon perméable à l'oxygène. Ce dernier est réduit au niveau de la cathode, créant ainsi une différence de potentiel proportionnelle à la quantité d'oxygène présente dans la chambre de mesure. Les signaux électriques sont recueillis par un ordinateur muni d'une carte d'acquisition et traités à l'aide du logiciel Oxygraph+ (Hansatech Instrument) puis convertis en nmolO<sub>2</sub>/ml.

##### 2.6.1.2 Procédure

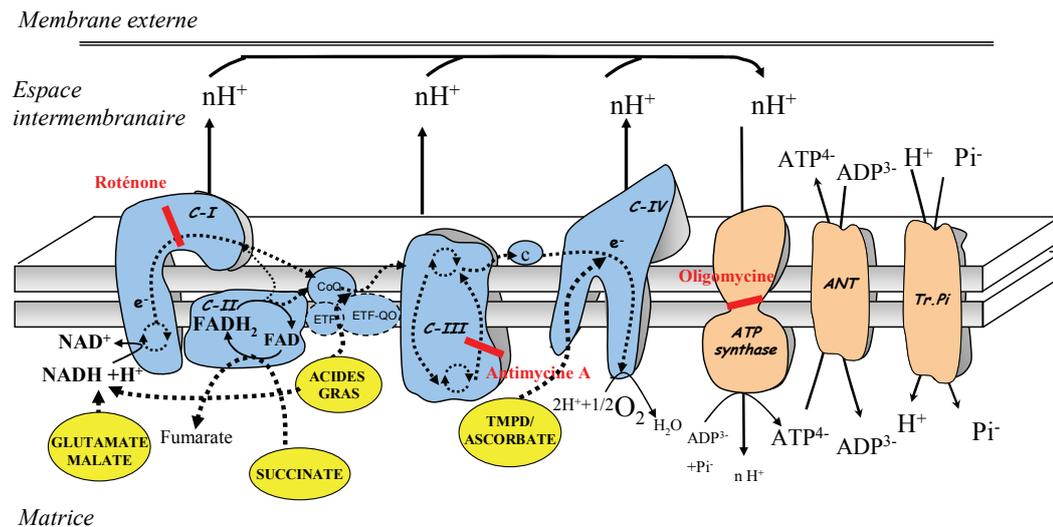
La consommation d'oxygène par les mitochondries est mesurée à 30°C dans un milieu de respiration tamponné à pH 7.2 (125 mM KCl, 20 mM Tris Base, 1 mM EGTA) auquel est ajouté 0.15% de BSA délipidée (FFA) et 5 mM Pi Tris pH 7.2.

Selon le substrat utilisé, 0.5 à 1 mg/ml de suspension mitochondriale sont placés dans la chambre d'oxygraphie. Après addition des substrats, l'état 2 de la respiration est mesuré.

L'adjonction de 300 µM d'ADP permet d'obtenir la respiration à l'état 3, c'est-à-dire en condition phosphorylante.

La respiration oligomycine-insensible est obtenue après addition de 1.25 µg/ml d'oligomycine, un inhibiteur spécifique de la rentrée des protons dans la matrice *via* l'ATP synthase. Cette respiration, dite à l'état 4, est le reflet d'une rentrée passive des protons à travers la membrane interne mitochondriale.

Enfin, l'ajout d'un découplant protonophore (DNP, 75 µM) permet d'obtenir une respiration découplée de la synthèse d'ATP.



**Figure 24 : Représentation schématique des voies d'entrées des substrats et des cibles d'action de différents inhibiteurs utilisés pour l'étude de l'oxydation phosphorylante.**

C-(Complexe), CoQ (Coenzyme Q), ETF/ETF-QO (Electron Transfer Flavoprotein-ubiquinone /oxidoreductase), ANT (Adenine Nucleotide Translocase), c (Cytochrome c), Tr.Pi (transporteur du phosphate).

Les mitochondries sont énergisées par différents substrats :

soit du Glutamate/Malate (5.5 mM/2.5 mM) qui permet d'explorer la chaîne respiratoire à partir du complexe I (NADH-ubiquinone déshydrogénase).

soit du succinate (5 mM) additionné de 2.5 µM de roténone, afin d'explorer la chaîne respiratoire à partir du complexe II (succinate déshydrogénase).

soit du palmitoyl-L-carnitine (55 µM), un acide gras à chaîne longue, ou de l'octanoyl-L-carnitine, un acide gras à chaîne courte, chacun en présence de Malate (1 mM). Ces deux acides gras permettent de mesurer l'activité de la chaîne respiratoire en présence de substrats lipidiques.

Les différentes conditions de respiration sont décrites dans le tableau suivant :

<b>Substrats / Inhibiteurs</b>	<b>Concentrations finales utilisées</b>	<b>Solutions mères</b>	<b>Volume ajouté (qsp 1.8 ml)</b>
<b>Glutamate/Malate</b>	5 mM/2.5 mM	0.5 M/0.25 M	18 µl/7 µl
<b>Succinate/Roténone</b>	5 mM/2.5 µM	1 M/ 2 mM	9 µl/2 µl
<b>Glutamate/Malate/Succinate</b>	5 mM/2.5 mM/5 mM	0.5 M/0.25 mM/5 mM	18 µl/9µl
<b>Octanoyl-Carnitine/Malate</b>	110 µM/1 mM	110 mM/0.25 M	1.8 µl/7 µl
<b>Palmitoyl-Carnitine/Malate</b>	55 µM/1 mM	20 mM/0.25 M	5 µl/7 µl
<b>TMPD/Ascorbate</b>	0.5 mM/0.5 mM	25 mM	36 µl
<b>ADP</b>	300 µM	100 mM	5.5 µl
<b>Antimycine A</b>	1.5 µM	1 mM	2 µl
<b>Oligomycine</b>	1.5 µg/ml	2 mg/ml	1.4 µl
<b>DNP</b>	75 µM	50 mM	2.7 µl

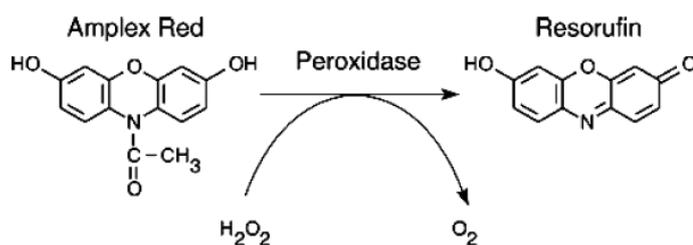
**Tableau 4 : Concentrations des substrats et inhibiteurs utilisés sur mitochondries isolées.**

## 2.6.2 Fluorimétrie : Mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 2.6.2.1 Principe

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries a été estimée par la libération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les mitochondries (Batandier et al. 2006). Celle-ci est mesurée par fluorimétrie en utilisant une sonde fluorescente : l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxasine). Cette molécule, en présence de peroxydase de radis noirs (horseradish peroxidase : HRP, EC : 1.11.1.7), est oxydée par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un composé fluorescent : la Résorufine ( $\lambda_{\text{excitation}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 584 \text{ nm}$ ).

L'équation d'oxydation de l'Amplex Red est la suivante :



Excitée à 560 nm par un faisceau monochromatique, la Résorufine émet à 584 nm. Nous suivons ainsi la vitesse de production d' $H_2O_2$  en suivant la fluorescence émise à 594 nm.

#### 2.6.2.2 Procédure

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre (Hitachi SFM 25) couplé à un ordinateur permettant le recueil des données et leurs analyses cinétiques. Le milieu réactionnel tamponné à pH 7.2 et thermostaté à 30°C est composé de 125 mM Chlorure de Potassium, 20 mM Tris Base, 1 mM EGTA auquel ont été ajoutés 0.15% de BSA-FFA, 5 mM Pi Tris pH 7.2, 1  $\mu$ M d'Amplex Red et 6 U/ml d'HRP.

Les mitochondries (0.2 mg/ml) sont plongées dans la cuve et agitées pendant 30 s avant de lancer la mesure. La succession des injections dans la cuve est décrite dans la figure suivante. La mesure commence par 2 minutes de stabilisation avant injection de substrat. La production est alors mesurée à l'état 2 pendant 2 minutes, puis en présence de roténone (inhibiteur du complexe I) et enfin d'Antimycine A (inhibiteur du complexe III).

L'estimation de la production d' $H_2O_2$  est exprimée en pmol d' $H_2O_2$ /mg protéines après étalonnage du système. Pour cela, une quantité connue d' $H_2O_2$  équivalente à environ 440 pmol (obtenue après dilution d'un étalon à 30% et dont la concentration est évaluée précisément par spectrophotométrie à 240 nm). Cet étalonnage est réalisé en présence des mitochondries. Il tient ainsi compte de l'action des défenses antioxydantes endogènes et de l'interaction possible de la préparation de mitochondries avec la sonde.

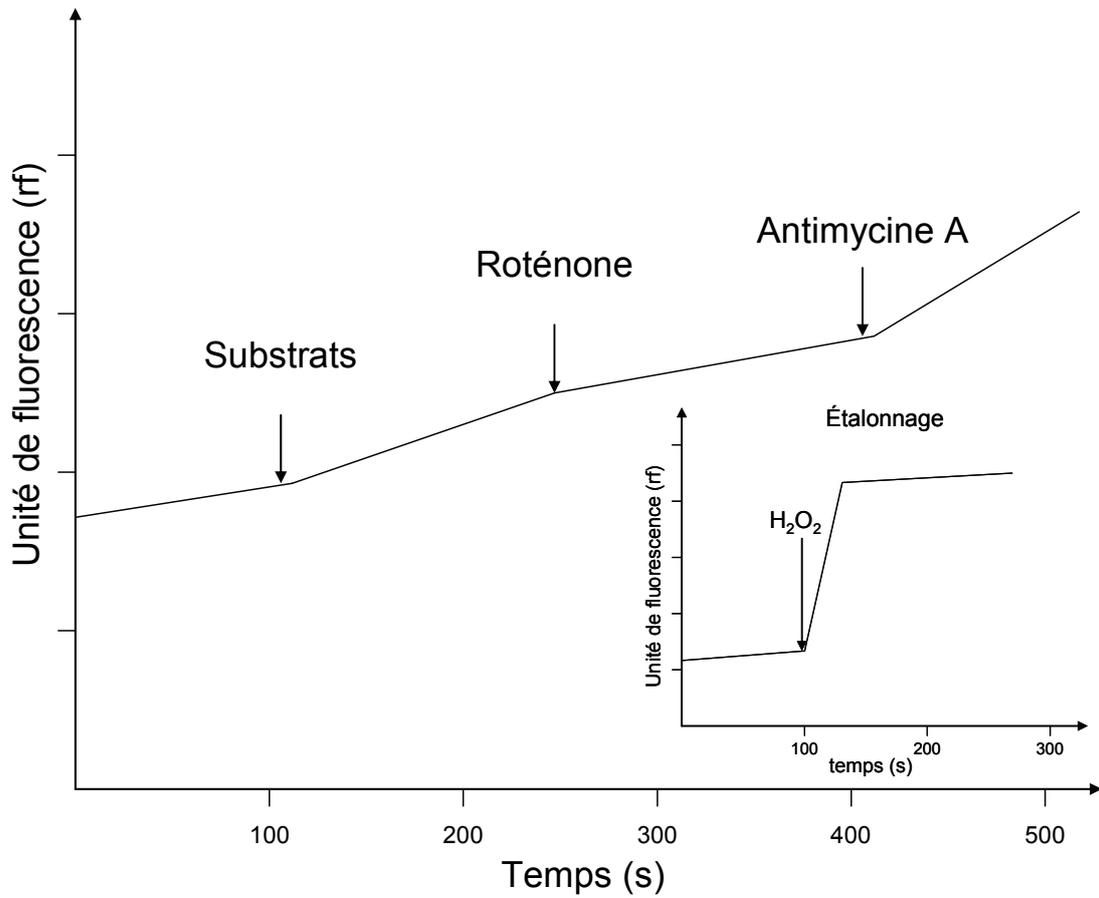


Figure 25 : Représentation schématique de la mesure de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par fluorimétrie.

Les concentrations de substrats et d'inhibiteurs utilisés sont détaillées dans le tableau suivant.

Substrats / Inhibiteurs / Sonde / enzymes / étalon	Concentrations finales utilisées	Solutions mères	Volume ajouté (qsp 1.8 ml)
Glutamate/Malate	5 mM/2.5 mM	0.5 M/0.25 M	18 µl/7 µl
Succinate/Roténone	5 mM/2.5 µM	1 M/ 2 mM	9 µl/2 µl
Glutamate/Malate/Succinate	5 mM/2.5 mM/5 mM	0.5 M/0.25 mM/5 mM	18 µl/9µl
Octanoyl-Carnitine/Malate	110 µM/1 mM	110 mM/0.25 M	1.8 µl/7 µl
Palmitoyl-Carnitine/Malate	55 µM/1 mM	20 mM/0.25 M	5 µl/7 µl
Amplex Red	1 µM	1 mM	1.8 µl
HRP	6 U/ml	6000 U/ml	1.8 µl
Antimycine A	1 mM	1.5 µM	2 µl
Oligomycine	1.5 µg/ml	2 mg/ml	1.4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	244 nM	88 µM	5 µl

**Tableau 5 : Concentrations des substrats, inhibiteurs, sondes et étalon utilisés sur mitochondries isolées en fluorimétrie pour l'estimation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

### 2.6.3 Mesure de la capacité de rétention calcique

#### 2.6.3.1 Principe

La capacité de rétention calcique (CRC) est estimée par la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (PTP). Cette mesure est effectuée en ajoutant successivement des doses fixes de calcium (inducteur puissant de l'ouverture du PTP) à une suspension de mitochondries jusqu'au déclenchement de l'ouverture du PTP. Celle-ci se matérialise par une libération massive du calcium accumulé par les mitochondries. Les mouvements calciques sont suivis à l'aide d'un spectrofluorimètre et d'une sonde calcique extra-mitochondriale : le Calcium Green ( $\lambda_{\text{excitation}} = 506 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 530 \text{ nm}$ ). La fluorescence émise est uniquement fonction de la concentration extra-mitochondriale de calcium puisque cette sonde ne diffuse pas au travers des membranes. Ainsi, à chaque addition de calcium, une augmentation de la fluorescence est observée puis celle-ci diminue au fur et à mesure que le calcium est capté par les mitochondries. Lorsque l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité survient, le calcium est libéré des mitochondries et la fluorescence augmente massivement. La

quantité de calcium utilisée pour observer ce phénomène, exprimée par mg de protéine mitochondriale, correspond à la CRC.

### 2.6.3.2 Procédure

Dans une cuve en quartz agitée et thermostatée à 25°C, les mitochondries (0.8 mg protéines/ml) sont placées dans un milieu contenant 250 mM de saccharose, 10 mM de MOPS et 1 mM de phosphate inorganique, pH 7.4. Après 1 minute d'incubation en présence de glutamate/malate (5/2.5 mM) ou de succinate (5 mM) ou de glutamate/malate/succinate (5/2.5/5 mM) et 1  $\mu$ M de Calcium Green, nous suivons la fluorescence de la sonde avec  $\lambda_{\text{excitation}} = 506$  nm et  $\lambda_{\text{émission}} = 530$  nm. Toutes les minutes, une charge de calcium de 12.5  $\mu$ M est ajoutée dans la cuve jusqu'à déclencher l'ouverture du PTP.

## 2.6.4 Détermination du rendement de l'oxydation phosphorylante : ATP/O

### 2.6.4.1 Principe

L'estimation du rapport entre la vitesse de production d'ATP et la consommation d'oxygène par les mitochondries permet d'apprécier le rendement de l'oxydation phosphorylante, autrement dit l'efficacité avec laquelle l'énergie d'oxydo-réduction est convertie en énergie chimique sous forme d'ATP.

Cette mesure témoigne ainsi à la fois des fuites (« leak ») de protons à travers la membrane interne mitochondriale, du patinage des pompes à protons (« slipping ») et de l'efficacité de l'ATP synthase.

Pour évaluer ce paramètre, il faut donc mesurer en parallèle la respiration mitochondriale et la vitesse de phosphorylation de l'ADP. Cette dernière est évaluée indirectement par la mesure de la phosphorylation du glucose en glucose-6-P par l'hexokinase (EC : 2.7.1.1). Pour ce faire, les mitochondries sont placées dans un milieu contenant du glucose (20 mM), de l'ATP (125  $\mu$ M) et des quantités faibles et variables d'hexokinase permettant une régénération plus ou moins rapide de l'ADP. L'ADP renouvelé en quantité non saturante par le système hexokinase stimule la respiration

mitochondriale à des niveaux variables et sous maximaux. Ainsi, nous pouvons mesurer la consommation d'oxygène (par oxygraphie) et la production d'ATP (dosage du G6P produit) à différentes vitesses.

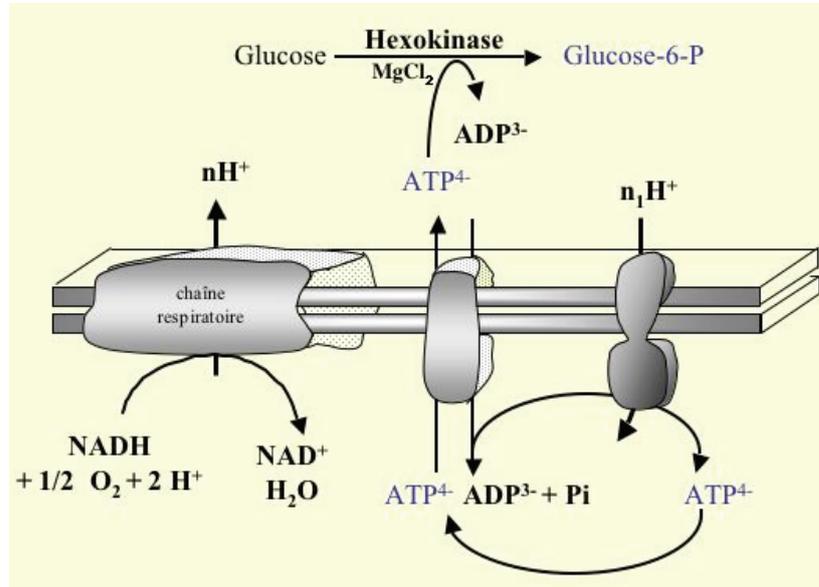


Figure 26 : Principe de mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante par la technique de l'hexokinase.

#### 2.6.4.2 Procédure

Les mitochondries ( $1 \text{ à } 1.5 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) sont placées en milieu KCl (125 mM Chlorure de Potassium, 20 mM Tris Base, 1mM EGTA auquel ont été ajoutés 0.15% de BSA-FFA, 5 mM Pi Tris pH 7.2, 20 mM de Glucose et 125  $\mu\text{M}$  d'ATP) dans une chambre d'oxygraphie, thermostatée à 30°C. Les substrats (Glutamate/Malate, Succinate + Roténone, Palmitoyl ou Octanoyl Carnitine) sont ajoutés et la respiration à l'état 2 est mesurée. Ensuite, la respiration est stimulée par des concentrations croissantes d'hexokinase (0.1 à 2 U/ml). Pour chacune des concentrations d'hexokinase, des prélèvements de la suspension mitochondriale sont effectués à intervalles réguliers (30 secondes) et précipités dans un mélange d'acide perchlorique 10% et d'EDTA 25 mM. Ces échantillons sont maintenus à 4°C afin d'éviter toutes réactions enzymatiques. Ils sont ensuite centrifugés et les surnageants neutralisés par un mélange de KOH 2 M, MOPS 0.3 M. Le contenu en G6P des échantillons est rapidement déterminé par dosage spectrophotométrique. Pour cela, 250  $\mu\text{l}$  de surnageant neutralisé sont mélangés à 1ml de

tampon de milieu réactionnel composé de  $\text{NAD}^+$  0.75 mM dans un tampon Triéthanolamine chlorure 0.2 M, Chlorure de magnésium 30 mM, EDTA 15 mM, pH = 7.4. Après une première lecture à 340 nm, 0.5 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PdH, EC : 1.1.1.49) sont ajoutées pour lancer la réaction. 20 minutes plus tard, une deuxième lecture est effectuée. La différence de DO entre les deux lectures permet à l'aide de la loi de Beer-Lambert et du coefficient d'extinction molaire du NADH de déterminer la concentration de G6P qui était présente dans le prélèvement. Par déduction, on détermine le flux d'ATP au moment du prélèvement auquel on associe une respiration mitochondriale (flux d' $\text{O}_2$ ). Le rendement est exprimé par le rapport ATP/  $\text{O}_2$ .

## 2.7 *Mesure d'activités enzymatiques*

### 2.7.1 **Mesure d'activités mitochondriales**

Ces mesures ont été effectuées sur des préparations de mitochondries, sur des hépatocytes ou des homogénats de foie. Les échantillons ont subi, avant les mesures, trois cycles de congélation/décongélation afin de faciliter l'accès des substrats aux enzymes membranaires. Les mesures ont été réalisées par spectrophotométrie dans des cuves en quartz de 1 ml agitées et thermostatées à 37°C.

#### 2.7.1.1 Mesure de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire

Cette mesure détermine l'activité NADH-ubiquinone oxydoréductase sensible à la roténone (EC : 1.6.5.3). L'équivalent de 10  $\mu\text{g}$  de mitochondries hépatiques ou 100  $\mu\text{g}$  de cellules est placé dans un tampon KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.5) auquel sont ajoutés 3.75  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de BSA délipidée, 100 $\mu\text{M}$  de décylubiquinone (accepteur d'électrons), et 100  $\mu\text{M}$  NADH (donneur d'électrons). L'oxydation du NADH est suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 340 nm pendant 3 minutes, puis l'addition de 10  $\mu\text{M}$  de roténone permet de soustraire la dérive liée à l'oxydation du NADH non spécifique à l'activité du complexe I. L'utilisation du coefficient d'extinction molaire du NADH (6.22  $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et de la vitesse de décroissance de la DO à 340 nm permet de calculer l'activité enzymatique du complexe I.

### 2.7.1.2 Mesure de l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire

Cette mesure détermine l'activité de la succinate déshydrogénase (EC : 1.3.5.1) en suivant le transfert d'électrons du succinate vers la décylubiquinone, puis le dichloro-indophénol (2,6 Dichloroindophenol : DCIP). La réduction de ce composé est suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 600 nm pendant 3 minutes. Pour cela, 24 µg de mitochondries ou 100 µg de cellules sont placés dans un milieu KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.5) auquel sont ajoutés  $3.75 \text{ mg.ml}^{-1}$  de BSA délipidée, 30 mM de succinate,  $50 \mu\text{M}$  de décylubiquinone,  $100 \mu\text{M}$  de DCIP,  $9.3 \mu\text{M}$  d'Antimycine A et  $5 \mu\text{M}$  de roténone. Le suivi de la décroissance de la DO à 600 nm pendant 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$  et le coefficient d'extinction molaire du DCIP ( $19.1 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) permet de calculer l'activité enzymatique spécifique du complexe II.

### 2.7.1.3 Mesure de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire

Cette mesure est basée sur la détermination de la vitesse d'oxydation de cytochromes c réduits à 95% par la cytochrome oxydase (EC : 1.9.3.1).

Pour cela, une solution de cytochrome c réduit à 95% est préparée en mélangeant une solution de cytochromes c réduits à 100% par un excès de dithionite de sodium et une solution de cytochrome c oxydé. Un état de réduction de 95% est atteint lorsque le spectre (entre 530 et 570 nm) atteint 95% de la valeur de DO maximale obtenue avec la solution totalement réduite.

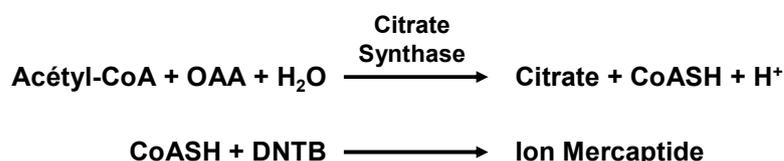
L'équivalent de 8 µg de mitochondries ou 100 µg de cellules est placé dans un tampon KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7) contenant  $80 \mu\text{M}$  de cytochrome c réduit à 95%. L'oxydation du cytochrome c est suivie par la mesure de la DO à 550 nm pendant 5 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . En utilisant le coefficient d'extinction molaire du cytochrome c ( $29.5 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), on calcule la vitesse d'oxydation du composé par la cytochrome oxydase.

### 2.7.1.4 Dosage de l'activité ATPase

L'activité de la sous-unité F1 de l'ATP synthase (EC : 3.6.1.14) a été mesurée sur mitochondries isolées et éclatées par spectrophotométrie, en couplant l'activité ATPasique à celle de la pyruvate kinase (EC : 2.7.1.40) et de la LDH (EC : 1.1.1.27), permettant de mesurer la disparition du NADH à 340 nm et à 37°C dans une cuve en quartz (Buckle et al. 1985). Pour cela, 1mg/ml de mitochondries sont placées dans un tampon Hepes/KOH 50 mM pH 8, MgSO<sub>4</sub> 5 mM et contenant : 2.5 µM de roténone, 2.5 mM de Phosphoénolpyruvate, 0.35 mM de NADH, 7 UI/ml de pyruvate kinase, 15 UI/ml de LDH et 0.1 % Triton X100. La disparition spontanée du NADH est suivie à 340 nm pendant 5 minutes, puis 2.5 mM d'ATP neutralisé sont ajoutés dans la cuve. La variation de densité optique à 340 nm est à nouveau enregistrée sur 5 minutes. Les réactions étant couplées mole à mole, la vitesse de disparition du NADH correspond à celle de l'ATP. Ainsi, en utilisant la loi de Lambert-Beer et le coefficient d'extinction molaire du NADH (6.22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), on calcule la vitesse de dégradation de l'ATP. Cette activité est considérée comme étant majoritairement due à l'activité de la F1-ATP synthase fonctionnant à l'envers (Buckle, Guerrieri et al. 1985).

### 2.7.1.5 Dosage de l'activité de la citrate synthase

Cette mesure est basée sur les réactions suivantes :



L'activité citrate synthase (EC : 2.3.3.1) est mesurée en suivant l'apparition d'ion mercaptide qui absorbe à 412 nm. Pour cela, 24 µg de mitochondries (ou l'équivalent de 100 µg de cellules ou d'homogénat) sont placés dans un tampon Tris 150 mM pH 8 contenant 0.1% de Triton X-100, 150 µM d'acide dinitrothiobenzoïque (DNTB), 300 µM d'acétyl-CoA. L'activité non spécifique est mesurée dans ces conditions pendant 3

minutes, puis l'addition de 0.5 mM d'oxaloacétate (OAA) permet de suivre la réaction complète. L'activité de la citrate synthase est ensuite calculée à partir du différentiel des deux pentes et du coefficient d'extinction molaire du DNTB ( $13.2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Srere 1969).

### 2.7.1.6 Dosage de l'activité de la G3PdH mitochondriale

Cette activité est mesurée en suivant le transfert des électrons entre les composés suivants et dont la première étape est catalysée par l' $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase (EC : 1.1.5.3) :



La réduction du DCIP (2,6 dichloroindophenol) s'accompagne d'une diminution de son absorbance à 600 nm ( $\epsilon_{\text{DCIP}} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

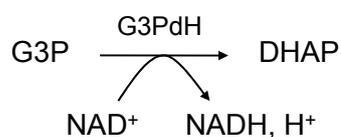
La mesure sur les échantillons s'effectue en plaçant 40  $\mu\text{g}$  de mitochondries (ou 200  $\mu\text{g}$  de cellules) dans la cuve contenant 1 ml de tampon KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM pH 7.5), 2.5 mg/ml de BSA, 9.3  $\mu\text{M}$  d'Antimycine A, 5  $\mu\text{M}$  de roténone, 50  $\mu\text{M}$  de Décyubiquinone et 100  $\mu\text{M}$  de DCIP.

Après 3 minutes d'agitation, l'ajout de 30 mM d' $\alpha$ -glycérophosphate lance la réaction de dosage. 3 minutes plus tard, 0.2 mM d'indométacine sont ajoutés afin d'inhiber spécifiquement l'activité de l' $\alpha$ -glycérophosphate mitochondriale. Le différentiel entre les deux dernières pentes permet ainsi de calculer l'activité spécifique de la G3PdH à l'aide du coefficient d'extinction molaire du DCIP.

### 2.7.2 Mesure d'activités enzymatiques cytosoliques

#### 2.7.2.1 Dosage de l'activité G3PdH cytosolique

Ce dosage est basé sur la réaction suivante qui est catalysée par la G3PdH (EC : 1.1.1.8) :



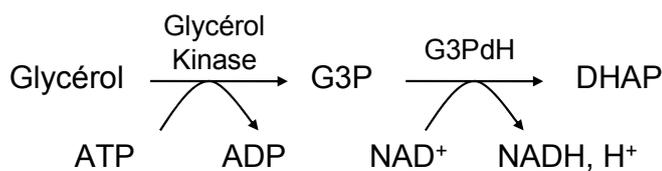
Il a été réalisé à partir de 100  $\mu\text{g}$  de surnageant de cellules (soniquées et centrifugées à 13000 g pendant 10 minutes à 4°C).

L'activité G3PdH cytosolique est suivie à 340 nm par la réduction de  $\text{NAD}^+$  en NADH à 37°C. Le milieu réactionnel utilisé est composé de 0.27 M de glycine, 0.4 M d'hydrate d'hydrazine et 1.8 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM de sn-glycérophosphate.

Après addition de 100  $\mu\text{g}$  d'échantillon, l'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 3 minutes avant d'ajouter 0.75 mM de  $\text{NAD}^+$  et de suivre sa réduction pendant 5 minutes. En fin d'expérience, 0.2 mM d'indométacine sont ajoutés afin de déterminer l'activité G3PdH mitochondriale contaminante.

#### 2.7.2.2 Dosage de l'activité Glycérol Kinase

Des hépatocytes isolés ont été congelés, soniqués et centrifugés à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Le dosage a été effectué sur le surnageant selon la méthode décrite par Bergmeyer. Il consiste à suivre l'apparition de NADH à 340 nm et repose sur les réactions suivantes.



Le milieu réactionnel est composé de 0.75 mM de  $\text{NAD}^+$ , 0.4 M d'hydrate d'hydrazine, 0.27 M de glycine, 1.8 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Il est supplémenté avec 300 mU.I de G3PdH et 20 mM de Glycérol. 500  $\mu\text{g}$  d'échantillons sont plongés dans 2 ml de milieu réactionnel. La DO est suivie pendant 5 minutes, puis l'ajout de 1.25 mM d'ATP permet de lancer la réaction propre au dosage. L'activité spécifique de la Glycérol Kinase (EC : 2.7.1.30) est calculée à l'aide du différentiel des deux pentes (cinétique avant et après addition d'ATP) et du coefficient d'extinction molaire du NADH.

## 2.8 *Analyses de la composition en cytochromes et en quinones des mitochondries*

### 2.8.1 Détermination de la concentration en cytochromes

Le principe de ce dosage est basé sur la variation du spectre d'absorption des cytochromes (hèmes) en fonction de leur degré d'oxydation. Cette mesure est effectuée à 30°C en réalisant simultanément les spectres d'une suspension de mitochondries, réduite ou oxydée, à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (Williams 1964). Pour cela, 5 mg de mitochondries sont placés dans deux cuves en quartz contenant 1 ml de tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M pH 7.4 additionné de 0.01% de Triton X100. Dans une cuve, 0.05 M d'ascorbate est ajouté et une première lecture d'absorbance est réalisée sur les deux cuves entre 500 et 650 nm. Ces tracés correspondent aux spectres de base et sont à soustraire aux suivants. Quelques cristaux de dithionite sont ajoutés dans la première cuve et permettent de réduire les cytochromes contenus dans cette cuve. 0.05 M de ferricyanure sont ajoutés dans la seconde cuve afin d'oxyder les cytochromes contenus dans celle-ci. Le même balayage de longueur d'onde est réalisé sur les deux cuves et le spectre de base de chaque cuve lui est soustrait. Les variations d'absorbances entre les conditions réduites et

oxydées, nécessaires aux calculs des concentrations de cytochromes, sont obtenues par la différence entre les spectres finaux des deux cuves.

Les concentrations en cytochromes a+a3 sont déterminées à partir des variations d'absorbance entre 605 et 630 nm, alors que celles des cytochromes b sont calculées à l'aide des différences entre 563 et 577 nm et, enfin, celles en cytochromes c+c1 entre 554 et 535 nm.

### **2.8.2 Détermination des concentrations de quinones et d' $\alpha$ -tocophérol**

Cette étude a été effectuée grâce à une collaboration avec l'équipe de Louis Casteilla et avec l'aide d'Anne Galinier du laboratoire de Biochimie du C.H.U. de Rangueil, à Toulouse (UMR 5241 CNRS-UPS, IFR 31, C.H.U. Rangueil, Toulouse, France).

Les quinones ont été extraites dans du 2-propanol à partir de bouts de foie clampés. Les quantités de CoQ9 et CoQ10, ainsi que d' $\alpha$ -tocophérol, ont été déterminées par HPLC avec détection électrochimique (Galinier et al. 2004).

### **2.9 *Analyse de la composition en acides gras du plasma, du foie et des mitochondries***

Cette analyse a été réalisée en collaboration avec Anne Athias de l'équipe du Centre de Recherche INSERM-UMR866 de la Faculté de Médecine de Dijon (Institut Fédératif de Recherche Santé-STIC, Université de Bourgogne, 21079 Dijon, France).

La quantification des acides gras a été réalisée par chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse. Pour cela, des standards internes ont été ajoutés à chaque échantillon de foie, de mitochondries ou de plasma, puis saponifiés dans 0.6 N d'hydroxyde de potassium éthanolique (Folch et al. 1957). Les acides gras sont alors extraits, dérivés et remis en suspension dans 100  $\mu$ L d'hexane. 1  $\mu$ L a ensuite été injecté dans le système pour déterminer le profil lipidique (Viens et al. 1996).

### **2.10 Expressions protéiques**

La technique du Western-Blot a été utilisée pour estimer l'expression de certaines protéines d'intérêt ou caractériser leur niveau de phosphorylation.

Elle a été mise en œuvre à partir d'homogénats de foie ou d'hépatocytes isolés et parfois incubés.

#### **2.10.1 Préparation des échantillons**

Les homogénats ont été réalisés à l'aide d'un broyeur de tissus fonctionnant par agitation des échantillons dans des tubes Eppendorff contenant des billes d'acier (Hoescht MM300). Deux séries d'agitations de 30 secondes à 30 Hz ont été réalisées pour homogénéiser 50 à 100 mg de tissus dans 1 ml de tampon de lyse.

Ce milieu est composé de 20 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100 (t-Octylphénoxy polyéthoxyéthanol) pH 7.5. Des cocktails d'inhibiteurs de protéases (Roche : protease inhibitor cocktail) et de phosphatases (Sigma : Phosphatase Inhibitor cocktail 1 + Sigma : Phosphatase Inhibitor cocktail 2) sont ajoutés extemporanément. Les homogénats ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 13000 g à 4°C.

La concentration en protéines du surnageant a été déterminée par la méthode de Pierce. Ces homogénats ont ensuite été dilués à 2.5 µg/µL dans un tampon de Laemmli (62.5 mM Tris-HCl, 0.0025% bleu de bromophénol, 2% SDS, 10% glycérol, 20% bêta-mercaptoéthanol, pH 6.8) et conservés à -80°C jusqu'à leur dépôt sur gel.

Avant leur utilisation, les échantillons ont été chauffés 10 minutes à 65°C afin de faciliter la dénaturation des protéines.

#### **2.10.2 Electrophorèse sur gel SDS-PAGE**

L'électrophorèse sur gel SDS-PAGE permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines d'intérêt recherchées ayant des poids moléculaires compris entre 50 et 150 kDa, nous avons choisi d'utiliser des gels de concentration de 8%

associés à des gels de séparation de 4% d'acrylamide. Ces gels sont préparés et coulés dans un système BioRad Miniprotean III pour gel de 1 mm d'épaisseur.

Après polymérisation des gels, le système est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration composé de 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine et 0.1% de SDS, pH 8.3. 10 µl d'échantillon, soit 25 µg de protéines, sont déposés dans chaque puits. Toutefois, sur chaque gel, un puits est réservé à 5 µl de marqueur de poids moléculaires (BioRad Precision Plus). La migration dure environ une heure à 150 V.

### 2.10.3 Transfert sur membrane de nitrocellulose

L'électrophorèse terminée, le gel est placé sur une membrane de nitrocellulose, préalablement équilibrée et humidifiée pendant 5 minutes avec le tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1 % SDS, 20 % méthanol, pH 8.3). Cette dernière avait été préalablement imbibée avec ce même tampon et placée sur trois épaisseurs de papier Wattman, en prenant soin d'éviter la formation de bulles. Le tout est recouvert de trois couches de papier Wattman, également humidifié avec le tampon de transfert. Ce « sandwich » est placé dans l'appareil de transfert (membrane côté anode) et un courant de 1 mA/cm<sup>2</sup> est appliqué pendant une heure. Après transfert, la membrane est rincée et colorée au rouge ponceau afin de vérifier l'efficacité et l'homogénéité du transfert. Après plusieurs rinçages permettant d'éliminer le colorant, la membrane est séchée pour être conservée ou utilisée pour les étapes suivantes.

### 2.10.4 Saturation (ou blocage)

La membrane est plongée dans un milieu contenant une grande quantité de protéines « inertes » (non recherchées) afin de saturer la surface de la membrane et d'éviter ainsi des liaisons non spécifiques des anticorps. Pour ces études, nous avons utilisé de la caséine contenue dans le lait écrémé. Les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec une faible agitation, dans un milieu TTBS lait 5% (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 1% Tween<sup>®</sup> 20 (polyéthylène sorbitan monolaurate), 5% m/v lait écrémé).

### 2.10.5 Détection par immuno-marquage

Après blocage, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire (dirigé contre la protéine recherchée) dilué dans du TTBS lait 5%. Selon les anticorps, le temps d'incubation et le nombre de rinçages qui suivent peuvent varier. En général, le couplage s'est effectué pendant la nuit, en agitation douce et à 4°C. La membrane est ensuite lavée dans du TTBS (50 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 1% Tween<sup>®</sup> 20 (polyéthylène sorbitan monolaurate)) par 3 rinçages de 10 minutes.

Une saturation rapide de 30 minutes avec du TTBS lait 5% est réalisée afin d'éviter des fixations non spécifiques de l'anticorps secondaire.

La membrane, préalablement couplée avec l'anticorps primaire, est incubée pendant 1 heure à 25°C avec l'anticorps secondaire (dirigé contre l'anticorps primaire) dilué dans du TTBS lait. La membrane est ensuite lavée dans du TTBS par 3 rinçages de 10 minutes.

Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à une peroxydase (EC : 1.11.1.7) qui permet leur détection par chimiluminescence.

### 2.10.6 Révélation par chimiluminescence

La membrane est incubée pendant 1 minute dans un milieu de chimiluminescence (100 mM Tris, 225 µM d'acide coumarique, 1.25 mM luminol, 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 8.8). La membrane est rapidement emballée dans du film étirable et placée dans une cassette de révélation. Des films photographiques (Amersham Hyperfilm ECL) sont exposés sur la membrane pendant des temps variables selon l'intensité du marquage obtenu, puis développés par immersion dans des bains de développement et de fixation (Kodak).

### 2.10.7 Analyse par densitométrie

Les films photographiques obtenus sont scannés et les signaux correspondants à la protéine d'intérêt (au poids moléculaire attendu) sont quantifiés. Pour permettre une quantification relative entre les groupes, un échantillon commun a été déposé systématiquement sur chaque gel afin de rapporter tous les signaux à celui-ci. L'analyse densitométrique a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ 1.37v de NIH USA.

### **2.11 Analyse de la transcription de gènes d'intérêt**

Cette analyse de quantification des ARNms hépatiques a été réalisée par RT-PCR (PCR en temps réel), méthode permettant une analyse relative (inter échantillon) de l'expression de gènes. Elle a été mise en œuvre à partir des ARN totaux, extraits et reverse-transcrits, de bouts de foie clampés et conservés à -80°C.

#### **2.11.1 Extraction des ARN totaux**

L'extraction s'est effectuée à l'aide de Trizol en utilisant la méthode proposée par Invitrogen. Elle consiste à incuber et homogénéiser des bouts de foie dans du Trizol (phénol et thiocyanate de guanidine) qui rompt les cellules et dénature les protéines (dont les nucléases endogènes) afin de préserver l'intégrité des ARN et ADN. Du chloroforme est additionné, le mélange agité puis laissé à décanter 10 minutes à 25°C. Une centrifugation 13000 g à 4°C permet ensuite de séparer l'échantillon en trois phases : une phase organique contenant les protéines, une phase aqueuse contenant les ARN. Entre les deux se trouve un anneau blanc contenant l'ADN. La phase supérieure (aqueuse contenant les ARN) est délicatement récupérée. Les ARN sont précipités par ajout d'isopropanol et centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes. Le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70%. L'éthanol est ensuite éliminé par pipetage et évaporation. Le culot est remis en suspension dans de l'eau de qualité PCR (sans ARNase). La quantité des ARN et la contamination par des ADN contenus dans chaque échantillon sont dosées par densité optique à 260 et 280 nm. L'intégrité des ARN est analysée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (détection par bromure d'éthidium). Afin d'éliminer les contaminations par de l'ADN, 1 µg d'ARN est incubé en présence de ADNase (amplification grade, Invitrogen). La transcription inverse (« reverse transcription ») est immédiatement réalisée sur ces échantillons après la digestion de l'ADN.

### 2.11.2 La transcription inverse

La transcription inverse permet de synthétiser des ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN. Pour cela, chaque échantillon est incubé en présence de transcriptase inverse (100 U de M-MLV reverse transcriptase) dans un volume final de 20  $\mu$ l en suivant les instructions du kit Invitrogen (Superscript III, Invitrogen).

### 2.11.3 RT-PCR : “Real-Time Polymerase Chain Reaction”

La RT-PCR, soit PCR en temps réel, permet d’amplifier un fragment d’ADN et de suivre par fluorescence la quantité de cet ADN en cours d’amplification. Le nombre de cycles nécessaires à l’amplification dépend étroitement de la quantité d’ADN complémentaire de l’amorce utilisée pour l’amplification. Ainsi, en comparant le nombre de cycles nécessaires à l’amplification pour chacun des échantillons, on peut comparer l’expression de gènes entre ces échantillons.

L’expression relative de chaque ARNm testé a été déterminée à l’aide du LightCycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) en utilisant le kit LightCycler®FastStartDNA Master<sup>PLUS</sup>SYBR Green I (Roche) et la méthode FastStart DNA Master Plus SYBR Green I. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau suivant. L’efficacité de l’amplification a été testée pour chaque amorce sur une série de dilutions d’un pool d’ADNc préparé à partir d’un aliquot de chaque échantillon. La quantification des produits PCR a été réalisée en utilisant la dérivée maximum seconde et la méthode des  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , à l’aide du programme LightCycler 3.5. Le gène de référence choisi est Arbp1 (Livak et al. 2001), gène ubiquitaire stable de la phosphoprotéine P0 constitutive des ribosomes.

Gene	Accession #	Protein	Forward primer	Reverse primer
Acaca	NM_022193	ACC alpha	5'-AGTGGAAAGGCACAGTGAAGG-3'	5'-CTATCACAGAGCGGACACCA-3'
Acacb	NM_053922	ACC beta	5'-AAGTGACCGACTCCAGATCC-3'	5'-AGATCCTTGGTGACGTAGGG-3'
Acadl	NM_012819	LCAD	5'-AGCTGCATGAAACCAAACG-3'	5'-CCATGGAGTTGAACACACTGA-3'
Acadm	NM_016986	MCAD	5'-TTTGGAAAGCTGCTAGTGGAG-3'	5'-GCAATAGAGGCAAAGTACGTGTT-3'
Acads	NM_022512	SCAD	5'-TGGGATGGGCTTCAAGATAG-3'	5'-ACTTCACGGCACAATCCAG-3'
Ant2	NM_057102	ANT2	5'-ATGCAGTCTGGACGCAAAG-3'	5'-ACCATGCACCCTTGAAAAAG-3'
Aqp9	NM_022960	AQP9	5'-TCCTGTTCTCTCGGACTCAAC-3'	5'-CCACCAGAAGTTATTTCCAACG-3'
Arbp	NM_022402	ARBP	5'-CCTGCACACTCGCTTCCTA-3'	5'-TGATGGAGTGAGGCACTGAG-3'
Atp5b	NM_134364	F1 ATPase	5'-TCGTGGGGTGCAAAGAT-3'	5'-CAAGAAGCGCTGTATCTTCCTT-3'
Cd36	NM_031561	CD36	5'-CATTGTACCTATACTGTGGCTAAATGA-3'	5'-CCAAGTAAGACCATCTCAACCA-3'
Cox8a	NM_134345	COX IV	5'-GAGCGTCTTCCCTCATCCT-3'	5'-TGAATAACATGATCCCAGGGTA-3'
Cpt1a	NM_031559	CPT1	5'-TGGGCTCTCACTGTATGTGTTC-3'	5'-CCTTGGCTGCGGTAAGACTA-3'
Cs	NM_130755	CS	5'-GCGTTTGTACCTTACCATCCA-3'	5'-GCAAAGGACAGGTAAGTGTCTGA-3'
Fabp1	NM_012556	FABP1	5'-CTTCTCCGGCAAAGTACCAAG-3'	5'-TTCCTTCTGGATGAGGTC-3'
Gpd1	NM_022215	cG3PdH	5'-TGAGACCATAAGCACAGCACA-3'	5'-TACTCCATCCCCTGCT-3'
Gpd2	NM_012736	mG3PdH	5'-GCCTGGCCTTCTTAATGTTC-3'	5'-CCTCGTGGCTGTTCAAGTT-3'
Gyk	NM_024381	Glyk	5'-TTTTGTCTTTTGGAAATGGAA-3'	5'-GTAAAAATCCAGCAAATTCATCA-3'
Hadh	NM_057186	HAD	5'-TGGACTGGATACTACAAAGTTCATCT-3'	5'-GGTCTTTTGGCCAGCTTCT-3'
Pck1	NM_198780	PEPCK	5'-GAAGGAGTGCCCATCGAA-3'	5'-TCCTACAAACACCCCATGCT-3'
Pkkr	NM_012624	PK	5'-CAATTGGCATTGAAAGTGG-3'	5'-TTTCAGGATACGCTCAGCAC-3'
Ppara	NM_013196	PPAR alpha	5'-CCTCGAACTGGATGACAGTG-3'	5'-CCCTCCTGCAACTTCTCAAT-3'
Ppargc1a	NM_031347	PGC1 alpha	5'-GGAATGCACCGTAAATCTGC-3'	5'-TTTCATTGACCTGCGTAAA-3'
Tfam	NM_031326	Tfam	5'-TCAGGCTTGGAAAAATCTGTCT-3'	5'-TGCGACGGATGAGATCACT-3'

Tableau 6 : Séquences (5'-3') des amorces utilisées pour la RT-PCR.

