



HAL
open science

Rôle des mouvements membranaires dans la régulation de la production endogène de glucose

Julien Chilloux

► **To cite this version:**

Julien Chilloux. Rôle des mouvements membranaires dans la régulation de la production endogène de glucose. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10023 . tel-01002675

HAL Id: tel-01002675

<https://theses.hal.science/tel-01002675>

Submitted on 21 Aug 2014

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.

N° d'ordre : 023-2012

Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenu le 5 Mars 2012

par

M. CHILLOUX Julien

TITRE :

**Rôle des mouvements membranaires dans la régulation de la
production endogène de glucose**

Directeur de thèse : Mme Amandine GAUTIER-STEIN

JURY : M. Bruno ALLARD, Président du jury
Mme Fabienne FOUFELLE, Rapporteur
M. Bernard THORENS, Rapporteur
M. Christophe LAMAZE, Examineur
M. Serge MANIE, Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. A. Bonmartin

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu le président du jury, Bruno Allard, d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury. Je remercie Bernard Thorens et Fabienne Fougelle d'avoir jugé mon manuscrit et ma soutenance.

Je remercie grandement Christophe Lamaze et Serge Manié d'avoir jugé mon travail lors de la soutenance mais aussi d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse tout au long de la construction de ce projet. Merci à eux d'avoir apporté leurs connaissances et leur savoir-faire tout au long de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement Amandine pour m'avoir encadré durant mon Master 2 et ma thèse. J'espère qu'elle gardera un bon souvenir de son premier « thésard » officiel. Pour ma part, je garderai le souvenir d'une chef patiente, pédagogue, dynamique avec d'énormes connaissances, et un savoir-faire qui n'a d'égal que sa gentillesse.

Je remercie Gilles de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il restera pour moi bien plus qu'un directeur de laboratoire car il représente un exemple à suivre notamment dans sa force à persévérer et à défendre ses opinions.

Je tiens aussi à remercier Valérie qui m'a permis d'effectuer mon premier stage de Master 1 au sein de l'unité me permettant ainsi de faire mes premiers pas dans la recherche.

Je remercie bien évidemment l'ensemble des membres de l'U855 avec qui j'ai lié des liens d'amitié permettant ainsi de travailler dans une très bonne ambiance. Dans tous les cas, cette petite « famille » me manquera beaucoup alors à tous, SLTLSPQ.

D'une façon plus personnelle, je tiens à remercier mes parents, mes sœurs et leur famille et ma belle-famille d'avoir ainsi créé un environnement propice à mon développement personnel qui se concrétise aujourd'hui par l'obtention de ce titre de docteur dont, je le sais, ils sont très fiers.

Enfin, la meilleure pour la fin, je remercie ma petite femme qui me soutient tous les jours et durant les moments difficiles qui ne manquent pas dans le domaine de la recherche. Son amour et son soutien sans faille depuis 10 ans se confirment encore aujourd'hui par sa venue avec moi dans nos nouvelles aventures londoniennes.

Un grand merci à tous pour votre gentillesse, votre amitié et votre amour qui permettent aujourd'hui mon épanouissement dans ce métier de chercheur.

Abréviations

3-O-MG	: 3-O-MéthylGlucose
Acétyl CoA	: Acétyl-Coenzyme A
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
AG	: Acide Gras
AMPc	: Adénosine Monophosphate cyclique
ARNm	: Acide Ribonucléique messenger
ATP	: Adénosine Triphosphate
Cav1, 2 et 3	: Cavéoline 1, 2 et 3
CREB	: Cyclic AMP response element-binding protein
CSD	: Caveolin-1 Scaffolding Domain
DIDS	: 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid
DMEM	: Dulbecco's Minimal Essential Medium
dmnX	: dorsal motor nucleus of the vagus nerve
eNOS	: endothelial Nitric Oxide Synthase
ERES	: Endoplasmic Reticulum Exit Site
F1,6BPase	: Fructose-1,6-Bisphosphatase
Foxo	: Forkhead-box protein O class
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer
G6P	: Glucose-6-Phosphate
G6Pase	: Glucose-6-Phosphatase
G6PC	: Glucose-6-Phosphatase Catalytic subunit
G6PT	: Glucose-6-Phosphate Transporter
GFP	: Green Fluorescent Protein
GK	: Glucokinase
GLP1	: Glucagon-like peptide-1
GLUT	: Glucose Transporter
GPI	: Glycosyl Phosphatidyl inositol
GRE	: Glucocorticoïde Response Element
GRU	: Glucocorticoïde Response Unit
GSD	: Glycogen Storage Disease (glycogénose)
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase-3
GTPase	: Guanosine Triphosphate hydrolase
HDL	: High Density Lipoprotein
HFHS	: High Fat High Sucrose
HK	: Hexokinase
HMIT	: Proton Myo-Inositol Transporter
HNF	: Hepatocyte Nuclear Factor
IGRP	: Islet G6Pase Related Protein