### 3 Statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme de moyenne pour chaque condition,  $\pm$  l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les comparaisons entre les différents groupes ont été effectuées par test ANOVA à analyses factorielles ou en mesures répétées (selon les données). Pour les données suivant une loi normale, un test de post hoc Fischer PLSD a été utilisé *a posteriori* pour déterminer les interactions. Un test non paramétrique de Mann & Whitney a été utilisé pour des valeurs à distribution non normale. Le seuil de significativité a été fixé à 5%. Ces analyses ont été réalisées grâce au logiciel StatView (StatView, ASA institute inc. Version 5.0, Cary Caroline du nord USA).

# **Résultats et Discussion**

Etude 1 :

Effets d'un régime enrichi en graisses sur  
le métabolisme hépatique

# 1 Effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique

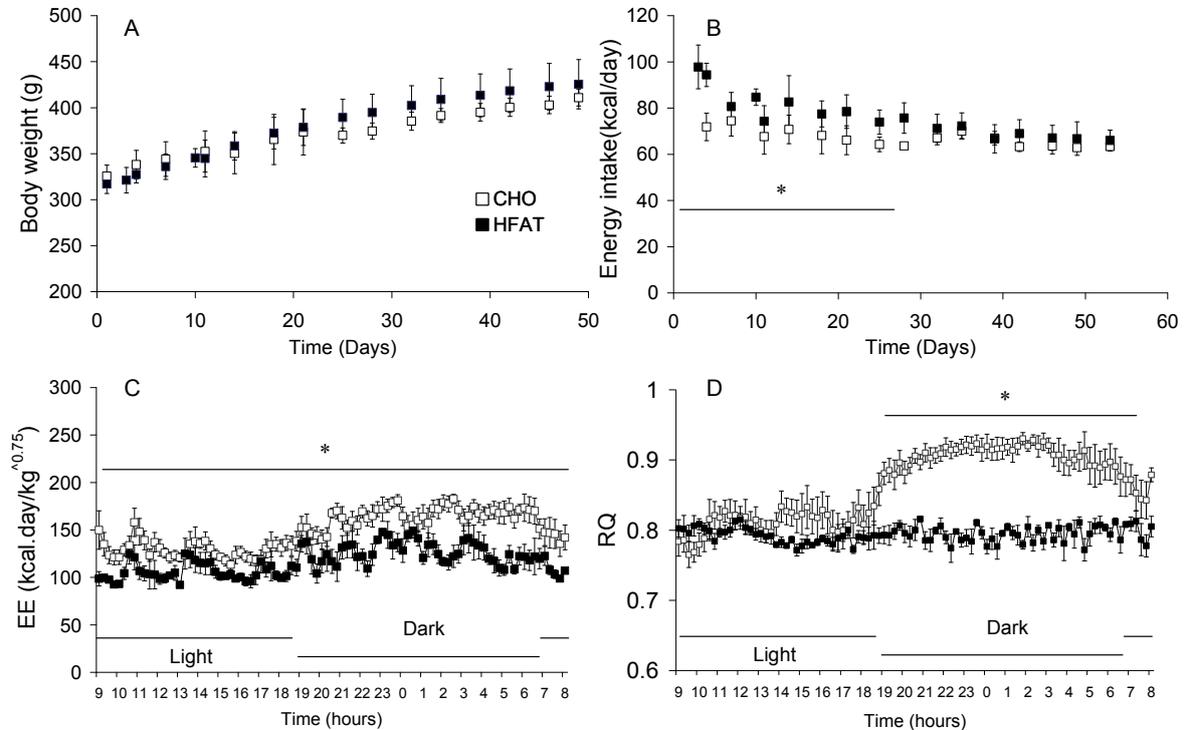
L'objectif de ce travail était d'étudier les effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique.

Cette étude nous a permis dans un premier temps, de développer et de mieux comprendre un modèle animal nutritionnel de développement du syndrome métabolique et d'insulino-résistance. Par la suite, ce modèle nous a servi à tester une nouvelle drogue antidiabétique développée et synthétisée par l'industriel Merck.

Un certain nombre de modèles animaux de ce type existent sur le marché ou sont cités dans la littérature, mais peu d'entre eux sont complètement décrits, en particulier au niveau hépatique. Or, il était indispensable de bien connaître le modèle sur lequel nous allions tester ce nouveau produit antidiabétique. Un modèle nutritionnel nous a paru le plus approprié pour mimer cette physiopathologie. En effet, l'ingestion de quantités importantes de graisses est connue pour induire le développement du syndrome métabolique qui conduit à un état d'insulino-résistance, puis au diabète de type 2 (Zimmet, Alberti et al. 2001; Chew et al. 2006). Ce phénomène, associé à un manque d'activité physique, semble être responsable de l'augmentation massive du développement du syndrome métabolique dans notre société. En utilisant ce type de modèle, nous espérons ainsi reproduire au mieux cette situation physiopathologique. Nous avons donc choisi de poursuivre le développement et l'analyse d'un modèle, déjà utilisé au laboratoire, qui consiste à soumettre des rats à 8 semaines de régime enrichi en graisses. Ce régime est composé à 50% de lard de porc additionné de 4% d'huile de soja (Cf Procédures expérimentales 1.1. page 67).

### ***1.1 Effets du régime sur la croissance, la dépense énergétique et la composition corporelle***

L'évolution de la masse corporelle des rats durant les 8 semaines d'étude est identique entre les groupes HFAT et CHO, les animaux de chacun des deux lots ayant pris environ 100 g à la fin du traitement. Le régime HFAT n'affecte donc pas la croissance des animaux pendant les huit semaines de régime hyper gras (Figure 27 A).



**Figure 27 : Dépense énergétique, quotient respiratoire, évolution de la masse corporelle et de la prise alimentaire chez le rat HFAT.**

Les animaux ont été pesés (A) et leur prise alimentaire (B) évaluée deux fois par semaine. La dernière semaine du régime, la dépense énergétique (C) et le quotient respiratoire (D) des rats ont été mesurés sur 24 heures. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour le groupe CHO et  $n=10$  pour le groupe HFAT. \*  $p<0.05$  CHO vs HFAT.

La prise alimentaire quotidienne des animaux sous régime hyper gras est supérieure au cours des 4 premières semaines. Ils ingèrent environ 80 kcal par jour, alors que les animaux du groupe témoin ont un apport quotidien de 66 kcal en moyenne. Cet effet est lié au fait que l'aliment est particulièrement appétissant pour les rongeurs. Néanmoins, l'ingestion se stabilise rapidement pour atteindre des valeurs nutritives identiques à celle du groupe témoin de l'ordre de 68 kcal (Figure 27 B). La dépense énergétique (EE), évaluée à partir de la consommation d'oxygène durant la dernière semaine du régime, est significativement plus faible dans le groupe HFAT. La dépense énergétique des animaux HFAT ne semble pas augmenter en période active (animaux nocturnes) alors que celle des animaux du groupe témoin augmente d'environ 30%. Cette différence pourrait être liée au fait que les animaux suivant un régime standard doivent ingérer deux fois plus de

nourriture (en volume de régime) et passent ainsi plus de temps et d'énergie à cette activité par rapport aux autres rats, afin d'assurer le même apport alimentaire. En effet, la densité énergétique du régime hyper gras est deux fois supérieure à celle du régime standard. C'est pour cette raison que les quantités de protéines et de vitamines dans le régime hyper gras ont été doublées afin de maintenir les mêmes apports entre les deux groupes d'animaux, mis à part la fraction lipidique. Il faut noter également que les animaux n'ont pas la possibilité d'avoir une activité physique importante dans le type de cage utilisé pour ces mesures. Par conséquent, la diminution de la dépense énergétique observée dans le groupe HFAT ne peut être expliquée par des modifications de comportement de ces animaux, entraînant des variations d'intensité d'activité physique. Nous ne pouvons donc pas spéculer sur des effets d'ordre psychique du régime aboutissant à des modifications de l'activité spontanée des animaux, responsables des variations de consommation d'oxygène. Il semblerait donc que les animaux n'aient pas le même rendement énergétique par rapport à l'oxygène. Or, en consommant des lipides, le rendement par rapport à l'oxygène devrait être plus faible dans le groupe HFAT (Figure 27), ce qui est vérifié par nos mesures expérimentales. Par contre, les données expérimentales de consommation d'oxygène représentées indirectement par la dépense énergétique (EE), ne concordent pas avec la prise alimentaire. En effet, comme les animaux ont une ingestion calorique et une masse corporelle identiques avec des régimes induisant des rendements différents par rapport à l'oxygène, nous sommes contraints de spéculer sur des modifications d'absorption des aliments différentes. L'absorption alimentaire des animaux sous régime hyper gras est sans doute légèrement plus faible que celle de l'autre groupe. Sachant que les animaux ont la même masse corporelle, cette différence pourrait être compensée par une légère augmentation d'activité physique des animaux du groupe CHO (dépense liée à la prise alimentaire plus importante).

Le quotient respiratoire est identique entre les deux groupes pendant la période diurne. Par contre, il est nettement augmenté la nuit dans le groupe CHO, alors qu'aucun changement n'est observé dans le groupe HFAT pendant cette période. L'absence de variation de quotient respiratoire en cours de journée, c'est-à-dire selon l'état nutritionnel des animaux montre que ces derniers ont perdu leur flexibilité métabolique, malgré une légère quantité de glucides présente dans le régime HFAT. Autrement dit, ils semblent être incapables d'utiliser majoritairement les glucides en période post prandiale.

Malgré l'absence de différence de masse corporelle des animaux au terme des 8 semaines de régime, l'analyse de la composition corporelle de ceux-ci a révélé des différences majeures. Les animaux ne sont pas plus lourds mais présentent une masse de tissus adipeux plus importante au détriment de la masse maigre (Tableau 7).

	Liver				Adipose tissues		
	Weight (g)	Proteins (mg/g)	F.A. (mg/g)	Glycogen (mg/g)	MT weight (g)	RP weight (g)	EP weight (g)
CHO	12.3 ± 0.79	194.5 ± 5.8	27.7 ± 1.3	55.4 ± 2.8	6.9 ± 0.49	4.9 ± 0.49	4.8 ± 0.45
HFAT	12.2 ± 0.45	187.4 ± 9.1	78.0 ± 6.8 *	28.4 ± 0.7 *	9.8 ± 0.70 *	9.9 ± 0.95 *	8.4 ± 0.65 *

**Tableau 7 : Effets du régime HFAT sur le foie et les tissus adipeux.**

Le foie, les tissus adipeux mésentérique (MT), rétropéritonéal (RP) et épидидymal (EP) ont été disséqués et pesés après les huit semaines de régimes témoin (CHO) ou hyper gras (HFAT). F.A. : acides gras. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM avec n=5 pour le groupe CHO et n=10 pour le groupe HFAT. \* p<0.05, significativement différent entre CHO et HFAT.

La masse de tissu adipeux mésentérique (MT) est accrue de 42%, celle du tissu adipeux rétropéritonéal est doublée et celle du tissu adipeux épидидymal est élevée de 75% par le régime.

Par contre, la masse du foie n'est pas modifiée par le régime HFAT. Néanmoins, cet organe est plus riche en graisse (+180%) et appauvri en glycogène (-50%). Ceci est le reflet de l'installation d'une stéatose hépatique chez les rats HFAT. En outre, la quantité de protéines hépatiques n'est pas modifiée par les huit semaines de régime. Cette donnée a également son importance car elle nous permettra d'exprimer les résultats des flux et des activités enzymatiques par « g de poids sec » (« g dry cells ») ou par « mg protéine » sans biais.

### *1.2 Effets du régime sur les compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale*

L'importance des dépôts de tissus adipeux mésentérique, rétro-péritonéal et épидидymal et l'accumulation de graisse au niveau hépatique dans le groupe HFAT, témoignent de perturbations profondes du métabolisme lipidique. La quantité et la qualité des lipides plasmatiques ou cellulaires ayant une importance capitale dans le métabolisme, nous avons analysé précisément par chromatographie et spectrométrie de masse ces paramètres. L'analyse de la composition détaillée des lipides plasmatiques, hépatiques et mitochondriaux a révélé que le régime affecte profondément les profils lipidiques (Tableau 8).

Les acides gras totaux plasmatiques sont augmentés de 32% dans le groupe HFAT et le profil lipidique est nettement différent. La somme des acides gras saturés n'est pas différente entre les deux groupes, contrairement à sa composition. En effet, l'acide stéarique (18:0) est doublé dans le groupe HFAT, alors que les acides gras 14:0, 16:0 et 20:0 sont abaissés. Les acides gras insaturés sont principalement plus faibles dans le groupe HFAT, mais quelques-uns sont également augmentés (18:1 n-9, 20:3 n-6 et 20:4 n-6). La somme des n-3, tout comme le rapport (n-3)/(n-6), sont diminués par les 8 semaines de régime. La plupart de ces différences sont retrouvées au niveau hépatique. Le contenu du foie en acides gras est quasiment multiplié par trois dans le groupe HFAT. Cette hausse est due principalement à la quantité accrue d'acides gras mono-insaturés, en particulier à celle de l'acide oléique. Comme dans le plasma, la proportion de n-3 est diminuée dans le foie. Les changements observés sur la fraction mitochondriale sont semblables à ceux détectés dans le plasma. Les sommes des acides gras, des n-6, des MUFA (acides gras mono-insaturés) et des acides gras saturés ne sont pas différentes entre les deux groupes. Par contre, la quantité de n-3 et, par conséquent, la proportion (n-3)/(n-6) sont diminuées dans le groupe HFAT. La somme des acides gras saturés n'est pas modifiée par le régime contrairement à ses proportions. Cette fraction est plus riche en 18:0 mais est appauvrie en 14:0 et 16:0. Enfin, les omégas 18:1 n-9 ; 20:3 n-6 et 20:4 n-6 sont significativement augmentés dans le groupe HFAT. Force est de constater qu'un lien étroit existe entre les divers compartiments analysés. D'une manière générale, les variations observées au niveau plasmatique se retrouvent au niveau hépatique et au sein des mitochondries.

FA %	Plasma		liver		liver mitochondria	
	CHO	HFAT	CHO	HFAT	CHO	HFAT
14:0	0.84 ± 0.06	0.36 ± 0.01 *	0.49 ± 0.03	0.21 ± 0.01 *	0.27 ± 0.02	0.08 ± 0.00 *
16:1 n-9	0.33 ± 0.01	0.17 ± 0.00 *	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.00	0.05 ± 0.00 *
16:1 n-7	3.14 ± 0.52	0.63 ± 0.01 *	2.49 ± 0.28	0.45 ± 0.06 *	1.54 ± 0.20	0.14 ± 0.00 *
16:0	29.79 ± 1.46	21.47 ± 0.20 *	32.19 ± 0.81	23.69 ± 0.60 *	26.70 ± 0.59	14.40 ± 0.30 *
18:3 n-6	0.06 ± 0.00	0.04 ± 0.00 *	0.11 ± 0.01	0.20 ± 0.01 *	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00 *
18:3 n-3	0.81 ± 0.06	0.30 ± 0.02 *	0.16 ± 0.02	0.25 ± 0.01 *	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.00 *
18:2 n-6	24.96 ± 1.89	18.64 ± 0.41 *	15.11 ± 0.49	15.06 ± 0.27	15.10 ± 0.81	12.56 ± 0.35 *
18:1 n-9	12.60 ± 0.80	20.31 ± 0.60 *	7.14 ± 0.45	25.85 ± 2.08 *	4.87 ± 0.21	7.54 ± 0.43 *
18:1 n-7	3.37 ± 0.21	1.48 ± 0.02 *	4.28 ± 0.37	1.52 ± 0.07 *	3.74 ± 0.24	1.28 ± 0.02 *
18:0	6.76 ± 0.23	16.02 ± 0.49 *	15.94 ± 0.55	17.69 ± 1.49	19.45 ± 0.67	32.73 ± 0.36 *
20:5 n-3	0.70 ± 0.04	0.14 ± 0.01 *	0.50 ± 0.01	0.12 ± 0.00 *	0.50 ± 0.02	0.08 ± 0.01 *
20:4 n-6	11.30 ± 0.72	16.99 ± 0.66 *	15.21 ± 0.64	11.73 ± 0.78 *	19.49 ± 0.44	24.64 ± 0.33 *
20:3 n-6	0.65 ± 0.02	1.12 ± 0.04 *	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.00	1.66 ± 0.04	2.19 ± 0.05 *
20:3 n-3	0.43 ± 0.03	0.31 ± 0.01 *	0.27 ± 0.02	0.12 ± 0.01 *	0.82 ± 0.05	0.43 ± 0.02 *
20:1 n-9	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.81 ± 0.06	0.31 ± 0.01 *	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.00
20:1 n-7	0.44 ± 0.14	0.07 ± 0.01 *	0.11 ± 0.01	0.23 ± 0.01 *	0.10 ± 0.03	0.02 ± 0.00 *
20:0	0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.00 *	0.11 ± 0.02	0.05 ± 0.01 *	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00 *
22:6 n-3	1.98 ± 0.14	0.92 ± 0.05 *	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	4.18 ± 0.23	2.77 ± 0.15 *
22:5 n-3	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.00 *	3.86 ± 0.34	1.52 ± 0.10 *	0.23 ± 0.01	0.15 ± 0.01 *
22:5	0.46 ± 0.05	0.29 ± 0.02 *	0.72 ± 0.03	0.45 ± 0.03 *	0.71 ± 0.06	0.46 ± 0.04 *
22:4 n-6	0.21 ± 0.02	0.20 ± 0.01 *	0.20 ± 0.01	0.30 ± 0.02 *	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.00
Sum (n-3) %	4.05 ± 0.21	1.73 ± 0.05 *	5.43 ± 0.41	2.25 ± 0.10 *	5.86 ± 0.28	3.51 ± 0.15 *
Sum (n-6) %	37.19 ± 2.47	37.00 ± 0.65	30.912 ± 0.89	27.41 ± 0.70 *	36.49 ± 1.07	39.62 ± 0.35
(n-3)/(n-6)	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.00 *	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.00 *	0.16 ± 0.01	0.09 ± 0.00 *
Sum MUFA %	20.56 ± 1.31	22.97 ± 0.62	14.28 ± 0.93	28.26 ± 2.12 *	10.46 ± 0.34	9.14 ± 0.44
saturated fatty acid %	37.67 ± 1.41	37.96 ± 0.50	48.659 ± 0.99	41.62 ± 1.61 *	46.47 ± 0.61	47.25 ± 0.13
Total #	2426.9 ± 347.7	3201.9 ± 137.5	27.7 ± 1.3	78.0 ± 6.9 *	172.4 ± 8.4	191.5 ± 6.3

**Tableau 8 : Compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale de rats sous régimes standard ou hyper gras.**

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux acides gras totaux sous la forme de moyennes ± SEM avec n=6 pour le groupe témoin (CHO) et n=10 pour le groupe ayant suivi le régime hyper gras (HFAT). Le total est exprimé en ng/µl pour le plasma, en ng/µg pour le foie et en ng/mg de protéines mitochondriales pour les mitochondries. \*, significativement différent entre les deux groupes avec p<0.05.

Ces modifications drastiques du contenu et de la composition en acides gras en réponse au régime enrichi en graisses donné aux animaux témoignent de changements importants, non seulement sur le plan du métabolisme, mais également au niveau des structures subcellulaires. De fait, les acides gras analysés dans la fraction mitochondriale sont principalement des constituants des membranes mitochondriales. La composition membranaire en acides gras jouant un rôle essentiel dans le fonctionnement intracellulaire, plus particulièrement celui impliquant les mitochondries, nous avons décidé d'étudier les fonctions mitochondriales hépatiques à partir de mitochondries isolées, puis d'apprécier l'impact du régime sur les fonctions cellulaires à l'aide du modèle de périfusion d'hépatocytes.

### 1.3 Effets du régime sur le fonctionnement mitochondrial

Une des premières approches du fonctionnement mitochondrial consiste à étudier la respiration en utilisant différents substrats de la chaîne respiratoire.

#### 1.3.1 Le régime HFAT inhibe la respiration mitochondriale

		CHO	HFAT
Glut/Mal (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	121.0 ± 8.9	110.6 ± 13.5
	State 4	6.4 ± 0.9	12.6 ± 2.8 *
Succinate (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	165.8 ± 11.7	91.9 ± 8.1 *
	State 4	13.8 ± 2.0	15.4 ± 3.0
Glut/Mal + Succinate (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	159.4 ± 13.4	81.1 ± 9.3 *
	State 4	17.1 ± 1.9	18.4 ± 2.5
Palmitoyl-carnitine (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	92.8 ± 4.8	69.7 ± 10.0 *
	State 4	12.5 ± 1.2	13.7 ± 3.5
TMPD/Asc/DNP (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )		174.9 ± 9.1	112.2 ± 20.2 *

**Tableau 9 : Effets du régime HFAT sur la consommation d'oxygène de mitochondries isolées de foie.**

Les mitochondries sont isolées comme indiqué dans la partie procédures expérimentales. La consommation d'oxygène a été mesurée à 30°C en incubant les mitochondries à 1 mg/ml avec du glutamate/malate (Glut/Mal), du succinate, du Glut/Mal + succinate ou du palmitoyl-carnitine et en présence de 1 mM d'ADP (state 3) ou de 5 µg/ml d'oligomycine (state 4). L'activité de la cytochrome oxydase (Complexe IV) a été déterminée en condition découplée (DNP) et en utilisant un couple rédox (donneur et accepteur d'électrons) spécifique de ce complexe. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM avec n=10 rats pour chacun des deux groupes et exprimées en nano atom O.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>. \*, significativement différent entre les groupes témoins (CHO) et sous régime hyper gras (HFAT) avec p < 0.05.

Les mitochondries extraites à partir de foie de rats soumis à un régime enrichi en graisses ont une respiration plus faible en conditions phosphorylantes (état 3) et ceci quel que soit le substrat utilisé. L'inhibition est de 8.6% en glutamate/malate, de 44.6% en présence de succinate, de 49.1% en glutamate/malate/succinate et de 25% en palmitoyl-carnitine. Seule la différence obtenue en glutamate/malate n'est pas significative, sans doute du fait de la faible intensité respiratoire dans cette situation.

Par contre, la respiration à l'état 4, c'est-à-dire en présence d'oligomycine (inhibiteur de F0 de l'ATPsynthase), est plus importante dans le groupe HFAT seulement

en présence de glutamate/malate. Cette différence n'est pas significativement retrouvée avec les autres substrats même si cette tendance est confirmée (Tableau 9). Cet effet pourrait être attribué à l'effet découplant des acides gras résiduels éventuellement présents dans les préparations de mitochondries de foie de rat du groupe HFAT. Bien que le gras, plus important dans les foies de rats HFAT, soit soigneusement éliminé lors de la préparation des mitochondries et malgré l'utilisation d'albumine lors des analyses de respiration, cette hypothèse ne peut être totalement écartée. Cet effet serait uniquement observé en présence de glutamate/malate car l'intensité de la respiration à l'état 4 avec ce type de substrat est particulièrement faible. Avec les autres substrats utilisés, la respiration à l'état 4 étant plus élevée, cet effet découplant serait masqué.

La consommation d'oxygène mesurée en présence de TMPD/Ascorbate en condition découplée (DNP), permet de mesurer l'activité maximale de la cytochrome oxydase *in situ*. Celle-ci est réduite de 36% dans le groupe HFAT par rapport au groupe témoin. Cette observation permet d'affirmer que l'inhibition de la respiration mitochondriale est toute ou partie liée à l'inhibition du complexe IV. L'activité de cette enzyme étant intimement contrôlée par l'environnement lipidique (Varanasi et al. 2006), il est possible que les modifications de composition lipidique observées sur mitochondries isolées soient responsables de cette baisse d'activité.

	CHO	HFAT
CS ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	83.6 $\pm$ 3.1	70.4 $\pm$ 2.0*
Complex I ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	34.5 $\pm$ 2.6	27.9 $\pm$ 2.5
Complex II ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	45.5 $\pm$ 5.5	46.7 $\pm$ 2.1
Complex IV ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	85.5 $\pm$ 2.8	71.0 $\pm$ 4.5*
ATPase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g prot}^{-1}$ )	23.5 $\pm$ 1.6	26.9 $\pm$ 1.6
Cytochromes a+a <sub>3</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	106 $\pm$ 17	122 $\pm$ 10
Cytochrome b (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	263 $\pm$ 20	279 $\pm$ 14
Cytochrome c (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	105 $\pm$ 12	119 $\pm$ 7
Cytochromes c+c <sub>1</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	239 $\pm$ 18	264 $\pm$ 11

**Tableau 10 : Effets du régime HFAT sur les complexes de la chaîne respiratoire et l'activité citrate synthase.**

Les activités de la citrate synthase (CS), des complexes I, II et IV ont été évaluées à partir d'hépatocytes isolés éclatés par congélations successives et en présence de détergent. Les mesures d'activité ATPase et les études de la composition en cytochromes ont été effectuées sur mitochondries isolées. Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=5 rats pour chacun des deux groupes. \*, significativement différent entre les groupes témoins (CHO) et sous régime hyper gras (HFAT) avec  $p < 0.05$ .

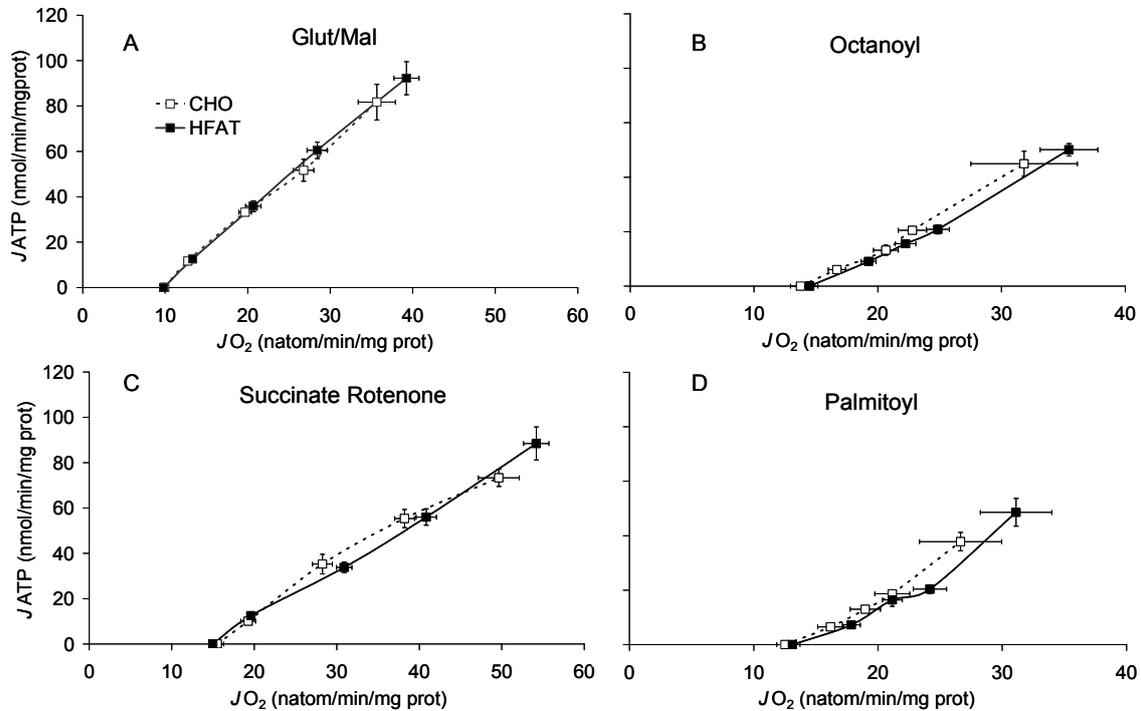
La mesure de l'activité isolée du complexe IV à partir de cytochrome c réduit, sur hépatocytes congelés et décongelés, et en présence de détergent (Triton X100), confirme l'inhibition d'activité de cette enzyme. Cette activité est de  $71 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$  dans les hépatocytes de rats sous régime hyper gras alors qu'elle atteint  $85.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$  dans les cellules de rats témoins. L'inhibition d'activité induite par ce régime est sans doute due à une diminution de la quantité de mitochondries. En effet, l'activité citrate synthase, témoin de la densité mitochondriale (Pon et al. 2007), mesurée sur hépatocytes, révèle une diminution de la quantité de mitochondries dans les cellules de ces animaux. Autrement dit, la diminution d'activité de la cytochrome oxydase (17%) correspond à une diminution d'activité citrate synthase de 16% dans ces conditions. De manière surprenante, la diminution du nombre de mitochondries dans les hépatocytes de rats HFAT, ne se répercute pas significativement sur les activités des autres complexes, en particulier sur l'activité du complexe II. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence d'une population de mitochondries particulières (à complexe II) qui serait sélectionnée par le régime.

Au final, l'inhibition de 36% du complexe IV, observée en respiration sur mitochondries isolées (donc purifiées), ne peut pas s'expliquer par la diminution du nombre de mitochondries, ni par l'inhibition de l'activité du complexe de manière isolée mais plutôt par son environnement moléculaire. Cette affirmation est confirmée par l'absence de variation de la quantité de cytochromes a+a3 spécifiques du complexe IV et mesurée sur mitochondries (Tableau 10). Nous pouvons donc conclure que le régime HFAT, en modifiant la composition membranaire mitochondriale, affecte l'activité de la cytochrome oxydase et, par conséquent, la respiration mitochondriale.

### **1.3.2 Le régime HFAT n'affecte pas le rendement de l'oxydation phosphorylante**

L'analyse du rendement de l'oxydation phosphorylante par rapport à l'oxygène permet d'analyser le fonctionnement des mitochondries à des niveaux de respiration d'intensités variables. La technique de l'hexokinase (décrite dans la partie procédures expérimentales) permet de stimuler la respiration par des concentrations sous saturantes d'ADP régénérées plus ou moins vite par des concentrations variables d'hexokinase à

partir d'ATP. Cette approche permet finalement d'apprécier le couplage entre le système oxydatif et le système phosphorylant.



**Figure 28 : Effets du régime hyper gras sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.**

La relation entre le flux respiratoire ( $J_{O_2}$ ) et de synthèse d'ATP ( $J_{ATP}$ ) a été déterminée sur mitochondries isolées de foie en suspension (2 mg/ml) dans un tampon de respiration et en présence de 5 mM glutamate/2.5 mM malate (A), 100  $\mu$ M octanoyl-carnitine (B), 5 mM succinate et 1.25  $\mu$ M rotenone (C), 100  $\mu$ M palmitoyl-carnitine (D). Les variations d'intensités des flux  $J_{O_2}$  et  $J_{ATP}$  ont été obtenues par additions de quantités croissantes d'hexokinase. Les valeurs sont présentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=10$  rats pour chaque groupe.

Quel que soit le substrat utilisé, le rendement ou l'efficacité de l'oxydation phosphorylante par rapport à l'oxygène n'est pas modifié par le régime (Figure 28). Les courbes de  $J(ATP)$  en fonction de  $J(O_2)$  se superposent entre les deux groupes. Ces résultats sont surprenants car, avec une telle modification de la composition lipidique membranaire des mitochondries, nous nous attendions à des modifications de rendement. Ce non-effet témoigne peut-être de l'importance du maintien de ce paramètre dans la fonction cellulaire.

Comme décrit dans la littérature, nous avons vérifié que le rendement par rapport à l'oxygène est plus élevé en présence de glutamate/malate, alors qu'il est plus faible en

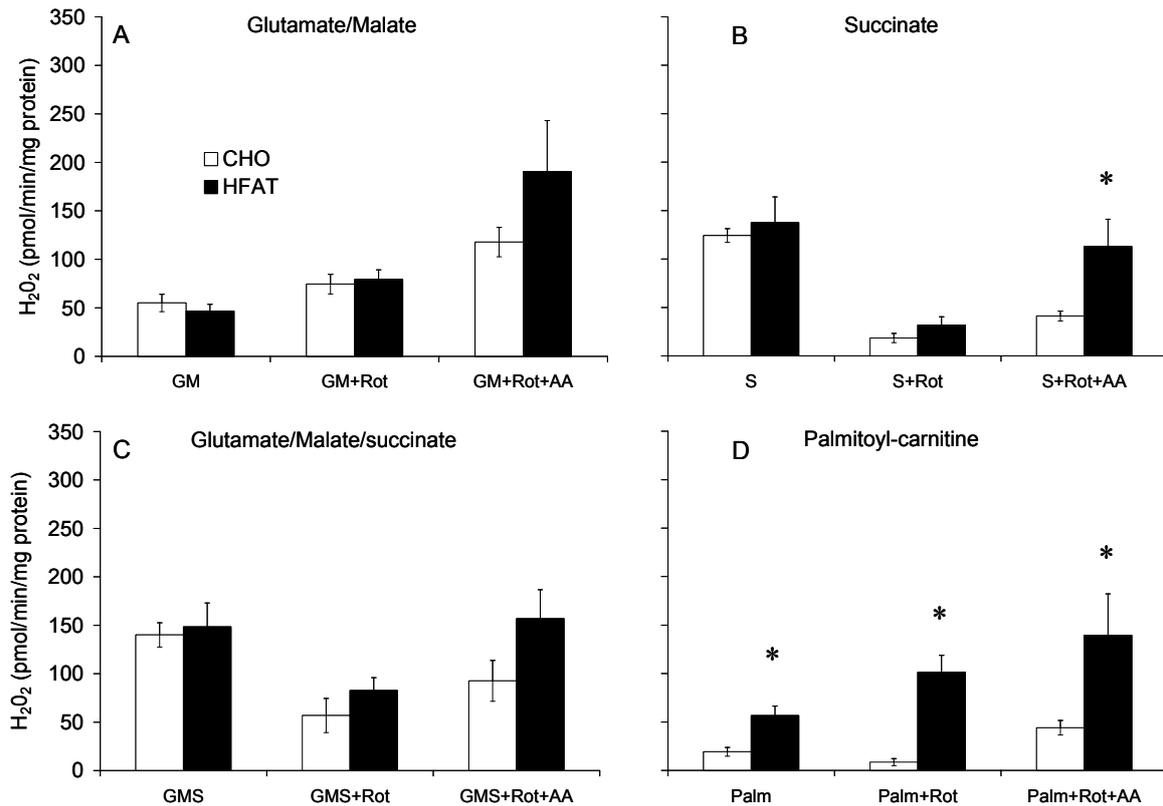
succinate ou avec des acides gras. Ceci provient du fait que la chaîne respiratoire fonctionne avec une pompe à protons de plus en glutamate/malate.

Si le rendement de l'oxydation phosphorylante n'est pas modifié, bien que la chaîne respiratoire soit inhibée au niveau de la cytochrome oxydase, alors des changements de production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) semblent inévitables. En effet, si aucun contrôle n'est effectué en amont de la chaîne respiratoire pour diminuer le flux d'électrons, alors l'état rédox des complexes et des quinones devrait être élevé par l'inhibition en fin de chaîne.

Finalement, l'inhibition de l'oxydation phosphorylante au niveau du complexe IV est susceptible d'avoir des effets sur la formation des ROS. Nous avons donc choisi d'analyser cette production radicalaire en l'estimant à partir des mesures de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur mitochondries isolées, car cette espèce réactive de l'oxygène est la plus stable et la plus facilement mesurable à l'aide de sondes fluorescentes.

### 1.3.3 Le régime HFAT augmente la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$

La mesure de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été effectuée par fluorimétrie, à l'aide de la sonde Amplex-red, sur mitochondries isolées en utilisant différents substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire afin de détecter les éventuels sites affectés (Batandier et al. 2002). Malheureusement, cette technique est seulement limitée à la mesure de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et non de l'ensemble des espèces radicalaires. Néanmoins, elle semble un bon compromis entre simplicité d'utilisation, coût engendré et spécificité de la mesure des ROS par rapport à d'autres sondes moins spécifiques ou aux techniques de RSE (résonances de spin électronique) très onéreuses (Davies et al. 1982).



**Figure 29 : Effets du régime hyper gras sur la production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Les mitochondries ont été incubées dans le tampon de respiration additionné de 6 UI de peroxydase de radis noir (horseradish peroxidase) et 1 µM d'Amplex Red. Les résultats ont été obtenus en présence de différents substrats : 5 mM glutamate/2.5 mM malate (A), 5 mM succinate (B), 5 mM glutamate/2.5 mM malate + 5 mM succinate (C), 100 µM palmitoyl-carnitine (D) et après addition de roténone (+Rot) et d'antimycine A (+Rot+AA). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes ± SEM avec n=10 rats pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les groupes hyper gras (HFAT) et témoins (CHO) (p < 0.05).

La production mitochondriale d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de glutamate/malate est augmentée par la présence de roténone et d'autant plus en présence d'antimycine A (inhibiteur du complexe III). De plus, cette augmentation est plus marquée avec les mitochondries extraites de foie de rats sous régime hyper gras. En présence de succinate, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est plus importante en condition basale, mais cette production est fortement inhibée par l'ajout de roténone. La production résiduelle en présence de roténone représente seulement 16% de la production initiale (Figure 29). Ceci indique et confirme clairement que la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de substrat du complexe II est majoritairement due à un flux inverse d'électrons vers le complexe I, phénomène décrit dans la littérature (Batandier, Guigas et al. 2006). L'ajout d'antimycine provoque une élévation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette augmentation est plus marquée dans le groupe HFAT et significativement différente de celle engendrée par les mitochondries de rats

témoins. La condition glutamate/malate/succinate est intermédiaire entre les situations glutamate/malate seuls et succinate seul. En présence d'acides gras, la production d' $H_2O_2$  est relativement faible dans chaque condition pour le groupe témoin. Par contre, celle-ci est fortement augmentée avec les mitochondries de rats sous régime hyper gras. Elle est 3 fois supérieure en substrats seuls, 10 fois plus élevée en présence de roténone et environ 3 fois plus importante après ajout d'Antimycine A. Ce profil semble indiquer que le trajet des électrons n'est pas le même lorsqu'ils proviennent d'acides gras et qu'il est fortement altéré par le régime HFAT. En effet, la compartimentation ou la canalisation (« channeling ») de la  $\beta$ -oxydation commence à être décrite dans la littérature : les acyl-Coa déshydrogénases délivreraient directement les électrons à l'ETF (Electron transfert protein) sans passer par le complexe I, alors que la 3-hydroxy-acyl-Coa déshydrogénase (enzyme à NAD) fournirait ses électrons directement au complexe I (Fukushima, Decker et al. 1989; Parker 2003).

L'augmentation de la production d' $H_2O_2$ , associée à l'inhibition de la chaîne respiratoire des animaux HFAT, semble indiquer qu'aucun contrôle n'est effectué en amont de la chaîne respiratoire afin de limiter cette production. Par conséquent, l'état rédox des complexes et des quinones devrait être modifié, ce que nous avons tenté de vérifier.

	CHO	HFAT
Q9 red (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	139.0 ± 4.4	116.7 ± 6.0*
Q10 red (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	31.9 ± 4.9	27.7 ± 3.3
Q9 ox. (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	11.6 ± 1.4	6.3 ± 2.1*
Q10 ox (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	ND	ND
TOT (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	182.6 ± 9.3	150.7 ± 9.6*
Q9 red/ox	12.8 ± 1.2	30.0 ± 6.0*
$\alpha$ -Tocopherol (nmol.gliver <sup>-1</sup> )	3.08 ± 0.11	22.99 ± 2.48*

**Tableau 11 : Effets du régime hyper gras sur le pool des quinones mitochondriales.**

Les concentrations en  $\alpha$ -Tocophérol, en quinones 9 et 10 (Q9 et Q10) réduites et oxydées ont été déterminées à partir de bouts de foie. Les résultats sont exprimés en nmol.g wet liver<sup>-1</sup> sous la forme de moyennes ± SEM avec n=5 pour le groupe Témoin (CHO) et n=10 pour le groupe sous régime hyper gras (HFAT). \*, significativement différent par rapport au groupe Témoin (p < 0.05).

Le tableau précédent indique que le *pool* des quinones est plus faible dans le groupe HFAT. Il est composé essentiellement de coenzyme Q9 chez le rat, ce qui est classiquement décrit dans la littérature (Lenaz, Fato et al. 2007; Ochoa et al. 2007). Les quantités de coenzymes Q9 réduites et oxydées sont diminuées toutes les deux. Néanmoins, le rapport Q9<sub>red/ox</sub> semble réduit par le régime (Tableau 11). Autrement dit, le régime hyper gras diminue l'ensemble des quinones et augmente son état de réduction. L'élévation de l'état de réduction des quinones est en accord avec l'inhibition de la respiration en fin de chaîne (complexe IV mesurée en TMPD/Asc) observée dans le groupe HFAT. Cette élévation, liée à l'inhibition du complexe IV, est encore accentuée par la diminution du *pool* des quinones.

D'une manière intéressante, la quantité d' $\alpha$ -Tocophérol est considérablement augmentée par le régime HFAT, sa concentration étant multipliée par 7. Cet effet très marqué de mise en place de défenses anti-oxydantes au niveau membranaire peut être la preuve d'une production massive d'espèces radicalaires par la mitochondrie. L'élévation de production de ROS observée sur les mitochondries est donc d'autant plus importante que ceux-ci sont piégés par l' $\alpha$ -Tocophérol. L'évaluation de la production de ROS que nous avons effectuée en mesurant la production d' $H_2O_2$  est donc largement sous estimée car la majorité doit être piégée par cet antioxydant. Si cette adaptation n'était pas présente, le niveau de production d' $H_2O_2$  serait nettement supérieur et aurait certainement des conséquences majeures et dramatiques sur le fonctionnement mitochondrial et *a fortiori* cellulaire.

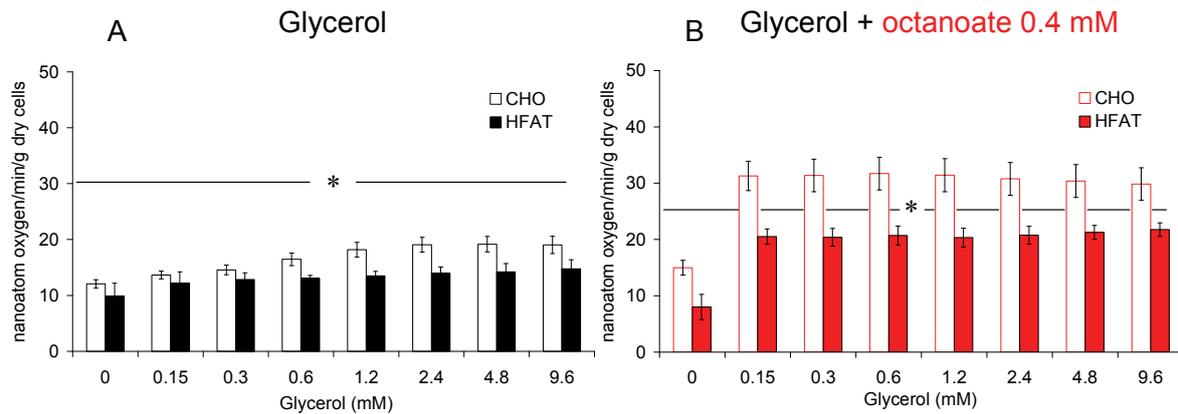
### ***1.4 Effets du régime sur le fonctionnement hépatocytaire***

Les résultats précédents mettent en évidence une modification importante du métabolisme mitochondrial induite par un régime hyper gras. Or, sachant que le cytosol contrôle étroitement le fonctionnement mitochondrial *in vivo via* les apports en métabolites mais aussi par des signaux cellulaires, il convient d'étudier le métabolisme cellulaire dans son ensemble. Pour cela, nous avons utilisé le modèle de périfusion d'hépatocytes qui permet d'intégrer la fonction cellulaire. Ce système nous permet également de travailler avec des concentrations sous saturantes en substrats générant des états stationnaires métaboliques (Cf. : Procédures expérimentales). Ces conditions particulières font la force de ce système qui fait souvent apparaître des contrôles différents des voies métaboliques.

#### **1.4.1 Le régime HFAT modifie les flux hépatiques**

Pour explorer ces routes métaboliques, nous avons utilisé du glycérol additionné ou non d'octanoate. Le glycérol est un substrat qui a la possibilité d'entrer soit dans la voie de la glycolyse, soit dans celle de la néoglucogénèse selon l'état énergétique cellulaire (Leverve et al. 1994). En effet, la première étape du métabolisme du glycérol est une phosphorylation par la glycérol kinase (GK). Cette étape est donc sous le contrôle du potentiel phosphate. La seconde est une déshydrogénation catalysée principalement par la glycérol 3-phosphate déshydrogénase cytosolique (G3PdHc). Cette étape est sous le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction cytosolique ou, plus précisément, sous celui de la disponibilité en NAD (Berry et al. 1973; Leverve et al. 1986). L'isoforme mitochondriale (G3PdHm) étant en quantité très réduite dans le foie, la proportion du flux catalysé par cette enzyme est assez faible. Le DHAP produit par ces enzymes peut alors s'orienter vers la voie glycolytique ou la voie gluconéogénique, à nouveau selon l'état énergétique cellulaire (Leverve, Fontaine et al. 1994). (Cf. : schéma : métabolisme du glycérol et de l'octanoate).

Dans un premier temps, nous avons mesuré la consommation d'oxygène par les hépatocytes à chaque état stationnaire métabolique.

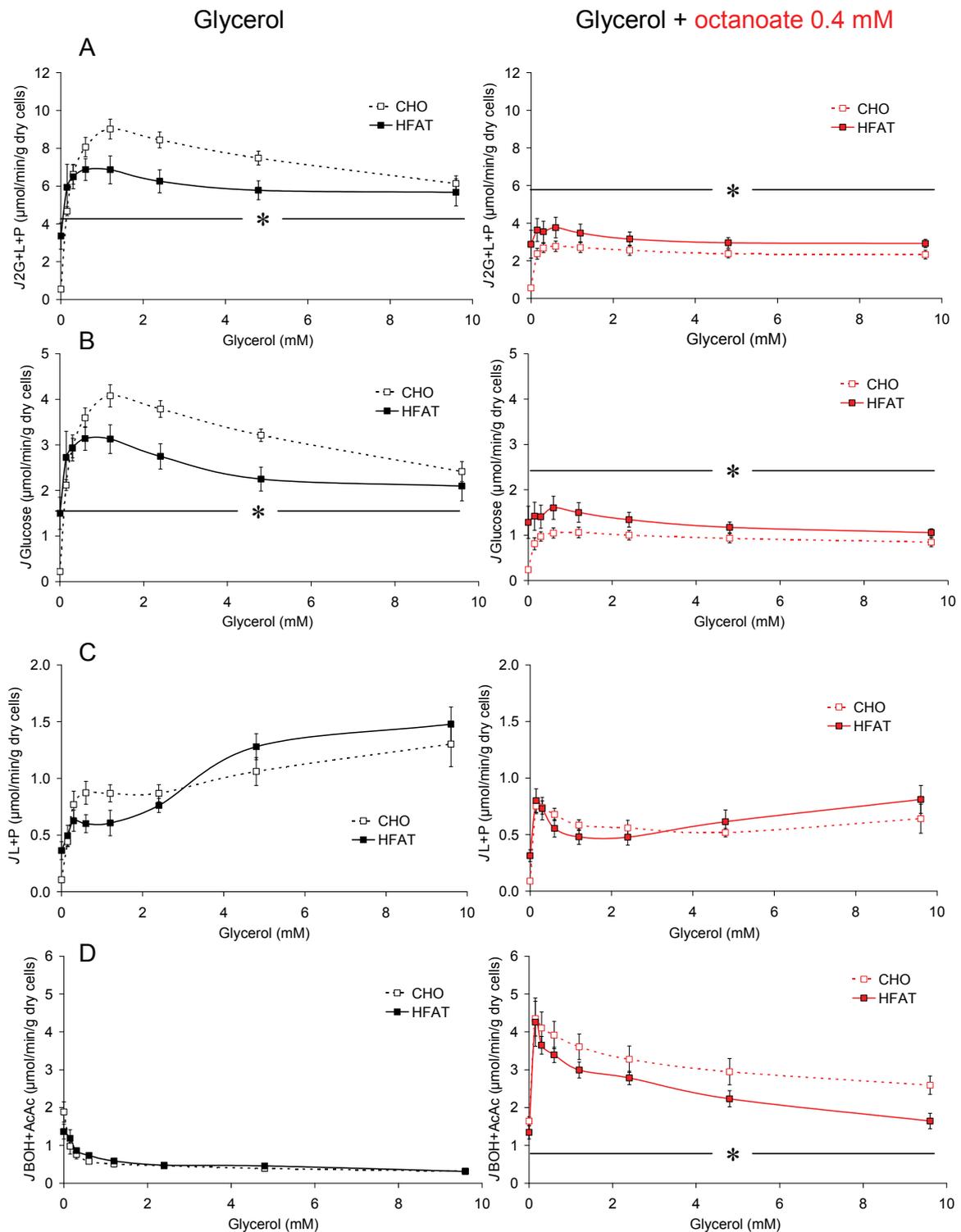


**Figure 30 : Effets du régime HFAT sur la respiration cellulaire.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats sous régime hyper gras (HFAT) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir (A)) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge (B)). Pour chaque état stationnaire, le flux d'oxygène ( $J_{O_2}$ ) a été mesuré en sortie des chambres dans le périfusat. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=5 pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec p<0.05.

La consommation d'oxygène par les hépatocytes s'élève en fonction de la disponibilité en glycérol jusqu'à une concentration de 1.2 mM. A partir de cette concentration, la respiration se stabilise à environ 18 nanoatomes d'oxygène par minute et par gramme de poids sec de cellules. En présence de 0.4 mM d'octanoate, la respiration atteint 30 nanoatomes d'oxygène par minute et par gramme de poids sec de cellules, quelle que soit la concentration de glycérol présente dans le liquide de périfusion. La présence d'acides gras dans le système provoque donc une augmentation importante de la respiration cellulaire, jamais atteinte avec le glycérol seul.

Avec des hépatocytes issus de rats ayant suivi le régime, les profils de respiration cellulaire sont identiques, mais avec des valeurs significativement plus faibles quel que soit l'état stationnaire (Figure 30). Le régime hyper gras inhibe donc la respiration cellulaire et ces données sont cohérentes avec celles obtenues sur mitochondries isolées. Quelles sont alors ses conséquences sur les flux métaboliques ?



**Figure 31 : Effets du régime hyper gras sur les flux métaboliques hépatiques.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats sous régime hyper gras (HFAT) à jeun depuis 24 heures ont été périéusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire,

les métabolites extracellulaires (Glucose, Lactate, Pyruvate) ont été mesurés dans le périfusât en sortie de chambre et permettent ainsi d'évaluer le flux total de glycérol métabolisé en équivalents à trois carbones par l'addition de 2 Glucose + 1 Lactate + 1 Pyruvate ( $J_{2G+L+P}$  (A)), le flux gluconéogénique ( $J_{\text{Glucose}}$  (B)), le flux glycolytique ( $J_{L+P}$  (C)) et le flux de corps cétoniques ( $J_{\text{BOH+AcAc}}$  (D)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

Lorsque nous observons le flux de glycérol métabolisé, estimé par la somme en équivalent 3 carbones ( $2G+L+P$ ) en fonction de la titration de ce substrat, nous constatons qu'il augmente dans un premier temps pour atteindre un maximum entre 0.6 et 1.2 mM, puis diminue progressivement malgré l'élévation de la concentration de glycérol infusé (Figure 31). En début de périfusion, l'augmentation de la concentration en glycérol, substrat réducteur, provoque une augmentation de son métabolisme qui est associé à une élévation du potentiel d'oxydoréduction. Ensuite, une accumulation de G3P est sans doute responsable de la diminution du métabolisme du glycérol et, par suite, du potentiel rédox. En effet, l'augmentation de la concentration de G3P et la diminution de la disponibilité en ATP conduisent tous deux à l'inhibition de la première étape du métabolisme du glycérol au niveau de la glycérol kinase (Robbins et al. 1991; Taleux et al. 2008). En parallèle, la diminution de la voie de la néoglucogénèse et le maintien de la glycolyse, seule voie génératrice d'ATP en absence d'acides gras, permet d'éviter une trop forte diminution du potentiel phosphate (Figure 31), ceci grâce à un contrôle des deux voies de façon réciproque. En présence d'octanoate, cette diminution du flux de glycérol n'est effectivement pas observée car l'ATP peut être généré par la  $\beta$ -oxydation.

Les résultats obtenus avec les hépatocytes de rats sous régime hyper gras depuis huit semaines, montrent une diminution du métabolisme du glycérol lorsqu'ils sont incubés en présence de glycérol seul. Cette diminution est liée à une néoglucogénèse plus faible. Néanmoins, nous pouvons noter que celle-ci est plus élevée dans le groupe HFAT en l'absence de glycérol exogène et pour de très faibles concentrations de ce substrat. Par contre, l'intensité de la glycolyse est identique entre les deux groupes d'animaux. La  $\beta$ -oxydation, estimée par la production de corps cétoniques ( $\text{BOH+AcAc}$ ), est très faible en présence de glycérol uniquement et ceci quelle que soit sa concentration. En effet, dans pareille situation, cette voie ne peut se faire qu'à partir de substrats endogènes et le régime hyper gras n'exerce aucune influence sur son intensité.

Afin de travailler dans un contexte plus physiologique, nous avons également utilisé de l'octanoate comme substrat lipidique. En effet, le métabolisme du glycérol est normalement associé à celui des acides gras puisque l'hydrolyse des triglycérides libère

des acides gras et du glycérol. Nous avons choisi l'octanoate car il s'agit d'un acide gras à chaîne courte qui a la possibilité d'être métabolisé sans le contrôle de la CPT-1 en diffusant à travers la membrane mitochondriale. En présence d'octanoate, acide gras à huit carbones, la  $\beta$ -oxydation peut fonctionner et fournir ainsi une grande quantité d'équivalents réduits. Cette condition expérimentale permet également de changer les contraintes rédox car le métabolisme des acides gras, et en particulier celui de l'octanoate, induit une forte réduction cellulaire. La réduction des compartiments cytosolique et mitochondrial lors du métabolisme des acides gras va augmenter la contrainte au niveau de la G3PdH cytosolique et donc diminuer le flux à travers la voie métabolique. Ceci a pour conséquence de diminuer la production de glucose à partir de glycérol (Berry MN 1973, Leverve XM 1986). Nos résultats confortent ces données de la littérature car, en présence de 0.4 mM d'octanoate, le métabolisme hépatique du glycérol est diminué de plus de 70% dans le groupe CHO et de 50% dans le groupe HFAT.

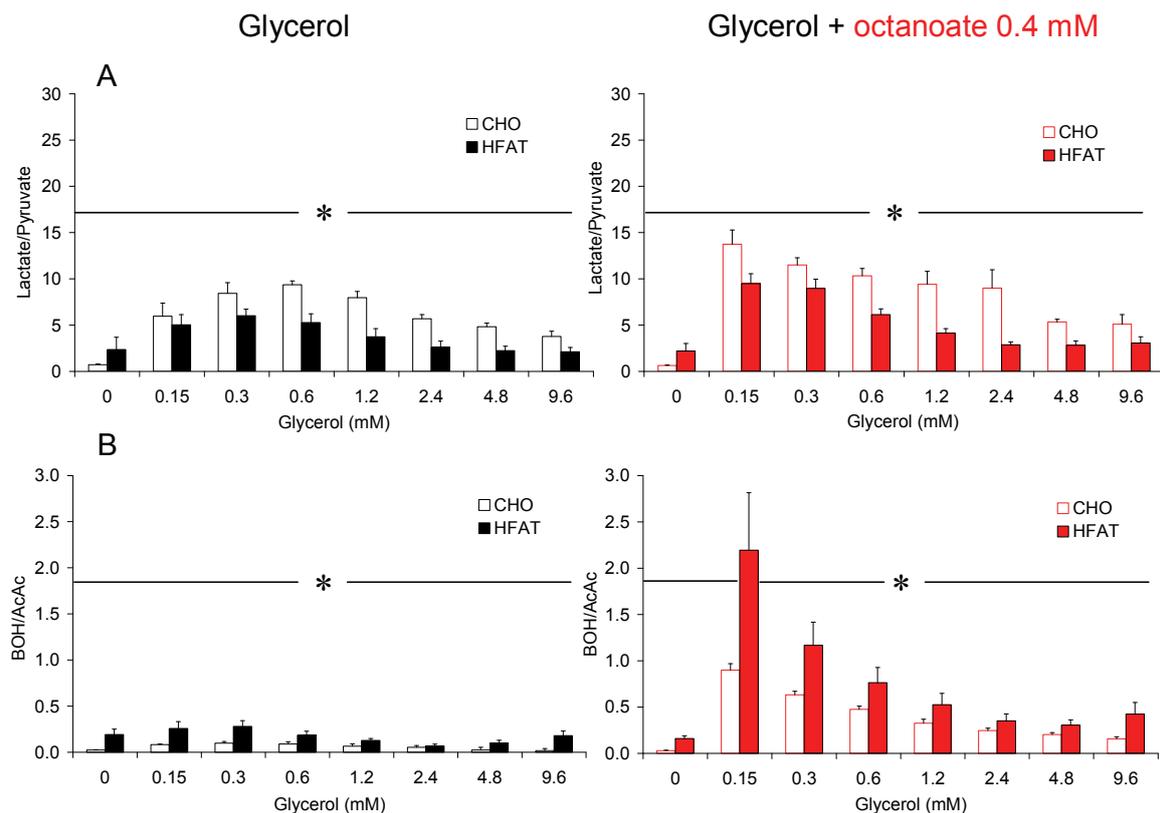
En présence d'octanoate, l'allure de la courbe est similaire à celle observée en glycérol seul : le métabolisme du glycérol augmente jusqu'à atteindre un maximum à partir de 0.6 mM de glycérol mais l'inhibition du métabolisme du glycérol aux concentrations élevées de glycérol (supérieures à 1.2 mM) est moins marquée (Figure 31 panel noir versus rouge). Cette observation est cohérente avec une moindre diminution d'ATP en présence d'octanoate et un rédox plus élevé (Taleux, Guigas et al. 2008). Notons que l'effet de l'octanoate sur le métabolisme du glycérol se porte préférentiellement sur la néoglucogénèse (inhibition de 75%) alors que la glycolyse est affectée d'environ 35% par l'octanoate (Figure 31) et ceci malgré une augmentation drastique du rapport lactate/pyruvate (Cf partie suivante).

Nos résultats obtenus avec les hépatocytes de rats sous régime HFAT montrent une augmentation du métabolisme du glycérol en présence d'octanoate alors qu'il était diminué sans acides gras. Cette élévation de l'utilisation du glycérol est principalement due à une augmentation significative de la néoglucogénèse, le flux glycolytique (estimé par la somme du lactate et du pyruvate produits) n'étant pas altéré par le régime. Par ailleurs, l'intensité de production des corps cétoniques est abaissée dans ce groupe suggérant ainsi une diminution de la  $\beta$ -oxydation.

### 1.4.2 Le régime HFAT affecte l'état rédox

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'état rédox est un paramètre essentiel dans le contrôle des voies métaboliques. Dans notre étude, nous avons évalué à la fois les potentiels rédox cytosolique et mitochondrial en déterminant respectivement les rapports lactate/pyruvate et BOH/AcAc. Comme attendu, les potentiels rédox cytosolique et mitochondrial sont nettement augmentés par la présence d'octanoate dans le liquide de perfusion (Figure 32 panel noir vs rouge).

En l'absence d'acide gras, le potentiel rédox cytosolique est augmenté au fur et à mesure de l'élévation de la concentration de glycérol puis, à partir de 1.2 mM, celui-ci s'abaisse. En présence d'octanoate, ce potentiel atteint immédiatement son maximum, puis décroît avec la titration de glycérol. Le potentiel rédox mitochondrial suit également ce profil.



**Figure 32 : Effets du régime hyper gras sur l'état rédox.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats sous régime hyper gras (HFAT) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Lactate, Pyruvate, BOH et AcAc) ont été mesurés dans le périfusat en sortie de chambre permettant ainsi d'évaluer le potentiel rédox cytosolique (Lactate/Pyruvate (A)) et le potentiel

rédox mitochondrial (BOH/AcAc (B)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

Nos mesures effectuées avec les hépatocytes de rats sous régime hyper gras montrent des profils d'évolution des rapports lactate/pyruvate et BOH/AcAc en fonction des concentrations de glycérol identiques à ceux des témoins. Par contre, les valeurs des rapports lactate/pyruvate et BOH/AcAc sont nettement différentes de celles des cellules témoins. En présence de glycérol, additionné ou non d'acides gras, le rapport L/P est significativement plus faible dans le groupe HFAT. En revanche, le rapport BOH/AcAc est plus élevé au niveau mitochondrial (Figure 32). Ces deux compartiments étant habituellement en équilibre, cette discordance peut paraître surprenante. En effet, la navette malate/aspartate, permet le transfert des équivalents réduits d'un compartiment vers l'autre. Cependant, cette navette est dépendante du potentiel transmembranaire mitochondrial. Ainsi, il semblerait que ce paramètre soit modifié par le régime. Ceci coïncide avec l'inhibition de respiration observée à la fois sur cellules et sur mitochondries isolées car celle-ci provoque une élévation du potentiel membranaire mitochondrial.

Au final, ces résultats montrent indirectement une inhibition de la phosphorylation oxydative (c'est-à-dire une diminution de la consommation d'oxygène associée à une élévation du potentiel rédox mitochondrial) aboutissant à une inhibition de la  $\beta$ -oxydation.

### 1.4.3 Le régime HFAT modifie le contrôle des voies métaboliques

En modifiant profondément le statut rédox cellulaire, le régime HFAT semble contrôler différemment les voies métaboliques. Ainsi, nous avons voulu savoir si d'autres paramètres susceptibles de réguler les flux, telles que la quantité d'enzymes, leur activité ou leur transcription pouvaient être modifiées par les huit semaines de régime. Nous avons donc réalisé une série de RT-PCR afin d'estimer l'expression de certains gènes clefs du métabolisme.

1.4.3.1 Le régime HFAT modifie la transcription de gènes clefs du métabolisme

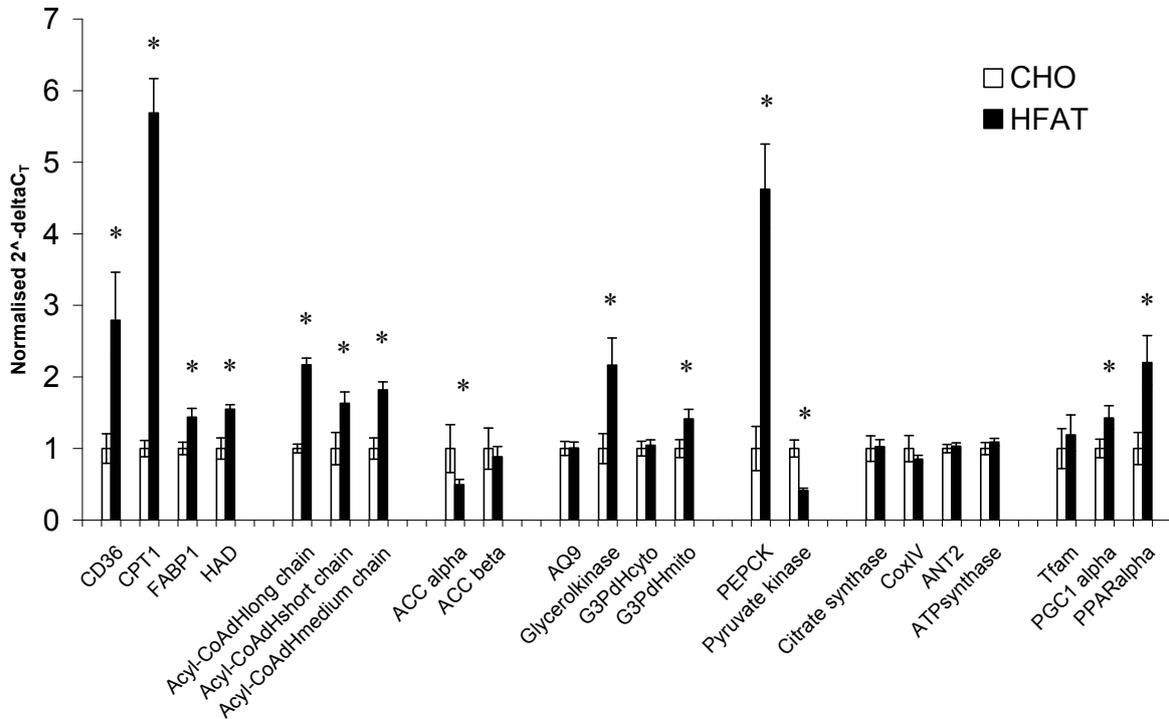


Figure 33 : Effets transcriptionnel du régime HFAT au niveau hépatique.

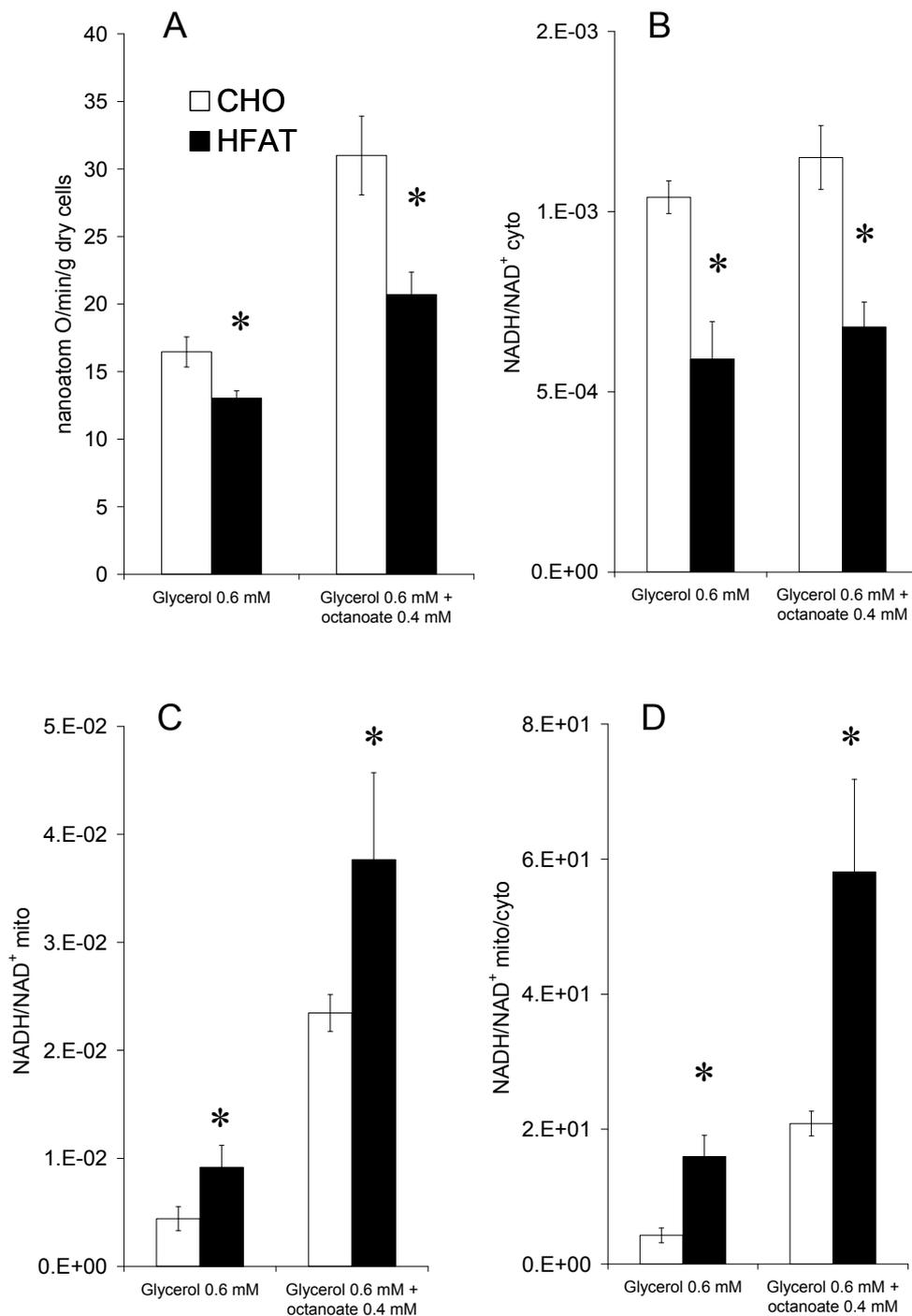
Les ARN totaux ont été extraits à partir de bouts de foie. Les ARNm ont été reverse-transcrits. Des PCR en temps réels ont été réalisées sur les ADNc en utilisant des amorces spécifiques de gènes de transporteurs, d'enzymes clefs du métabolisme, ou de facteur de transcription. Les quantités d'ARNms ont été normalisées par rapport à celle de l'ARNm du gène ubiquitaire stable de la phosphoprotéine P0 constitutive des ribosomes (Arbp1). La quantification a été réalisée par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les résultats sont exprimés en valeurs relatives à celles du groupe témoin sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour le groupe témoin (CHO) et  $n=10$  pour le groupe HFAT. \*, significativement différent entre les deux groupes,  $p<0.05$ .

La figure précédente montre les effets du régime HFAT sur la transcription de gènes du métabolisme des acides gras et du glycérol, mais également de la phosphorylation oxydative (Figure 33). Par rapport aux témoins, les foies de rat du groupe HFAT contiennent davantage d'ARNms de CD36, CPT1, FABP1, HAD et AcylCoA-déshydrogénases (« long, medium and short chain ») alors que celui de l'acylCoA carboxylase est diminué. Les ARNms de la glycérol kinase et de la G3PdH mitochondriale sont plus élevés dans le groupe HFAT. Ceux de la citrate synthase et de la cytochrome oxydase ne sont pas affectés par le régime, alors que ceux des facteurs de transcription de PGC1 alpha et PPAR alpha sont augmentés. Nous pouvons noter également que les ARNms de la PEPCK sont plus nombreux dans le groupe HFAT, alors que ceux de la pyruvate kinase sont réduits.

D'une façon surprenante et contrastante avec les conséquences thermodynamiques et cinétiques de l'effet du régime hyper gras sur les mitochondries et les cellules, certaines protéines de la  $\beta$ -oxydation semblent surtranscrites alors que d'autres, impliquées dans la phosphorylation oxydative, ne semblent pas affectées.

### 1.4.3.2 Le potentiel membranaire mitochondrial : point de contrôle du système

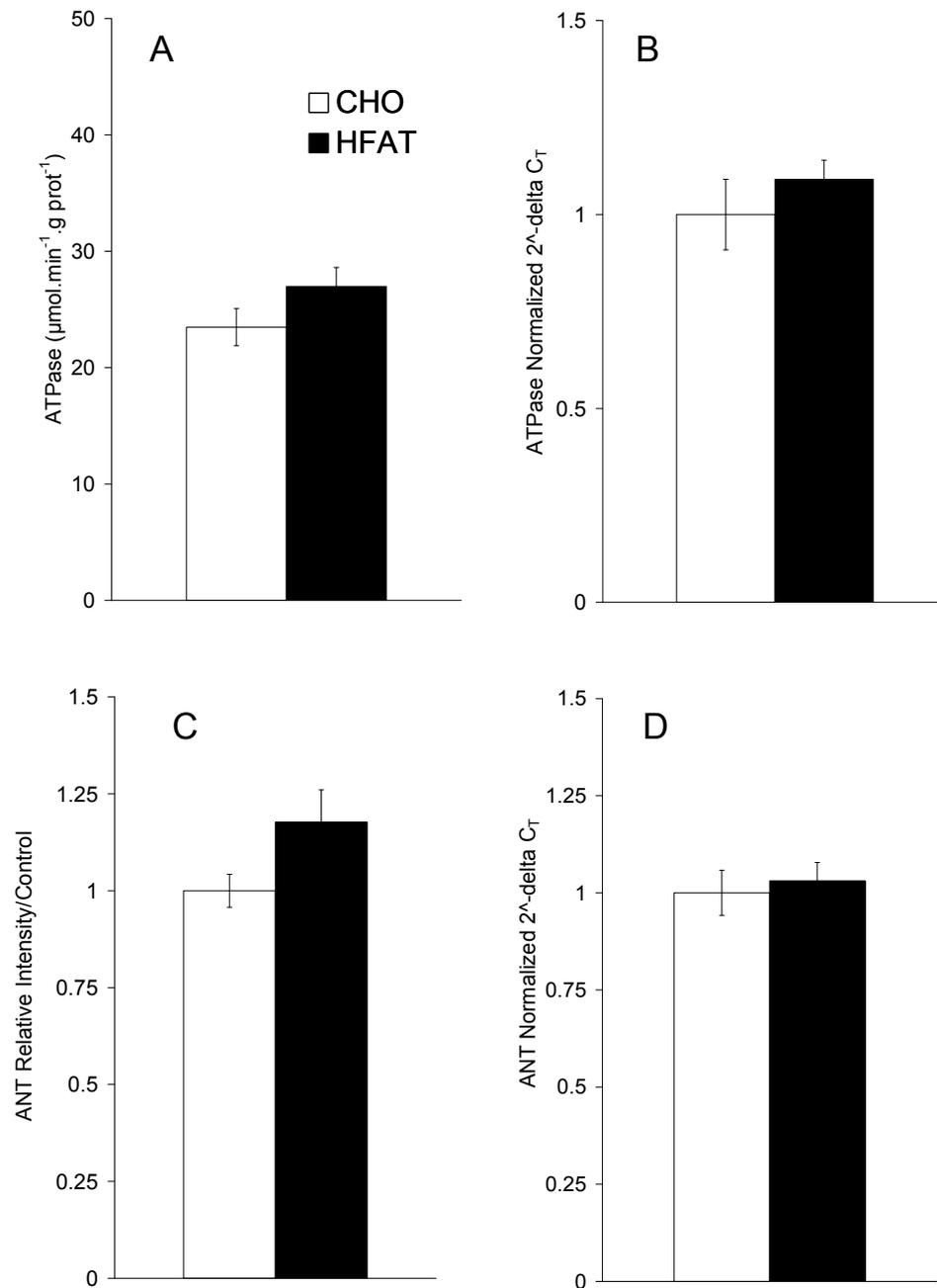
Le potentiel membranaire mitochondrial pourrait être l'acteur principal de l'effet du régime HFAT. En effet, un changement de potentiel déplacerait le contrôle des voies métaboliques. Pour mieux comprendre, voici une synthèse des paramètres importants qui contribueraient à changer les flux (Figure 34).



**Figure 34 : Effets du régime HFAT sur le potentiel membranaire mitochondrial.**

La consommation d'oxygène ( $JO_2$ ) a été mesurée en présence de 0.6 mM de glycérol ou de 0.6 mM de glycérol additionné de 0.4 mM d'octanoate (A). Les rapports NADH/NAD cytosolique (B) et mitochondrial (C) correspondants et le rapport des deux ( $NADH/NAD_{mit}/NADH/NAD_{cyt}$ ) (D) ont été calculés à partir des rapports lactate/pyruvate et hydroxybutyrate/acétoacétate respectivement comme décrits dans la partie procédures expérimentales. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM pour  $n=5$  dans chaque groupe. \*, significativement différent entre le groupe témoin (CHO) et le groupe sous régime hyper gras (HFAT).

Sur les hépatocytes intacts, la respiration est inhibée par le régime hyper gras (Figure 34 A) alors que la matrice mitochondriale est plus réduite (Figure 34 B). Ces résultats vont dans le sens d'une inhibition de la chaîne respiratoire ou du système phosphorylant. Contrairement à ce que nous pouvions attendre avec une telle inhibition de respiration, le compartiment cytosolique est plus oxydé dans les cellules de rats sous régime HFAT (Figure 34 C). Ceci devrait se traduire par une élévation du potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta p$ ). Puisque nous n'avons pas pu mesurer directement ce paramètre dans ces conditions d'expérimentation, c'est-à-dire en périfusion d'hépatocytes, nous l'avons estimé indirectement en calculant le rapport (NADH/NAD) mitochondrial/(NADH/NAD) cytosolique. En effet, le transport transmembranaire de glutamate qui dépend du potentiel ( $\Delta p$ ) est la force qui contrôle la navette malate-aspartate qui elle-même équilibre les niveaux rédox entre cytosol et matrice mitochondriale. Autrement dit, les statuts rédox mitochondrial et cytosolique sont en relation étroite avec le  $\Delta p$ . Ce rapport est significativement plus élevé dans le groupe HFAT par rapport au groupe témoin (CHO), indiquant clairement une élévation du potentiel transmembranaire mitochondrial (Figure 34). Ceci est totalement cohérent avec une inhibition de la chaîne respiratoire localisée dans sa partie terminale ou sur le système phosphorylant. Toutefois, l'activité isolée de l'ATPase et son contenu en ARNms, tout comme la quantité de protéine de l'ANT et ses ARNms ne sont pas affectés par le régime (Figure 35). De nouveau, un effet lié à l'environnement moléculaire (composition lipidique ou molécules signales) semble être le plus probable et constituer le facteur contrôlant.



**Figure 35 : Effets du régime hyper gras sur le système phosphorylant.**

L'activité ATPase (A) a été mesurée par spectrophotométrie. La quantité d'ANT a été évaluée par western-blot sur mitochondries isolées (ANT 2, B). Le contenu en ARNm des deux protéines a été évalué par RT-PCR. Les données sont relatives à celles obtenues avec le groupe témoin et exprimées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  rats pour le groupe témoin et  $n=10$  pour le groupe HFAT. \*, significativement différent entre les deux groupes avec ( $p < 0.05$ ).

### 1.5 Conclusion et Discussion

L'exposition à un régime hyper gras pendant huit semaines provoque des troubles du métabolisme énergétique dans les hépatocytes conduisant à une inhibition de la phosphorylation oxydative comme le démontrent l'inhibition de la respiration et la réduction de la matrice mitochondriale en présence de glycérol avec ou sans acides gras. Cette baisse de la respiration en présence d'octanoate contraste avec l'élévation de transcription d'enzymes clefs du métabolisme des acides gras (CD36, CPT-1, FABP-1 acylCoA déshydrogénase à chaînes longues, médiums et courtes). La diminution de respiration semblerait plutôt être liée à une inhibition de la respiration mitochondriale. Cette hypothèse est confirmée par les mesures de respiration à l'état 3 avec des mitochondries issues de rats HFAT en présence de substrats spécifiques des complexes I, II ou IV ou en fournissant directement la  $\beta$ -oxydation. Une diminution d'activité des complexes respiratoires est à exclure puisque les activités isolées des complexes I et II tout comme le contenu en cytochrome b (spécifique du complexe III) ne sont pas affectés par le régime. Par contre, le complexe IV nous semble être la cible. En effet, son activité mesurée avec du TMPD/Ascorbate en présence de DNP ou à l'aide de cytochrome c réduit est significativement plus faible dans le groupe HFAT (-35 et -17% respectivement). Néanmoins, l'absence de tout changement du contenu en cytochromes a+a3 et en ARNm de la COX-IV va dans le sens d'une quantité de protéines et d'ARNm inchangés par le régime. De ce fait, l'inhibition d'activité cytochrome oxydase, ne serait pas due à une baisse de la quantité de protéines mais plutôt à un effet fonctionnel. En effet, il a été précédemment démontré que l'activité de ce complexe est sensible à l'environnement lipidique et *a fortiori* à la composition lipidique membranaire mitochondriale (Varanasi, Mills et al. 2006). Cette hypothèse est renforcée par le fait que nos analyses ont mis en évidence des changements importants des profils lipidiques membranaires.

Le régime HFAT semble diminuer l'ensemble des quinones, ce qui affecte la fonction mitochondriale. La quantité de Q9, quinone majoritaire dans l'espèce animale utilisée, est significativement plus faible et dans un état plus réduit dans le groupe HFAT. Cet effet est en accord avec les résultats de production d' $H_2O_2$ . La production de cette espèce réactive de l'oxygène en présence de glutamate/malate est la même dans les deux groupes en condition basale ou en présence de roténone. Elle n'est également pas modifiée

par le régime lorsque cette mesure est réalisée avec du succinate en présence ou non de roténone. Par ailleurs, la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est clairement augmentée en acyl-carnitine dans chacune des conditions (basale, roténone, roténone plus antimycine). Cette observation, rappelle les phénomènes de compartimentation et de canalisation (« channeling ») de la  $\beta$ -oxydation. Des données de la littérature soutiennent cette hypothèse puisqu'il est maintenant admis que les acyl-CoA déshydrogénases fourniraient leurs électrons au *pool* des quinones *via* l'ETF (Electron Transfert Protein) en détournant ainsi le complexe I, alors que la 3-hydroxy-acyl-CoA déshydrogénase, NAD dépendante, les fournirait directement au complexe I. L'élévation de l'état d'oxydoréduction des quinones pourrait bien être responsable de l'augmentation de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation massive d' $\alpha$ -Tocophérol.

En définitive, l'augmentation des capacités métaboliques des acides gras (élévation de la transcription des enzymes clefs) associée à une diminution du *pool* des quinones et à une inhibition du complexe IV, doit logiquement se traduire par une augmentation de l'état rédox mitochondrial. C'est exactement ce que nous avons observé sur les hépatocytes de rats HFAT dont la matrice est plus réduite. Par contre, leur compartiment cytosolique est plus oxydé, provoquant ainsi une élévation du gradient entre ces deux compartiments. L'échange du pouvoir rédox se faisant par la navette malate/aspartate, dépendante du  $\Delta p$ , une augmentation du potentiel transmembranaire mitochondrial était à envisager. Ce postulat s'est confirmé par les mesures des rapports (NADH/NAD) mitochondrial/cytosolique. Un effet du régime en aval de la chaîne respiratoire est donc probable. Comme l'activité ATPasique, la quantité de protéine de l'ANT et le contenu en ARNms de ces protéines sont inchangés par le régime, l'effet provient sûrement de l'environnement moléculaire. Le profil lipidique mitochondrial étant fortement modifié par le régime, cette hypothèse est plausible d'autant plus que l'ANT est connue pour être fortement régulée par les lipides environnants (Mak et al. 1983).

Le régime hyper gras affecte donc le phénotype des animaux et leur métabolisme : leur prise alimentaire, initialement plus importante, se stabilise au niveau de celle des rats témoins, leur dépense énergétique est plus faible et leur QR indique une oxydation des acides gras plus importante *in vivo*. Cette dernière observation n'est pas en contradiction avec la diminution des capacités d'oxydation des lipides mesurée avec les hépatocytes ou sur mitochondries isolées car l'utilisation *in vivo* des lipides et leur oxydation dépend de la

concentration plasmatique en acides gras libres qui est plus élevée dans le groupe HFAT. D'une manière intéressante, nous avons mis en évidence dans ce modèle une élévation de la transcription de la PEPCK qui traduit une augmentation de son activité puisque le contrôle de cette enzyme est principalement transcriptionnel (Hanson et al. 1997). De plus, cette enzyme, qui constitue une étape clef dans la néoglucogenèse, est également capable de modifier le métabolisme des lipides (Hakimi et al. 2005; Hanson et al. 2008). Dans notre modèle, elle pourrait ainsi être responsable des contrôles métaboliques différents en présence ou non d'acides gras.

Etude 2 :  
Effets du traitement E008 sur le  
métabolisme hépatique

## 2 Effets du traitement E008 sur le métabolisme hépatique

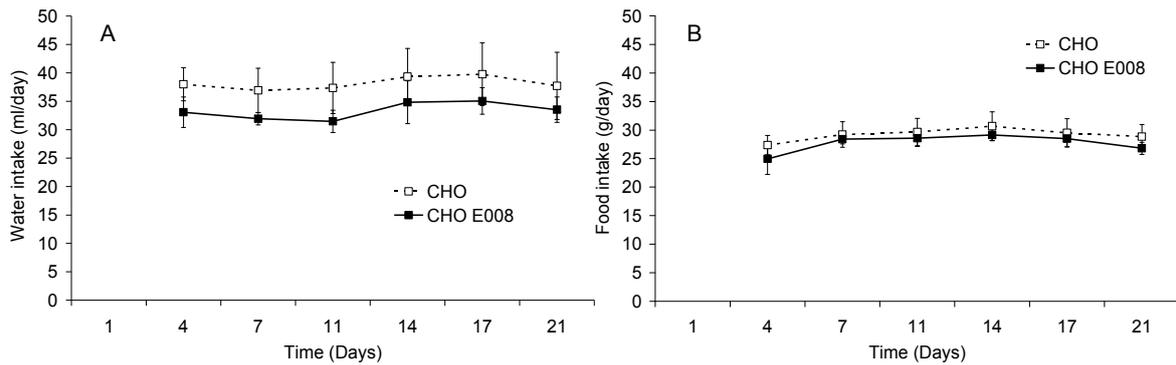
L'objectif de cette partie est d'étudier les effets d'un nouveau traitement antidiabétique sur le métabolisme hépatique. Nous avons commencé par tester le produit sur des rats témoins, c'est-à-dire sous régime standard (à base d'hydrates de carbonés : CHO) afin d'évaluer l'impact du traitement sur la santé des animaux, puis de détecter les premiers effets métaboliques. Dans un premier temps, nous avons suivi leur croissance et réalisé quelques études toxicologiques. Par la suite, nous nous sommes intéressés aux modifications éventuelles du métabolisme hépatique dues au traitement E008. Dans cet objectif, nous avons analysé le fonctionnement des mitochondries de foie, puis celui des hépatocytes d'animaux traités ou non par la substance médicamenteuse pendant 3 semaines. Nous avons ensuite réalisé des études similaires sur le modèle nutritionnel de rats sous régime hyper gras développé en première partie et fini par utiliser le traitement sur un modèle de rat diabétique de type II : le rat Goto-Kakizaki (Portha et al. 1991; Alvarez et al. 2000).

### 2.1 *Effets du traitement E008 sur des rats sous régime standard*

Avant même de tester le produit sur des animaux diabétiques, ou développant un syndrome métabolique, il convenait d'étudier ses effets sur des rats témoins (sous régime standard) afin d'écarter toute interaction du traitement avec la santé de nos animaux. Nous avons donc soumis une douzaine de rats à un traitement E008 dans l'eau de boisson, à une concentration de 1 mg/ml qui permet d'atteindre une dose thérapeutique d'environ 100 mg/kg/j.

#### **2.1.1 Effets du traitement sur la croissance, la dépense énergétique, la composition corporelle : toxicologie du produit**

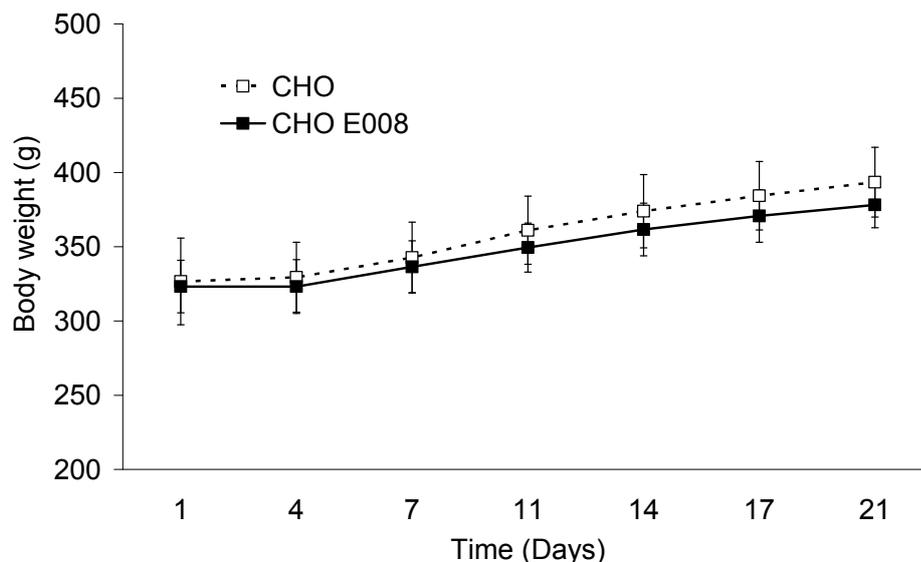
Pendant les trois semaines de traitement E008, les animaux ont été suivis et pesés régulièrement. Les prises alimentaires et hydriques ont également été mesurées deux fois par semaine.



**Figure 36 : Evolution des prises alimentaires et hydriques de rats témoins ou sous traitement E008.**

La quantité de nourriture (A) et le volume de boisson (B) ingérés par les animaux ont été évalués deux fois par semaine. Les résultats sont exprimés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM pour  $n=6$ .

Les animaux du groupe subissant le traitement E008 (CHO E008) ont une prise hydrique légèrement plus faible que celle des animaux témoins (CHO). Néanmoins, cette différence n'est pas significative entre les deux groupes et ne se répercute pas sur la prise alimentaire des animaux puisqu'elle reste similaire entre les deux groupes d'animaux durant les 3 semaines de traitement (Figure 36). Les rats absorbent environ 35 ml de boisson quotidiennement. Cette ingestion permet une prise de 350 mg/jour d'E008. Les animaux ayant une masse corporelle moyenne d'environ 350 g sur les 3 semaines, la dose thérapeutique réelle approche ainsi 100 mg/kg/j.