IP	: Immunoprécipitation
IRE	: Insulin Response Element
IRS	: Insuline receptor substrate
LDL	: Low Density Lipoprotein
MS	: Mass Spectrometry
PCK1	: Pyruvate kinase
PEG	: Production Endogène de Glucose
PEPCK	: Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PHG	: Production Hépatique de Glucose
PI3K	: Phosphoinositide-3 kinase
PI4P	: Phosphatidylinositol 4-Phosphate
PIG	: Production Intestinale de Glucose
PKA,B et C	: Protéine Kinase A, B et C
PRG	: Production rénale de glucose
PTRF	: Polymérase I and transcript Release Factor
RCPG	: Récepteurs couplés aux protéines. G
RE	: Réticulum Endoplasmique
RIP	: Rat Insulin Promoter
SGLT	: Sodium Glucose-Linked Transporter
TA	: Tissu adipeux
TG	: Triglycérides
TGN	: Trans-Golgi Network
UDP	: Uridine diphosphate
UGRP	: Ubiquitous G6Pase Related Protein

Table des matières

<u>Abréviations</u>	3
<u>Données bibliographiques</u>	8
<u>I- L'homéostasie glucidique chez l'homme</u>	9
<u>I.1 Le stockage du glucose et de l'énergie glucidique</u>	9
<u>I.1.a La Glycogénogenèse</u>	9
<u>I.1.b La lipogenèse à partir du glucose</u>	9
<u>I.2 La production endogène de glucose</u>	10
<u>I.2.a La Glycogénolyse</u>	10
<u>I.2.b La Néoglucogenèse</u>	10
<u>I.2.c Les rôles complémentaires des organes producteurs de glucose dans la production de glucose</u>	11
<u>I.2.d Les rôles différentiels des organes producteurs de glucose dans la régulation de l'homéostasie glucidique</u>	12
<u>I.3 La régulation de la production endogène de glucose</u>	12
<u>I.3.a Les hormones pancréatiques</u>	12
<u>I.3.b Les hormones du stress</u>	14
<u>I.3.c Les nutriments</u>	15
<u>II- Le complexe G6Pase</u>	16
<u>II.1 La G6PC</u>	17
<u>II.2 La G6PT</u>	18
<u>II.3 La localisation tissulaire</u>	18
<u>II.4 La régulation à court terme de l'activité G6Pase</u>	19
<u>III- Une voie de sortie du glucose alternative à GLUT2</u>	21
<u>III.1 Les mécanismes de transport du glucose</u>	21
<u>III.1.a Les transporteurs de glucose sodium dépendants (SGLTs)</u>	21
<u>III.1.b Les facilitateurs de transport du glucose (GLUTs)</u>	22
<u>III.2 GLUT2</u>	23
<u>III.3 GLUT2 et la détection du glucose</u>	24
<u>III.3.a La sécrétion d'insuline</u>	24
<u>III.3.b La détection du glucose central</u>	25
<u>III.3.c La détection du glucose hépatoportal</u>	25
<u>III.4 Le syndrome de Fanconi-Bickel et son modèle murin</u>	26
<u>III.5 GLUT2 et le transport du glucose</u>	27
<u>III.5.a L'absorption intestinale du fructose et du glucose</u>	27
<u>III.5.b La sortie du glucose issu de la PEG</u>	27
<u>IV- Cavéoline-1, transport et métabolisme</u>	29
<u>IV.1 Les cavéolines</u>	29
<u>IV.1.a La synthèse des cavéolines et des cavéoles</u>	29
<u>IV.1.b La structure des différentes cavéolines</u>	30
<u>IV.2 Les fonctions de la Cavéoline-1</u>	31
<u>IV.2.a Le trafic vésiculaire</u>	31
<u>IV.2.b L'homéostasie du cholestérol</u>	32
<u>IV.2.c La régulation de la transduction des signaux</u>	34
<u>IV.2.d « Mécano-sensing »</u>	36
<u>IV.3 Cavéoline-1 : pathologie humaine et modèle murin</u>	36
<u>IV.3.a Tumorigénèse et cancer</u>	36
<u>IV.3.b L'insulino-résistance et le métabolisme des lipides et du glucose</u>	37