**Figure 37 : Evolution de la masse corporelle au cours de 3 semaines de traitement des rats Wistar.**

La masse corporelle des animaux a été mesurée deux fois par semaine pendant les 3 semaines de traitement E008 à 1 mg/ml dans l'eau de boisson. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  par groupe.

Le nouveau composé E008 n'a pas d'effet sur la masse corporelle des animaux puisque son évolution pendant 21 jours de traitement ne diffère pas entre les deux groupes (Figure 37).

Tout au long du traitement, les animaux de chacun des deux groupes ont une prise alimentaire identique. En moyenne, 29 g de nourriture sont ingérés quotidiennement. Comme le régime standard A04 a une valeur énergétique de 2900 kcal/kg, l'apport énergétique journalier atteint 84 kcal.

La dépense énergétique (EE), estimée à partir de la consommation en oxygène des animaux, est parfaitement identique entre les deux groupes CHO et CHO E008 (Figure 38 A).

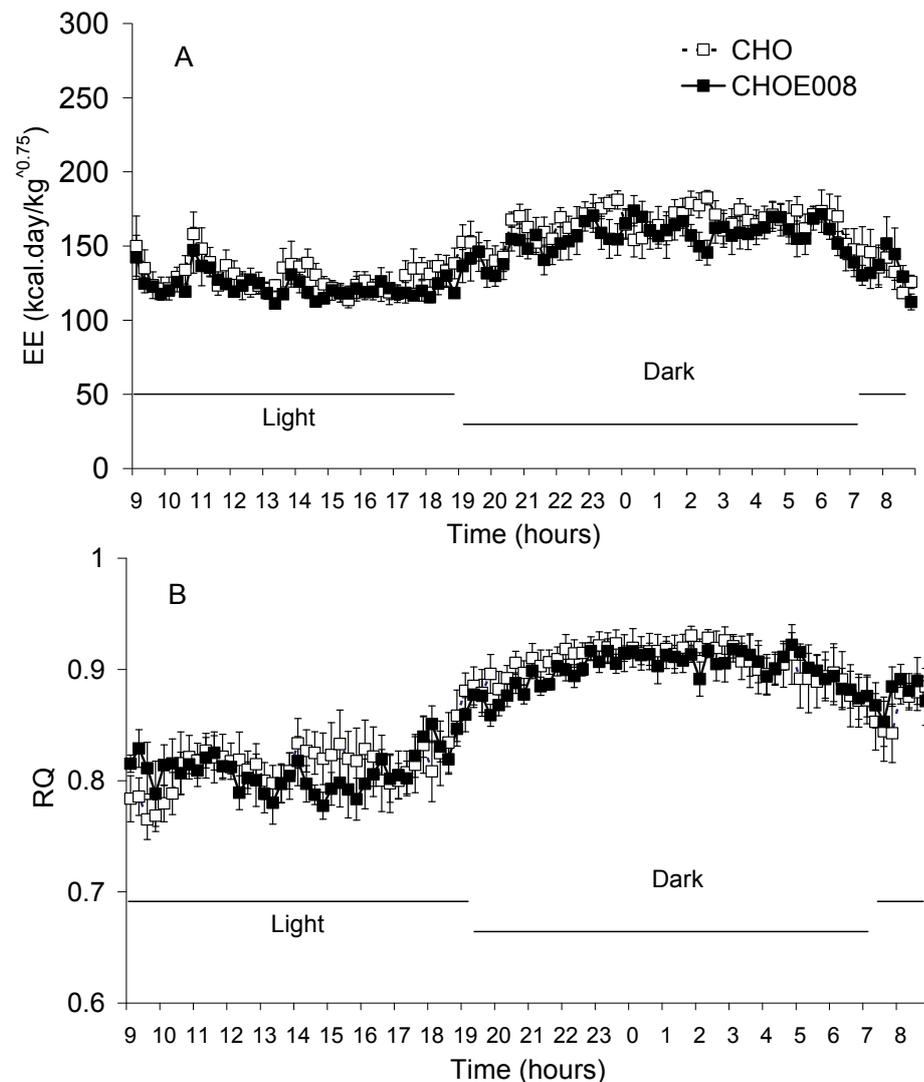


Figure 38 : Dépense énergétique et quotient respiratoire de rats témoins ou sous traitement E008.

Le 19<sup>ème</sup> jour du traitement, la dépense énergétique (A) et le quotient respiratoire (B) ont été mesurés sur 24 heures. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM pour  $n=6$ .

La dépense énergétique des animaux est variable selon le cycle de luminosité. En effet, dès l'absence de lumière, la dépense énergétique augmente rapidement d'environ 37% sur 2 heures. Elle se stabilise à ce niveau pendant toute la période nocturne (Figure 38 A). Ceci n'est pas surprenant puisque les rats sont des animaux nocturnes, très actifs la nuit et qui se nourrissent également durant cette période. L'absence de différence entre les deux groupes d'animaux traités ou non est un résultat cohérent avec le fait que les animaux ont une prise alimentaire et une masse corporelle identique entre les deux groupes. L'analyse du quotient respiratoire révèle un profil identique à celui de la dépense énergétique (Figure 38 B). Le jour, le quotient respiratoire est proche de 0.8. En début de journée, les animaux ont cessé de se nourrir depuis quelques heures au moins et sont donc en fin de période post prandiale ou en début de jeûne. Leur quotient respiratoire témoigne d'un métabolisme basé sur les différentes catégories d'aliments (lipides, glucides et protéines). Par contre, le quotient respiratoire des animaux est proche de 1 la nuit, lorsque les animaux sont en pleine ingestion alimentaire. Cette valeur est le reflet d'un métabolisme basé essentiellement sur les glucides pendant cette période. Ce phénomène va de paire avec la composition du régime à base d'hydrates de carbones. Selon leur état nutritionnel, les animaux sont capables d'alterner entre métabolisme des lipides ou des glucides. Ils ont donc une bonne flexibilité métabolique.

Le traitement E008 semble incapable de modifier le quotient respiratoire ou la dépense énergétique des animaux car nous avons obtenu exactement les mêmes tracés que précédemment avec des rats ayant suivi le traitement pendant 3 semaines (Figure 38). Autrement dit, le métabolisme global ne subit aucune modification majeure par le nouveau composé. Toutefois, ces mesures étant réalisées sur animaux, un changement de l'activité métabolique d'un ou de quelques organes ne peut pas être exclu car ne pourrait être détecté. Au terme des 3 semaines de traitement, nous avons pesé la masse de différents tissus adipeux et d'organes clefs afin de détecter d'éventuels changements de composition corporelle ou une toxicité du composé sur un organe particulier.

	CHO	CHO E008
Body (g)	405.2 ± 11.0	387.0 ± 6.5
Liver (g)	15.55 ± 0.76	14.93 ± 0.45
Liver proteins (mg/g)	194.5 ± 5.8	199.0 ± 6.3
Liver fatty acids (mg/g)	27.7 ± 1.3	28.6 ± 1.8
Heart (g)	1.02 ± 0.04	1.05 ± 0.02
Spleen (g)	0.86 ± 0.02	0.82 ± 0.04
Kidney (g)	1.12 ± 0.05	1.11 ± 0.02
Retroperitoneal adipose tissue (g)	3.29 ± 0.29	3.62 ± 0.21
Epididymal adipose tissue (g)	2.57 ± 0.19	2.42 ± 0.08
Mesenteric adipose tissue (g)	3.81 ± 0.33	3.79 ± 0.50
Subcutaneous adipose tissue (g)	2.47 ± 0.34	1.75 ± 0.27
Soleus muscle (mg)	137.30 ± 9.34	125.12 ± 3.62
Plantaris muscle (mg)	357.97 ± 9.26	344.13 ± 11.53
Brown adipose tissue (mg)	614.17 ± 60.87	595.53 ± 58.19
Pancreas (g)	1.64 ± 0.07	1.58 ± 0.07

**Tableau 12 : Effets du traitement E008 sur la masse corporelle et celle de différents organes clefs.**

Au terme de 3 semaines de traitement E008 à 1 mg/ml dans l'eau de boisson, la masse de différents tissus a été mesurée. Les contenus hépatiques en protéines et en acides gras ont été évalués sur un bout de foie prélevé lors de la dissection et sont exprimés par g de tissus frais. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM pour n=6.

Le traitement E008 de 3 semaines n'affecte pas la composition corporelle des animaux (Tableau 12).

Les masses des tissus adipeux mésentérique, épидидymal, rétro-péritonéal et sous-cutané ne sont pas modifiées par le traitement. Le composé antidiabétique ne provoque donc pas d'accumulation de graisse chez les animaux, ce qui n'est pas le cas de bon nombre d'antidiabétiques actuellement sur le marché (Hermansen et al. 2007). Le traitement préserve aussi la masse musculaire des animaux car les masses des muscles solaires et plantaires ne sont pas affectées. De plus, le E008 ne semble pas présenter une éventuelle toxicité car la masse de tous les organes prélevés reste la même en fin de

traitement (Tableau 12). Les études réalisées par Merck sur ce composé confirment pleinement ces données. « Le nouveau produit dispose en effet d'une *safety* parfaite avec une toxicité quasi nulle » (communication personnelle Merck). Sa dose létale 50 est très élevée, ce qui devrait permettre de proposer des doses thérapeutiques assez importantes sans aucun risque d'effets secondaires. Cette particularité représente un énorme avantage par rapport à d'autres composés antidiabétiques contemporains, telle la Metformine qui provoque parfois des hyper-lactatémies aux doses thérapeutiques usuelles et qui en font son principal point faible.

Suite au traitement E008, la masse du foie des animaux est identique entre les deux groupes. De plus, les dosages de protéines et d'acides gras réalisés sur les foies issus de rats traités (CHO E008) ont révélé des valeurs identiques à celles du groupe témoin (CHO) (Tableau 12). Le traitement ne provoque donc pas de stéatose, ni de fibrose hépatique. Ainsi, le nouveau composé ne présente pas de toxicité particulière sur cet organe. La masse du pancréas n'est pas davantage modifiée par le traitement. Le traitement anti-diabétique n'agit donc pas sur la prolifération cellulaire de cet organe. De plus, l'insulinémie des animaux n'est pas modifiée suite aux 3 semaines de traitement (Tableau 13). Nous pouvons ainsi exclure un effet du produit sur le métabolisme *via* ce facteur circulant important. Enfin, la glycémie à jeun des animaux (environ 8.5 mM) ne diffère pas entre les deux groupes (Tableau 13). Ce taux, relativement élevé pour cette espèce animale, est probablement lié au mode de prélèvement qui a été réalisé sur des rats anesthésiés au pentobarbital, un agent connu pour augmenter la glycémie.

	CHO	CHO E008
Glycémie (mM)	8.24 ± 0.45	8.87 ± 0.43
Insuline (ng/ml)	4.17 ± 0.9	4.56 ± 0.57

**Tableau 13 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des animaux.**

Le sang des animaux à jeun depuis 24 h a été prélevé dans l'aorte abdominale. Le glucose et l'insuline ont été dosés sur le plasma. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes ± SEM pour n=6 par groupe.

En conclusion, le traitement E008 de 3 semaines à 100 mg/kg/j n'affecte pas l'état de santé des animaux. Il ne perturbe pas leur métabolisme dans son ensemble puisque les paramètres macroscopiques (masse corporelle, quotient respiratoire, dépense énergétique) mais aussi circulants, ne sont pas modifiés. Néanmoins, un effet ciblé sur quelques organes pourrait exister et être masqué dans ces études macroscopiques. Nous nous sommes donc

intéressés au fonctionnement d'un organe clef du métabolisme qui est étroitement impliqué dans la pathologie du diabète : le foie. Dans un premier temps, nous avons étudié le fonctionnement mitochondrial des cellules hépatiques. En effet, ces organites, au rôle essentiel dans le métabolisme, sont atteints dans la pathologie diabétique et sont également la cible de quelques antidiabétiques actuels dont la Metformine. Cette cible thérapeutique a donc fait l'objet de toute notre attention.

### 2.1.2 Effets du traitement E008 sur le fonctionnement mitochondrial

L'examen du fonctionnement mitochondrial a débuté par l'analyse de la respiration mitochondriale en présence de substrats spécifiques des différents complexes de la chaîne respiratoire.

#### 2.1.2.1 Effets du traitement sur la respiration mitochondriale

		CHO	CHO E008
Glut/Mal (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	128.0 ± 7.9	135.5 ± 1.7
	State 4	8.7 ± 1.1	11.0 ± 0.3
Succinate (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	161.9 ± 8.6	177.7 ± 5.7
	State 4	19.3 ± 1.2	22.6 ± 0.9
Octanoyl-carnitine (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	99.2 ± 8.8	107.5 ± 3.5
	State 4	11.7 ± 0.7	12.9 ± 0.9
Palmitoyl-carnitine (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )	State 3	87.6 ± 11.2	90.1 ± 4.7
	State 4	12.5 ± 0.8	12.2 ± 0.8
TMPD/Asc/DNP (n.atom O.min <sup>-1</sup> .mg prot <sup>-1</sup> )		195.1 ± 19.8	204.9 ± 7.2

**Tableau 14 : Effets du traitement E008 sur la consommation d'oxygène des mitochondries isolées de foie.**

La consommation d'oxygène a été mesurée à 30°C en incubant les mitochondries isolées à 1 mg/ml avec du glutamate/malate (Glut/Mal), du succinate, de l'octanoyl-carnitine ou du palmitoyl-carnitine et en présence de 1 mM d'ADP (state 3) ou de 5 µg/mL d'oligomycine (state 4). L'activité de la cytochrome oxydase (Complexe IV) a été déterminée en condition découplée (DNP) et en utilisant un couple rédox (donneur et accepteur d'électrons) spécifique de ce complexe. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM avec n=10 rats pour chacun des deux groupes et exprimées en nano atom O.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>.

La consommation d'oxygène de mitochondries isolées en condition phosphorylante (état 3) est de 128 nano atom O.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup> en présence de glutamate/malate. Elle augmente de 20% en présence de succinate et de roténone mais elle est réduite de moitié en présence d'acides gras. La respiration maximale est obtenue en TMPD/Asc/DNP avec 195 nano atom O.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>. A l'état 4, l'intensité de la respiration représente environ 10% de la consommation d'oxygène mesurée en présence d'ADP à l'état 3 (Tableau 14).

Les intensités de respiration, mesurées tant à l'état 3 qu'à l'état 4, avec des mitochondries de foie de rats ayant suivi le traitement E008 ne sont pas différentes de celles obtenues avec les témoins. Le traitement E008 n'induit pas de changement de respiration mitochondriale hépatique. Néanmoins, ces mesures sont réalisées sur mitochondries isolées et ne tiennent notamment pas compte du nombre de mitochondries par cellule et de l'environnement intracellulaire qui pourrait influencer l'activité de la chaîne respiratoire au sein des cellules. De ce fait, on ne peut pas conclure sur l'effet du produit sur le fonctionnement mitochondrial *in vivo*.

Pour répondre en partie à cette question, nous avons mesuré l'activité citrate synthase (témoin de la densité mitochondriale (Pon et Schon 2007)) et les activités isolées de différents complexes à partir d'hépatocytes isolés et congelés.

	CHO	CHO E008
CS (μmol.min <sup>-1</sup> .g dry cells <sup>-1</sup> )	83.6 ± 3.1	97.5 ± 3.69*
Complex I (μmol.min <sup>-1</sup> .g dry cells <sup>-1</sup> )	34.5 ± 2.6	27.7 ± 2.9*
Complex II (μmol.min <sup>-1</sup> .g dry cells <sup>-1</sup> )	45.5 ± 5.5	37.7 ± 7.7
Complex IV (μmol.min <sup>-1</sup> .g dry cells <sup>-1</sup> )	85.5 ± 2.8	86.3 ± 4.4
ATPase (μmol.min <sup>-1</sup> .g prot <sup>-1</sup> )	23.5 ± 1.6	19.2 ± 0.74*
Cytochromes a+a <sub>3</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	106 ± 17	147 ± 14*
Cytochrome b (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	263 ± 20	275 ± 21
Cytochrome c (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	105 ± 12	133 ± 14
Cytochromes c+c <sub>1</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	239 ± 18	279 ± 19

**Tableau 15 : Effets du traitement E008 sur les complexes de la chaîne respiratoire et l'activité citrate synthase.**

Les activités citrate synthase (CS), des complexes I, II et IV ont été évaluées à partir d'hépatocytes isolés éclatés par congélations successives et en présence de détergent. Les mesures d'activités ATPase et les études de la composition en cytochromes ont été effectuées sur mitochondries isolées. Les données sont présentées sous forme de moyennes ± SEM avec n=5 rats pour chacun des deux groupes. \*, significativement différent entre les groupes témoins (CHO) et sous traitement E008 (CHO E008) avec p < 0.05.

L'activité citrate synthase mesurée sur hépatocytes de rats traités est plus importante de 16%. En considérant que cette activité enzymatique, mesurée sur cellules entières, est le témoin de la densité mitochondriale (Pon et Schon 2007), ces résultats indiquent que le traitement E008 augmente le nombre de mitochondries (Tableau 15). En effet, malgré le développement de nouvelles techniques d'estimation de la densité mitochondriale, comme le dosage de l'ADN mitochondrial, le dosage de l'activité citrate synthase reste un bon paramètre puisqu'une forte corrélation entre ces deux dosages a été montrée (Pon et Schon 2007). L'hypothèse d'une élévation de la densité mitochondriale est également confortée par une augmentation de la quantité de cytochromes a+a3. Le traitement E008 augmenterait l'activité du cycle de Krebs et une partie des composants de l'oxydation phosphorylante.

D'une manière surprenante, les activités des complexes I et II mesurées sur cellules sont plus faibles. Seule l'activité du complexe IV est identique à celle des témoins. L'activité ATPase, réduite dans les mitochondries de rats traités par E008, contribue également à diminuer leur capacité génératrice d'ATP. Les mitochondries sont donc plus nombreuses dans les cellules de rats traités mais avec des capacités d'oxydation et de synthèse d'ATP diminuées. Ceci peut-être le témoin d'une réponse adaptative induite par le traitement : le nombre de mitochondries serait augmenté pour compenser la diminution d'activité du complexe I et de l'ATPase.

Par contre, les respirations maximales obtenues sur mitochondries isolées ne semblent pas être limitées par la diminution de ces activités (Tableau 15).

Sur cellules entières, l'activité du complexe I est la plus affectée par le traitement (Tableau 15). Cependant, les mesures de respiration en glutamate/malate réalisées sur mitochondries fraîchement isolées n'ont pas révélé de différence entre les deux groupes (Tableau 14). Ainsi, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans leur environnement cellulaire est inhibée par le traitement. En effet, même si les mitochondries sont plus nombreuses au sein des cellules de rats traités, les activités des complexes I et II sont réduites. Un facteur d'inhibition, cytosolique ou accroché à la membrane mitochondriale externe, semble perdu lors de l'extraction des mitochondries car les mesures d'activités sur mitochondries isolées ne diffèrent pas.

L'analyse du contenu en cytochromes de mitochondries de rats traités a révélé une augmentation de la quantité de cytochromes a+a3 alors que les concentrations de

cytochromes b, c et c+c1 sont inchangées. Les mitochondries des animaux sous traitement E008 contiendraient ainsi davantage de complexe IV afin de tenter de compenser l'inhibition de respiration induite par le facteur cytosolique. Cependant, il faut noter que le changement de contenu en cytochromes a+a3 de 40%, dans les mitochondries de rats traités, ne s'accompagne pas de variation d'activité de la cytochrome oxydase mesurée en TMPD/Asc/DNP. Finalement, ces données confortent l'hypothèse d'un effet inhibiteur lié à l'environnement moléculaire (lipidique) ou *via* un facteur cytosolique mais qui serait maintenu sur cette enzyme après l'extraction des mitochondries. Puisque le contrôle de la respiration mitochondriale s'exerce principalement par l'activité de la cytochrome oxydase et celle du transporteur des nucléotides adényliques (Erecinska et al. 1982; Brown 1992), la diminution d'activité du complexe I n'a pas de conséquence sur le flux respiratoire lorsque les mitochondries sont fournies en glutamate/malate. Dans l'étude précédente, nous avons déjà montré que la composition lipidique membranaire mitochondriale pouvait modifier le fonctionnement de ces organites et particulièrement l'activité de la cytochrome-oxydase. Ainsi, nous avons analysé les compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale d'animaux témoins ou traités par le nouveau composé afin d'estimer l'impact du traitement sur ce paramètre majeur dans la fonction mitochondriale.

2.1.2.2 Effets du traitement E008 sur les compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale.

FA %	Plasma		Liver		liver mitochondria	
	CHO	CHO E008	CHO	CHO E008	CHO	CHO E008
14:0	0.84 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.49 ± 0.03	0.43 ± 0.02 *	0.27 ± 0.02	0.31 ± 0.02 *
16:1 n-9	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
16:1 n-7	3.14 ± 0.52	4.2 ± 0.55 *	2.49 ± 0.28	2.42 ± 0.23	1.54 ± 0.20	1.89 ± 0.25
16:0	29.79 ± 1.46	30.92 ± 1.19	32.19 ± 0.81	32.25 ± 0.99	26.70 ± 0.59	26.64 ± 1.04
18:3 n-6	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00
18:3 n-3	0.81 ± 0.06	0.813 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
18:2 n-6	24.96 ± 1.89	22.72 ± 0.96	15.11 ± 0.49	15.44 ± 0.58	15.10 ± 0.81	13.89 ± 0.59
18:1 n-9	12.60 ± 0.80	14.75 ± 0.54	7.14 ± 0.45	8.10 ± 0.46	4.87 ± 0.21	5.05 ± 0.13
18:1 n-7	3.37 ± 0.21	4.66 ± 0.35 *	4.28 ± 0.37	3.95 ± 0.32	3.74 ± 0.24	5.11 ± 0.47 *
18:0	6.76 ± 0.23	5.58 ± 0.38	15.94 ± 0.55	16.07 ± 0.79	19.45 ± 0.67	17.99 ± 0.95
20:5 n-3	0.70 ± 0.04	0.52 ± 0.04 *	0.50 ± 0.01	0.51 ± 0.03	0.50 ± 0.02	0.39 ± 0.03 *
20:4 n-6	11.30 ± 0.72	9.64 ± 0.88	15.21 ± 0.64	14.03 ± 0.74	19.49 ± 0.44	19.21 ± 0.40
20:3 n-6	0.65 ± 0.02	0.60 ± 0.07	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01	1.66 ± 0.04	1.71 ± 0.08
20:3 n-3	0.43 ± 0.03	0.36 ± 0.02 *	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.82 ± 0.05	0.77 ± 0.09
20:1 n-9	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.81 ± 0.06	0.747 ± 0.03	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
20:1 n-7	0.44 ± 0.14	0.21 ± 0.04 *	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.01
20:0	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01 *	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00 *
22:6 n-3	1.98 ± 0.14	2.13 ± 0.14	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	4.18 ± 0.23	5.31 ± 0.50 *
22:5 n-3	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	3.86 ± 0.34	4.07 ± 0.28	0.23 ± 0.01	0.33 ± 0.04 *
22:5	0.46 ± 0.05	0.50 ± 0.07	0.72 ± 0.03	0.75 ± 0.06	0.71 ± 0.06	0.71 ± 0.05
22:4 n-6	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.02
Sum (n-3) %	4.05 ± 0.21	3.95 ± 0.22	5.43 ± 0.41	5.59 ± 0.30	5.86 ± 0.28	6.91 ± 0.53
Sum (n-6) %	37.19 ± 2.47	33.24 ± 1.49	30.912 ± 0.89	30.02 ± 0.96	36.49 ± 1.07	35.04 ± 0.93
(n-3)/(n-6)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02 *
Sum MUFA %	20.56 ± 1.31	24.62 ± 1.09 *	14.28 ± 0.93	14.84 ± 0.68	10.46 ± 0.34	12.34 ± 0.69 *
saturated fatty acid %	37.67 ± 1.41	37.63 ± 1.26	48.65 ± 0.99	48.79 ± 1.22	46.47 ± 0.61	44.98 ± 0.76 *
Total #	2426.9 ± 347.7	3850.6 ± 758.1	27.7 ± 1.3	28.64 ± 1.8	172.4 ± 8.4	188.0 ± 15.3

Tableau 16 : Compositions lipidiques plasmatique, hépatique et mitochondriale de rats sous traitement E008.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux acides gras totaux sous la forme de moyennes ± SEM avec n=6 pour le groupe témoin (CHO) et n=6 pour le groupe ayant suivi le traitement E008 (CHO E008). Le total est exprimé en ng/μL pour le plasma, en ng/μg pour le foie et en ng/mg de protéines mitochondriales pour les mitochondries. \*, significativement différent entre les deux groupes avec p<0.05.

Les acides gras totaux plasmatiques, hépatiques et mitochondriaux sont identiques entre les deux groupes (Tableau 16). Par contre, la somme des acides gras mono insaturés est augmentée par le traitement dans chaque compartiment. Au niveau hépatique dans son ensemble, seule la proportion d'acide myristique (14:0) est diminuée par le traitement. Dans le plasma comme dans les membranes mitochondriales, le profil lipidique est finalement très peu modifié. Les proportions en acides gras 20:0 et 20:5 n-3 sont les seules à être affectées par le traitement. Leur proportion est diminuée de 20% environ. La plus faible quantité d'acides gras insaturés 20:5 n-3 ne se répercute pas pour autant sur la somme des acides gras insaturés, ni sur le rapport des acides gras saturés/insaturés

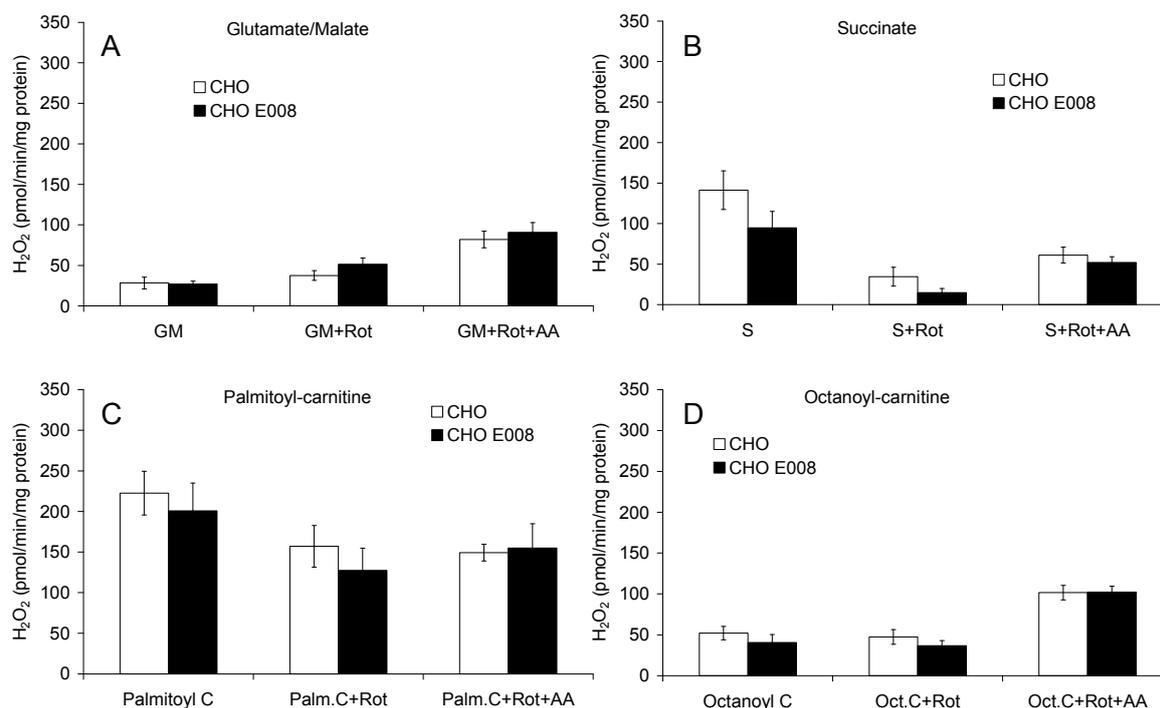
puisqu'il est augmenté par le traitement. En effet, cet acide gras ne représente que 0.5% des acides gras totaux, soit une très faible quantité. Au final, seulement très peu de variations des profils lipidiques dues au traitement sont observables. Il est néanmoins concevable que cette subtile variation de proportion d'acides gras à 20 carbones soit un élément majeur de régulation de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

L'élévation de la quantité d'acide myristique dans les membranes mitochondriales, alors que sa proportion dans le foie a plutôt tendance à être diminuée, révèle sans doute un enrichissement purement lié au traitement E008. Cet acide gras particulier pourrait être responsable de modifications de fonctionnement des mitochondries. En effet, il est depuis peu reconnu que, dans l'hépatocyte, l'acide myristique a la capacité de se lier de façon covalente à plusieurs protéines. Une équipe de Rennes a déjà montré une myristoylation N-terminale (liaison amide) de la sous unité  $\alpha$  d'une protéine G hétérotrimérique ainsi qu'une acylation latérale (liaison thioester ou ester) de protéines du cytosquelette (actine) et de petites protéines G. L'acide myristique joue donc un rôle essentiel dans l'activation de certaines protéines et dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires (Rioux et al. 2007). Il a également été montré que l'acide myristique a la capacité d'activer la  $\Delta 6$ -désaturase dans des cultures d'hépatocytes. Ceci favorise la conversion de l'acide  $\alpha$ -linoléique en acide docosahéxaénoïque (DHA, 22:6 n-3). Nos analyses montrent que sa proportion est augmentée dans les membranes mitochondriales ce qui conforte ces données et notre hypothèse. Connaissant les propriétés de cet oméga 3, nous pouvons envisager un effet du médicament *via* le changement de proportion de cet acide gras. En effet, cet acide gras a la capacité de changer la fluidité membranaire mais aussi d'agir sur des facteurs de transcription comme les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors).

Au regard de ces hypothèses, nous nous sommes dès lors intéressés à la production radicalaire et au rendement de l'oxydation phosphorylante qui pourraient être modifiés par une altération de la fluidité membranaire induite par le traitement.

### 2.1.2.3 Le traitement E008 inhibe la production mitochondriale d' $H_2O_2$

La production d' $H_2O_2$  a été évaluée sur mitochondries isolées en utilisant différents substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire afin de cibler le site des effets éventuellement observés.



**Figure 39 : Effets du traitement E008 sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

Les mitochondries isolées ont été incubées dans le tampon de respiration additionné de 6 UI de peroxydase de radis noir (horseradish peroxidase) et 1  $\mu$ M d'Amplex Red. Les résultats ont été obtenus en présence de différents substrats : 5 mM glutamate/2.5 mM malate (A), 5 mM succinate (B), 100  $\mu$ M palmitoyl-carnitine (C), 100  $\mu$ M octanoyl-carnitine (D) et après addition de roténone (+Rot) puis d'antimycine A (+Rot+AA). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 rats pour chaque groupe.

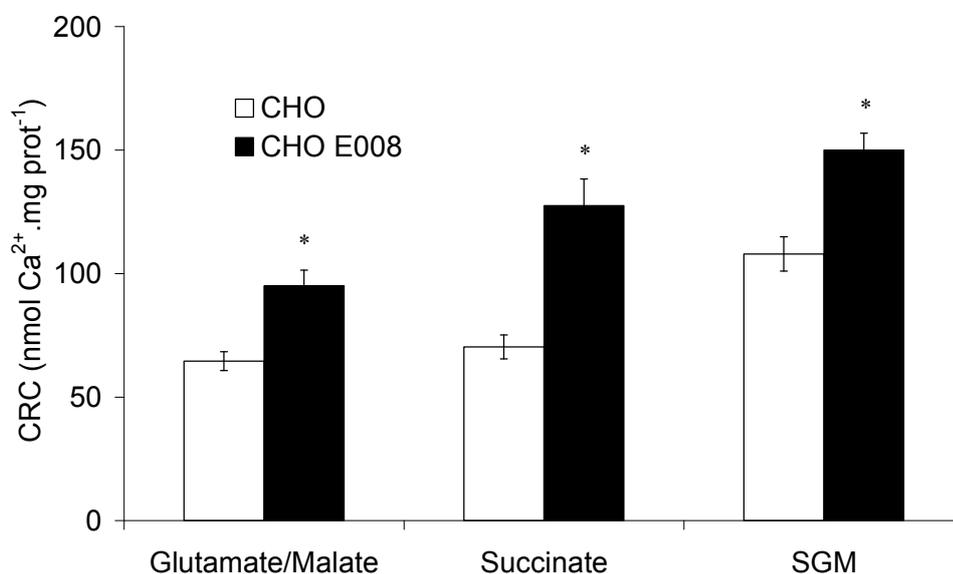
En présence de glutamate/malate ou d'octanoyl-carnitine, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est faible (Figure 39 A et D). Elle est environ quatre fois plus importante en succinate et cinq fois plus importante en palmitoyl-carnitine (Figure 39 B et C). En glutamate/malate, la production est très légèrement augmentée par la présence de roténone mais elle triple en présence d'antimycine A (AA). Conformément aux données de la littérature, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lieu principalement au niveau du complexe III avec ce type de substrats. En revanche, lors de l'oxydation du succinate, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est fortement inhibée par la présence de roténone et s'élève à nouveau en présence d'AA et de roténone. Dans cette condition, la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est due à un flux inverse d'électrons vers le complexe I qui est diminué en présence de roténone (Batandier, Guigas et al. 2006). Avec le palmitoyl-carnitine, la production d'espèces réactives est diminuée par l'inhibiteur du complexe I et inchangée par l'AA d'où une génération principalement liée à l'activité du complexe I.

Lors de l'oxydation de l'octanoyl-carnitine, la production est inchangée par la roténone mais est élevée par la présence d'inhibiteur du complexe III. Ceci traduit une production radicalaire au niveau de l'ubiquinol-cytochrome c réductase.

La production d'espèces réactives par les mitochondries isolées à partir de foies de rats traités avec E008 n'est pas affectée lorsque celles-ci sont énergisées par du glutamate/malate. Par contre, cette production est nettement diminuée en présence de succinate. L'effet persiste en présence de roténone alors qu'il disparaît avec l'antimycine A (Figure 39). Le composé E008 a ainsi la capacité de diminuer la production de radicaux libres, non pas en inhibant le flux inverse d'électrons, mais plutôt en diminuant l'intensité totale du flux d'électrons. Nous pouvons également suggérer un effet additif à celui de la roténone, mais ceci impliquerait une diminution de la respiration et de la production d' $H_2O_2$  en glutamate/malate, ce qui n'est pas observé. Si tel n'est pas le cas, ceci impliquerait un trajet différent des électrons du flux inverse. Cette dernière proposition, qui reste la plus probable, renforcerait également certaines hypothèses déjà décrites dans la littérature qui proposent deux trajets différents pour les flux d'électrons descendants ou remontants la chaîne respiratoire (Batandier, Guigas et al. 2006). En présence d'acides gras, la production d'espèces réactives de l'oxygène est diminuée par le traitement E008 mais avec un effet moins marqué. Le traitement agirait ainsi préférentiellement sur le trajet inverse des électrons provenant du complexe II et de l'ETF vers le complexe I.

La production radicalaire et l'activité du complexe I étant diminuées par le traitement, nous nous sommes ensuite focalisés sur l'éventuelle implication du traitement E008 dans les phénomènes apoptotiques. En effet, ces deux paramètres contribuent largement au phénomène d'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), lui-même lié à l'induction de la mort cellulaire par apoptose. Disposant au laboratoire d'une technique permettant d'apprécier des perturbations de ce processus, à savoir la mesure de la capacité de rétention calcique ou CRC, nous avons réalisé des analyses à partir de mitochondries isolées de rats traités. Outre la possibilité qu'elle puisse contrôler le déclenchement des phénomènes apoptotiques et modifier le fonctionnement mitochondrial, l'ouverture du PTP participe à la redistribution des nucléotides réduits et à la dépolarisation des mitochondries (Dumas et al. 2009). Ainsi, toute modification de l'état du PTP ou de la transition de perméabilité pourrait jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique.

### 2.1.2.4 Le traitement E008 augmente la capacité de rétention calcique



**Figure 40 : Effets du traitement chronique E008 sur les capacités de rétention calcique mitochondriales.**

Les mitochondries ont été isolées à partir de rats témoins (CHO) ou traités par E008 (CHO E008) selon la technique décrite dans la partie procédures expérimentales. Les capacités de rétention calcique mitochondriale ont été évaluées à l'aide d'une sonde fluorescente (Calcium Green 1 $\mu$ M) en présence de différents substrats : Glutamate/Malate (5/2.5 mM), Succinate (5mM), Glutamate/Malate/Succinate (G/M/S 5/2.5/5 mM). Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec p<0.05.

Les mesures de capacités de rétention calcique correspondent à la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer une libération massive de calcium par les mitochondries. Cette libération massive correspond à une ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP). Ce phénomène dépend de plusieurs paramètres dont la concentration intra-mitochondriale de calcium, l'activité du complexe I, le pH et des agents pharmacologiques tels que la cyclophyliline D ou la Metformine (Batandier, Guigas et al. 2006).

Nos résultats montrent une capacité de rétention calcique de 65 à 70 nmol/mg prot lorsque les mitochondries de rats témoins sont fournies en glutamate/malate ou succinate. Elle atteint 108 nmol/mg prot en présence de glutamate/malate et succinate. La même expérience en utilisant des mitochondries de rats traités par E008 a révélé une augmentation significative des capacités de rétention calcique de celles-ci. Cette augmentation est de 46% en glutamate/malate ou glutamate/malate/succinate et atteint 80%

en succinate (Figure 40). Cette élévation des capacités de rétention peut être due à une diminution de la concentration en calcium des mitochondries ou à une inhibition de l'ouverture du PTP.

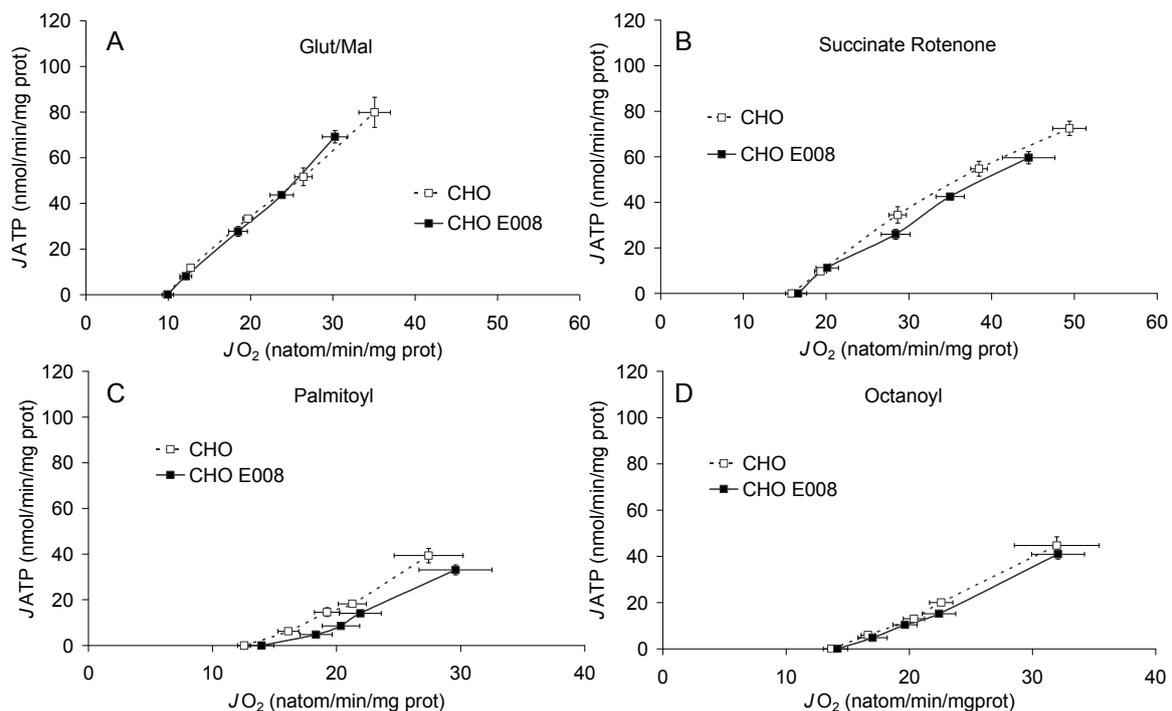
Généralement, les traitements pharmacologiques sont connus pour agir sur la régulation du PTP plutôt que sur la concentration matricielle de calcium. Nous avons donc retenu la première hypothèse. La composition et les régulateurs du PTP ne sont pas encore clairement définis à ce jour mais certains candidats sont avancés (Zorov et al. 2009). Le complexe I ne semble pas faire partie intégrante du PTP, néanmoins, son activité et la production de ROS qu'il engendre influencent grandement son ouverture. En effet, plusieurs études ont montré qu'une modification du flux des électrons à travers le complexe I pouvait moduler l'ouverture du PTP (Fontaine 1998, Chauvin 2001). Nos résultats peuvent donc nous conduire à suggérer que l'inhibition du complexe I observée pourrait influencer indirectement l'ouverture du PTP. En effet, l'augmentation de CRC en glutamate/malate pourrait être due à une inhibition du flux des électrons à travers ce complexe, limitant ainsi la production de ROS et, par suite, l'ouverture du PTP. En succinate, l'élévation de la CRC pourrait être liée à l'inhibition du flux inverse d'électrons, responsable d'une grande partie de la production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Batandier, Guigas et al. 2006). Toutefois, les mesures de respiration mitochondriale obtenues ne vont pas en ce sens puisque aucun effet du traitement n'a été observé en glutamate/malate. Si l'effet était uniquement dû à une inhibition du trajet inverse des électrons, sans baisse conjointe de la respiration, nous devrions observer une modification de production d'espèces réactives de l'oxygène. C'est en effet ce qu'ont montré les résultats de la production d' $H_2O_2$  en succinate puisqu'une diminution de production de cette espèce a été mesurée. Cet effet persiste en présence de roténone. De ce fait, cela implique un trajet différent des électrons en flux inverse qui serait inhibé spécifiquement par le traitement E008. L'inhibition aurait ainsi lieu sur un site différent du lieu d'action de la roténone. Une inhibition de ce site provoquerait une inhibition du flux inverse sans agir sur la respiration. Ceci ressemblerait beaucoup à l'effet inhibiteur du complexe I par le DCIP au niveau des FMN (Discussion personnelle Batandier C. : résultats non publiés).

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus lors de l'analyse de production d' $H_2O_2$  mitochondriale. Nous proposons qu'E008 est capable d'inhiber spécifiquement le

flux inverse d'électrons et la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui lui est associée, augmentant ainsi la capacité de rétention calcique.

### 2.1.2.5 Effets du traitement E008 sur le rendement de l'oxydation-phosphorylante.

L'analyse de la composition lipidique membranaire des mitochondries de rats traités par E008 ne fait pas apparaître d'importants changements. Cependant, l'élévation du rapport n-3/n-6 et de la proportion d'acides gras mono insaturés dans la fraction mitochondriale pourrait être à l'origine de modifications du rendement de l'oxydation phosphorylante. Nous avons donc analysé sur mitochondries isolées le couplage entre l'oxydation et la phosphorylation en présence de différents substrats.



**Figure 41 : Effets du traitement E008 sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.**

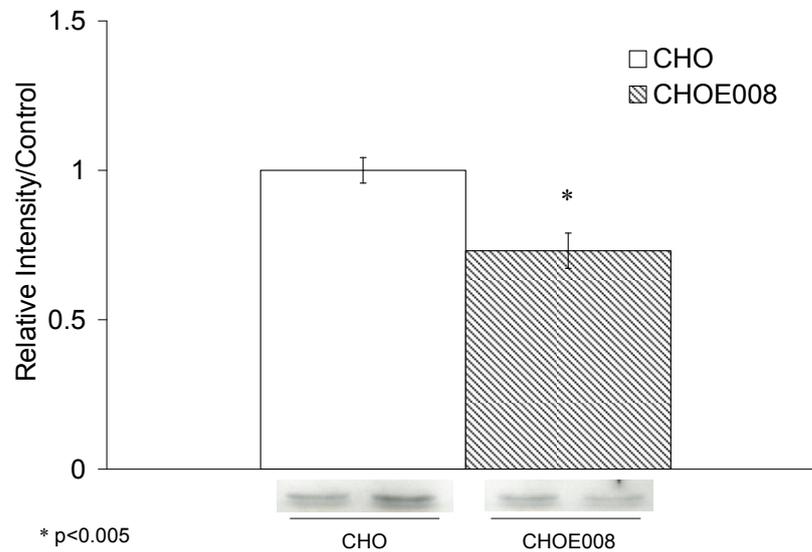
La relation entre le flux respiratoire ( $J\text{O}_2$ ) et de synthèse d'ATP ( $J\text{ATP}$ ) a été déterminée sur mitochondries isolées de foie en suspension (2 mg/ml) dans un tampon de respiration et en présence de 5 mM glutamate/2.5 mM malate (A), 5 mM succinate et 1.25  $\mu\text{M}$  rotenone (B), 55  $\mu\text{M}$  palmitoyl-carnitine (C) ou 100  $\mu\text{M}$  octanoyl-carnitine (D). Les variations d'intensité des flux  $J\text{O}_2$  et  $J\text{ATP}$  ont été obtenues par addition de quantités croissantes d'hexokinase. Les valeurs sont présentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=10 rats pour chaque groupe.

La production d'ATP par les mitochondries est proportionnelle à leur consommation d'oxygène. En effet, la corrélation entre les deux paramètres est une droite quel que soit le substrat utilisé. Par contre, la pente de la droite qui témoigne du rendement par rapport à l'oxygène, varie selon le substrat utilisé. Comme attendu, la valeur la plus élevée est obtenue en présence des substrats du complexe I (glutamate/malate). Autrement dit, pour synthétiser une même quantité d'ATP, l'oxydation à partir de glutamate/malate consomme moins d'oxygène par rapport à l'oxydation de succinate ou d'acides gras.

Les courbes obtenues avec les mitochondries de rats exposés au E008 se superposent avec les courbes des témoins lorsque du glutamate/malate ou du succinate est fourni aux mitochondries (Figure 41 A et B). Nous pouvons donc affirmer que le traitement E008 ne modifie pas le rendement de l'oxydation phosphorylante dans ces conditions. Par contre, en présence d'acides gras, le rendement par rapport à l'oxygène des mitochondries isolées de rats traités semble être plus faible que celui obtenu avec les rats témoins (Figure 41 C et D). La droite obtenue avec les mitochondries de rats traités est en effet légèrement décalée vers la droite. Ceci signifie que les mitochondries consomment plus d'oxygène pour une même quantité d'ATP produite. Cette différence n'est pas significative mais l'effet pourrait bien exister notamment en présence d'acide gras à chaîne longue. Si l'action du traitement E008 existe uniquement en présence d'acides gras, elle ne peut être mise en relation avec un effet membranaire, à moins de considérer l'existence d'une population de mitochondries spécifique de l'oxydation des acides gras et qui serait particulièrement affectée par le traitement au niveau membranaire.

Cette technique de mesure de respiration mitochondriale à vitesses sous maximales a mis en évidence une différence de respiration entre les mitochondries issues d'animaux traités ou non par E008. En effet, pour chaque dose d'hexokinase, les flux d'ATP et d'oxygène sont plus faibles avec les mitochondries issues d'animaux traités lorsqu'elles sont fournies en glutamate/malate ou succinate. Ceci traduit un contrôle différent du système phosphorylant sur la respiration mitochondriale ou une sensibilité à l'ADP diminuée en présence de substrats spécifiques des complexes I ou II. Puisque la cytochrome oxydase possède, sur sa sous-unité IV, un site de régulation allostérique par l'ATP et/ou l'ADP, nous suggérons que son activité contrôle le flux respiratoire dans cette situation. Toutefois, ce contrôle dépendrait des rapports des nucléotides adényliques qui eux sont dépendants de l'activité de l'ATP synthase et de celle de l'ANT.

L'activité ATP synthase étant diminuée par le traitement, ceci pourrait expliquer la diminution de ces flux. Toutefois, à défaut de pouvoir évaluer son activité, nous avons mesuré l'expression de l'ANT.



**Figure 42 : Effets du traitement E008 sur l'expression hépatique de l'isoforme 2 de l'ANT.**

Les westerns blots ont été réalisés à partir de bouts de foies de rats témoins ou sous traitement E008. Le niveau d'expression de l'ANT-2 a été rapporté à celui des rats témoins. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=8$  pour chaque groupe.

La quantité d'ANT-2 (isoforme hépatique majoritaire) est réduite par le traitement E008 (Figure 42). Puisque l'activité ATPase est également diminuée, nous pouvons conclure que l'ensemble du système phosphorylant est affecté par le nouveau composé E008. A l'évidence, cette altération est fortement contrôlante à des états de respiration non saturants, donc proche des conditions cellulaires. Toutefois, sur cellules, la diminution de respiration qui devrait en découler n'a pas pu être observée car elle serait masquée par l'augmentation de la densité mitochondriale des rats traités. Cependant, l'inhibition de l'expression de l'ANT a certainement pour conséquence de modifier les rapports des nucléotides adényliques et, par suite, le contrôle des voies métaboliques par ce paramètre. Nous nous intéresserons à cette variable dans la troisième partie de ce manuscrit.

Le fonctionnement mitochondrial est donc affecté à plusieurs niveaux par le traitement E008 et ce de manière spécifique selon l'utilisation des substrats.

En présence de substrats spécifiques du complexe I, seul un effet du traitement sur la CRC a pu être observé. Par contre, en succinate, le traitement E008 réduit la production

d'espèces réactives et augmente la CRC, alors que la respiration et le rendement ne sont pas affectés. En présence d'acides gras, la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est réduite par le traitement E008 et concomitante à la diminution du rendement par rapport à l'oxygène des mitochondries.

En diminuant la production mitochondriale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  *via* une action sur le complexe I, E008 contribuerait ainsi à augmenter la capacité de rétention calcique des mitochondries. Une inhibition spécifique du flux inverse des électrons au niveau du complexe I est donc très probable. L'enrichissement des membranes mitochondriales en acide myristique observé suite au traitement pourrait être associé à une myristylation d'une des nombreuses protéines de ce complexe et être à l'origine de modifications de fonctionnement des mitochondries. L'action inhibitrice sur l'expression de l'ANT peut participer à augmenter les capacités de rétention calcique car cette protéine est connue pour participer à la régulation de l'ouverture du PTP (Kumarswamy et al. 2009).

Par ailleurs, le changement de rendement de phosphorylation par rapport à l'oxygène mis en évidence durant l'oxydation des acides gras peut s'expliquer par l'existence d'une sous-population de mitochondries utilisant spécifiquement les acides gras et qui serait particulièrement affectée par le traitement, ou par l'effet d'inhibition de l'ANT dont le contrôle diffère lors de l'oxydation des acides gras par rapport aux autres substrats.

Après avoir étudié les modifications de fonctionnement des mitochondries dues au traitement des animaux par E008, nous avons analysé les effets potentiels sur le métabolisme hépatocytaire.

### 2.1.3 Effets du traitement sur le fonctionnement hépatocytaire

Afin d'étudier le fonctionnement hépatique en s'affranchissant des paramètres circulatoires, nous avons utilisé le système de périfusion d'hépatocytes décrit dans la partie procédures expérimentales. Ce système nous permet de travailler avec des concentrations relativement faibles et non saturantes en substrat aboutissant à des états stationnaires métaboliques. Nous travaillons également en absence d'insuline et de toute autre hormone, rendant les contrôles des voies métaboliques exclusivement dépendants du fonctionnement des hépatocytes. J'insiste sur le fait que nous n'avons pas utilisé de drogue dans le système de périfusion. De ce fait, les modifications, que nous pourrions observer, ne seraient dues qu'aux conséquences du traitement E008 de trois semaines et ne pourraient donc en aucun cas être liées à l'effet du composé *in vitro* directement sur les hépatocytes. Dans de telles conditions, nous analysons l'empreinte effective du traitement sur le fonctionnement des hépatocytes.

#### 2.1.3.1 E008 ne modifie pas la respiration cellulaire

La respiration cellulaire a été mesurée en périfusion d'hépatocytes. Deux substrats ont été utilisés : le glycérol en concentration croissante de 0.15 à 9.6 mM additionné ou non d'octanoate 0.4 mM.

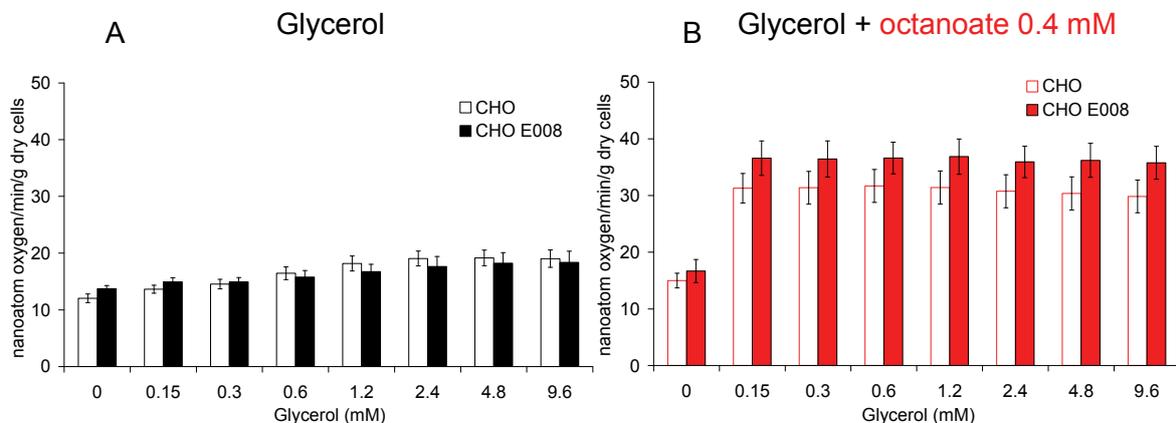


Figure 43 : Effets de 3 semaines de traitement E008 sur la respiration cellulaire.

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats ayant suivi le traitement E008 (CHO E008) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5%

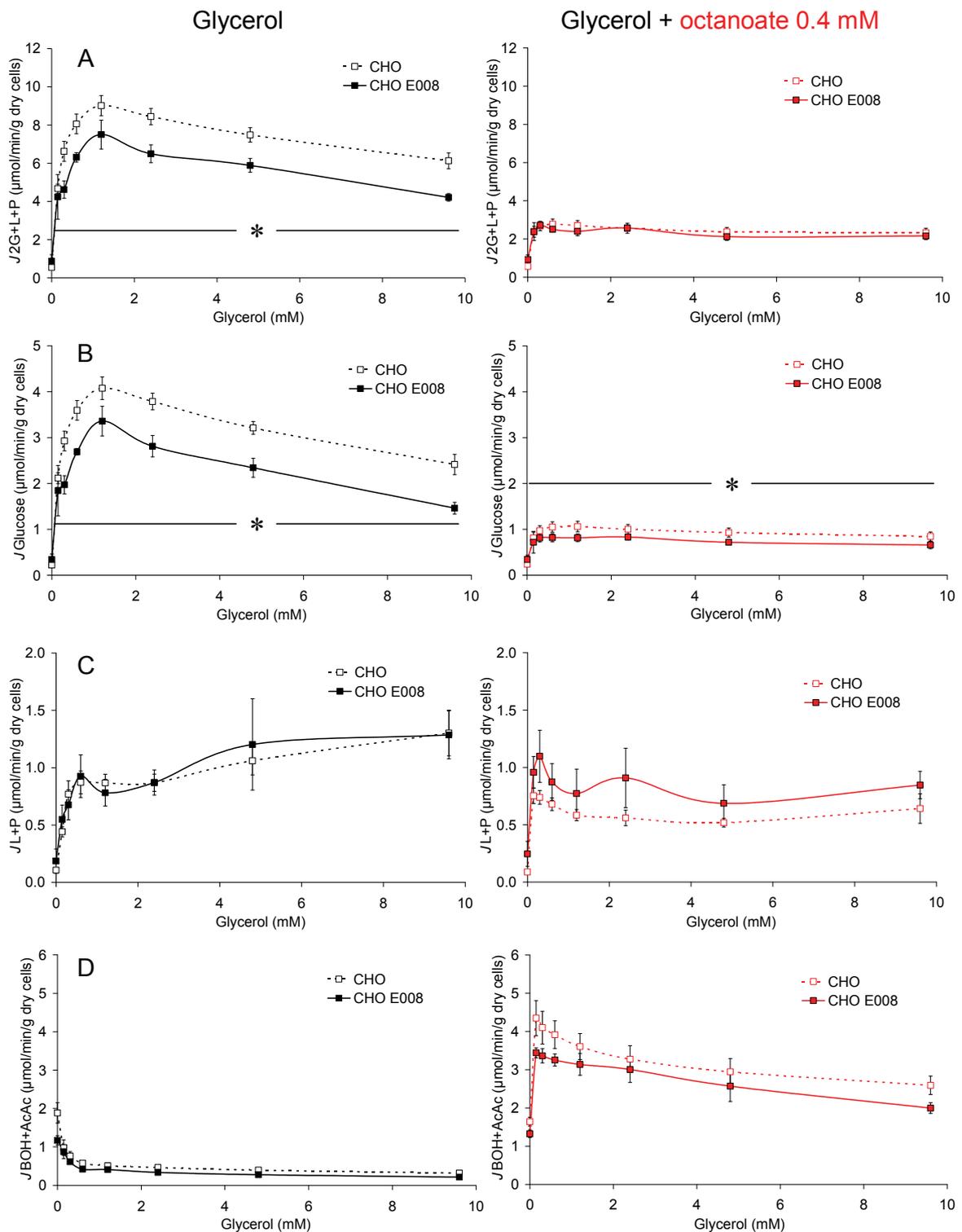
CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). La consommation d'oxygène a été mesurée pour chaque état stationnaire. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=5 pour chaque groupe.

La consommation d'oxygène des hépatocytes en l'absence de substrats exogènes est d'environ 13 nanoatom oxygen/min/g dry cells. Elle augmente linéairement avec la concentration en glycérol infusée pour atteindre 19.03 nanoatom oxygen/min/g dry cells (Figure 43 A). En présence d'octanoate, la respiration cellulaire est nettement plus élevée puisqu'elle approche 31 nanoatom oxygen/min/g dry cells. Par contre, elle ne varie pas avec l'augmentation de la disponibilité en glycérol en présence des acides gras (Figure 43 B). Une expérience identique avec des hépatocytes de rats ayant suivi le traitement E008 a donné des résultats identiques (Figure 43 A et B barres pleines). La respiration cellulaire n'est pas modifiée par le traitement. Néanmoins, une faible augmentation de la consommation d'oxygène en présence des acides gras apparaît. Ce résultat est cohérent avec la légère diminution de rendement par rapport à l'oxygène, observée en présence d'acides gras sur mitochondries isolées.

### 2.1.3.2 E008 inhibe la néoglucogenèse

L'étude des flux métaboliques hépatiques a été réalisée comme précédemment, par périfusion d'hépatocytes, en utilisant du glycérol additionné ou non d'octanoate.

Le flux de glycérol métabolisé par les hépatocytes de rats témoins, estimé par la somme en équivalent 3 carbones (2G+L+P), augmente progressivement en fonction de la concentration de glycérol infusée mais seulement pour les plus faibles concentrations utilisées (de 0.15 mM à 1.2 mM). Il atteint 9.02  $\mu$ mol/min/g dry cells à 1.2 mM de glycérol. A des concentrations supérieures, le flux métabolisé diminue linéairement en fonction de la concentration de glycérol jusqu'à 6.13  $\mu$ mol/min/g dry cells pour une concentration de 9.6 mM de glycérol. Le flux de glucose suit exactement le même profil. Par contre, le flux glycolytique augmente avec la concentration de glycérol. La production de corps cétoniques en présence de glycérol uniquement s'effectue à partir des substrats endogènes ; elle est donc faible dans cette condition et diminue en cours d'expérimentation (Figure 44).



**Figure 44 : Effets du traitement E08 sur les flux métaboliques hépatiques.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats ayant suivi le traitement E08 (CHO E08) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Glucose, Lactate, Pyruvate) ont été mesurés dans le périfusate en sortie de chambre et permettent ainsi d'évaluer le flux total de glycérol métabolisé en équivalents à trois

carbones par l'addition de 2 Glucose + 1 Lactate + 1 Pyruvate ( $J_{2G+L+P}$  (A)), le flux gluconéogénique ( $J_{G}$  (B)), le flux glycolytique ( $J_{L+P}$  (C)) et le flux de corps cétoniques ( $J_{BOH+AcAc}$  (D)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

Les hépatocytes de rats traités par E008 métabolisent une quantité de glycérol inférieure à celle des hépatocytes témoins. Ce flux est réduit de 17% (Figure 44 A). Cette diminution est liée à une diminution de la néoglucogénèse (Figure 44 B). En effet, le glucose produit par les hépatocytes de rats traités à partir du glycérol est significativement inférieur à chaque état stationnaire. En revanche, la production de lactate et de pyruvate n'est pas affectée par le traitement E008 (Figure 44 C). Au final, seule la voie de la néoglucogénèse est freinée par le traitement. Ce nouveau composé a donc la capacité de diminuer la production hépatique de glucose sans augmenter le flux glycolytique. Ce résultat est particulièrement intéressant car une élévation de la production de lactate et de pyruvate est souvent observée lorsque l'intensité de la néoglucogénèse est réduite. Cet effet ciblé sur la voie gluconéogénique constitue un atout majeur pour ce nouveau produit. En effet, l'absence de modifications du flux glycolytique par le traitement E008 écarte le risque d'induire des hyper-lactatémies. La production de corps cétoniques, très faible en présence de glycérol uniquement, n'est pas davantage modifiée par le traitement (Figure 44 D).

En présence de 0.4 mM d'octanoate (panel de droite), le flux de glycérol est nettement réduit car il atteint au maximum 2.8  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry cells (Figure 44 A). Ce flux relativement faible s'explique par une diminution importante du flux de glucose. La production de glucose atteint rapidement son maximum de 1.05  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry cells pour une concentration de glycérol de 0.3 mM (Figure 44 B). Avec les hépatocytes de rats traités par E008, nous obtenons un flux de glucose significativement plus faible de 22%. Cette diminution d'intensité de la voie de la néoglucogénèse se répercute directement sur le flux de glycérol métabolisé car la voie de la glycolyse n'est pas affectée par le traitement (Figure 44 B et C). En revanche, la présence d'octanoate dans le liquide de périfusion augmente considérablement la production de corps cétoniques. Elle atteint 4.35  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry cells lorsque la concentration en glycérol est très faible (0.15 mM) puis diminue progressivement jusqu'à 2.6  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  dry cells pour une concentration de glycérol de 9.6 mM. L'évaluation de ce flux avec des hépatocytes isolés de rats traités par E008 fait apparaître une légère diminution de son intensité. Néanmoins cette différence n'est pas significative entre les deux groupes (Figure 44 D).

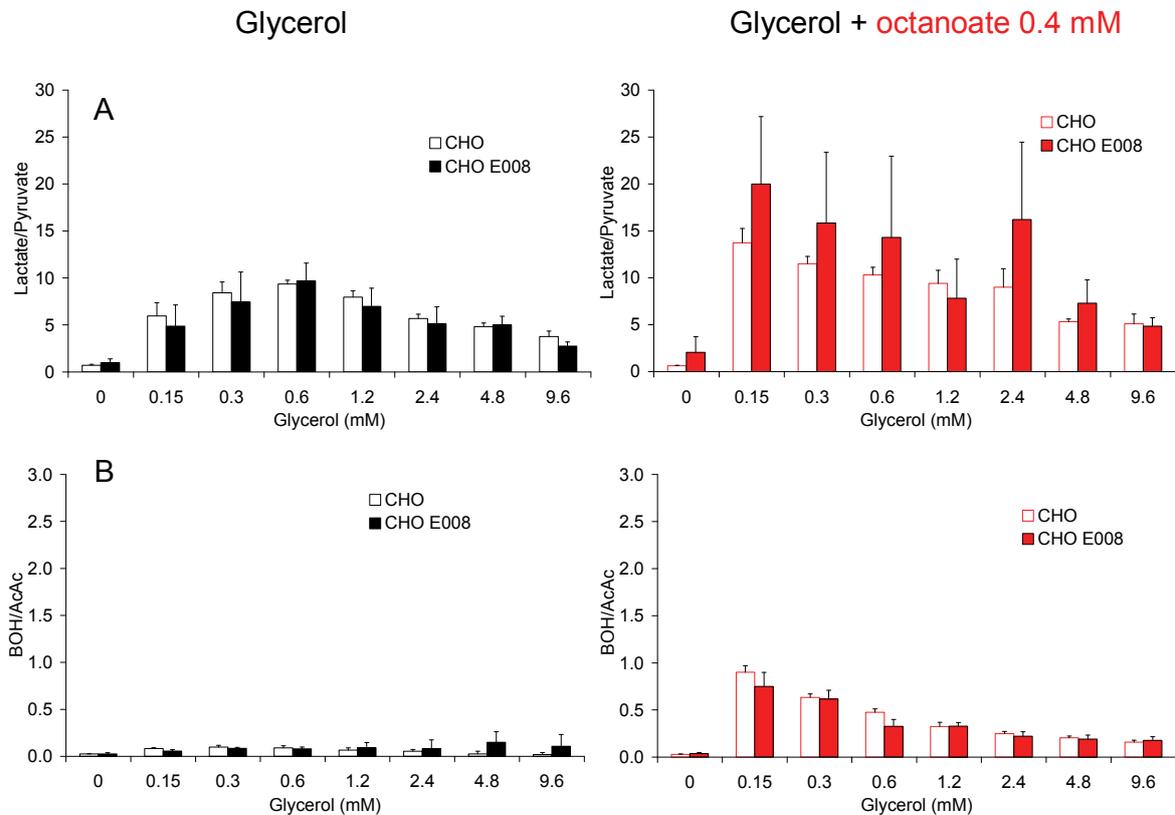
Nos résultats obtenus avec les hépatocytes de rats traités par E008 à 1 mg/ml dans l'eau de boisson montrent une diminution du métabolisme du glycérol en présence ou en l'absence d'octanoate. Cette diminution de l'utilisation du glycérol, d'environ 20%, est uniquement due à une inhibition de la néoglucogenèse car la voie de la glycolyse n'est pas modifiée par le traitement. Le nouveau composé E008 a la capacité de diminuer l'intensité de la voie de la néoglucogenèse sans augmenter celle de la glycolyse. L'inhibition a donc certainement lieu en amont du DHAP pour réduire spécifiquement la néoglucogenèse sans augmenter la glycolyse. Nous nous sommes alors intéressés aux contrôles du métabolisme du glycérol en amont du DHAP. Le potentiel phosphate qui pourrait contrôler le flux *via* l'activité de la glycérol kinase n'a pas été considéré pour l'instant car ce type de contrôle métabolique n'est pas habituel. Nous avons décidé d'analyser dans un premier temps le potentiel rédox avant d'étudier l'effet du composé E008 sur les rapports des nucléotides adényliques *in vitro* (Cf. partie III de ce manuscrit).

### 2.1.3.3 E008 n'affecte pas le potentiel rédox

Les potentiels rédox cytosolique et mitochondrial sont deux paramètres importants qui contrôlent le métabolisme du glycérol à plusieurs niveaux (Cf. schéma du métabolisme du glycérol et de l'octanoate). Le potentiel rédox cytosolique est estimé par le rapport des flux lactate/pyruvate alors que le potentiel rédox mitochondrial est estimé par le rapport des flux BOH/AcAc.

L'évolution du potentiel rédox cytosolique selon la disponibilité du glycérol suit une courbe en cloche. Il augmente progressivement pour atteindre un rapport de 10 à 0.6 mM puis diminue jusqu'à 4 pour une concentration de glycérol de 9.6 mM. En présence d'octanoate, le rapport lactate/pyruvate est considérablement augmenté, atteignant une valeur proche de 15 dès l'addition d'octanoate dans le liquide de périfusion. Il diminue progressivement avec l'augmentation de la concentration de glycérol.

Le potentiel rédox mitochondrial suit le même profil mais il est 10 fois plus faible. Les rapports obtenus, à chaque état stationnaire, avec les hépatocytes de rats traités sont identiques à ceux obtenus avec des hépatocytes de rats témoins (Figure 45). Ce traitement n'agit donc pas sur les flux métaboliques *via* les potentiels rédox. La modification d'intensité du flux de la néoglucogenèse observée dans les hépatocytes de rats traités n'est donc pas liée à une modification du potentiel rédox cytosolique ou mitochondrial.



**Figure 45 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins (CHO) et de rats sous traitement E008 (CHO E008) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Lactate, Pyruvate, BOH et AcAc) ont été mesurés dans le périfusat en sortie de chambre permettant ainsi d'évaluer le potentiel rédox cytosolique (Lactate/Pyruvate (A)) et le potentiel rédox mitochondrial (BOH/AcAc (B)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=5 pour chaque groupe.

La modification de contrôle sur la voie néoglucogénique ne semble pas due à un changement de potentiel rédox. Néanmoins, le changement d'intensité du flux de glycérol métabolisé qui se répercute directement sur la production de glucose est sans doute lié à un changement de flux au travers des premières étapes du métabolisme du glycérol. En effet, un changement d'activité enzymatique en aval du DHAP provoquerait certainement un changement d'intensité des deux voies en même temps et dans des sens opposés. Autrement dit, si la voie de la néoglucogénèse était inhibée entre le DHAP et le glucose, cela induirait une élévation de la voie de la glycolyse car la force en amont du DHAP resterait la même. Puisque ce potentiel rédox inchangé par le traitement E008 n'est pas

responsable des modifications des flux métaboliques, nous avons estimé les activités enzymatiques maximales des premières enzymes du métabolisme du glycérol et de l'octanoate dont certaines pourraient contrôler les flux.

	CHO	CHO E008
GlyK ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$1.56 \pm 0.07$	$1.53 \pm 0.06$
cG3PdH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$44.05 \pm 3.82$	$40.06 \pm 4.47$
mG3PdH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$5.27 \pm 0.30$	$4.99 \pm 0.49$
HCDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ )	$439.7 \pm 29.2$	$417.3 \pm 26.07$

**Tableau 17 : Effets du traitement E008 sur les activités enzymatiques GK, G3PdH et HCDH.**

Les activités glycérol kinase (GlyK), glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique (cG3PdH) et mitochondriale (mG3PdH) ont été mesurées à partir d'hépatocytes congelés et l'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HCDH) à partir de mitochondries. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM pour n=6 pour chaque groupe.

Aucune des activités enzymatiques mesurées n'est affectée par le traitement E008 (Tableau 17). Ainsi, le contrôle du métabolisme du glycérol ne semble pas s'opérer par une modification des capacités maximales de ces enzymes. Le contrôle pourrait être exercé par le potentiel phosphate sur la glycérol-kinase. Cette donnée n'a pu être vérifiée en périfusion avec des hépatocytes de rats traités mais elle a été mesurée en incubation et en présence de la drogue. Les résultats sont présentés dans la partie III de ce manuscrit.

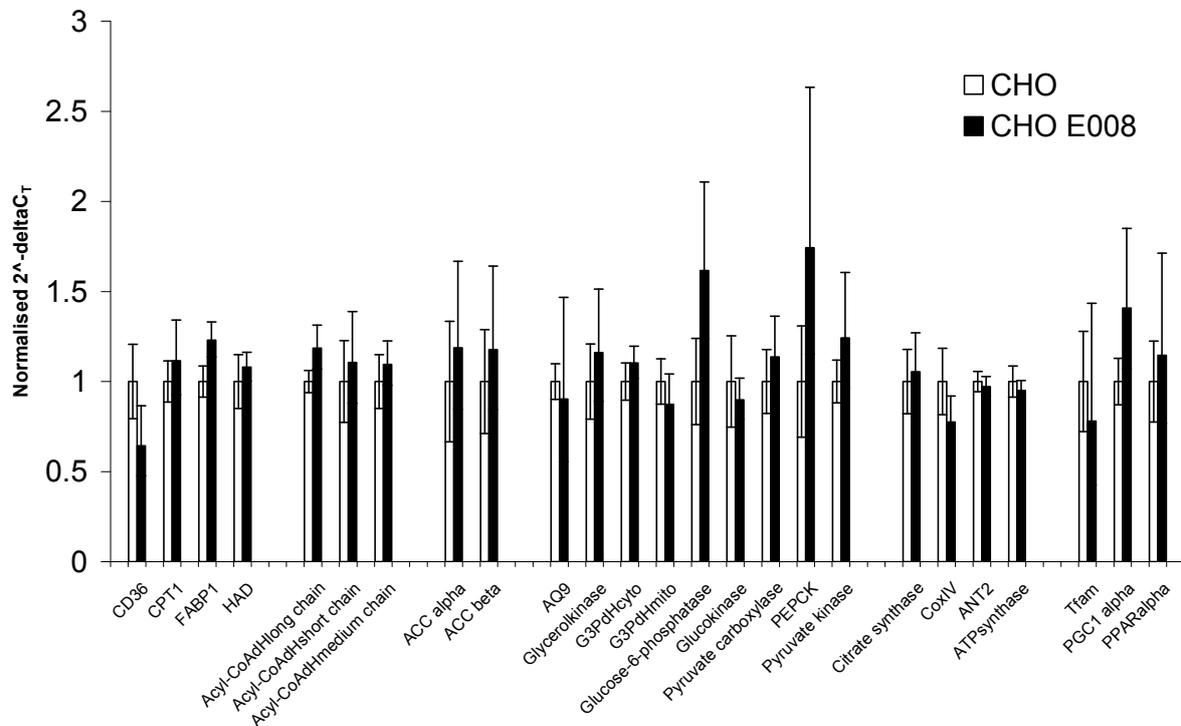
En tenant compte des modifications d'activité enzymatiques mitochondriales induites par le traitement, en particulier la diminution de l'activité ATPasique mais aussi de l'inhibition d'expression de l'ANT, nous pouvons supposer que le traitement provoque une diminution du potentiel phosphate. Cependant, si tel était le cas, nous devrions alors observer une élévation du potentiel rédox et donc des rapports lactate/pyruvate et BOH/AcAc. Or, nos données expérimentales, qui ne montrent aucun changement des potentiels rédox, ne sont pas en faveur de ce concept. Nous pouvons toutefois envisager que l'inhibition de la phosphorylation ne provoque pas d'élévation de potentiel rédox en considérant un léger effet découplant du produit. C'est en effet ce qu'ont confirmé les expériences de rendement par rapport à l'oxygène en présence d'acides gras. L'inhibition modeste du système phosphorylant associée à un léger découplage de l'oxydation phosphorylante permettrait de maintenir les potentiels rédox cellulaires. Ce subtil effet du nouveau composé lui permettrait d'agir comme un médicament plutôt qu'un poison

inhibiteur de la chaîne respiratoire. En revanche, ceci impliquerait un effet « pléiotrope » de la molécule.

#### 2.1.3.4 Effets transcriptionnels du traitement E008

Pour obtenir une vision rapide des effets multiples du traitement, nous avons réalisé une série de RT-PCR permettant de déterminer de potentielles cibles de la molécule.

Bien conscient du fait que le contrôle d'une voie métabolique ne se fasse pas nécessairement sur la transcription du gène des protéines en question, cette approche nous a permis de savoir rapidement si le traitement pouvait agir au niveau transcriptionnel.



**Figure 46 : Effets du traitement E008 sur la transcription de certains gènes impliqués dans le métabolisme hépatique du glycérol et des acides gras.**

Les ARN totaux ont été extraits à partir de bouts de foies. Les ARNm ont été reverse-transcrits. Des PCR en temps réels ont été réalisées sur les ADNc en utilisant des amorces spécifiques de gènes de transporteurs, d'enzymes clés du métabolisme, ou de facteur de transcription. Les quantités d'ARNms ont été normalisées par rapport à celle de l'ARNm du gène ubiquitaire stable de la phosphoprotéine P0 constitutive des ribosomes (Arbp1). La quantification a été réalisée par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Les résultats sont exprimés en valeurs relatives à celles du groupe témoin sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 pour les groupes témoins (CHO) et traités (CHO E008).

Comme présenté sur la figure précédente, le traitement E008 ne modifie pas la transcription des gènes étudiés (Figure 46). Ces résultats indiquent que le traitement n'agit pas au niveau transcriptionnel ou bien, plus raisonnablement, que la transcription des gènes recherchés n'est pas affectée. Nous pouvons remarquer que la transcription des gènes de l'ANT-2 et de l'ATPsynthase n'est pas affectée, tandis que leur activité ou leur contenu protéique sont modifiés. La transcription des gènes PGC1-alpha, de Tfam et de PPAR-alpha est également inchangée, alors que ces facteurs de transcription contrôlent la biogenèse mitochondriale.

### 2.1.4 Synthèse

En conclusion, le traitement E008, développé comme futur traitement antidiabétique, a la capacité de diminuer le flux de la néoglucogenèse. Cet effet n'affecte pas l'intensité de la glycolyse mais diminue légèrement la production de corps cétoniques à partir d'octanoate. Les modifications d'intensité des différentes voies ne sont pas associées à des modifications du potentiel rédox. Par contre, un léger changement du rendement de l'oxydation phosphorylante a été observé sur mitochondries isolées en présence d'acides gras. Le même effet a été observé sur cellules intactes. En effet, en présence de glycérol uniquement, le flux de glycérol métabolisé est plus faible avec les cellules d'animaux traités alors que leur consommation d'oxygène est identique. De même, en présence de glycérol additionné d'octanoate, le flux de glycérol métabolisé est identique entre les deux groupes et la production de corps cétoniques est légèrement inférieure suite au traitement E008, alors que la respiration cellulaire est légèrement plus élevée dans ce groupe. Ces deux constatations montrent donc une diminution de rendement par rapport à l'oxygène de ces hépatocytes. Néanmoins, cet effet découplant lié au traitement ne peut être généralisé, puisque cette modification de rendement n'est pas observée en présence de glutamate/malate, substrat spécifique du complexe I sur mitochondries isolées, alors que sur cellules, l'effet est présent en glycérol, substrat fournissant ce même complexe. La seule hypothèse que nous pouvons avancer dans cette situation est un contrôle exercé au niveau cellulaire. Malheureusement, avec nos données, rien ne nous permet de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Par ailleurs, le traitement E008 provoque une inhibition de l'activité du système phosphorylant (activité ATPsynthase et expression de l'ANT) qui peut se répercuter sur le

potentiel phosphate. Ainsi, si le rapport des nucléotides adényliques est diminué par le traitement, cela pourrait induire une diminution du flux au travers de la glycérol kinase et inversement (*ie* si le flux diminue la production d'ATP sera réduite dans ces conditions). Cet effet aurait pour conséquence de réduire l'intensité de la néoglucogenèse car la voie de la glycolyse serait maintenue préférentiellement pour éviter une trop forte chute du rapport des nucléotides adényliques. L'augmentation d'activité citrate synthase, induite par le traitement et mesurée sur hépatocytes, traduisant une élévation de densité mitochondriale, ne suffirait pas à maintenir une synthèse d'ATP suffisante car la quantité d'ANT dans ces cellules reste globalement plus faible alors que les mitochondries sont plus nombreuses.

Puisque le contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire par le système phosphorylant n'est pas identique selon le substrat utilisé (Brand, Hafner et al. 1988), l'action du composé E008 ne provoque pas le même effet sur la respiration mitochondriale et les flux métaboliques qui en découlent. *In fine*, l'action du E008 a des conséquences différentes selon les substrats métabolisés.

Le traitement E008 provoque également une inhibition du flux inverse des électrons au niveau du complexe I, ce qui a des conséquences sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et sur la capacité de rétention calcique des mitochondries. L'inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité pourrait également modifier la répartition et la compartimentation des équivalents réduits (NADH) (que nous n'avons pas pu détecter par les dosages des métabolites) et ainsi modifier le contrôle des voies métaboliques (Dumas, Argaud et al. 2009). Toutefois, un effet du traitement sur le système phosphorylant reste l'hypothèse la plus probable.

En espérant amplifier les phénomènes et cerner davantage les cibles potentielles du nouveau composé, nous avons choisi d'étudier ses effets sur des modèles d'animaux diabétiques. Le traitement E008 a dans un premier temps été administré à des rats soumis au régime enrichi en graisses décrit en première partie. Nous l'avons ensuite testé sur un modèle de rats insulino-résistants, les rats Goto-Kakizaki.

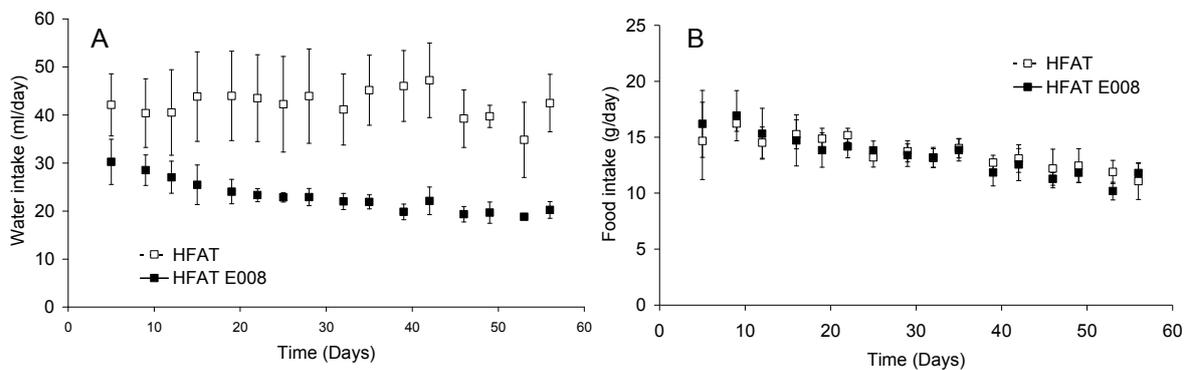
## 2.2 Effets du traitement E008 sur le modèle HFAT

Après avoir testé l'efficacité du produit E008 sur des rats témoins (sous régime standard), nous nous sommes intéressés à ses effets sur le modèle de rats développant un syndrome métabolique analysé en première partie de ce manuscrit. Pour cela, nous avons traité une série d'animaux sous régime hyper gras avec le nouveau composé pendant 8 semaines.

Les rats ont donc suivi un régime hyper gras associé ou non au traitement E008 dans l'eau de boisson à 1 mg/ml.

### 2.2.1 Effets du traitement sur la croissance, le quotient respiratoire et la composition corporelle des animaux

Pendant les 8 semaines de régime et de traitement E008, les animaux ont été suivis et pesés deux fois par semaine. Leur consommation de boisson et de nourriture a également été évaluée durant toute cette période.



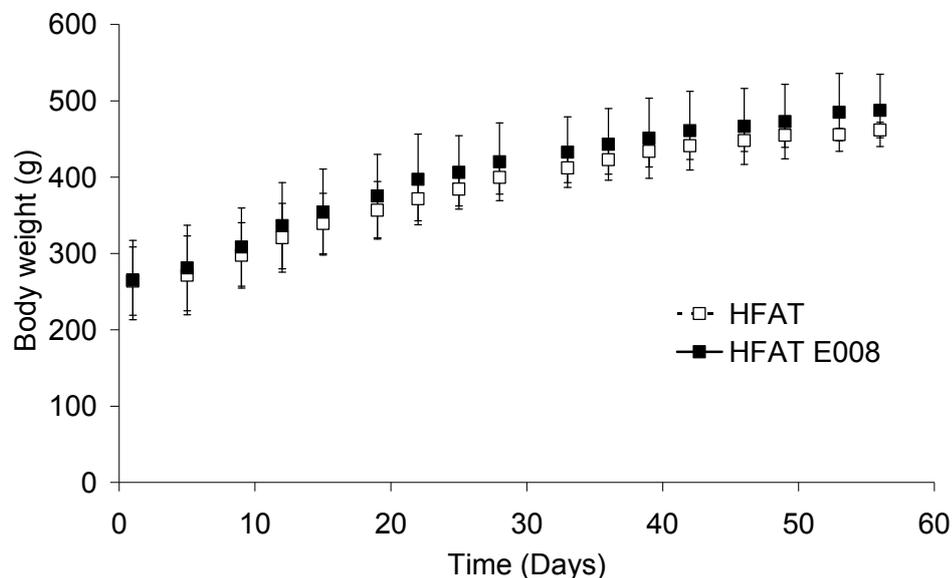
**Figure 47 : Evolution des prises alimentaires et hydriques des rats sous régime hyper gras associé ou non au traitement E008.**

La quantité de nourriture (A) et le volume de boisson (B) ingérés par les animaux ont été évalués deux fois par semaine. Les données sont présentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6.

Les rats suivant le régime hyper gras associé au traitement E008 (HFAT E008) ont une prise hydrique plus faible que celle des animaux témoins (HFAT). Sous régime hyper gras, les animaux absorbent quotidiennement environ 40 ml de boisson alors qu'ils

consomment seulement 20 ml lorsque le médicament est dissout dans l'eau de boisson (Figure 47 A). Cette diminution de prise hydrique n'avait pas été observée avec le régime standard dans l'étude précédente. Le régime hyper gras étant plus hydraté, il permet aux animaux de se priver plus facilement de boisson en particulier lorsque le médicament est dissout dans celle-ci. Cette restriction spontanée est sans doute liée à un goût désagréable de la substance médicamenteuse perçu par les rongeurs.

Cette différence de prise hydrique n'est pas associée à une diminution des prises alimentaires des animaux du groupe sous traitement E008. Celle-ci aurait pu rendre difficile l'interprétation de nos résultats (Figure 47 B).

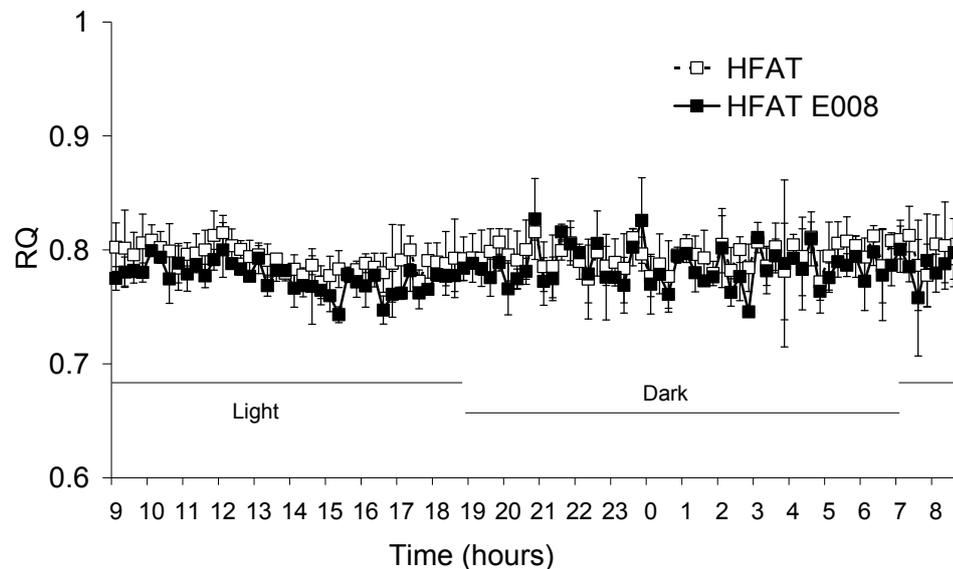


**Figure 48 : Evolution de la masse corporelle au cours des 8 semaines de traitement des rats sous régime hyper gras.**

La masse corporelle des animaux a été mesurée deux fois par semaine pendant les 8 semaines de régime associé ou non au traitement E008 à 1 mg/ml dans l'eau de boisson. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$ .

Pendant les 8 semaines de traitement, l'évolution de la masse corporelle des animaux ne diffère pas entre les deux groupes (Figure 48). La molécule E008 n'a donc pas d'effet sur la prise de poids. Les animaux sous régime hyper gras ont atteint une masse corporelle de 480 g environ en fin de régime. Leur masse moyenne sur les 8 semaines était d'environ 400 g. Puisque la consommation de boisson était de 20 ml en moyenne pour les animaux sous traitement, la dose d'E008 absorbée est de 50 mg/kg/j. Cette dose thérapeutique est donc deux fois plus faible que celle utilisée avec les animaux témoins (sous régime standard) mais reste dans les doses thérapeutiques envisagées.

Le quotient respiratoire, ou plus précisément ses variations selon l'état nutritionnel des animaux au cours de la journée, étant altéré par le régime hyper gras, nous avons analysé l'effet du traitement E008 associé au régime sur ce paramètre métabolique.



**Figure 49 : Quotient respiratoire de rats sous régime hyper gras associé ou non au traitement E008.**

Lors de la dernière semaine de régime et de traitement, le quotient respiratoire a été mesuré sur 24 heures dans des cages calorimétriques. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM pour  $n=6$ .

Comme dans la première étude, le quotient respiratoire des rats sous régime hyper gras est stable en fonction du temps (Figure 49). Ceci traduit le fait que les animaux ont perdu leur flexibilité métabolique. Autrement dit, leur métabolisme est constamment basé sur les lipides alors qu'en période postprandiale, l'utilisation des glucides devrait être majoritaire. Le signal insulinique est donc insuffisant chez ces animaux ou la quantité de glucide présente dans le régime est trop faible pour observer un changement de quotient respiratoire lié à l'oxydation des glucides.

Le quotient respiratoire des animaux sous traitement E008 est à chaque instant identique à celui des témoins.

Au terme des huit semaines de traitement, les masses du foie et de différents tissus adipeux ont été mesurées.

	HFAT	HFAT E008
Body (g)	461.6 ± 4.6	487.4 ± 21.0
Liver (g)	12.15 ± 0.45	13.57 ± 0.86
Liver proteins (mg/g)	187.4 ± 9.0	193.6 ± 14.0
Liver fatty acids (mg/g)	78.0 ± 6.9	89.45 ± 16.0
Retroperitoneal adipose tissue (g)	9.89 ± 0.95	8.71 ± 1.38
Epididymal adipose tissue (g)	8.39 ± 0.65	8.27 ± 1.04
Mesenteric adipose tissue (g)	9.79 ± 0.70	8.77 ± 0.97

**Tableau 18 : Effets du traitement E008 sur les masses corporelles, hépatiques et adipeuses de rats sous régime hyper gras.**

Au terme des 8 semaines de régime associé ou non au traitement E008 à 1 mg/ml dans l'eau de boisson, les masses des différents tissus ont été mesurées. Les contenus hépatiques en protéines et en acides gras ont été évalués sur un bout de foie prélevé lors de la dissection et sont exprimés par g de tissus frais. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM pour n=6.