IV.3.c Les pathologies cardio-vasculaires.....	39
IV.3.d Les pathologies pulmonaires.....	39
Démarche expérimentale.....	40
I- Etude de la régulation post-traductionnelle de la G6Pase.....	43
I.1 Introduction.....	44
I.2 Matériels et méthodes.....	45
I.2.a Analyse informatique et sites de phosphorylation.....	45
I.2.b Mutagenèse dirigée.....	45
I.2.c Culture cellulaire et Transfection.....	46
I.2.d Western Blot.....	47
I.2.e Anticorps primaires.....	47
I.2.f Dosages d'activité G6Pase.....	47
I.2.g Isolement des hépatocytes primaires.....	48
I.2.h Immunoprécipitation de la G6PC.....	48
I.2.i Spectrométrie de masse.....	49
I.2.j Phosphorylation P32.....	49
I.3 Résultats - Discussion.....	49
I.3.a Identification et étude de sites potentiels de phosphorylation par la PKA.....	50
I.3.b Analyse de la séquence de la G6PC par MS.....	52
I.3.c Phosphorylation in vitro.....	54
I.3.d Interaction G6PC-G6PT.....	55
I.4 Conclusion et perspectives.....	55
II- Mise en évidence d'une voie de sortie de glucose indépendante de GLUT2 impliquant la cavéoline-1.....	57
II.1 Introduction.....	58
II.2 Matériels et méthodes.....	58
II.2.a Animaux.....	58
II.2.b Isolement et culture des hépatocytes primaires.....	59
II.2.c Production de glucose et glucose intracellulaire.....	59
II.2.d Dosage du glycogène.....	60
II.2.e Extraction d'ARNm et quantification.....	60
II.2.f Western Blot, Dosage d'activité G6Pase et immunoprécipitation.....	60
II.2.g Anticorps primaires.....	60
II.2.h Microscopie.....	60
II.2.i Mutagenèse dirigée de la G6PC.....	61
II.3 Résultats - Discussion.....	62
II.3.a Existence d'une voie vésiculaire impliquée dans le transport du glucose produit de novo.....	62
II.3.b Rôle de la cavéoline-1 dans la sortie vésiculaire du glucose.....	63
II.3.c Relations entre production de glucose dans le RE et voie vésiculaire de sortie.....	65
II.4 Conclusion et perspectives.....	68
III- Discussion Générale.....	70
III.1 Caractérisation de la voie vésiculaire de sortie du glucose : implication de la cavéoline 1.....	71
III.2 Mécanismes de sortie du glucose par la voie vésiculaire impliquant la Cav1.....	74
III.3 Voie vésiculaire et néoglucogenèse : implication de deux pools de G6P.....	76
III.4 Régulations de la voie vésiculaire de sortie du glucose ; Relation avec l'activité G6Pase.....	77
Travaux Personnels.....	79
Articles.....	80

<u>Communications orales</u>	80
<u>Posters commentés</u>	80
<u>Posters</u>	81
<u>Références bibliographiques</u>	82

Données bibliographiques

I- L'homéostasie glucidique chez l'homme

L'homéostasie glucidique consiste en un équilibre finement régulé de la concentration plasmatique en glucose autour d'une valeur de 1 g/L. Le glucose est la molécule nécessaire à l'apport énergétique nécessaire au fonctionnement des globules rouges, du cerveau et des muscles en contraction rapide. L'homéostasie glucidique est donc un paramètre vital. Cet équilibre glycémique est permis par les mécanismes tendant à faire :

1- diminuer la glycémie que sont la consommation du glucose par les organes et le stockage énergétique sous forme de glycogène (glycogénogenèse) ou sous forme de triglycérides (lipogenèse)

2- augmenter la glycémie que sont l'apport exogène ponctuel de glucose par l'alimentation et la production endogène de glucose (Figure 1).

I.1 Le stockage du glucose et de l'énergie glucidique

I.1.a La glycogénogenèse

La glycogénogenèse (Figure 2) est la voie métabolique qui permet, durant les périodes d'hyperglycémie, de stocker le glucose sous forme de glycogène. Cette réaction se déroule dans le foie et dans les muscles squelettiques pour permettre, lors d'épisodes d'hypoglycémie, de produire de nouveau du glucose. La première étape de la glycogénogenèse est le captage du glucose via des transporteurs de glucose au niveau du foie et des muscles, qui sont respectivement GLUT2 et GLUT4. La molécule de glucose est ensuite phosphorylée en glucose-6-phosphate (G6P) par la glucokinase (GK) dans le foie et par l'hexokinase (HK) dans les muscles squelettiques. La chaîne de réaction produit, à son terme, de l'UDP-glucose transformé en molécule de glycogène par la glycogène synthase.