Le traitement E008 n'a pas de répercussion sur la composition corporelle des animaux sous régime hyper gras. Les rats traités sont donc aussi gras que les animaux témoins après huit semaines de régime hyper gras. La composition hépatique n'est pas davantage modifiée car les teneurs en protéines et en acides gras sont similaires (Tableau 18). La teneur en glycogène, constituant majoritaire restant, n'est certainement pas modifiée puisque la masse totale du foie est inchangée, tout comme les teneurs des deux autres constituants principaux. Autrement dit, la différence de masse restante, correspondante en grande partie au glycogène, est donc identique entre les deux groupes.

	HFAT	HFAT E008
Glycémie (mM)	8.10 ± 0.59	7.54 ± 0.21
Insuline (ng/ml)	5.04 ± 0.45	3.80 ± 0.83

**Tableau 19 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des rats sous régime hyper gras.**

Le sang des animaux à jeun depuis 24h a été prélevé dans l'aorte abdominale. Le glucose et l'insuline ont été dosés sur le plasma. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM pour n=6 par groupe.

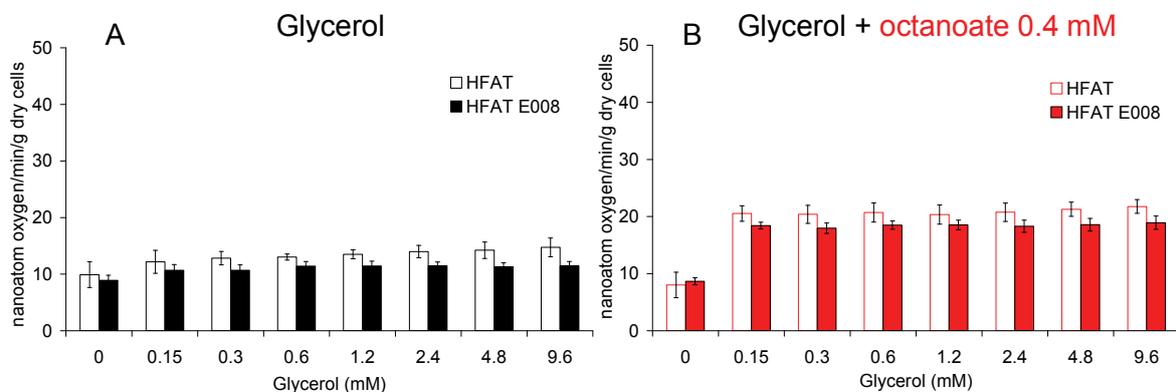
Les glycémies mesurées à jeun ne diffèrent pas entre les animaux des deux groupes. Le traitement ne provoque donc pas de changement de ce paramètre circulant à jeun. Par contre, l'insulinémie des animaux traités semble plus faible alors que la glycémie est identique (Tableau 19). Ainsi, un plus faible taux d'insuline suffit pour obtenir le même taux de glucose dans le sang des animaux traités. Ceci révélerait une amélioration du signal insulinique chez les animaux ayant suivi le traitement E008 ou un contrôle des voies métaboliques différent *via* un autre signal se substituant à celui de l'insuline.

Après avoir analysé les effets macroscopiques de la molécule E008 sur les rats suivant un régime hyper gras, nous nous sommes intéressés à ses effets sur les flux métaboliques hépatiques.

### 2.2.2 Effets du traitement sur le fonctionnement hépatocytaire de rats sous régime hyper gras

Le même modèle d'étude des flux métaboliques, la périfusion d'hépatocytes, a été utilisé dans ces expériences. A nouveau, les cellules ont été isolées à partir de foie de rats sous régime hyper gras et ayant suivi ou non le traitement E008 pendant 8 semaines. Ensuite, les cellules ont été périfusées avec du glycérol additionné ou non d'octanoate.

#### 2.2.2.1 Effets du traitement E008 sur la respiration cellulaire.



**Figure 50 : Effets de 8 semaines de régime hyper gras associé ou non au traitement E008 sur la respiration cellulaire.**

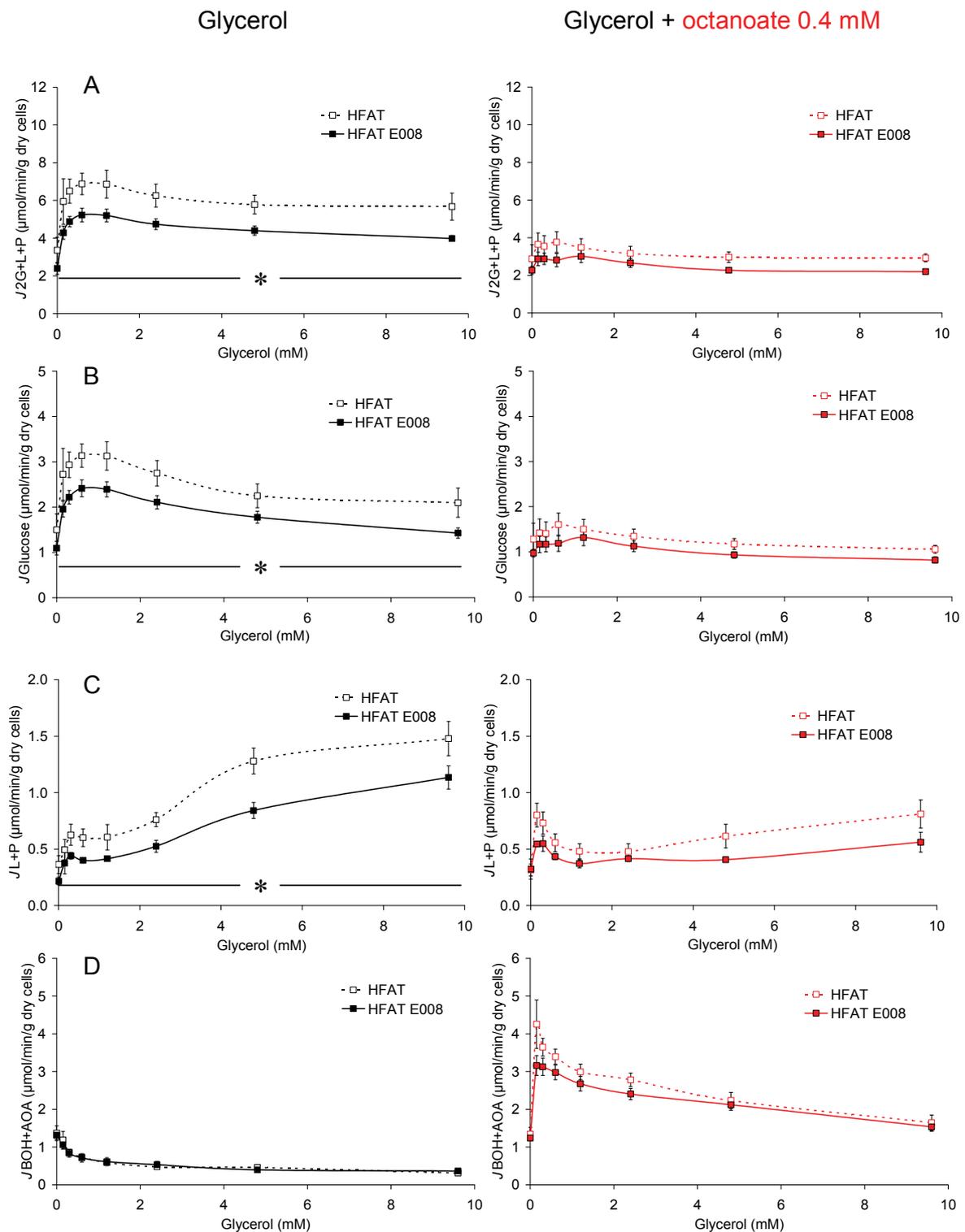
Les hépatocytes isolés de rats sous régime hyper gras (HFAT) et de rats ayant suivi le régime mais associé au traitement E008 (HFAT E008), à jeun depuis 24 heures, ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) et avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). La consommation d'oxygène a été mesurée pour chaque état stationnaire. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=5 pour chaque groupe.

La respiration cellulaire augmente légèrement avec la disponibilité en glycérol chez les animaux sous régime hyper gras car la respiration cellulaire est constitutivement inhibée par le régime chez ces animaux (Cf. première partie). Elle est comprise entre 10 et 15 nano atom d'oxygène/min/g dry cells. La consommation d'oxygène des hépatocytes de rats traités par E008 est encore plus faible que celle des animaux témoins (Figure 50 A). En présence d'octanoate, la respiration cellulaire des animaux témoins est plus élevée et approche les 20 nano atom d'oxygène/min/g dry cells quelle que soit la concentration de glycérol infusée. Celle des hépatocytes de rats traités est sensiblement plus faible (Figure 50 B).

Finalement, même si cette différence de consommation d'oxygène n'est pas statistiquement différente entre les deux groupes d'animaux, sans doute pour des raisons de manque de puissance du test lié au faible nombre d'animaux, le traitement E008 des rats sous régime hyper gras semble induire une légère inhibition de la respiration hépatocytaire.

### 2.2.2.2 Le traitement E008 inhibe la néoglucogenèse

Comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, le métabolisme du glycérol est modifié chez les rats ayant suivi un régime hyper gras. L'intensité de la néoglucogenèse à partir de ce composé et en présence d'octanoate est anormalement élevée. L'objectif de cette étude était de déterminer si le traitement E008 rétablissait l'intensité des différentes voies.



**Figure 51 : Effets du traitement E08 sur les flux métaboliques hépatiques de rats sous régime hyper gras.**

Les hépatocytes isolés de rats sous régime hyper gras (HFAT) et de rats ayant suivi le traitement E08 associé au régime (HFAT E08), à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) et avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15,

0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire les métabolites extracellulaires (Glucose, Lactate, Pyruvate) ont été mesurés dans le périculteur en sortie de chambre et permettent ainsi d'évaluer le flux total de glycérol métabolisé en équivalents à trois carbones par l'addition de 2 Glucose + 1 Lactate + 1 Pyruvate ( $J_{2G+L+P}$  (A)), le flux gluconéogénique ( $J_{Glucose}$  (B)), le flux glycolytique ( $J_{L+P}$  (C)) et le flux de corps cétoniques ( $J_{BOH+AcAc}$  (D)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=5$  pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

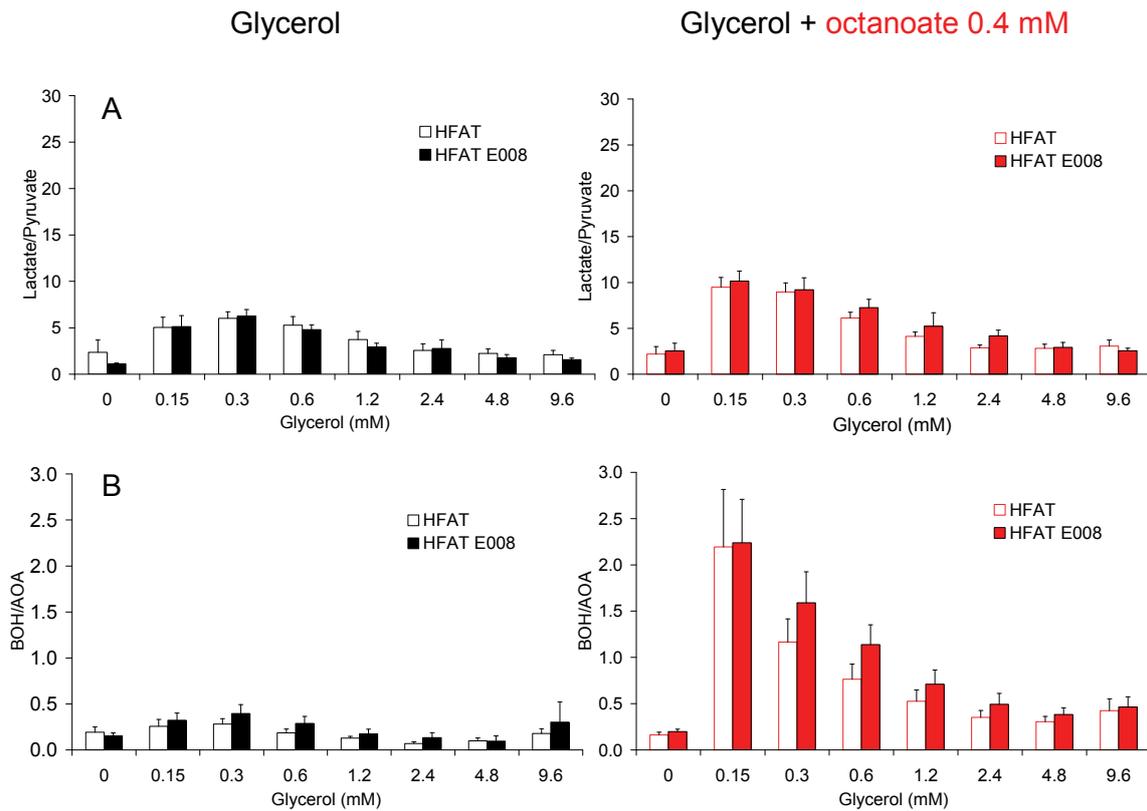
D'une manière générale, les variations de flux en fonction de la disponibilité en glycérol sont identiques entre les deux groupes d'animaux. En revanche, leur intensité est parfois différente. Le métabolisme du glycérol, estimé par la somme des flux en équivalents à trois carbones, est plus faible dans les cellules issues de rats traités par E008. Cette diminution du métabolisme du glycérol est principalement due à une inhibition marquée de l'intensité de la néoglucogénèse dans ces cellules. Ce flux est réduit de près de 25% (Figure 51 A et B). L'intensité de la glycolyse est également diminuée par le traitement E008 des animaux sous régime HFAT et contribue aussi à réduire le métabolisme du glycérol (Figure 51 C).

Ces effets ont été observés en présence de glycérol seul, mais également en présence d'octanoate même si l'effet dans ces conditions est moins marqué de par une intensité des flux beaucoup plus faible.

Comme pour l'étude précédente, nous avons estimé les potentiels rédox afin de révéler les changements éventuels de contrôle des voies métaboliques.

### 2.2.2.3 Effets du traitement E008 sur le contrôle des flux métaboliques

Les potentiels rédox cytosolique et mitochondrial ont été estimés par les rapports des flux lactate/pyruvate et hydroxybutyrate/acétoacétate respectivement.



**Figure 52 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox d'hépatocytes de rats sous régime hyper gras.**

Les hépatocytes isolés de rats sous régime hyper gras (HFAT) et de rats sous régime hyper gras associé au traitement E008 (HFAT E008) à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Lactate, Pyruvate, BOH et AcAc) ont été mesurés dans le périfusat en sortie de chambre permettant ainsi d'évaluer le potentiel rédox cytosolique (Lactate/Pyruvate (A)) et le potentiel rédox mitochondrial (BOH/AcAc (B)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=5 pour chaque groupe.

Quel que soit l'état stationnaire métabolique, les potentiels rédox cytosolique et mitochondrial sont identiques entre les cellules issues d'animaux traités ou non par E008 (Figure 52 A et B). Le changement d'intensité des voies métaboliques lié au traitement n'est donc pas la conséquence de modifications des potentiels rédox. Le contrôle des voies a donc lieu *via* un autre paramètre. Suite aux études menées sur les rats sous régime standard, nous avons émis l'hypothèse d'un contrôle sur la glycérol kinase *via* un potentiel phosphate abaissé. Ce postulat est reconduit sur ce type d'animaux. Ainsi, nous avons analysé les différents paramètres qui pourraient influencer les rapports de nucléotides adényliques.

	HFAT	HFAT E008
CS ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$70.4 \pm 2.0$	$63.5 \pm 1.9^*$
Complex I ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$27.9 \pm 2.5$	$14.6 \pm 1.8^*$
Complex II ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$46.7 \pm 2.1$	$44.7 \pm 5.2$
Complex IV ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$71.0 \pm 4.5$	$60.1 \pm 4.5$
ATPase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g prot}^{-1}$ )	$26.9 \pm 1.6$	$27.0 \pm 1.9$
Cytochromes a+a <sub>3</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	$122 \pm 10$	$122 \pm 21$
Cytochrome b (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	$279 \pm 14$	$264 \pm 30$
Cytochrome c (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	$119 \pm 7$	$111 \pm 9$
Cytochromes c+c <sub>1</sub> (pmol.mg prot <sup>-1</sup> )	$264 \pm 11$	$256 \pm 24$
GlyK ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$1.78 \pm 0.06$	$1.75 \pm 0.14$
cG3PdH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$27.09 \pm 2.95$	$23.50 \pm 3.02$
mG3PdH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$ )	$3.49 \pm 0.50$	$3.39 \pm 0.50$
HCDH ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ )	$331.1 \pm 30.9$	$365 \pm 22.0$

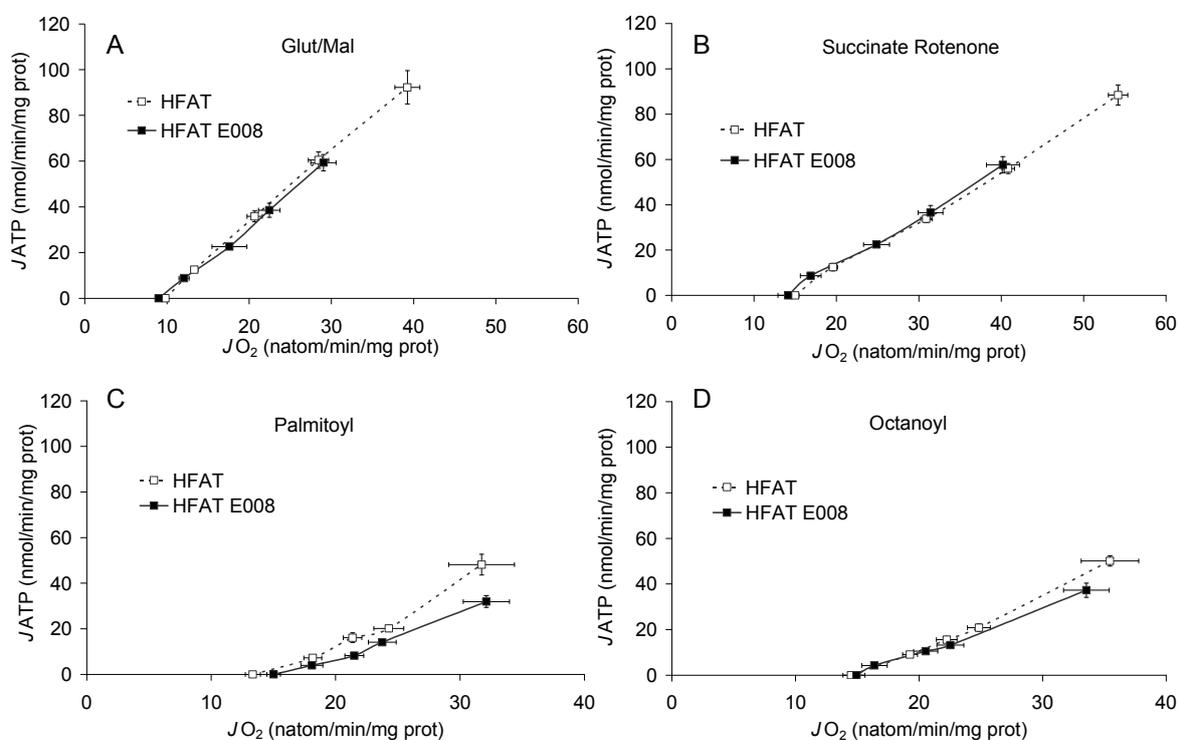
**Tableau 20 : Effets du traitement E008 sur les complexes de la chaîne respiratoire et les activités enzymatiques CS, GK, G3PdH et HCDH.**

Les activités citrate synthase (CS), glycérol kinase (GK), glycérol-3-phosphate déshydrogénases cytosolique (cG3PdH) et mitochondriale (mG3PdH), des complexes I, II et IV ont été évaluées à partir d'hépatocytes isolés éclatés par congélations successives et en présence de détergent. L'activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (HCDH) et ATPase et les études de la composition en cytochromes ont été effectuées sur mitochondries isolées. Les données sont présentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 rats pour chacun des deux groupes. \*, significativement différent entre les groupes sous régime hyper gras (HFAT) et sous régime hyper gras associé au traitement E008 (HFAT E008) avec  $p < 0.05$ .

Suite au traitement E008, l'activité citrate synthase est diminuée au sein des hépatocytes de rats traités. Ces cellules auraient de ce fait une densité mitochondriale plus faible (Pon et Schon 2007). Cependant, l'inhibition de l'activité spécifique du complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) est nettement réduite dans ces cellules (Tableau 20). La proportion d'inhibition de cette activité est plus importante que celle de l'activité citrate synthase. Autrement dit, ce n'est pas par une diminution du nombre de mitochondries que nous pouvons expliquer la totalité de l'inhibition de l'activité du complexe I. En plus de diminuer l'activité citrate synthase, le traitement induirait également une baisse de l'activité du complexe I. Si ce n'est pas le cas, nous pouvons considérer au moins deux types de population de mitochondries : une population à complexe I et une autre à

complexe II et proposer que seule la population dotée d'activité complexe I soit réduite suite au traitement. Cette hypothèse est la plus probable car elle permettrait également d'expliquer que l'activité complexe II (Succinate oxydase-ubiquinone réductase) soit maintenue au sein des cellules. Si ceci n'était pas le cas, nous aurions dû observer une diminution parallèle des différentes activités enzymatiques mitochondriales. Il faut noter également que l'activité ATPasique mais aussi les teneurs en cytochromes mesurées sur mitochondries isolées sont identiques entre les deux groupes (Tableau 20). Au final, il y aurait donc moins de mitochondries dans les hépatocytes de rats traités par E008 et avec une activité complexe I plus faible. Ceci pourrait expliquer la légère inhibition de respiration mesurée sur les hépatocytes en périfusion avec du glycérol pour substrat.

Aucune mesure de respiration à vitesse maximale n'a été réalisée à partir de préparations de mitochondries isolées de ces animaux. Ces mesures auraient pu confirmer ou infirmer ces hypothèses. En effet, à partir de mitochondries isolées, nous nous serions attendus à une diminution d'activité spécifique du complexe I et à une élévation de l'activité complexe II. Néanmoins, les mesures de rendement par rapport à l'oxygène établies sur mitochondries isolées nous permettent d'émettre quelques hypothèses.



**Figure 53 : Effets du traitement E008 sur le rendement par rapport à l'oxygène des mitochondries isolées de foie.**

La relation entre le flux respiratoire ( $JO_2$ ) et de synthèse d'ATP ( $JATP$ ) a été déterminée sur mitochondries isolées de foie en suspension (2 mg/ml) dans un tampon de respiration et en présence de 5 mM glutamate/2.5 mM malate (A), 5 mM succinate et 1.25  $\mu$ M rotenone (B), 100  $\mu$ M palmitoyl-carnitine (C) ou 100  $\mu$ M octanoyl-carnitine (D). Les variations d'intensité des flux  $JO_2$  et  $JATP$  ont été obtenues par additions de quantités croissantes d'hexokinase. Les valeurs sont présentées sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 rats pour chaque groupe.

En effet, la respiration maximale obtenue avec la dose la plus importante d'hexokinase, mais qui ne correspond pas forcément à la vitesse maximale de respiration, est plus faible avec les mitochondries issues de rats traités (Figure 53). Cette différence est également présente en succinate/roténone. Ainsi, si l'on considère que les hépatocytes de rats traités possèdent des mitochondries plus riches en complexes II, nous devrions obtenir une vitesse de respiration maximale supérieure en succinate. Ce n'est pourtant pas le cas, alors que l'activité complexe II mesurée sur cellules est identique pour une quantité de mitochondries restreinte. Il y aurait donc un contrôle supplémentaire qui inhiberait l'activité spécifique du complexe II *in situ*. Cet effet ne peut être situé sur les complexes III et IV car les respirations en acides gras ne sont pas affectées. *In situ*, le complexe II serait donc spécifiquement inhibé. Nous avons alors dosé les quinones qui pourraient contrôler l'activité de ce complexe au sein des mitochondries.

	HFAT	HFAT E008
Q9 red (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	116.7 $\pm$ 6.0	110.5 $\pm$ 6.3
Q10 red (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	27.7 $\pm$ 3.3	29.9 $\pm$ 6.5
Q9 ox. (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	6.3 $\pm$ 2.1	5.8 $\pm$ 3.0
Q10 ox (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	ND	ND
TOT (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	150.7 $\pm$ 9.6	146.2 $\pm$ 12.5
Q9 red/ox	30.0 $\pm$ 6.0	29.4 $\pm$ 5.4
$\alpha$ -Tocopherol (nmol.g liver <sup>-1</sup> )	23.0 $\pm$ 8.2	21.7 $\pm$ 1.9

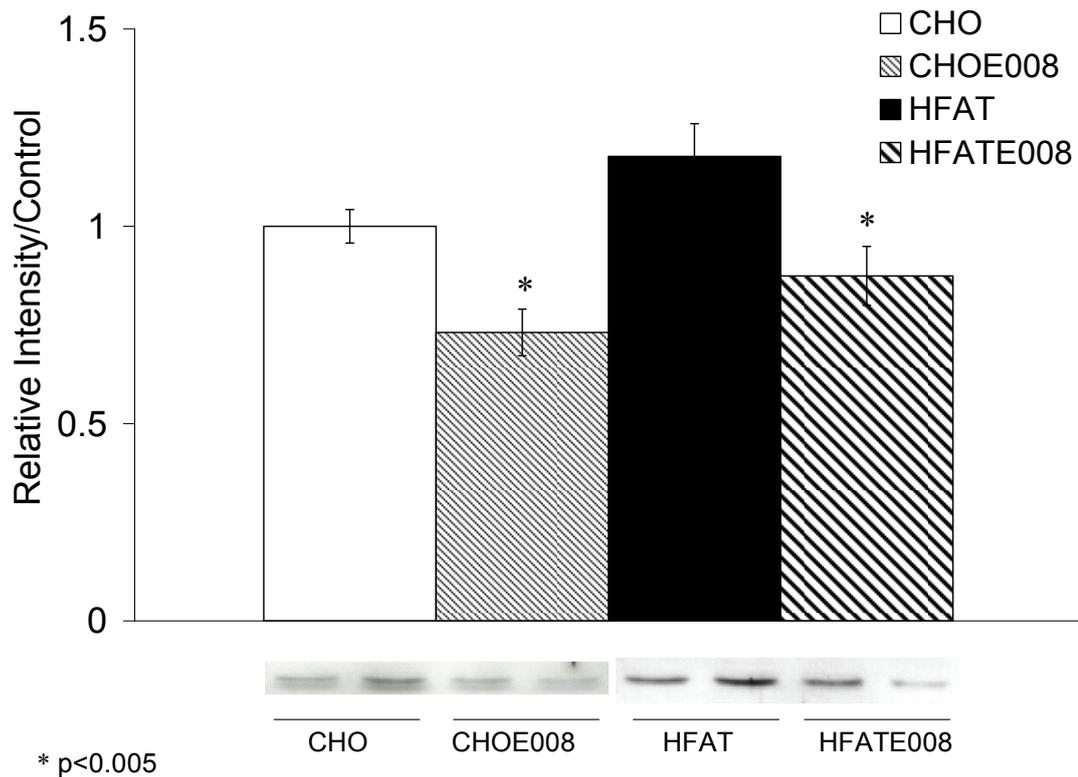
**Tableau 21 : Effets du traitement E008 sur les concentrations mitochondriales des quinones et de l' $\alpha$ -tocophérol.**

Les concentrations en  $\alpha$ -Tocophérol, en quinones 9 et 10 (Q9 et Q10) réduites et oxydées ont été déterminées à partir de bouts des foies. Les résultats sont exprimés en nmol.g wet liver<sup>-1</sup> sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 pour le groupe sous régime hyper gras (HFAT) et n=6 pour le groupe sous régime hyper gras associé au traitement E008 (HFAT E008). \*, significativement différent entre les deux groupes (p < 0.05).

Les concentrations des différentes quinones, mais aussi d' $\alpha$ -Tocophérol sont identiques entre les animaux traités ou non par E008. L'état rédox de celles-ci ne diffère pas davantage (Tableau 21). De ce fait, l'inhibition du complexe II ne peut être liée à un

changement de concentration ou de l'état rédox des quinones *in situ*. Par contre, les respirations maximales obtenues avec les acides gras sont identiques entre les groupes. De ce fait, l'ensemble des mitochondries capables d'oxyder les acides gras est aussi important dans les cellules de foies de rats traités ou non. Puisque les cellules de rats traités contiennent globalement moins de mitochondries, il y a donc un enrichissement des cellules de rats traités en mitochondries de ce type. Si tel est le cas, ces mitochondries pourraient, si elles contiennent des complexes II, maintenir l'activité complexe II mesurée sur cellules. Par contre, lorsque la mesure est réalisée sur mitochondries, nous n'observons pas d'élévation de respiration puisque ce complexe serait libre dans la membrane et non fonctionnel car non associé au complexe III en raison de sa compétition avec les ETF sur l'ensemble des quinones. Le traitement pourrait ainsi favoriser les interactions entre les ETF, les quinones et les complexes III (Parker et al. 2000).

Cependant, si les ETF sont plus importants et que la respiration mitochondriale n'est pas modifiée en présence d'acides gras, c'est qu'un contrôle supplémentaire a lieu. Ayant observé, sur mitochondries isolées de rats traités, que pour la même dose d'hexokinase utilisée, la respiration et le flux d'ATP étaient réduits, nous avons proposé une inhibition du système phosphorylant. Or, comme l'activité ATPasique mesurée sur ces mitochondries n'est pas modifiée suite au traitement, nous proposons une inhibition de l'adénine nucléotide translocase (ANT). L'activité de cette enzyme étant quasi impossible à mesurer, nous avons réalisé des westerns blots dirigés contre cette protéine.



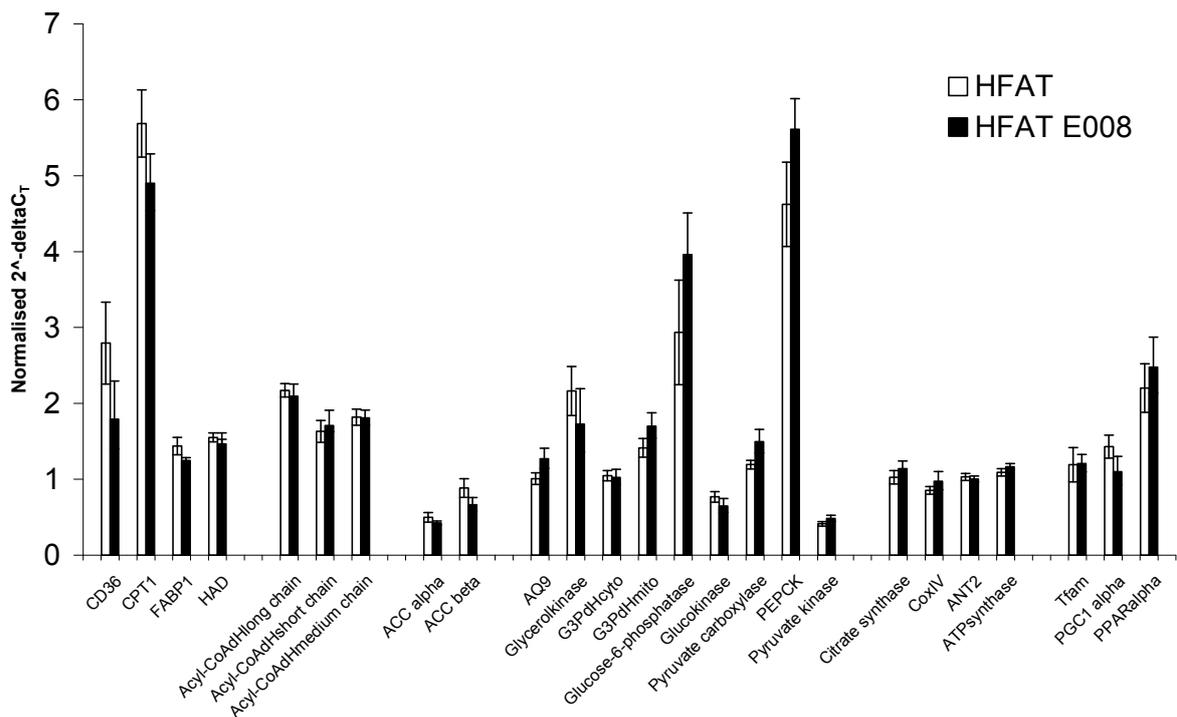
**Figure 54 : Effets du traitement E008 sur l'expression hépatique de l'ANT-2.**

Les westerns blots ont été réalisés à partir de bouts de foies de rats témoins ou sous régime hyper gras et associé ou non au traitement E008. Le niveau d'expression de l'ANT-2 a été rapporté à celui des rats témoins sous régime standard. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=8$  pour chaque groupe.

Ces résultats montrent une inhibition de l'expression de l'ANT-2 de plus de 25 % dans les foies de rats sous traitement E008, qu'ils soient sous régime standard ou sous régime hyper gras (Figure 54). Nous proposons que cet effet marqué du traitement sur le système phosphorylant change le contrôle de l'oxydation phosphorylante selon le type de substrats oxydés. Si l'activité de cette protéine très contrôlante est déjà réduite par l'inhibition *via* les acyl-CoA, alors l'inhibition par la diminution de son expression serait cachée et inversement. Des études de contrôle de l'oxydation phosphorylante sur mitochondries isolées ont en effet montré que le palmitoyl-CoA inhibe fortement l'ANT (Ciapaite et al. 2006). Cette même étude montre aussi que le contrôle de l'ANT sur la consommation d'oxygène est modéré sur cellule ( $C=0.13$ ). Ceci expliquerait pourquoi l'inhibition de la respiration induite par le traitement n'est que modeste. En revanche, le contrôle de l'ANT sur les rapports des nucléotides adényliques est très élevé. Il est de -0.70 sur le rapport ATP/ADP intra-mitochondrial et de 0.23 sur le rapport extra-mitochondrial.

Ainsi, nous proposons que l'inhibition de l'ANT, liée au traitement des animaux, induit des perturbations profondes des rapports des nucléotides adényliques qui modifieraient le contrôle des voies métaboliques. Ce paramètre n'a pu être mesuré à partir de ces animaux traités et sous régime depuis 8 semaines. Néanmoins, si le composé est capable d'agir sur l'expression de l'ANT, il est possible que ce dernier puisse changer l'activité de l'enzyme par action directe. Des mesures de concentration des nucléotides ont été réalisées sur hépatocytes incubés en présence d'E008 pendant 40 minutes afin de permettre une action sur l'activité de l'ANT et son expression si son renouvellement est rapide. Les résultats sont présentés dans la troisième partie de ce manuscrit.

Comme dans l'étude précédente, nous avons analysé la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme afin de déterminer si ce traitement avait un effet transcriptionnel.



**Figure 55 : Effets du traitement E008 des rats sous régime hyper gras sur la transcription de gènes cibles.**

Les ARN totaux ont été extraits à partir de bouts de foie. Les ARNm ont été reverse-transcrits. Des PCR en temps réels ont été réalisées sur les ADNc en utilisant des amorces spécifiques de gènes de transporteurs, d'enzymes clefs du métabolisme, ou de facteur de transcription. Les quantités d'ARNm ont été normalisées par rapport à celle de l'ARNm du gène ubiquitaire stable de la phosphoprotéine P0 constitutive des ribosomes (Arbp1). La quantification a été réalisée par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Les résultats sont exprimés en valeurs relatives à celles du groupe témoin sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  pour les groupes sous régime hyper gras (HFAT) et sous régime hyper gras associé au traitement E008 (HFAT E008).

Cette analyse par RT-PCR sur les animaux sous régime hyper gras n'a pas mis en évidence de modification de transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du glycérol et de l'octanoate suite au traitement (Figure 55). La même observation avait été faite sur les animaux sous régime standard.

La transcription de l'isoforme 2 de l'ANT n'est pas sous-exprimée chez les rats ayant suivi le traitement antidiabétique. Ainsi, nous pouvons proposer que l'inhibition de l'expression de cette enzyme soit liée à une modification de sa traduction ou de sa vitesse de dégradation. Si tel est le cas, ceci permettrait un effet rapide du nouveau composé, qui concorderait avec les effets observés en 10 minutes sur hépatocytes incubés en présence de E008 (Cf. partie III du manuscrit).

Comme dans l'étude précédente où nous avons observé une modification particulière des compositions lipidiques, nous avons également analysé les profils d'acides gras plasmatiques hépatiques et mitochondriaux des animaux sous régime hyper gras et associé ou non au traitement E008.

FA %	Plasma		liver		liver mitochondria	
	HFAT	HFAT E008	HFAT	HFAT E008	HFAT	HFAT E008
14:0	0.36 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.00
16:1 n-9	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00
16:1 n-7	0.63 ± 0.01	0.66 ± 0.03	0.45 ± 0.06	0.33 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.00
16:0	21.47 ± 0.20	21.82 ± 0.45	23.69 ± 0.60	23.66 ± 0.61	14.40 ± 0.30	13.56 ± 0.34
18:3 n-6	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.20 ± 0.01	0.14 ± 0.02 *	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
18:3 n-3	0.30 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.05	0.07 ± 0.00	0.06 ± 0.00
18:2 n-6	18.64 ± 0.41	18.00 ± 0.29	15.06 ± 0.27	14.40 ± 0.70	12.56 ± 0.35	12.68 ± 0.39
18:1 n-9	20.31 ± 0.60	24.31 ± 0.87 *	25.85 ± 2.08	27.27 ± 3.87	7.54 ± 0.43	6.73 ± 0.35
18:1 n-7	1.48 ± 0.02	1.65 ± 0.02	1.52 ± 0.07	1.60 ± 0.10	1.28 ± 0.02	1.38 ± 0.07
18:0	16.02 ± 0.49	15.16 ± 0.42	17.69 ± 1.49	16.88 ± 2.56	32.73 ± 0.36	32.85 ± 0.67
20:5 n-3	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
20:4 n-6	16.99 ± 0.66	14.10 ± 0.86 *	11.73 ± 0.78	11.14 ± 2.12	24.64 ± 0.33	25.52 ± 0.29
20:3 n-6	1.12 ± 0.04	1.01 ± 0.06	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.01	2.19 ± 0.05	2.38 ± 0.05 *
20:3 n-3	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.03
20:1 n-9	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.01 *	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.03	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
20:1 n-7	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
20:0	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
22:6 n-3	0.92 ± 0.05	0.78 ± 0.05	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	2.77 ± 0.15	2.99 ± 0.21
22:5 n-3	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	1.52 ± 0.10	1.38 ± 0.25	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.02
22:5	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.49 ± 0.03
22:4 n-6	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.19 ± 0.00	0.19 ± 0.01
<b>Sum (n-3) %</b>	<b>1.73 ± 0.05</b>	<b>1.61 ± 0.05</b>	<b>2.25 ± 0.10</b>	<b>2.10 ± 0.29</b>	<b>3.51 ± 0.15</b>	<b>3.77 ± 0.24</b>
<b>Sum (n-6) %</b>	<b>37.00 ± 0.65</b>	<b>33.38 ± 0.88</b>	<b>27.41 ± 0.70</b>	<b>27.11 ± 1.76</b>	<b>39.62 ± 0.35</b>	<b>40.81 ± 0.28</b>
<b>(n-3)/(n-6)</b>	<b>0.05 ± 0.00</b>	<b>0.05 ± 0.00</b>	<b>0.08 ± 0.00</b>	<b>0.08 ± 0.01</b>	<b>0.09 ± 0.00</b>	<b>0.09 ± 0.00</b>
<b>Sum MUFA %</b>	<b>22.97 ± 0.62</b>	<b>27.20 ± 0.88 *</b>	<b>28.26 ± 2.12</b>	<b>29.61 ± 3.99</b>	<b>9.14 ± 0.44</b>	<b>8.42 ± 0.39</b>
<b>saturated fatty acid %</b>	<b>37.96 ± 0.50</b>	<b>37.45 ± 0.33</b>	<b>41.62 ± 1.61</b>	<b>40.73 ± 2.02</b>	<b>47.25 ± 0.13</b>	<b>46.50 ± 0.49</b>
<b>Total #</b>	<b>3201.9 ± 137.5</b>	<b>3911.8 ± 252.7</b>	<b>78.0 ± 6.9</b>	<b>89.45 ± 15.98</b>	<b>191.5 ± 6.3</b>	<b>192.76 ± 11.2</b>

Tableau 22 : Effets du traitement sur les compositions lipidiques plasmatiques, hépatiques et mitochondriales de rats sous régime hyper gras.

Les données sont exprimées en pourcentage par rapport aux acides gras totaux sous la forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  pour le groupe sous régime hyper gras (HFAT) et  $n=6$  pour le groupe ayant suivi également le traitement E008 (HFAT E008). Le total est exprimé en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  pour le plasma, en  $\text{ng}/\mu\text{g}$  pour le foie et en  $\text{ng}/\text{mg}$  de protéines mitochondriales pour les mitochondries. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

Cette analyse n'a pas révélé de différence significative entre les deux groupes d'animaux (Tableau 22). Ainsi, sur ce modèle d'animaux, le traitement E008 n'a pas d'effet sur la composition membranaire et certainement pas sur la fluidité des membranes. Dans ce cas, ce type d'effet ne peut pas expliquer l'action du nouveau composé.

L'étude de l'effet du traitement sur les animaux ayant suivi un régime hyper gras confirme quelques hypothèses émises dans l'étude précédente mais en élimine d'autres. Dans l'ensemble, le traitement induit une inhibition du système phosphorylant qui passe par une diminution d'expression de l'ANT dans les deux cas. Ceci induirait une diminution des rapports ATP/ADP et, par conséquent, des modifications profondes du contrôle des voies métaboliques.

Un effet sur le complexe I est également proposé mais rien ne permet de déterminer le mode d'action précis du composé sur cette protéine. Les effets observés sur l'ANT et les capacités de rétention calcique pourraient être intriqués, car l'ANT, tout comme le complexe I, sont connus pour participer au phénomène d'ouverture du pore de transition de perméabilité.

Par ailleurs, l'hypothèse d'un enrichissement des cellules en une sous-population mitochondriale particulière suite au traitement E008 tient toujours. En effet, sur les rats sous régime standard, nous avons proposé une augmentation de densité mitochondriale avec enrichissement en mitochondries dotées de complexes II et d'ETF préférentiellement.

Sur les rats sous régime enrichi en graisses, le traitement E008 provoque une diminution du nombre de mitochondries associée à un enrichissement en organites à activité ETF-QO et complexe II. De plus, puisque les rats sous régime hyper gras ont une densité mitochondriale réduite, la biogénèse de ces organites est certainement perturbée chez ces animaux. Ainsi, si le traitement E008 induit une inhibition spécifique de la biogénèse de mitochondries à activité complexe I, ces animaux seraient incapables de compenser cette baisse par une hausse de production de mitochondries à complexe II. Finalement, les hépatocytes des animaux sous régime enrichi en graisses et sous traitement E008 ont une densité mitochondriale très faible qui se confirme par la mesure d'activité

citrate synthase. L'ensemble aboutirait à un défaut de production d'ATP responsable de la diminution du potentiel phosphate participant à la réorientation des flux métaboliques induite par le traitement.

### 2.3 Effets du traitement E008 sur les rats GK

Après avoir testé l'efficacité du produit sur des rats témoins et sur des rats sous régime enrichi en graisses développant un syndrome métabolique, nous avons testé le composé sur des rats Goto-Kakizaki. Ces animaux sont connus pour contracter un diabète de type II au cours de leur développement et constituent ainsi un modèle d'étude particulièrement intéressant pour notre composé pharmacologique (Portha, Serradas et al. 1991; Alvarez, Bailbe et al. 2000).

Dans cette étude, nous nous sommes limités à l'analyse de l'effet d'un traitement E008 sur les flux métaboliques hépatiques de ces animaux. En effet, les voies métaboliques sont particulièrement affectées chez les rats GK et notre objectif était de voir si E008 pouvait les restaurer.

Le traitement des animaux pendant 3 semaines à une dose de 100 mg/kg/j n'a pas modifié leur glycémie à jeun anormalement élevée mais a diminué leur insulinémie. Comme sur les rats sous régime enrichi en graisses, le traitement améliore le signal insulinique ou induit une régulation métabolique se substituant à celui-ci. En effet, un plus faible taux d'insuline plasmatique suffit pour maintenir un même taux de glucose circulant (Tableau 23).