I.1.b La lipogenèse à partir du glucose

Le catabolisme du glucose fournit des substrats à la lipogenèse. Une partie du glucose est donc utilisée pour la production *de novo* de lipides qui pourront être utilisés comme source d'énergie (Figure 3). La production de lipides se déroule principalement dans le foie et leur stockage se fait surtout dans le tissu adipeux. Ce stockage permet un fort rendement énergétique par rapport au volume occupé (1g de lipides → 9 kcal vs 1g de glucose → 3,75 kcal). Le glucose entre dans les

hépatocytes via GLUT2 dans le foie et via GLUT4 dans les adipocytes. Le glucose produit du pyruvate soit directement via la glycolyse soit indirectement via la voie des pentoses phosphates, par la production de glycéraldéhyde-3-phosphate. Ce pyruvate produit dans le cytosol est ensuite transformé en acétyl CoA au niveau de la mitochondrie. Enfin, ce dernier rejoint la voie de synthèse des acides gras dans le cytosol pour produire des triglycérides.

1.2 La production endogène de glucose

La production endogène de glucose (PEG) (Figure 4) permet la production de glucose lors d'épisodes hypoglycémiques non compensés par un apport exogène de glucose. Cette PEG est composée de deux voies métaboliques : la glycogénolyse et la néoglucogenèse, qui sont utilisées généralement successivement selon la durée de l'épisode d'hypoglycémie et du stock de glycogène.

1.2.a La glycogénolyse

La glycogénolyse est le processus permettant de produire du glucose à partir des stocks de glycogène. Tandis que le muscle utilise ses stocks de glycogène pour un apport énergétique uniquement *in situ*, le foie fournit le glucose nécessaire au fonctionnement de tout l'organisme. Le glycogène est converti en premier lieu en Glucose-1-Phosphate par la glycogène phosphorylase puis en G6P par la phosphoglucomutase. Enfin, le G6P est transformé en glucose grâce à la glucose-6-phosphatase (G6Pase). La glycogénolyse hépatique est le mécanisme majoritaire déclenché lorsque l'organisme a besoin de produire du glucose. Cependant, la glycogénolyse est un mécanisme de production à court terme car les réserves de glycogène s'épuisent après 24h de jeûne chez l'Homme et après 12h chez la souris.

1.2.b La néoglucogenèse

La néoglucogenèse permet la production *de novo* de glucose à partir de précurseurs endogènes non glucidiques (Figure 4) :

1- le pyruvate provenant de la glycolyse (voie d'oxydation du glucose) est transformé au niveau de la mitochondrie en oxaloacétate puis en phosphoénolpyruvate qui remonte la voie de la glycolyse.

2- le lactate provenant de la fermentation lactique du glucose au niveau des muscles. Cette voie est appelée cycle de Cori. Une fois dans la cellule néoglucogénique, le lactate est transformé en pyruvate par la lactate déshydrogénase.

3- le glycérol provenant de l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides du foie et du tissu adipeux. Le glycérol est transformé successivement en glycérol-3-phosphate puis en dihydroxyacétone phosphate et enfin en glycéraldéhyde-3-phosphate qui peut remonter la voie de la néoglucogenèse au niveau du fructose-1,6-diphosphate.

4- les acides aminés glucoformateurs (i.e. tous les acides aminés sauf la lysine et la leucine) provenant du catabolisme des protéines musculaires. Le métabolisme des acides aminés les transforme en oxaloacétate, utilisable dans la néoglucogenèse.

La néoglucogenèse fait intervenir plusieurs enzymes dont la plupart sont communes à la voie de la glycolyse. Cependant, trois réactions sont irréversibles et font intervenir des enzymes spécifiques à la PEG, et constituent ainsi des cibles clés de sa régulation. Ces trois enzymes sont la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-c), qui transforme l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, la fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BPase), qui transforme le fructose-1,6-diphosphate en fructose-6-phosphate et enfin, la glucose-6-phosphatase (G6Pase), qui transforme le glucose-6-phosphate en glucose. Contrairement à la PEPCK-c et à la F1,6BPase, exprimées dans un grand nombre de tissus, l'expression de la G6Pase est restreinte à seulement trois tissus : le foie, les reins et l'intestin (Rajas et al. 1999). Cette expression restreinte confère à ces trois tissus la spécificité de produire du glucose par la néoglucogenèse.

Ces trois tissus n'ont cependant pas tous la même importance ni le même rôle dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

1.2.c Les rôles complémentaires des organes producteurs de glucose dans la production de glucose

Le foie est le seul organe pouvant mobiliser la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Nordlie et al. 1999). Lors d'un jeûne court, le foie utilise en premier lieu ses réserves de glycogène et, si le jeûne se prolonge, la néoglucogenèse hépatique prend le relais principalement à partir du lactate, de l'alanine et du glycérol. Dans le cas d'une longue période de jeûne, le foie est secondé dans cette production de glucose par le rein et l'intestin (Mithieux et al. 2006). La production rénale de glucose (PRG) peut alors représenter plus de 50% de la production endogène de glucose chez le rat à jeun depuis 24h (Pillot et al. 2009) et pourrait représenter 20% chez l'homme à l'état postabsorptif (Cersosimo et al. 1999). Le substrat principal de cette PRG est la glutamine. Concernant la production intestinale de glucose (PIG), celle-ci est très faible en situation post-absorptive mais peut représenter jusqu'à 20 voire 35% de la PEG chez le rat à jeun pendant 48 et 72h (Croset et al. 2001; Mithieux et al. 2004). Les substrats principaux de la PIG sont la glutamine (80%) et le glycérol

(20%) (Croset et al. 2001). Notre laboratoire a montré que les productions rénale et intestinale de glucose sont suffisantes pour maintenir l'homéostasie glucidique en l'absence de la PHG, contrairement à l'idée généralement admise (Mutel et al., 2011).

1.2.d Les rôles différentiels des organes producteurs de glucose dans la régulation de l'homéostasie glucidique

De nombreux travaux suggèrent que la PHG aurait plutôt des effets délétères en opposition à la PIG qui aurait des effets bénéfiques sur l'homéostasie glucidique.

En effet la PHG, chez les patients diabétiques de type 2, est augmentée, participant ainsi à l'hyperglycémie caractérisant cette pathologie (Clare et al. 2000; Beck-Nielsen et al. 2002). De plus, l'augmentation spécifique de la PHG chez le rat suffit à induire l'apparition de symptômes caractéristiques d'un pré-diabète (Trinh et al. 1998).

A l'inverse, la PIG, libérant du glucose au niveau de la veine porte, a des effets bénéfiques sur la régulation de l'homéostasie glucidique. Concernant la régulation de la prise alimentaire, notre laboratoire a montré qu'un régime enrichi en protéines induit la PIG, qui augmente la glycémie portale. Ce glucose portal est responsable de l'effet de satiété des protéines par l'intermédiaire de l'activation des noyaux hypothalamiques (Mithieux et al. 2005). Le signal glucose portal induit par une augmentation de la PIG est également responsable de l'amélioration du profil glycémique de souris rendues obèses par un régime riche en sucrose et en lipides (HFHS : High Fat High Sucrose) ayant subi une chirurgie bariatrique (Troy et al. 2008). En accord avec ces résultats, nous avons montré que les régimes riches en protéines améliorent la sensibilité à l'insuline de la PHG contribuant ainsi à une amélioration des paramètres glycémiques (Pillot et al. 2009). Enfin, ces résultats controversés ont été confirmés grâce à l'utilisation de modèles transgéniques. De récents travaux de notre équipe ont permis de montrer que, dans un modèle murin invalidé pour la G6Pase intestinale, l'effet de satiété des régimes enrichis en protéines est annulé (Penhoat et al. 2011).

1.3 La régulation de la production endogène de glucose

La régulation de la PEG est un facteur majeur dans le maintien de l'homéostasie glucidique, quelque soit l'état nutritionnel de l'organisme. De nombreux signaux hormonaux, nutritionnels et/ou nerveux existent afin de réguler finement cette production de glucose.

1.3.a Les hormones pancréatiques

- L'insuline

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules β du pancréas, au sein des îlots de Langerhans, principalement sous le contrôle de la glycémie. En période d'hyperglycémie, le glucose va stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β . L'insuline sécrétée induit alors une diminution de la glycémie en inhibant la PEG. Elle favorise l'utilisation du glucose par le foie en induisant la glycogénogenèse et, parallèlement, inhibe les enzymes de la néoglucogenèse.