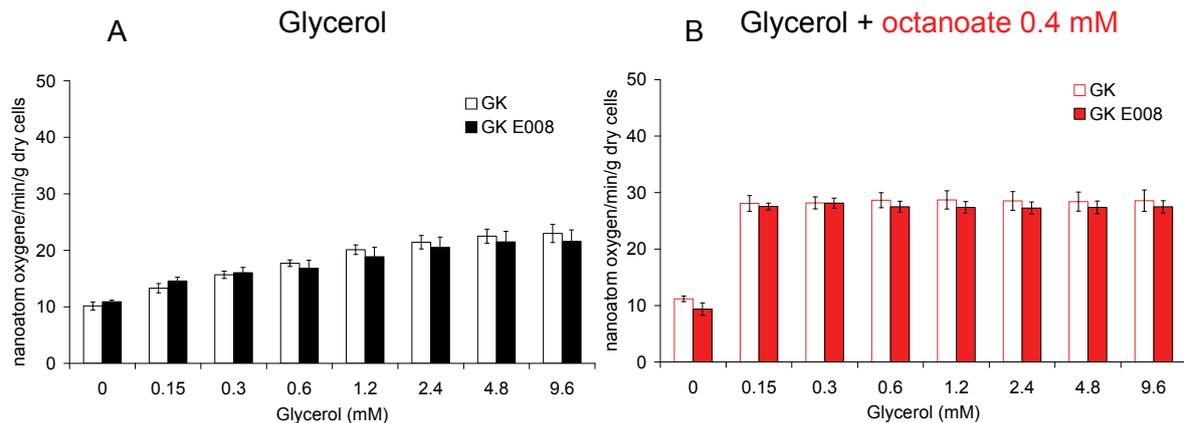
	GK	GK E008
Glycémie (mM)	8.65 ± 0.49	8.78 ± 0.71
Insuline (ng/ml)	2.14 ± 0.25	1.41 ± 0.15*

**Tableau 23 : Effets du traitement E008 sur la glycémie et l'insulinémie des rats GK.**

Le sang des animaux à jeun depuis 24 h a été prélevé dans l'aorte abdominale. Le glucose et l'insuline ont été dosés sur le plasma. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ± SEM pour n=6 par groupe.

### 2.3.1 Effets du traitement E008 sur la respiration cellulaire

La respiration cellulaire a été mesurée en périfusion d'hépatocytes en utilisant comme substrats du glycérol en concentration croissante de 0.15 à 9.6 mM additionné ou non d'octanoate 0.4 mM.



**Figure 56 : Effets de 3 semaines de traitement E008 des rats GK sur la respiration cellulaire.**

Les hépatocytes isolés de rats Goto Kakizaki ayant suivi (GK E008) ou non (GK) le traitement E008, à jeun depuis 24 heures, ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>) et avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, la consommation d'oxygène a été mesurée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=6 pour chaque groupe.

La consommation d'oxygène des hépatocytes isolés à partir de rats GK est proche de celle obtenue avec des cellules de rats témoins (Cf partie 2.1.3). Elle est d'environ 10 nanoatom oxygen/min/g dry cells en absence de substrat exogène, puis augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration en glycérol pour atteindre 23 nanoatom oxygen/min/g dry cells avec 9.6 mM de glycérol. En présence de 0.4 mM d'octanoate, la respiration est maximale quelle que soit la disponibilité en glycérol avec une consommation d'oxygène de 30 nanoatom/min/g dry cells (Figure 56).

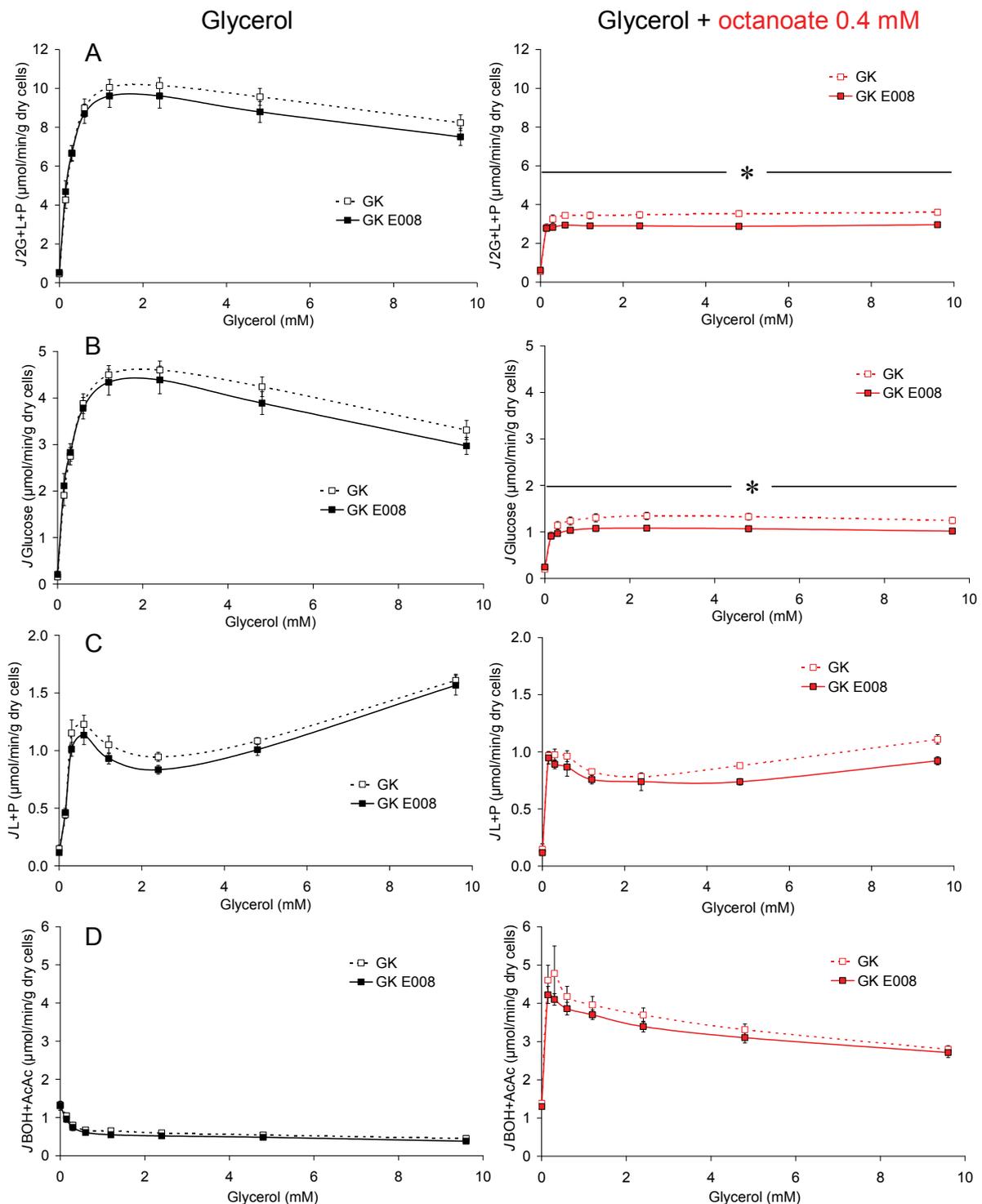
L'expérience similaire réalisée avec des hépatocytes de rats traités par E008 a donné exactement les mêmes profils de respiration (Figure 56). Le traitement E008 n'induit donc pas d'inhibition de respiration chez ces animaux.

### 2.3.2 Effets du traitement E008 sur les flux métaboliques

L'analyse des flux métaboliques hépatiques a été réalisée comme dans les études précédentes en périfusion d'hépatocytes.

Le flux de glycérol métabolisé est anormalement élevé de 15% chez les rats GK en présence de glycérol seul. Lorsque de l'octanoate est ajouté au glycérol, son métabolisme est augmenté de 30% par rapport aux animaux témoins (Cf. partie 2.1.3). Ces augmentations du métabolisme du glycérol sont principalement dues à une hausse de la voie de la néoglucogenèse puisque les autres voies ne sont pas affectées.

Le traitement E008 des animaux ne réduit que légèrement le métabolisme anormalement élevé du glycérol lorsque l'expérience est réalisée en l'absence d'acide gras. Par contre, lorsque de l'octanoate est fourni aux cellules, l'utilisation du glycérol est nettement inhibée par le traitement (Figure 57 A). Cette baisse du flux de glycérol est due à une inhibition de 15% de la néoglucogenèse (Figure 57 B).

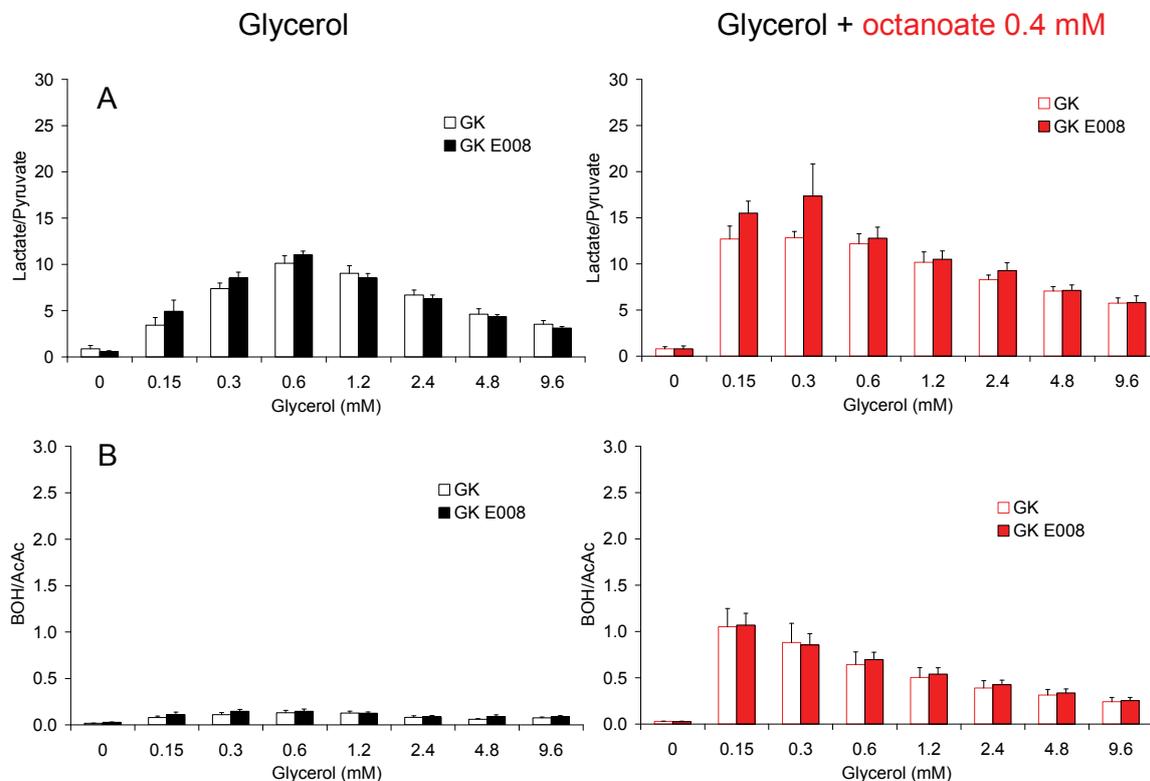


**Figure 57 : Effets du traitement E08 sur les flux métaboliques hépatiques des rats GK.**

Les hépatocytes isolés de rats GK ayant suivi (GK E08) ou non (GK) le traitement E08, à jeun depuis 24 heures ont été périfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Glucose, Lactate, Pyruvate) ont été mesurés dans le périfusat en sortie de chambre et permettent ainsi d'évaluer le flux total de glycérol métabolisé en équivalents à trois carbones par l'addition de 2 Glucose + 1 Lactate + 1 Pyruvate ( $J_{2G+L+P}$  (A)), le flux gluconéogénique ( $J_{\text{Glucose}}$  (B)), le

flux glycolytique ( $J_{L+P}$  (C)) et le flux de corps cétoniques ( $J_{BOH+AcAc}$  (D)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  pour chaque groupe. \*, significativement différent entre les deux groupes avec  $p<0.05$ .

Comme dans les autres modèles, le traitement E008 diminue la production hépatique de glucose. Ici, cette diminution est révélée uniquement en présence d'acides gras, lorsque le potentiel rédox est élevé *via* la  $\beta$ -oxydation et le flux de glucose relativement faible. Puisqu'une augmentation du potentiel rédox plus importante en présence d'octanoate dans les cellules de rats traités pourrait expliquer la diminution de l'intensité de la voie de la néoglucogenèse, nous avons analysé ce paramètre.



**Figure 58 : Effets du traitement E008 sur l'état rédox des hépatocytes de rats GK.**

Les hépatocytes isolés de rats GK ayant suivi (GK E008) ou non (GK) le traitement E008, à jeun depuis 24 heures ont été pérfusés avec du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>), avec des concentrations croissantes de glycérol (0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8 et 9.6 mM) et en l'absence (panel de gauche en noir) ou en présence d'octanoate 0.4 mM (panel de droite en rouge). Pour chaque état stationnaire, les métabolites extracellulaires (Lactate, Pyruvate, BOH et AcAc) ont été mesurés dans le pérfusat en sortie de chambre permettant ainsi d'évaluer le potentiel rédox cytosolique (Lactate/Pyruvate (A)) et le potentiel rédox mitochondrial (BOH/AcAc (B)). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  pour chaque groupe.

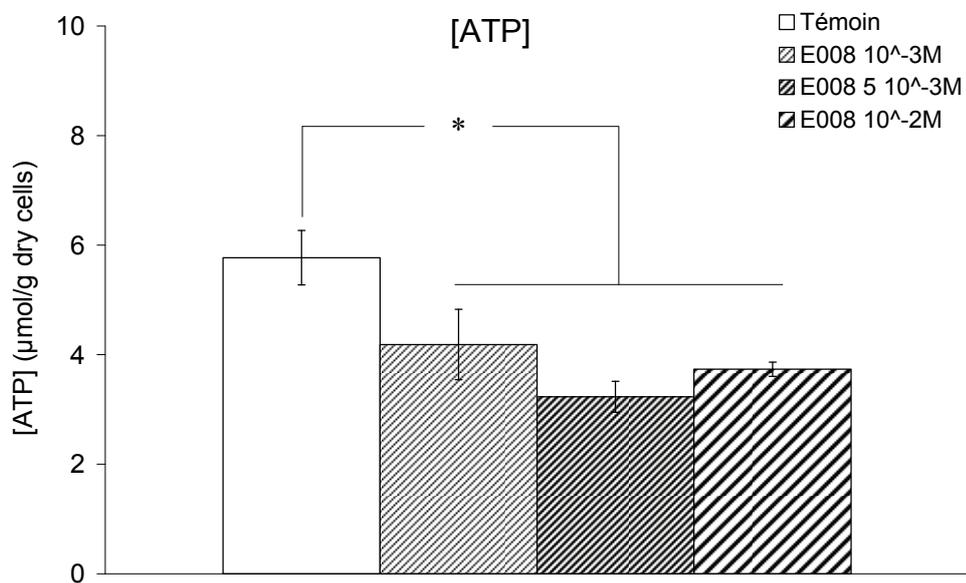
Les profils d'évolution des potentiels rédox en fonction de la concentration de glycérol sont exactement les mêmes que ceux obtenus avec les animaux témoins. Le traitement des rats GK par le composé E008 ne modifie pas davantage ce paramètre (Figure 58). De ce fait, la modification des flux induite par le traitement ne s'explique pas par une variation de potentiel rédox.

Comme dans les autres modèles, nous proposons que la diminution de la néoglucogenèse soit liée à une diminution de potentiel phosphate, mais dont la causalité n'a pas été recherchée dans cette étude. Une fois de plus, dans ce modèle animal particulier, l'action du nouveau composé semble avoir des conséquences variables selon le type de substrats métabolisés qui s'expliquent certainement par son action sur le système phosphorylant.

### 3 Effets de E008 sur le statut énergétique hépatique et l'activation de l'AMPK

Dans les premières parties de ce manuscrit, nous suggérons que le composé E008 provoque une diminution du potentiel phosphate dans les hépatocytes qui aurait pour conséquence de réduire l'intensité de la néoglucogenèse sans affecter la glycolyse. N'ayant pu mesurer ce paramètre avec le modèle d'étude précédent sur les hépatocytes de rats traités par la substance médicamenteuse, nous avons analysé les rapports des nucléotides adényliques sur des hépatocytes isolés de rats témoins mais incubés en présence de E008.

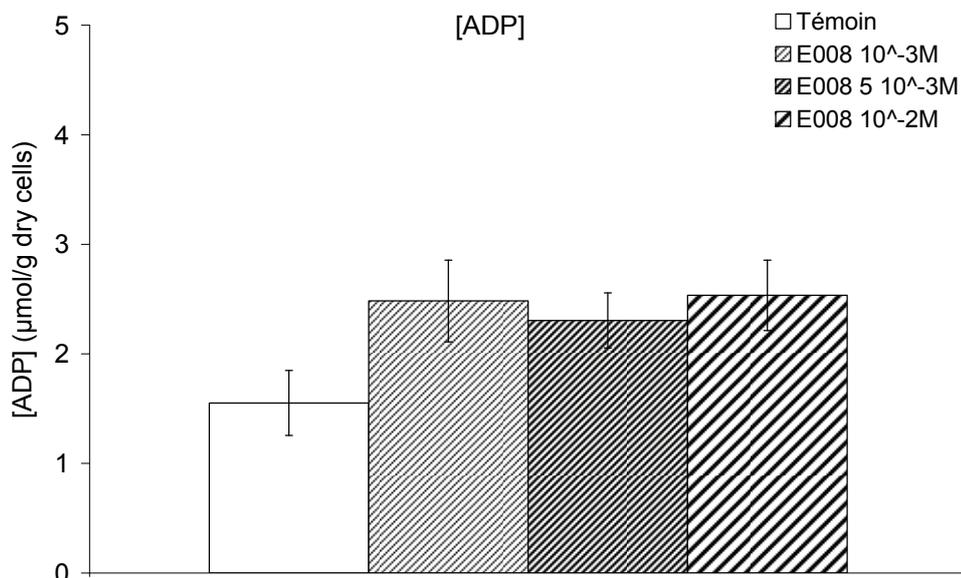
#### 3.1 Effets de E008 sur les concentrations cytosoliques des nucléotides adényliques



**Figure 59 : Effets du composé E008 *in vitro* sur la concentration en ATP cytosolique.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins, à jeun depuis 24h, ont été incubés à 10 mg dry cells/ml en présence de lactate+pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations de E008. La concentration d'ATP cytosolique a été déterminée par HPLC après séparation des fractions cytosolique et mitochondriale. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=6 pour chaque condition. L'expérience a été renouvelée 3 fois. \*, significativement différent entre les groupes avec p<0.05.

Avec chaque dose d'E008 utilisée, la concentration d'ATP cytosolique est diminuée après 40 minutes d'incubation des hépatocytes (Figure 59). L'effet du composé est donc présent dès 1 mM et n'est pas dépendant de la concentration du produit.

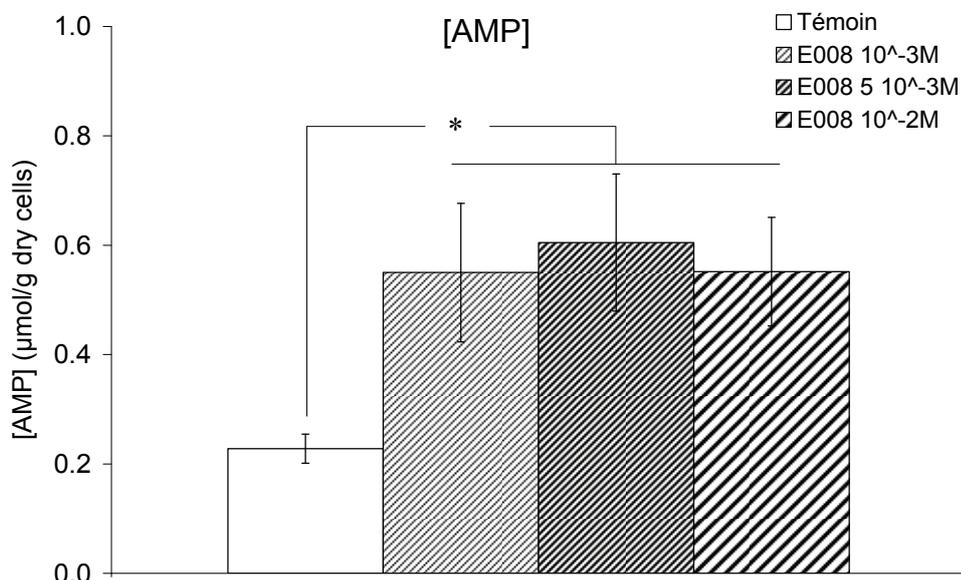


**Figure 60 : Effets du composé E008 *in vitro* sur la concentration en ADP cytosolique.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins, à jeun depuis 24h, ont été incubés à 10 mg dry cells/ml en présence de lactate+pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations de E008. La concentration d'ADP cytosolique a été déterminée par HPLC après séparation des fractions cytosolique et mitochondriale. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec  $n=6$  pour chaque condition. L'expérience a été renouvelée 3 fois.

Par ailleurs, les concentrations d'ADP cytosoliques sont légèrement augmentées par 40 minutes d'incubation en présence d'E008. De la même manière, ce phénomène ne dépend pas de la concentration du produit (Figure 60).

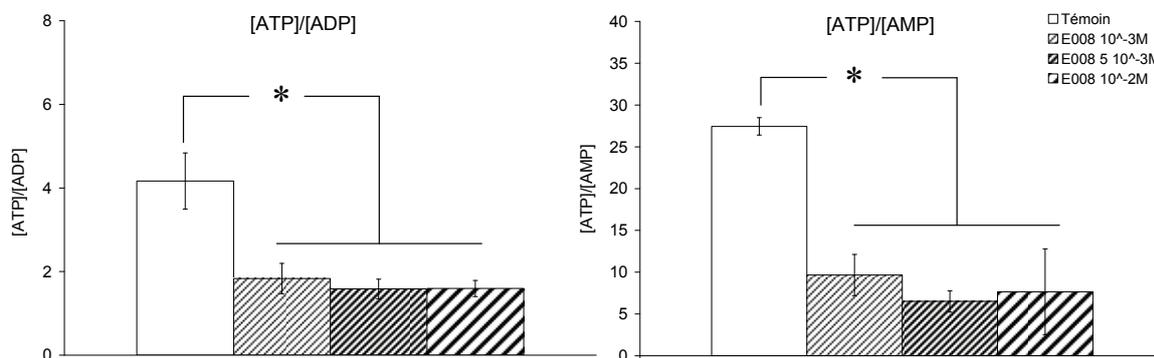
Puisque les concentrations d'ATP et d'ADP sont modifiées par l'incubation des cellules avec le nouveau composé E008, nous avons également dosé la concentration cytosolique d'AMP. En effet, l'AMP est majoritairement produit par la réaction catalysée par l'adénylate kinase, à savoir la synthèse d'une molécule d'AMP et d'ATP à partir de deux molécules d'ADP. Ainsi, la concentration d'AMP est particulièrement dépendante de la concentration d'ADP.



**Figure 61 : Effets du composé E008 *in vitro* sur la concentration en AMP cytosolique.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins, à jeun depuis 24h, ont été incubés à 10 mg dry cells/ml en présence de lactate+pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations de E008. La concentration d'AMP cytosolique a été déterminée par HPLC après séparation des fractions cytosolique et mitochondriale. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 pour chaque condition. L'expérience a été renouvelée 3 fois. \*, significativement différent entre les groupes avec  $p < 0.05$ .

La concentration d'AMP est significativement augmentée dans le compartiment cytosolique lorsque les cellules sont incubées en présence d'E008 (Figure 61).



**Figure 62 : Effets du composé E008 sur les rapports des nucléotides adéniques *in vitro*.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins, à jeun depuis 24h, ont été incubés à 10 mg dry cells/ml en présence de lactate+pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations de E008. Les concentrations d'ATP, d'ADP et d'AMP cytosolique ont été déterminées par HPLC après séparation des fractions cytosolique et mitochondriale. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM avec n=6 pour chaque condition. L'expérience a été renouvelée 3 fois. \*, significativement différent entre les groupes avec  $p < 0.05$ .

En calculant les rapports ATP/ADP et ATP/AMP, nous constatons qu'ils sont réduits de moitié lorsque les hépatocytes sont incubés en présence d'E008 (Figure 62). Finalement, le composé a des conséquences drastiques sur les rapports des nucléotides adényliques qui constituent la « jauge » de l'état énergétique cellulaire. Le composé provoque donc une diminution du rapport ATP/ADP. Ce résultat concorde avec l'hypothèse d'inhibition du système phosphorylant et la diminution du potentiel phosphate que nous avons suggérée dans la seconde partie de ce manuscrit.

### 3.2 Effets de E008 sur les concentrations mitochondriales des nucléotides adényliques

La diminution de la concentration d'ATP et l'augmentation de celle d'ADP et d'AMP au niveau cytosolique pouvant être la conséquence d'un défaut de transfert d'énergie cellulaire entre les compartiments ou d'un défaut de production d'ATP, nous avons alors dosé les concentrations des nucléotides adényliques dans la fraction mitochondriale pour tenter de trancher entre les deux hypothèses.

Conditions	MITOCHONDRIE			
	Basale	E008 10-3M	E008 5*10-3M	E008 10-2M
<b>ATP</b>	3,7 ± 0,3	2,7 ± 0,2	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,3
<b>ADP</b>	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,8 ± 0,1*	3,5 ± 0,2*
<b>AMP</b>	0,44 ± 0,03	0,52 ± 0,06	0,59 ± 0,04*	0,64 ± 0,04*
<b>ATP+ADP+AMP</b>	6,1 ± 0,3	5,4 ± 0,2	6,4 ± 0,3	7,2 ± 0,3*
<b>ATP/ADP</b>	1,99 ± 0,25	1,31 ± 0,18*	1,08 ± 0,15*	0,90 ± 0,12*
<b>ATP/AMP</b>	8,9 ± 1,1	5,9 ± 1,1*	5,5 ± 0,9*	5,2 ± 0,9*

**Tableau 24 : Effets du composé E008 sur les concentrations mitochondriales des nucléotides adényliques *in vitro*.**

Les hépatocytes isolés de rats témoins, à jeun depuis 24h, ont été incubés à 10 mg dry cells/ml en présence de lactate-pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations de E008. Les concentrations d'ATP, d'ADP et d'AMP mitochondriales ont été déterminées par HPLC après séparation des fractions cytosolique et mitochondriale. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM avec n=6 pour chaque condition. L'expérience a été renouvelée 3 fois. \*, significativement différent entre les groupes avec p<0.05.

Les dosages des nucléotides dans la fraction mitochondriale montrent une diminution de la concentration d'ATP et une élévation des concentrations d'ADP et d'AMP. Ceci a pour conséquence de diminuer les rapports ATP/ADP et ATP/AMP (Tableau 24). Avec ces résultats, nous pouvons conclure que le composé E008 induit un déficit de production d'ATP dans les cellules *in vitro*.

Des études menées au laboratoire dans les mêmes conditions d'expérimentation ont montré que le composé E008 inhibe la respiration cellulaire *in vitro* (AL. Borel) Toutefois, ces mêmes études montrent que l'addition d'un découplant (DNP) lève en partie l'inhibition de la respiration. Ceci traduit le fait que le composé E008 provoque un effet inhibiteur sur la respiration en agissant à la fois sur le système phosphorylant mais aussi sur la chaîne respiratoire. Avec ces données, nous suggérons que le composé, *in vitro*, provoque une diminution des rapports des nucléotides adényliques par inhibition concomitante de la chaîne respiratoire et du système phosphorylant. Ainsi, un défaut de transfert d'énergie entre cytosol et mitochondries par l'ANT ne peut être observé dans cette situation.

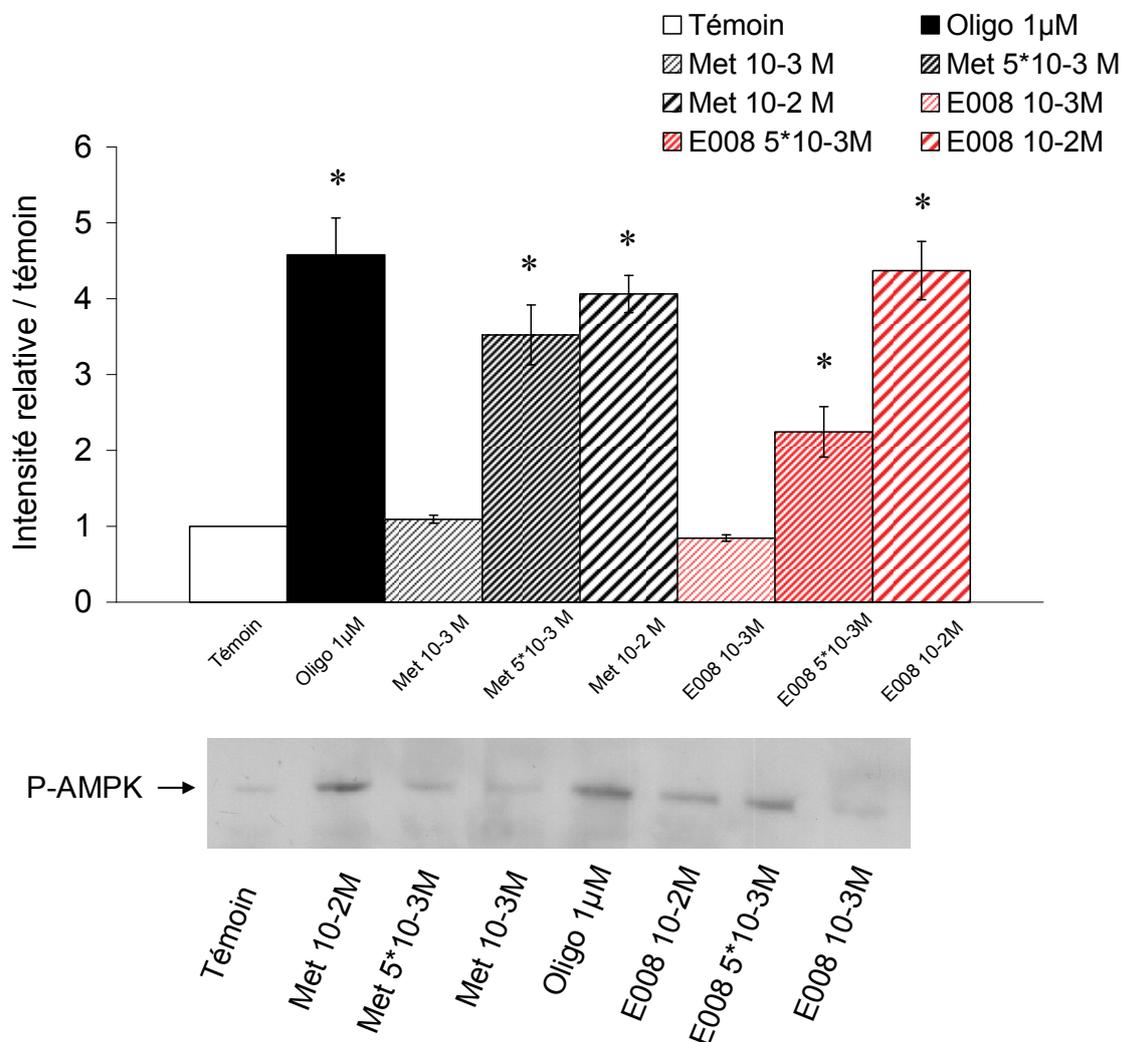
L'analyse des concentrations des nucléotides adényliques dans des hépatocytes incubés en présence d'E008 montre clairement une baisse des rapports ATP/ADP et ATP/AMP. Une chute de ces rapports est normalement responsable de l'activation de l'AMPK. Ainsi, nous avons analysé le niveau de phosphorylation de l'AMPK dans ces hépatocytes.

### **3.3 Effets de E008 sur l'activation de l'AMPK**

L'AMPK est une protéine kinase hétérotrimérique constituée d'une sous-unité catalytique ( $\alpha$ ) et de deux sous-unités régulatrices ( $\beta$  et  $\gamma$ ) (Hardie 2007). Considérée comme la « jauge » métabolique cellulaire, l'AMPK est activée par des changements de concentration des nucléotides adényliques, en particulier par une chute de la concentration d'ATP et la hausse d'AMP qui en résulte. En présence de concentration suffisante d'AMP, l'AMPK est phosphorylée sur la Thr<sup>172</sup> localisée sur la boucle d'activation de la sous-unité catalytique. Puisque l'incubation des cellules avec le composé E008 provoque des

changements drastiques des concentrations de nucléotides, nous avons fait l'hypothèse qu'il induise également une activation de l'AMPK. Disposant d'anticorps spécifiques de la forme phosphorylée de l'AMPK, nous avons réalisé quelques westerns blots à partir des cellules incubées.

Dans cette étude, les hépatocytes isolés à partir de rats témoins ont été incubés avec différentes concentrations de E008 ou de Metformine ( $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  M) pendant 40 minutes. Nous avons utilisé de l'oligomycine et de la Metformine, bien connus pour activer l'AMPK, comme contrôles positifs (Zhou et al. 2001; Guigas et al. 2006).

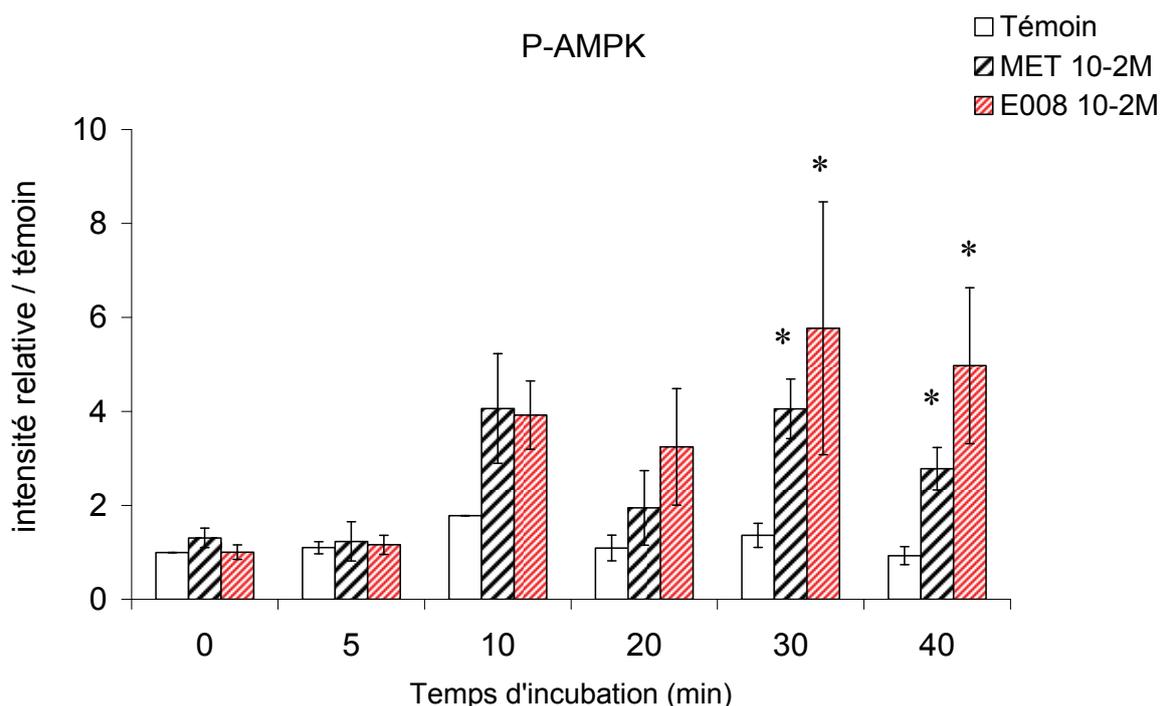


**Figure 63 : Effets de l'incubation des hépatocytes en présence de E008 sur l'état de phosphorylation de l'AMPK.**

Les hépatocytes isolés ont été incubés à 10 mg dry cells/ml pendant 40 minutes en présence de lactate et de pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations d'E008, de Metformine ou d'oligomycine. 25 µg de

protéines ont été déposés pour la réalisation des westerns blots. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. \*, significativement différent par rapport à la condition témoin avec  $p < 0.05$ .

L'analyse des westerns blots montre une augmentation de la quantité d'AMPK phosphorylée dans les hépatocytes incubés en présence d'oligomycine ou de Metformine à partir de 5 mM. Cette augmentation est également obtenue par incubation des cellules en présence d'E008 à partir de 5 mM (Figure 63). Comme la Metformine ou l'oligomycine, E008 est donc capable d'activer l'AMPK en 40 minutes.

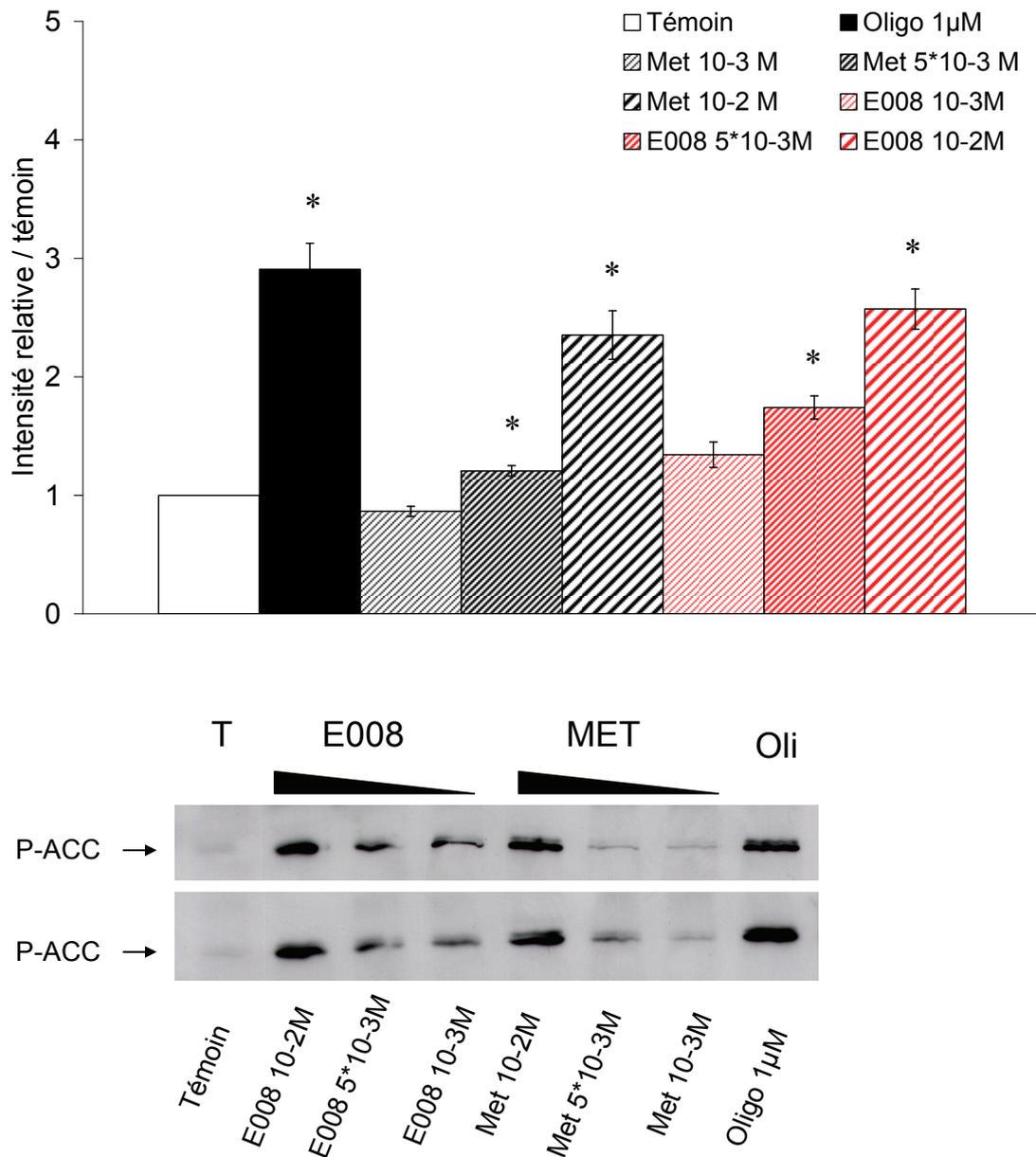


**Figure 64 : Cinétique de l'activation de l'AMPK par incubation des hépatocytes en présence de E008 ou de Metformine.**

Les hépatocytes isolés ont été incubés à 10 mg dry cells/ml pendant 5, 10, 20, 30 ou 40 minutes en présence de lactate et de pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations d'E008 ou de Metformine. 25  $\mu$ g de protéines ont été déposés pour la réalisation des westerns blots. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. \*, significativement différent par rapport à la condition témoin avec  $p < 0.05$ .

La même étude réalisée avec des temps variables allant de 5 à 40 minutes montre que le nouveau composé, comme la Metformine, augmente l'état de phosphorylation de l'AMPK dès 10 à 20 minutes d'incubation des cellules en présence des drogues. L'activation de l'AMPK devient significativement différente seulement à partir de 30 minutes (Figure 64). L'action de ces deux substances médicamenteuses nécessite donc au minimum 10 minutes d'incubation.

L'activation de l'AMPK est connue pour induire la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) (Zhou, Myers et al. 2001). Nous avons ainsi vérifié les capacités de E008 à induire ce changement de phosphorylation dans les hépatocytes incubés.



**Figure 65 : Effets de l'incubation des hépatocytes en présence de E008 sur l'état de phosphorylation de l'ACC.**

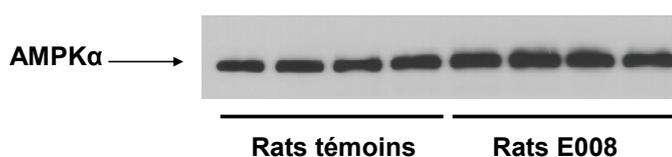
Les hépatocytes isolés ont été incubés à 10 mg dry cells/ml pendant 40 minutes en présence de lactate et de pyruvate (20/2 mM) et avec différentes concentrations d'E008, de Metformine ou d'oligomycine. 25  $\mu$ g de protéines ont été déposés pour la réalisation des westerns blots. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. \*, significativement différent par rapport à la condition témoin avec  $p < 0.05$ .

La quantité d'ACC phosphorylée est parfaitement cohérente avec la quantité d'AMPK phosphorylée. En effet, dans chaque condition où la quantité d'AMPK phosphorylée est augmentée (oligomycine, Metformine et E008 50 et 100 mM), la teneur en ACC phosphorylée est également supérieure (Figure 65).

Finalement, l'activation de l'AMPK par E008 provoque la phosphorylation de l'ACC qui a pour conséquence d'inhiber l'activité acétyl-CoA carboxylase. Ceci aboutit à l'inhibition de la biosynthèse des acides gras dans les cellules hépatiques.

Le composé E008 a donc la capacité de diminuer les rapports des nucléotides adényliques qui contrôlent la phosphorylation de l'AMPK. L'action sur cette enzyme clef du métabolisme, dont les cibles multiples sont décrites en introduction (Foretz et al. 2006), pourrait expliquer les réorientations des flux métaboliques induites par le traitement E008.

Afin de valider cette hypothèse sur le modèle de traitement chronique des animaux, nous avons réalisé des westerns blots sur des bouts de foies d'animaux traités pendant 3 semaines par le nouveau composé E008. N'ayant pu détecter spécifiquement par westerns blots la forme phosphorylée de l'AMPK à partir de bouts de foies de rats, nous avons analysé la quantité totale d'AMPK.



**Figure 66 : Effets de 3 semaines de traitement E008 sur l'expression des sous-unités  $\alpha$  de l'AMPK.**

Des bouts de foies de rats traités ou non pendant 3 semaines par E008 ont été prélevés et clampés. Leurs protéines ont été extraites et un western blot dirigé contre les sous-unités  $\alpha$  de l'AMPK a été réalisé avec 25  $\mu$ g de protéine.

Après 3 semaines de traitement E008, l'expression des sous-unités  $\alpha$  de l'AMPK est augmentée au niveau hépatique (Figure 66). Cette hausse de la quantité d'AMPK traduit une activation de cette protéine chez ces animaux. Ce résultat conforte les hypothèses émises précédemment concernant l'activation de l'AMPK par le composé E008.

L'AMPK jouant un rôle essentiel dans l'orientation des flux métaboliques, nous suggérons que les modifications du métabolisme du glycérol, observées en périfusion d'hépatocytes avec inhibition de la néoglucogenèse par le traitement, soient intimement contrôlées par l'activation de cette kinase (Foretz, Taleux et al. 2006).

# **Conclusions et perspectives**

# 1 Conclusions

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés aux effets d'un régime enrichi en graisses sur le métabolisme hépatique. Ce type de régime provoque en huit semaines la perte de flexibilité métabolique. Il induit des modifications majeures des compositions lipidiques plasmatique, membranaire et mitochondriale. La respiration mitochondriale, contrairement au rendement de l'oxydation phosphorylante, est également affectée par ce régime qui génère une inhibition de l'activité du complexe I et de la cytochrome oxydase. Par ailleurs, la production d' $H_2O_2$  est accrue par le régime. En conséquence de ces effets mitochondriaux, les flux métaboliques sont modifiés : le métabolisme du glycérol est accru en présence d'acide gras, alors qu'il est réduit en leur absence. Cette augmentation est due à une élévation de la néoglucogenèse sans perturbation de la glycolyse. La production de corps cétoniques est également réduite et traduit probablement une inhibition de la  $\beta$ -oxydation. Ces perturbations sont associées à des modifications de l'état redox cellulaire. Le cytosol des hépatocytes, issus de rats sous régime hyper gras, est plus oxydé alors que le compartiment mitochondrial est plus réduit. Une inhibition de la navette malate/aspartate, responsable de l'équilibre entre les deux compartiments, expliquerait ce déséquilibre qui concorde avec l'inhibition de la respiration et l'élévation du potentiel membranaire. L'analyse par RT-PCR d'une série de gènes du métabolisme a montré une élévation de la transcription des gènes des enzymes de la  $\beta$ -oxydation sans modification de celle des enzymes de l'oxydation phosphorylante. Ainsi, les changements de compositions lipidiques membranaires, associés à la diminution du *pool* des quinones, pourraient être responsables des changements d'activité enzymatique du système phosphorylant. Ceci provoquerait une élévation du potentiel membranaire qui modifierait le contrôle des voies métaboliques et participerait aux dysfonctionnements hépatiques qui surviennent en condition d'insulinorésistance.