• La régulation à long terme

L'insuline régule l'expression des gènes de la néoglucogenèse au niveau transcriptionnel. En effet, la quantité d'ARNm de la sous-unité catalytique de la G6Pase (G6PC), induit au cours du jeûne, est normalisée par la réalimentation ou un traitement à l'insuline dans les trois tissus néoglucogéniques (Mithieux et al. 1996; Rajas et al. 1999). L'insuline inhibe la transcription des gènes codant pour les enzymes clés de la néoglucogenèse : G6pase (G6pc) et PEPCkC (Pck1), à travers un élément de réponse à l'insuline IRE/IRS (Insulin Response Element/ Insulin Response Sequence) impliquant le facteur de transcription Foxo1 (Hall et al. 2000; Mounier & Posner 2006).

• La régulation à court terme

De façon très rapide, l'insuline est capable d'induire la synthèse de glycogène en régulant la phosphorylation des enzymes impliquées dans son métabolisme. En activant la voie de signalisation PI3K/PKB, l'insuline induit la phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), inhibant ainsi son activité (McManus et al. 2005). Il en résulte une moindre phosphorylation de la glycogène synthase, qui passe alors sous sa forme activée, permettant la synthèse du glycogène. L'insuline peut également réguler rapidement la glycolyse et la néoglucogenèse, notamment par le contrôle des enzymes phosphofructokinase et fructose-2,6-bisphosphatase via la PI3K (Bertrand et al. 1999). L'enzyme bifonctionnelle phosphofructokinase II/Fructose-2,6-bisphosphatase produit un activateur allostérique de la phosphofructokinase : le fructose-2,6-diphosphate. L'insuline augmente l'activité phosphofructokinase II de l'enzyme, permettant la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate à partir de fructose-6-phosphate. Le fructose-2,6-diphosphate produit va alors activer la phosphofructokinase, favorisant la voie de la glycolyse. Ainsi, sous l'effet de l'insuline, la voie de la glycolyse est activée, inhibant la voie de la néoglucogenèse. Parallèlement à cette régulation, les produits lipidiques de la PI3K exercent une régulation directe de l'activité G6Pase (cf. §II.4.a)

- **Le glucagon**

Le glucagon est libéré par les cellules α du pancréas, au sein des îlots de Langerhans, lorsque la glycémie est basse. Il a pour rôle principal de stimuler la PHG. Le glucagon agit en se fixant à son récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, ce qui active l'adénylate cyclase et entraîne l'augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPc). La cible majeure de l'AMPc produit est la protéine kinase A (PKA) (Figure 5). Le récepteur au glucagon a été identifié dans de nombreux tissus tels que le foie, le cerveau, l'intestin, le rein et le tissu adipeux (Burcelin et al. 1996).

• **La régulation à long terme**

Au niveau transcriptionnel, le glucagon entraîne, via l'activation de la PKA, la phosphorylation de certains facteurs de transcription, telle que la protéine cAMP responsive Element Binding Protein (CREB), qui participent à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la production de glucose (Dalle et al. 2004). La protéine CREB phosphorylée (P-CREB) peut se fixer sur les sites consensus CRE (cAMP response element) des promoteurs G6pc et Pck1 (Jitrapakdee et al. 1997; Schmoll et al. 1999). Cette régulation dépendante de la PKA peut être renforcée par d'autres facteurs de transcription, tels que HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4) et C/EBP (CAAT/enhancer binding protein) et des coactivateurs tels que CBP et CRTC2 dans le foie et l'intestin (Croniger et al. 1998; Gautier-Stein et al. 2005, 2006; Wang et al. 2010; Yabaluri & Bashyam 2010). Dans le rein, P-CREB se fixe sur le promoteur G6Pc mais pas sur celui de Pck1 dont l'expression au cours du jeûne est régulée par l'acidose métabolique (Mutel et al. 2011b).

• **La régulation à court terme**

A l'inverse de l'insuline, le glucagon peut, de façon très rapide, activer la glycogénolyse hépatique grâce à l'activation de la glycogène phosphorylase et à l'inhibition de la glycogène synthase, en induisant la phosphorylation de ces enzymes via la PKA et la phosphorylase kinase (Bollen et al. 1998). Le glucagon régule aussi l'activité de la pyruvate kinase de façon indirecte via la PKA (Pilkis et al. 1982). Le glucagon agit également au niveau de l'enzyme phosphofructokinase II/fructose-2,6- bisphosphatase, en activant l'activité fructose-2,6-bisphosphatase et donc en inhibant la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate (Pilkis et al. 1982). Enfin, cette hormone agit directement sur le flux d'hydrolyse du G6P à travers la G6Pase (cf. §II.4.b).

1.3.b Les hormones du stress

- **Les glucocorticoïdes**

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdes sécrétées lors de situations de stress par les

cellules du cortex de la glande surrénale (Cortisol, corticostérone). L'effet des glucocorticoïdes, assuré par l'activation du récepteur nucléaire GR (Glucocorticoïd Receptor), est majoritairement transcriptionnel sur les gènes de la néoglucogenèse, . Les glucocorticoïdes peuvent diffuser au travers de la membrane plasmique puis se fixent sur leurs récepteurs cytoplasmiques permettant leur translocation dans le noyau. Les GR se lient sur le promoteur des gènes G6pc et Pck1 via les unités de réponse aux glucocorticoïdes (GRU), composées de sites de liaison aux glucocorticoïdes (GRE) et de sites de liaisons à des facteurs accessoires tels que HNF1 et Foxo pour G6pc et HNF3 β et HNF4 pour Pck1 (Lin et al. 1998; Stafford et al. 2001; Vander Kooi et al. 2005).

- **L'adrénaline**

L'adrénaline est synthétisée par les cellules de la médullo-surrénale et sa sécrétion est sous la dépendance du système nerveux sympathique. Elle agit en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central et comme hormone dans la circulation sanguine.

La sécrétion d'adrénaline est significativement augmentée, tout comme celles du glucagon et des glucocorticoïdes, en situation de stress. Cette hormone exerce son action de façon directe, suite à sa fixation sur les récepteurs α - et β - adrénergiques. La fixation à ces récepteurs induit l'activation de la voie dépendante de l'AMPc et pourrait réguler l'expression des enzymes de la néoglucogenèse via cette voie. En effet, l'adrénaline est responsable d'une augmentation de la glycogénolyse ainsi que de la néoglucogenèse hépatique (Nonogaki 2000) et rénale (Cersosimo et al. 1999). Cependant, notre équipe a mis en évidence une augmentation de la PEG et de l'activité G6Pase par l'adrénaline chez le rat, indépendamment d'une augmentation de la quantité de protéines (Bady et al. 2002). Cette hormone permet également d'augmenter l'afflux de précurseurs néoglucogéniques au foie et au rein en agissant sur les tissus périphériques (McGuinness et al. 1997). Enfin, l'adrénaline peut agir également de façon indirecte en stimulant la sécrétion de glucagon et en inhibant la sécrétion insulinaire, amplifiant ainsi la libération de glucose (Nonogaki 2000).

1.3.c Les nutriments

• Le glucose

Indépendamment de ses effets stimulateurs sur la sécrétion d'insuline, le glucose est capable d'inhiber sa production par le foie (Moore et al. 1998). Une étude chez des chiens à jeun depuis 36 heures, a démontré qu'une hyperglycémie induite, en présence de concentrations basales en insuline et glucagon, entraîne une diminution de plus de 50% de la PEG (Shulman et al. 1978). Ces résultats ont été confirmés chez le rat. *In vivo*, un clamp hyperglycémique hypoinsulinémique diminue la

glycogénolyse hépatique de près de 60% (Rossetti et al. 1993). *In vitro*, la perfusion en condition hyperglycémique du foie diminue la PHG (Shiota et al. 1996). Une étude chez l'homme a également confirmé l'inhibition de la PHG suite à une hyperglycémie (Petersen et al. 1998). Les mécanismes de régulation supprimant la PHG semblent concerner la glycogénolyse car ils impliquent une très forte diminution du flux à travers la glycogène phosphorylase et une augmentation du flux à travers la glucokinase (Rossetti et al. 1993; Petersen et al. 1998).

Concernant la néoglucogenèse, les résultats obtenus sont essentiellement transcriptionnels. *In vivo* et *in vitro*, le glucose induit l'expression du gène G6pc1 (Massillon et al. 1996; Argaud et al. 1997; Massillon 2001; Bizeau et al. 2001; Vidal-Alabré et al. 2011). Dans les modèles animaux diabétiques, l'hyperglycémie induit la modification de CRTC2 et Foxo1 par O-glycosylation (Kuo et al. 2008; Dentin et al. 2008). Ces formes actives augmentent l'expression de la g6pc et pck1 contribuant ainsi à l'induction de la PHG et au développement du diabète de type 2.