La seconde partie de ce travail, présente les effets *in vivo* d'un nouveau traitement antidiabétique par le composé « E008 » sur le métabolisme hépatique. Ce traitement est sans effet sur la prise de poids des animaux. Au niveau hépatique, ce composé provoque une inhibition de la respiration mitochondriale qui est compensée par l'augmentation de la densité des mitochondries. Le traitement E008 inhibe le complexe I et diminue la

production d'espèces réactives de l'oxygène induite par le flux inverse d'électrons. Suite au traitement, nous avons observé un accroissement des capacités de rétention calcique des mitochondries hépatiques. Ce phénomène est certainement en relation étroite avec l'inhibition du complexe I et la diminution d'expression de l'ANT. En revanche, le traitement n'affecte pas le rendement de l'oxydation phosphorylante mais diminue le métabolisme hépatique du glycérol en réduisant l'intensité de la néoglucogenèse.

L'administration de ce nouveau composé à des rats sous régime hyper gras, permet de réduire la production hépatique de glucose anormalement élevée chez ces animaux, en inhibant la respiration hépatocytaire. Cette inhibition serait la conséquence d'une baisse d'expression de l'ANT et d'une diminution d'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. Ceci provoquerait une chute du rapport ATP/ADP et une élévation de la concentration d'AMP responsable de la réorientation des flux métaboliques.

Sur les animaux Goto-Kakizaki, l'efficacité du traitement à limiter la néoglucogenèse n'a été observée qu'en présence d'acides gras. Cette constatation a renforcé l'hypothèse d'une interaction du mécanisme d'action du composé E008 avec la voie de la  $\beta$ -oxydation.

Les études menées *in vitro* avec ce composé ont montré qu'il activait l'AMPK. Cette activation coïncide avec une diminution de la concentration d'ATP et une hausse de celle d'ADP et d'AMP. Ainsi, les effets métaboliques observés suite au traitement chronique des animaux pourraient s'expliquer par une activation de cette kinase induite par le déficit énergétique engendré par l'inhibition du système de l'oxydation phosphorylante.

## 2 Perspectives

Notre hypothèse d'augmentation du potentiel membranaire mitochondrial induite par le régime repose sur des calculs de rapports entre l'état rédox cytosolique et mitochondrial. Le développement de techniques de mesures plus directes de ce paramètre, comme la cytométrie en flux sur hépatocytes combinée à l'utilisation de sondes fluorescentes sensibles au potentiel (TMRM), pourrait confirmer nos données. Par ailleurs, l'enrichissement des hépatocytes en une population mitochondriale à complexe I ou II, lié au régime ou au traitement, pourrait être exploré grâce à des techniques d'immunomarquage et d'imagerie associées à une quantification par cytométrie en flux. Pour cela, il

suffirait à partir d'hépatocytes isolés de rats sous régime ou traitement, de réaliser après perméabilisation un immuno-marquage à l'aide d'anticorps spécifiques du complexe I ou II et d'évaluer les densités des deux populations. L'utilisation des mêmes outils avec des sondes non dépendantes du potentiel de membrane mitochondrial (Mitotracker ou Nonyl acridine orange) pourrait renforcer, ou infirmer, notre hypothèse d'une biogenèse mitochondriale perturbée. L'examen en microscopie électronique pourrait aussi nous donner des informations utiles sur la densité mitochondriale, l'accumulation de graisses et surtout la morphologie des organites qui semble être modifiées par le régime. Enfin, la diminution du *pool* des quinones observée suite au régime paraît être le phénomène le plus précoce et à l'origine des dysfonctionnements hépatiques. Une supplémentation par des quinones (Q10) devrait nous permettre de révéler l'importance de ces coenzymes dans la fonction mitochondriale et au-delà. En effet, si la diminution de l'ensemble des quinones est une étape précoce du développement de l'insulinorésistance, qui conduit à l'installation d'une stéatose hépatique, tenter de maintenir ce *pool* et *a fortiori* l'état rédox, devrait être un moyen efficace de lutte contre cette pathologie.

# **Bibliographie**

- Acin-Perez R., Fernandez-Silva P., Peleato M. L., Perez-Martos A. et Enriquez J. A. (2008). "Respiratory active mitochondrial supercomplexes." Mol Cell **32**(4): 529-39.
- al-Habori M. (1995). "Microcompartmentation, metabolic channelling and carbohydrate metabolism." Int J Biochem Cell Biol **27**(2): 123-32.
- Alvarez C., Bailbe D., Picarel-Blanchot F., Bertin E., Pascual-Leone A. M. et Portha B. (2000). "Effect of early dietary restriction on insulin action and secretion in the GK rat, a spontaneous model of NIDDM." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(6): E1097-103.
- Arnold S. et Kadenbach B. (1999). "The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically." FEBS Lett **443**(2): 105-8.
- Ashrafian H., Frenneaux M. P. et Opie L. H. (2007). "Metabolic mechanisms in heart failure." Circulation **116**(4): 434-48.
- Assifi M. M., Suchankova G., Constant S., Prentki M., Saha A. K. et Ruderman N. B. (2005). "AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(5): E794-800.
- Basciano H., Miller A. E., Naples M., Baker C., Kohen R., Xu E., Su Q., Allister E. M., Wheeler M. B. et Adeli K. (2009). "Metabolic effects of dietary cholesterol in an animal model of insulin resistance and hepatic steatosis." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(2): E462-73.
- Bastard J. P., Maachi M., Lagathu C., Kim M. J., Caron M., Vidal H., Capeau J. et Feve B. (2006). "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance." Eur Cytokine Netw **17**(1): 4-12.
- Batandier C., Fontaine E., Keriell C. et Leverve X. M. (2002). "Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects." J Cell Mol Med **6**(2): 175-87.
- Batandier C., Guigas B., Detaille D., El-Mir M. Y., Fontaine E., Rigoulet M. et Leverve X. M. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." J Bioenerg Biomembr **38**(1): 33-42.

- Befroy D. E., Petersen K. F., Dufour S., Mason G. F., de Graaf R. A., Rothman D. L. et Shulman G. I. (2007). "Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients." *Diabetes* **56**(5): 1376-81.
- Benard G., Faustin B., Galinier A., Rocher C., Bellance N., Smolkova K., Casteilla L., Rossignol R. et Letellier T. (2008). "Functional dynamic compartmentalization of respiratory chain intermediate substrates: implications for the control of energy production and mitochondrial diseases." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(8): 1543-54.
- Bender E. et Kadenbach B. (2000). "The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation." *FEBS Lett* **466**(1): 130-4.
- Bergmeyer H. U. (1974). *Methods in Enzymatic Analysis*. New-York, Academic Press.
- Berry M. N. et Friend D. S. (1969). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study." *J Cell Biol* **43**(3): 506-20.
- Berry M. N., Kun E. et Werner H. V. (1973). "Regulatory role of reducing-equivalent transfer from substrate to oxygen in the hepatic metabolism of glycerol and sorbitol." *Eur J Biochem* **33**(3): 407-17.
- Bobyleva V., Paziienza L., Muscatello U., Kneer N. et Lardy H. (2000). "Short-term hypothermia activates hepatic mitochondrial sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase and thermogenic systems." *Arch Biochem Biophys* **380**(2): 367-72.
- Boden G., She P., Mozzoli M., Cheung P., Gumireddy K., Reddy P., Xiang X., Luo Z. et Ruderman N. (2005). "Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver." *Diabetes* **54**(12): 3458-65.
- Brand M. D., Hafner R. P. et Brown G. C. (1988). "Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain." *Biochem J* **255**(2): 535-9.
- Bringer J., Fontaine P., Detournay B., Nachit-Ouinekh F., Bami G. et Eschwege E. (2009). "Prevalence of diagnosed type 2 diabetes mellitus in the French general population: the INSTANT study." *Diabetes Metab* **35**(1): 25-31.
- Brown G. C. (1992). "Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells." *Biochem J* **284** ( Pt 1): 1-13.

- Brownlee M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." Diabetes **54**(6): 1615-25.
- Brunmair B., Staniek K., Gras F., Scharf N., Althaym A., Clara R., Roden M., Gnaiger E., Nohl H., Waldhausl W. et Furnsinn C. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" Diabetes **53**(4): 1052-9.
- Brusq J. M., Ancellin N., Grondin P., Guillard R., Martin S., Saintillan Y. et Issandou M. (2006). "Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine." J Lipid Res **47**(6): 1281-8.
- Buckle M., Guerrieri F. et Papa S. (1985). "Changes in activity and F1 content of mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase in regenerating rat liver." FEBS Lett **188**(2): 345-51.
- Bultema J. B., Braun H. P., Boekema E. J. et Kouril R. (2009). "Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato." Biochim Biophys Acta **1787**(1): 60-7.
- Cahill G. F., Jr., Owen O. E. et Felig P. (1968). "Insulin and fuel homeostasis." Physiologist **11**(2): 97-102.
- Caperna T. J., Shannon A. E., Richards M. P., Garrett W. M. et Talbot N. C. (2007). "Identification and characterization of aquaporin-9 (AQP9) in porcine hepatic tissue and hepatocytes in monolayer culture." Domest Anim Endocrinol **32**(4): 273-86.
- Chance B. et Williams G. R. (1955). "A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation." Nature **176**(4475): 250-4.
- Chen C., Ko Y., Delannoy M., Ludtke S. J., Chiu W. et Pedersen P. L. (2004). "Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP." J Biol Chem **279**(30): 31761-8.
- Chew G. T., Gan S. K. et Watts G. F. (2006). "Revisiting the metabolic syndrome." Med J Aust **185**(8): 445-9.
- Ciapaite J., Bakker S. J., Diamant M., van Eikenhorst G., Heine R. J., Westerhoff H. V. et Krab K. (2006). "Metabolic control of mitochondrial properties by adenine nucleotide translocator determines palmitoyl-CoA effects. Implications for a mechanism linking obesity and type 2 diabetes." Febs J **273**(23): 5288-302.

- Colca J. R., McDonald W. G., Waldon D. J., Leone J. W., Lull J. M., Bannow C. A., Lund E. T. et Mathews W. R. (2004). "Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E252-60.
- Cook G. A. et Gamble M. S. (1987). "Regulation of carnitine palmitoyltransferase by insulin results in decreased activity and decreased apparent  $K_i$  values for malonyl-CoA." J Biol Chem **262**(5): 2050-5.
- Cusi K. (2009). "Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **16**(2): 141-9.
- Daum G. (1985). "Lipids of mitochondria." Biochim Biophys Acta **822**(1): 1-42.
- Davies K. J., Quintanilha A. T., Brooks G. A. et Packer L. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-205.
- DeFronzo R. A., Ferrannini E. et Simonson D. C. (1989). "Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake." Metabolism **38**(4): 387-95.
- Desvergne B. et Wahli W. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev **20**(5): 649-88.
- Devin A., Guerin B. et Rigoulet M. (1996). "Dependence of flux size and efficiency of oxidative phosphorylation on external osmolarity in isolated rat liver mitochondria: role of adenine nucleotide carrier." Biochim Biophys Acta **1273**(1): 13-20.
- Devin A., Guerin B. et Rigoulet M. (1997). "Response of isolated rat liver mitochondria to variation of external osmolarity in KCl medium: regulation of matrix volume and oxidative phosphorylation." J Bioenerg Biomembr **29**(6): 579-90.
- Diamond J. (2003). "The double puzzle of diabetes." Nature **423**(6940): 599-602.
- Dumas J. F., Argaud L., Cottet-Rousselle C., Vial G., Gonzalez C., Detaille D., Leverve X. et Fontaine E. (2009). "Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells." J Biol Chem **284**(22): 15117-25.
- Dunning B. E. et Gerich J. E. (2007). "The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications." Endocr Rev **28**(3): 253-83.

- Duszynski J., Groen A. K., Wanders R. J., Vervoorn R. C. et Tager J. M. (1982). "Quantification of the role of the adenine nucleotide translocator in the control of mitochondrial respiration in isolated rat-liver cells." FEBS Lett **146**(2): 262-6.
- Eaton S. (2002). "Control of mitochondrial beta-oxidation flux." Prog Lipid Res **41**(3): 197-239.
- El-Mir M. Y., Nogueira V., Fontaine E., Averet N., Rigoulet M. et Leverve X. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." J Biol Chem **275**(1): 223-8.
- Erecinska M. et Wilson D. F. (1982). "Regulation of cellular energy metabolism." J Membr Biol **70**(1): 1-14.
- Fiek C., Benz R., Roos N. et Brdiczka D. (1982). "Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta **688**(2): 429-40.
- Folch J., Lees M. et Sloane Stanley G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.
- Fontaine E. M., Moussa M., Devin A., Garcia J., Ghisolfi J., Rigoulet M. et Leverve X. M. (1996). "Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria." Biochim Biophys Acta **1276**(3): 181-7.
- Foretz M., Ancellin N., Andreelli F., Saintillan Y., Grondin P., Kahn A., Thorens B., Vaulont S. et 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**(5): 1331-9.
- Foretz M., Carling D., Guichard C., Ferre P. et Foufelle F. (1998). "AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes." J Biol Chem **273**(24): 14767-71.
- Foretz M., Taleux N., Guigas B., Horman S., Beauloye C., Andreelli F., Bertrand L. et 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**(4): 381-8.
- Frank V. et Kadenbach B. (1996). "Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios." FEBS Lett **382**(1-2): 121-4.

- Frerman F. E. (1987). "Reaction of electron-transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase with the mitochondrial respiratory chain." Biochim Biophys Acta **893**(2): 161-9.
- Frerman F. E. (1988). "Acyl-CoA dehydrogenases, electron transfer flavoprotein and electron transfer flavoprotein dehydrogenase." Biochem Soc Trans **16**(3): 416-8.
- Fry M. et Green D. E. (1980). "Cardiolipin requirement by cytochrome oxidase and the catalytic role of phospholipid." Biochem Biophys Res Commun **93**(4): 1238-46.
- Fryer L. G., Parbu-Patel A. et Carling D. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." J Biol Chem **277**(28): 25226-32.
- Fukushima T., Decker R. V., Anderson W. M. et Spivey H. O. (1989). "Substrate channeling of NADH and binding of dehydrogenases to complex I." J Biol Chem **264**(28): 16483-8.
- Galgani J. E., Moro C. et Ravussin E. (2008). "Metabolic flexibility and insulin resistance." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(5): E1009-17.
- Galinier A., Carriere A., Fernandez Y., Bessac A. M., Caspar-Bauguil S., Periquet B., Comtat M., Thouvenot J. P. et Casteilla L. (2004). "Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q content in rat tissues." FEBS Lett **578**(1-2): 53-7.
- Gerson A. R., Brown J. C., Thomas R., Bernards M. A. et Staples J. F. (2008). "Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondrial metabolism in mammalian hibernation." J Exp Biol **211**(Pt 16): 2689-99.
- Gil-Villarino A., Garcia-Fuentes E., Zafra M. F. et Garcia-Peregrin E. (1999). "Coconut oil induces short-term changes in lipid composition and enzyme activity of chick hepatic mitochondria." J Nutr Biochem **10**(6): 325-30.
- Groen A. K., van Roermund C. W., Vervoorn R. C. et Tager J. M. (1986). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon." Biochem J **237**(2): 379-89.
- Groen A. K., Vervoorn R. C., Van der Meer R. et Tager J. M. (1983). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. I. Kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon." J Biol Chem **258**(23): 14346-53.

- Groen A. K., Wanders R. J., Westerhoff H. V., van der Meer R. et Tager J. M. (1982). "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration." J Biol Chem **257**(6): 2754-7.
- Guigas B., Bertrand L., Taleux N., Foretz M., Wiernsperger N., Vertommen D., Andreelli F., Viollet B. et Hue L. (2006). "5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation." Diabetes **55**(4): 865-74.
- Guigas B., Detaille D., Chauvin C., Batandier C., De Oliveira F., Fontaine E. et Leverve X. (2004). "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study." Biochem J **382**(Pt 3): 877-84.
- Hackenbrock C. R., Chazotte B. et Gupte S. S. (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." J Bioenerg Biomembr **18**(5): 331-68.
- Hakimi P., Johnson M. T., Yang J., Lepage D. F., Conlon R. A., Kalhan S. C., Reshef L., Tilghman S. M. et Hanson R. W. (2005). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the critical role of cataplerosis in the control of hepatic metabolism." Nutr Metab (Lond) **2**: 33.
- Hanson R. W. et Hakimi P. (2008). "Born to run; the story of the PEPCK-Cmus mouse." Biochimie **90**(6): 838-42.
- Hanson R. W. et Reshef L. (1997). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression." Annu Rev Biochem **66**: 581-611.
- Hardie D. G. (2007). "AMP-activated protein kinase as a drug target." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 185-210.
- Hardie D. G. (2008). "Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease." FEBS Lett **582**(1): 81-9.
- Hawley S. A., Gadalla A. E., Olsen G. S. et Hardie D. G. (2002). "The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism." Diabetes **51**(8): 2420-5.
- Heinrich R. et Rapoport T. A. (1975). "Mathematical analysis of multienzyme systems. II. Steady state and transient control." Biosystems **7**(1): 130-6.

- Helling S., Vogt S., Rhiel A., Ramzan R., Wen L., Marcus K. et Kadenbach B. (2008). "Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase." Mol Cell Proteomics **7**(9): 1714-24.
- Hermansen K. et Mortensen L. S. (2007). "Bodyweight changes associated with antihyperglycaemic agents in type 2 diabetes mellitus." Drug Saf **30**(12): 1127-42.
- Hoch F. L. (1992). "Cardiolipins and biomembrane function." Biochim Biophys Acta **1113**(1): 71-133.
- Hogeboom G. H. et Kupp E. L. (1955). "Relation between cell structure and cell chemistry." Fed Proc **14**(2): 633-8.
- Hogeboom G. H., Schneider W. C. et Pallade G. E. (1948). "Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material." J Biol Chem **172**(2): 619-35.
- Hoppel C., Kerner J., Turkaly P. et Tandler B. (2001). "Rat liver mitochondrial contact sites and carnitine palmitoyltransferase-I." Arch Biochem Biophys **392**(2): 321-5.
- Huttemann M., Arnold S., Lee I., Muhlenbein N., Linder D., Lottspeich F. et Kadenbach B. (2000). "Turkey cytochrome c oxidase contains subunit VIa of the liver type associated with low efficiency of energy transduction." Eur J Biochem **267**(7): 2098-104.
- Idris I., Gray S. et Donnelly R. (2001). "Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes." Diabetologia **44**(6): 659-73.
- Jager S., Handschin C., St-Pierre J. et Spiegelman B. M. (2007). "AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12017-22.
- Kacser H. et Burns J. A. (1973). "The control of flux." Symp Soc Exp Biol **27**: 65-104.
- Kadenbach B. et Arnold S. (1999). "A second mechanism of respiratory control." FEBS Lett **447**(2-3): 131-4.
- Kadenbach B., Huttemann M., Arnold S., Lee I. et Bender E. (2000). "Mitochondrial energy metabolism is regulated via nuclear-coded subunits of cytochrome c oxidase." Free Radic Biol Med **29**(3-4): 211-21.
- Kerbey A. L., Randle P. J., Cooper R. H., Whitehouse S., Pask H. T. et Denton R. M. (1976). "Regulation of pyruvate dehydrogenase in rat heart. Mechanism of

- regulation of proportions of dephosphorylated and phosphorylated enzyme by oxidation of fatty acids and ketone bodies and of effects of diabetes: role of coenzyme A, acetyl-coenzyme A and reduced and oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide." Biochem J **154**(2): 327-48.
- Kim J. A., Wei Y. et Sowers J. R. (2008). "Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance." Circ Res **102**(4): 401-14.
- Kirwan J. P., Solomon T. P., Wojta D. M., Staten M. A. et Holloszy J. O. (2009). "Effects of 7 days of exercise training on insulin sensitivity and responsiveness in type 2 diabetes mellitus." Am J Physiol Endocrinol Metab **297**(1): E151-6.
- Klingenberg M. (2008). "The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier." Biochim Biophys Acta **1778**(10): 1978-2021.
- Knoll G. et Brdiczka D. (1983). "Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state. Dynamic interactions of the boundary membranes." Biochim Biophys Acta **733**(1): 102-10.
- Ko Y. H., Delannoy M., Hullihen J., Chiu W. et Pedersen P. L. (2003). "Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP." J Biol Chem **278**(14): 12305-9.
- Krssak M., Falk Petersen K., Dresner A., DiPietro L., Vogel S. M., Rothman D. L., Roden M. et Shulman G. I. (1999). "Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a <sup>1</sup>H NMR spectroscopy study." Diabetologia **42**(1): 113-6.
- Kumarswamy R. et Chandna S. (2009). "Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them?" Mitochondrion **9**(1): 1-8.
- Kunz W., Bohnensack R., Bohme G., Kuster U., Letko G. et Schonfeld P. (1981). "Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems." Arch Biochem Biophys **209**(1): 219-29.
- Kunz W. S. et Davis E. J. (1991). "Control of reversible intracellular transfer of reducing potential." Arch Biochem Biophys **284**(1): 40-6.
- Lam T. K., van de Werve G. et Giacca A. (2003). "Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(2): E281-90.

- Lazarou M., Thorburn D. R., Ryan M. T. et McKenzie M. (2009). "Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease." *Biochim Biophys Acta* **1793**(1): 78-88.
- Leclerc I., Kahn A. et Doiron B. (1998). "The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex." *FEBS Lett* **431**(2): 180-4.
- Leclerc I., Lenzner C., Gourdon L., Vaulont S., Kahn A. et 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**(7): 1515-21.
- Lee I., Salomon A. R., Ficarro S., Mathes I., Lottspeich F., Grossman L. I. et Huttemann M. (2005). "cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity." *J Biol Chem* **280**(7): 6094-100.
- Lee I., Salomon A. R., Yu K., Samavati L., Pecina P., Pecinova A. et Huttemann M. (2009). "Isolation of regulatory-competent, phosphorylated cytochrome C oxidase." *Methods Enzymol* **457**: 193-210.
- Lee W. J., Lee I. K., Kim H. S., Kim Y. M., Koh E. H., Won J. C., Han S. M., Kim M. S., Jo I., Oh G. T., Park I. S., Youn J. H., Park S. W., Lee K. U. et Park J. Y. (2005). "Alpha-lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of AMP-activated protein kinase." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(12): 2488-94.
- Lee Y. P. et Lardy H. A. (1965). "Influence of Thyroid Hormones on L-Alpha-Glycerophosphate Dehydrogenases and Other Dehydrogenases in Various Organs of the Rat." *J Biol Chem* **240**: 1427-36.
- Lenaz G., Fato R., Formiggini G. et Genova M. L. (2007). "The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport." *Mitochondrion* **7 Suppl**: S8-33.
- Leverve X. M., Fontaine E., Putod-Paramelle F. et Rigoulet M. (1994). "Decrease in cytosolic ATP/ADP ratio and activation of pyruvate kinase after in vitro addition of almitrine in hepatocytes isolated from fasted rats." *Eur J Biochem* **224**(3): 967-74.
- Leverve X. M., Verhoeven A. J., Groen A. K., Meijer A. J. et Tager J. M. (1986). "The malate/aspartate shuttle and pyruvate kinase as targets involved in the stimulation of gluconeogenesis by phenylephrine." *Eur J Biochem* **155**(3): 551-6.
- Lewin T. M., Kim J. H., Granger D. A., Vance J. E. et Coleman R. A. (2001). "Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently." *J Biol Chem* **276**(27): 24674-9.

- Liang X., Le W., Zhang D. et Schulz H. (2001). "Impact of the intramitochondrial enzyme organization on fatty acid oxidation." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 2): 279-82.
- Lieber C. S., Leo M. A., Mak K. M., Xu Y., Cao Q., Ren C., Ponomarenko A. et DeCarli L. M. (2004). "Model of nonalcoholic steatohepatitis." *Am J Clin Nutr* **79**(3): 502-9.
- Lin J., Wu S. et Chan S. I. (1995). "Electron transfer from cytochrome c to 8-azido-ATP-modified cytochrome c oxidase." *Biochemistry* **34**(19): 6335-43.
- Livak K. J. et Schmittgen T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Luo Z., Saha A. K., Xiang X. et Ruderman N. B. (2005). "AMPK, the metabolic syndrome and cancer." *Trends Pharmacol Sci* **26**(2): 69-76.
- Lynch R. M. et Balaban R. S. (1987). "Coupling of aerobic glycolysis and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in renal cell line MDCK." *Am J Physiol* **253**(2 Pt 1): C269-76.
- Mak I. T., Shrago E. et Elson C. E. (1983). "Modification of liver mitochondrial lipids and of adenine nucleotide translocase and oxidative phosphorylation by cold adaptation." *Biochim Biophys Acta* **722**(2): 302-9.
- Martin T. L., Alquier T., Asakura K., Furukawa N., Preitner F. et Kahn B. B. (2006). "Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle." *J Biol Chem* **281**(28): 18933-41.
- Mitchell P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* **191**: 144-8.
- Mogensen M., Sahlin K., Fernstrom M., Glinborg D., Vind B. F., Beck-Nielsen H. et Hojlund K. (2007). "Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes." *Diabetes* **56**(6): 1592-9.
- Mootha V. K., Lindgren C. M., Eriksson K. F., Subramanian A., Sihag S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstrale M., Laurila E., Houstis N., Daly M. J., Patterson N., Mesirov J. P., Golub T. R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E. S., Hirschhorn J. N., Altshuler D. et Groop L. C. (2003). "PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes." *Nat Genet* **34**(3): 267-73.

- Morgunov I. et Srere P. A. (1998). "Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate." J Biol Chem **273**(45): 29540-4.
- Morino K., Petersen K. F., Dufour S., Befroy D., Frattini J., Shatzkes N., Neschen S., White M. F., Bilz S., Sono S., Pypaert M. et Shulman G. I. (2005). "Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents." J Clin Invest **115**(12): 3587-93.
- Murray R., Granner D., Mayes P. et Rodwell V. (1993). PRECIS DE BIOCHIMIE DE HARPER, De Boeck Université.
- Nagai Y., Nishio Y., Nakamura T., Maegawa H., Kikkawa R. et Kashiwagi A. (2002). "Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(5): E1180-90.
- Nawrocki A. R., Rajala M. W., Tomas E., Pajvani U. B., Saha A. K., Trumbauer M. E., Pang Z., Chen A. S., Ruderman N. B., Chen H., Rossetti L. et Scherer P. E. (2006). "Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists." J Biol Chem **281**(5): 2654-60.
- Neel J. V. (1999). "The "thrifty genotype" in 1998." Nutr Rev **57**(5 Pt 2): S2-9.
- New K. J., Eaton S., Elliott K. R. et Quant P. A. (1999). "Is it time to reconsider the role of CPT I in control of hepatic ketogenesis?" Adv Exp Med Biol **466**: 227-32.
- Nisoli E., Clementi E., Carruba M. O. et Moncada S. (2007). "Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome?" Circ Res **100**(6): 795-806.
- Nogueira V., Piquet M. A., Devin A., Fiore C., Fontaine E., Brandolin G., Rigoulet M. et Leverve X. M. (2001). "Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency." J Bioenerg Biomembr **33**(1): 53-61.
- Nogueira V., Rigoulet M., Piquet M. A., Devin A., Fontaine E. et Leverve X. M. (2001). "Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand." J Biol Chem **276**(49): 46104-10.

- Nunn A. V., Bell J. D. et Guy G. W. (2009). "Lifestyle-induced metabolic inflexibility and accelerated ageing syndrome: insulin resistance, friend or foe?" Nutr Metab (Lond) **6**: 16.
- Ochoa J. J., Quiles J. L., Lopez-Frias M., Huertas J. R. et Mataix J. (2007). "Effect of lifelong coenzyme Q10 supplementation on age-related oxidative stress and mitochondrial function in liver and skeletal muscle of rats fed on a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **62**(11): 1211-8.
- Ostlund A. K., Gohring U., Krause J. et Brdiczka D. (1983). "The binding of glycerol kinase to the outer membrane of rat liver mitochondria: its importance in metabolic regulation." Biochem Med **30**(2): 231-45.
- Ovadi J. et Srere P. A. (2000). "Macromolecular compartmentation and channeling." Int Rev Cytol **192**: 255-80.
- Owen M. R., Doran E. et Halestrap A. P. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem J **348 Pt 3**: 607-14.
- Parker A. et Engel P. C. (2000). "Preliminary evidence for the existence of specific functional assemblies between enzymes of the beta-oxidation pathway and the respiratory chain." Biochem J **345 Pt 3**: 429-35.
- Parker A. R. (2003). "Binding of the human "electron transferring flavoprotein" (ETF) to the medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) involves an arginine and histidine residue." J Enzyme Inhib Med Chem **18**(5): 453-62.
- Patti M. E., Butte A. J., Crunkhorn S., Cusi K., Berria R., Kashyap S., Miyazaki Y., Kohane I., Costello M., Saccone R., Landaker E. J., Goldfine A. B., Mun E., DeFronzo R., Finlayson J., Kahn C. R. et Mandarino L. J. (2003). "Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8466-71.
- Perez-Carreras M., Del Hoyo P., Martin M. A., Rubio J. C., Martin A., Castellano G., Colina F., Arenas J. et Solis-Herruzo J. A. (2003). "Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis." Hepatology **38**(4): 999-1007.
- Pessayre D. (2007). "Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease." J Gastroenterol Hepatol **22 Suppl 1**: S20-7.

- Pessayre D., Fromenty B. et Mansouri A. (2004). "Mitochondrial injury in steatohepatitis." Eur J Gastroenterol Hepatol **16**(11): 1095-105.
- Petersen K. F., Dufour S., Befroy D., Garcia R. et Shulman G. I. (2004). "Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes." N Engl J Med **350**(7): 664-71.
- Pilkis S. J. et Granner D. K. (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Physiol **54**: 885-909.
- Pon L. A. et Schon E. A. (2007). "Mitochondria." Methods in Cell Biology **80**: 207.
- Porpaczy Z., Sumegi B. et Alkonyi I. (1987). "Interaction between NAD-dependent isocitrate dehydrogenase, alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, and NADH:ubiquinone oxidoreductase." J Biol Chem **262**(20): 9509-14.
- Portha B., Serradas P., Bailbe D., Suzuki K., Goto Y. et Giroix M. H. (1991). "Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes." Diabetes **40**(4): 486-91.
- Quiles J. L., Huertas J. R., Manas M., Ochoa J. J., Battino M. et Mataix J. (2001). "Dietary fat type and regular exercise affect mitochondrial composition and function depending on specific tissue in the rat." J Bioenerg Biomembr **33**(2): 127-34.
- Ravikumar B., Gerrard J., Dalla Man C., Firbank M. J., Lane A., English P. T., Cobelli C. et Taylor R. (2008). "Pioglitazone decreases fasting and postprandial endogenous glucose production in proportion to decrease in hepatic triglyceride content." Diabetes **57**(9): 2288-95.
- Reaven G. M. (1997). "Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988." Nutrition **13**(1): 65; discussion 64, 66.
- Rioux V. et Legrand P. (2007). "Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **10**(6): 752-8.
- Robbins B. L., Foster J. D. et Nordlie R. C. (1991). "Metabolic intermediates as potential regulators of glucose-6-phosphatase." Life Sci **48**(11): 1075-81.
- Robinson J. et Newsholme E. A. (1969). "The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices." Biochem J **112**(4): 449-53.
- Russell A. P. (2004). "Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox." Int J Obes Relat Metab Disord **28 Suppl 4**: S66-71.

- Saha A. K., Avilucea P. R., Ye J. M., Assifi M. M., Kraegen E. W. et Ruderman N. B. (2004). "Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 580-5.
- Samuel V. T., Liu Z. X., Qu X., Elder B. D., Bilz S., Befroy D., Romanelli A. J. et Shulman G. I. (2004). "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." J Biol Chem **279**(31): 32345-53.
- Schagger H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 154-9.
- Schagger H., de Coo R., Bauer M. F., Hofmann S., Godinot C. et Brandt U. (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." J Biol Chem **279**(35): 36349-53.
- Schagger H. et Pfeiffer K. (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." Embo J **19**(8): 1777-83.
- Schmitz-Peiffer C. et Biden T. J. (2008). "Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes." Diabetes **57**(7): 1774-83.
- Schon E. A. et Dencher N. A. (2009). "Heavy breathing: energy conversion by mitochondrial respiratory supercomplexes." Cell Metab **9**(1): 1-3.
- Shaw R. J., Lamia K. A., Vasquez D., Koo S. H., Bardeesy N., Depinho R. A., Montminy M. et Cantley L. C. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science **310**(5754): 1642-6.
- Shoelson S. E., Herrero L. et Naaz A. (2007). "Obesity, inflammation, and insulin resistance." Gastroenterology **132**(6): 2169-80.
- Simkovic M. et Frerman F. E. (2004). "Alternative quinone substrates and inhibitors of human electron-transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase." Biochem J **378**(Pt 2): 633-40.
- Soyal S., Krempler F., Oberkofler H. et Patsch W. (2006). "PGC-1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes." Diabetologia **49**(7): 1477-88.
- Spiegelman B. M. (1998). "PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor." Diabetes **47**(4): 507-14.
- Srere P. A. (1969). Citrate synthase. Methods Enzymol. **13**.

- Steenart N. A. et Shore G. C. (1997). "Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit IV is phosphorylated by an endogenous kinase." FEBS Lett **415**(3): 294-8.
- Storlien L., Oakes N. D. et Kelley D. E. (2004). "Metabolic flexibility." Proc Nutr Soc **63**(2): 363-8.
- Streicher-Scott J., Lapidus R. et Sokolove P. M. (1994). "The reconstituted mitochondrial adenine nucleotide translocator: effects of lipid polymorphism." Arch Biochem Biophys **315**(2): 548-54.
- Sumegi B., Batke J. et Porpaczy Z. (1985). "Substrate-induced structural changes of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex." Arch Biochem Biophys **236**(2): 741-52.
- Sumegi B. et Srere P. A. (1984). "Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases." J Biol Chem **259**(24): 15040-5.
- Suwa M., Egashira T., Nakano H., Sasaki H. et Kumagai S. (2006). "Metformin increases the PGC-1 $\alpha$  protein and oxidative enzyme activities possibly via AMPK phosphorylation in skeletal muscle in vivo." J Appl Physiol **101**(6): 1685-92.
- Tager J. M., Wanders R. J., Groen A. K., Kunz W., Bohnsack R., Kuster U., Letko G., Bohme G., Duszynski J. et Wojtczak L. (1983). "Control of mitochondrial respiration." FEBS Lett **151**(1): 1-9.
- Takamura T., Misu H., Matsuzawa-Nagata N., Sakurai M., Ota T., Shimizu A., Kurita S., Takeshita Y., Ando H., Honda M. et Kaneko S. (2008). "Obesity upregulates genes involved in oxidative phosphorylation in livers of diabetic patients." Obesity (Silver Spring) **16**(12): 2601-9.
- Taleux N., Guigas B., Dubouchaud H., Moreno M., Weitzel J., Goglia F., Favier R. et Leverve X. (2008). "High expression of thyroid hormone receptors and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver is linked to enhanced fatty acid oxidation in *lou/C*, a rat strain resistant to obesity." J Biol Chem.
- Turner N., Li J. Y., Gosby A., To S. W., Cheng Z., Miyoshi H., Taketo M. M., Cooney G. J., Kraegen E. W., James D. E., Hu L. H., Li J. et Ye J. M. (2008). "Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action." Diabetes **57**(5): 1414-8.

- Turunen M., Olsson J. et Dallner G. (2004). "Metabolism and function of coenzyme Q." Biochim Biophys Acta **1660**(1-2): 171-99.
- van der Heijden G. J., Wang Z. J., Chu Z. D., Sauer P. J., Haymond M. W., Rodriguez L. M. et Sunehag A. L. (2009). "A 12-Week Aerobic Exercise Program Reduces Hepatic Fat Accumulation and Insulin Resistance in Obese, Hispanic Adolescents." Obesity (Silver Spring).
- Varanasi L., Mills D., Murphree A., Gray J., Purser C., Baker R. et Hosler J. (2006). "Altering conserved lipid binding sites in cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides* perturbs the interaction between subunits I and III and promotes suicide inactivation of the enzyme." Biochemistry **45**(50): 14896-907.
- Velasco G., Geelen M. J. et 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**(2): 169-75.
- Velot C., Mixon M. B., Teige M. et Srere P. A. (1997). "Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon." Biochemistry **36**(47): 14271-6.
- Viana A. Y., Sakoda H., Anai M., Fujishiro M., Ono H., Kushiyama A., Fukushima Y., Sato Y., Oshida Y., Uchijima Y., Kurihara H. et Asano T. (2006). "Role of hepatic AMPK activation in glucose metabolism and dexamethasone-induced regulation of AMPK expression." Diabetes Res Clin Pract **73**(2): 135-42.
- Viens L., Athias A., Lizard G., Simard G., Gueldry S., Braschi S., Gambert P., Lallemand C. et Lagrost L. (1996). "Effect of lipid transfer activity and lipolysis on low density lipoprotein (LDL) oxidizability: evidence for lipolysis-generated non-esterified fatty acids as inhibitors of LDL oxidation." J Lipid Res **37**(10): 2179-92.
- Viollet B., Guigas B., Leclerc J., Hebrard S., Lantier L., Mounier R., Andreelli F. et Foretz M. (2009). "AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives." Acta Physiol (Oxf) **196**(1): 81-98.
- Viollet B., Lantier L., Devin-Leclerc J., Hebrard S., Amouyal C., Mounier R., Foretz M. et Andreelli F. (2009). "Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes." Front Biosci **14**: 3380-400.
- Wiederkehr A. et Wollheim C. B. (2006). "Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action." Endocrinology **147**(6): 2643-9.

- Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R. et King H. (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-53.
- Wiley S. E., Murphy A. N., Ross S. A., van der Geer P. et Dixon J. E. (2007). "MitoNEET is an iron-containing outer mitochondrial membrane protein that regulates oxidative capacity." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5318-23.
- Williams J. N., Jr. (1964). "A Method for the Simultaneous Quantitative Estimation of Cytochromes a, B, C1, and C in Mitochondria." Arch Biochem Biophys **107**: 537-43.
- Wittig I. et Schagger H. (2007). "Electrophoretic methods to isolate protein complexes from mitochondria." Methods Cell Biol **80**: 723-41.
- Wittig I. et Schagger H. (2009). "Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes." Biochim Biophys Acta **1787**(6): 672-80.
- Woods A., Azzout-Marniche D., Foretz M., Stein S. C., Lemarchand P., Ferre P., Foufelle F. et Carling D. (2000). "Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase." Mol Cell Biol **20**(18): 6704-11.
- Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S. P., Momcilovic M., Johnstone S. R., Carlson M. et Carling D. (2005). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." Cell Metab **2**(1): 21-33.
- Yamaoka S., Urade R. et Kito M. (1988). "Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil." J Nutr **118**(3): 290-6.
- Yeh M. M. et Brunt E. M. (2007). "Pathology of nonalcoholic fatty liver disease." Am J Clin Pathol **128**(5): 837-47.
- Yoon J. C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C. R., Granner D. K., Newgard C. B. et Spiegelman B. M. (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 131-8.
- Zhang B. B., Zhou G. et Li C. (2009). "AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome." Cell Metab **9**(5): 407-16.

- Zhang D., Liu Z. X., Choi C. S., Tian L., Kibbey R., Dong J., Cline G. W., Wood P. A. et Shulman G. I. (2007). "Mitochondrial dysfunction due to long-chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency causes hepatic steatosis and hepatic insulin resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 17075-80.
- 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. et Moller D. E. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-74.
- Zhou J. Y., Zhou S. W., Zhang K. B., Tang J. L., Guang L. X., Ying Y., Xu Y., Zhang L. et Li D. D. (2008). "Chronic effects of berberine on blood, liver glucolipid metabolism and liver PPARs expression in diabetic hyperlipidemic rats." Biol Pharm Bull **31**(6): 1169-76.
- Zimmet P., Alberti K. G. et Shaw J. (2001). "Global and societal implications of the diabetes epidemic." Nature **414**(6865): 782-7.
- Zorov D. B., Juhaszova M., Yaniv Y., Nuss H. B., Wang S. et Sollott S. J. (2009). "Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore." Cardiovasc Res.
- Zou M. H., Kirkpatrick S. S., Davis B. J., Nelson J. S., Wiles W. G. t., Schlattner U., Neumann D., Brownlee M., Freeman M. B. et 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**(42): 43940-51.
- Zuurendonk P. F., Tischler M. E., Akerboom T. P., Van Der Meer R., Williamson J. R. et Tager J. M. (1979). "Rapid separation of particulate and soluble fractions from isolated cell preparations (digitonin and cell cavitation procedures)." Methods Enzymol **56**: 207-23.

# **Liste des publications et communications**

# 1 Publications

- **Vial G**, Dubouchaud D, Couturier K, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L, Leverve X. "Effect of high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver."  
Soumis à Hepatology Septembre 2009.
- Dumas JF, Argaud L, Cottet-Rousselle C, **Vial G**, Gonzalez C, Detaille D, Leverve X, Fontaine E. "Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells." J Biol Chem. 2009 May 29; 284(22):15117-25. Epub 2009 Apr 3.
- **Vial G**, Dubouchaud H, Couturier K, Lanson M, Leverve X, Demaison L. "Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition with cariporide prevents alterations of coronary endothelial function in streptozotocin-induced diabetes." Mol Cell Biochem. 2008 Mar; 310(1-2):93-102. Epub 2007 Dec 5.
- Sarre A, Gabrielli J, **Vial G**, Leverve X, Assimacopoulos-Jeannet F. "Low glucose regulates AMP-activated kinase via ROS in beta cells." Free Radical Biology & Medicine. En soumission.

## Abstracts:

- Sarre A, **Vial G**, Leverve XM, Assimacopoulos-Jeannet F. « Les radicaux libres participent à la régulation d'AMPK dans les cellules bêta. » Diabetes & Metabolism. Vol 35, N° S1- mars 2009. pp. 29-30.
- **Vial G**, Taleux N, Favier R, LeverveX. "Liver metabolic fluxes in response to high fat diet." Biochimica et Biophysica Acta 1777 (2008) S2-S111. 19 July 2008.

- **Vial G**, Gaye R, Dubouchaud H, Favier R, Leverve X, Demaison L. “Beneficial effects of cariporide on coronary endothelial reactivity in streptozotocin-induced diabetes.” Journal of Molecular and Cellular Cardiology, ISSN: 0022-2828, Vol: 44, Issue: 4, Date: 2008, Start page: 757 of pages: 1.

## 2 Communications

- **Vial G**, Dubouchaud H, Couturier K, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L., Leverve X. “Liver metabolic fluxes in response to high fat diet.”  
45th Annual Meeting of the European Association for Study of Diabetes. Vienna (Austria), 29 September - 2 October 2009.
- **Vial G**, Dubouchaud H, Couturier K, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L., Leverve X. “Liver metabolic fluxes in response to high fat diet.”  
3<sup>ème</sup> colloque MeetOchondrie. La Grande-Motte (France). 4-7 mai 2009.
- Sarre A, **Vial G**, Leverve X, Assimacopoulos-Jeannet F. « Les radicaux libres participent à la régulation d’AMPK dans les cellules bêta. »  
Congrès ALFEDIAM 2009, Palais de la musique et des congrès de Strasbourg, 17 au 20 mars 2009.
- **Vial G**, Taleux N, Favier R, LeverveX. « Modifications des flux métaboliques hépatiques par un nouvel anti-diabétique. »  
Congrès du réseau MeetOchondrie. Aussois (France). 21-24 Mai 2008.
- **Vial G**, Taleux N, Favier R, LeverveX. “Liver metabolic fluxes in response to high fat diet.”  
15th European Bioenergetics Conference 2008 (ebec2008) Trinity College Dublin (Ireland), from 19-24th July 2008
- Sanz MN, Sanchez-Martin C, Detaille D, Gomez-Peralta F , Recio-Cordova JM, R-Villanueva G, **Vial G**, El-Mir MY. “Thiazolidinediones exert hepatic antidiabetic

effects, not mediated by PPARgamma receptor, by inhibiting glucose-6-phosphatase activity and stimulating pyruvate kinase action in isolated rat hepatocytes.”

3rd International Congress on Prediabetes and the metabolic Syndrome Nice (France), April 1-4 avril, 2009.

- **Vial G**, Taleux N, Favier R, Leverve X. « Modifications des flux métaboliques hépatiques par un nouvel anti-diabétique. »

Congrès annuel du Groupe Français de Bioénergétique. Oléron (France). 21-24 Juin 2007.

- **Vial G**, Chaté V, Leverve X, Demaison L. “Excess mannitol does not protect the myocardium during ischemia/reperfusion.”

Printemps de la cardiologie 2006. Toulouse (France). 10-13 Mai 2006.

- **Vial G**, Gaye R, Dubouchaud H, Leverve X, Favier R, Demaison L. “Beneficial effects of cariporide, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor, on coronary reactivity in streptozotocin-induced.”

11th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research. Nice (France) Friday 29th September – Sunday 1st October 2006.