- **Les acides gras**

Les acides gras (AG) à longue chaîne induisent la néoglucogenèse hépatique *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'oxydation des AG dans le foie conduit à la production de nombreux substrats clés tels que l'acétyl-CoA, le NADH et l'ATP. L'acétyl-CoA permet l'activation allostérique de la pyruvate carboxylase et le NADH est nécessaire à la formation de glycéraldéhyde-3P à partir de 1,3-bisphosphoglycérate dans la voie de la néoglucogenèse (Lam et al. 2003). Cependant, le rôle des AG dans la régulation de la PHG est complexe. En effet, malgré l'induction de la néoglucogenèse, la PEG n'est pas nécessairement augmentée (Clore et al. 1991; Roden et al. 2000). De plus, les AG induisent des effets opposés selon leur degré de saturation. Ainsi, les AG saturés induisent une accumulation de l'ARNm g6pc *in vitro* ou *in vivo* (Massillon et al. 1997; Chatelain et al. 1998) alors que les AG polyinsaturés inhibent la transcription du gène (Rajas et al. 2002).

- **Les protéines**

Une étude de notre laboratoire a mis en évidence qu'un régime riche en protéines entraîne une augmentation de l'activité des enzymes de la néoglucogenèse dans l'intestin et particulièrement de la G6Pase (Mithieux et al. 2005). Au cours de leur trajet dans le tractus gastro-intestinal, les protéines sont hydrolysées pour former des peptones. Ces peptones stimulent la production d'AMPc et augmentent l'activité de la PKA, ce qui entraîne la phosphorylation de CREB (Gevrey et al. 2002, 2004). Ce mécanisme de régulation par les peptones impliquant la PKA et CREB pourrait être mis en jeu à la fois dans la régulation transcriptionnelle du gène G6pc mais aussi dans la régulation post-traductionnelle de l'enzyme (cf.§II.4.c).

II- Le complexe G6Pase

La G6Pase est l'enzyme clé de la production endogène de glucose. En effet, c'est elle qui catalyse la dernière étape commune à la glycogénolyse et à la néoglucogenèse, i.e. la déphosphorylation du G6P en glucose (Figure 4). Cette position stratégique l'implique *de facto* dans des pathologies de l'homéostasie glucidique. En effet, l'absence d'activité G6Pase conduit à la glycogénose de type 1 (ou GSD1a), maladie caractérisée notamment par un déficit de production endogène de glucose et, de ce fait, de fortes hypoglycémies dans les périodes de jeûne. A l'inverse, une dérégulation de l'activité G6Pase est corrélée à une augmentation de la PEG et au diabète de type 2.

La G6Pase est un complexe enzymatique situé dans la membrane du réticulum endoplasmique et composé de deux sous-unités : une sous-unité transportant le G6P du cytoplasme vers le lumen du réticulum endoplasmique (G6PT) et une sous-unité catalytique (G6PC) qui transforme le G6P en glucose et phosphate inorganique (Figure 6).

II.1 La G6PC

La G6PC (Figure 7) est la sous-unité catalytique du complexe G6Pase. C'est une protéine hydrophobe constituée de 357 acides aminés et de neuf domaines transmembranaires enchassés dans la membrane du réticulum endoplasmique (Hemrika & Wever 1997; Pan et al. 1998). La G6PC est exprimée uniquement dans les trois tissus néoglucogéniques (Minassian et al. 1996; Rajas et al. 1999) et confère à ces organes la capacité de produire du glucose. Les mutations affectant l'activité de la G6PC conduisent à la glycogénose de type 1a (Chou & Mansfield 2008). Cette pathologie est caractérisée par une hypoglycémie chronique, une hépatomégalie et une néphromégalie dues à une accumulation importante de glycogène dans ces organes.

D'autres isoformes de la G6PC existent : la G6PC2 (ou IGRP : Islet-specific G6Pase-Related Protein) et la G6PC3 (ou UGRP : Ubiquitously expressed G6Pase catalytic subunit-Related Protein). L'isoforme G6PC2, présentant 50% d'homologie de séquence avec la G6PC, est exprimé uniquement dans les îlots pancréatiques. Cependant, aucune activité phosphatase n'a pu être mise en évidence par surexpression de la protéine (Arden et al. 1999; Martin et al. 2001). Ainsi, la G6PC2 ne participe pas, de façon significative, à la PEG. Concernant la protéine G6PC3, elle est homologue à 36% avec la G6PC1 (Martin et al. 2002; Shieh et al. 2003). Son expression est ubiquitaire, avec une expression maximale dans les muscles squelettiques (Martin et al. 2002). De même que pour la G6PC2, l'activité phosphohydrolase de la G6PC3 n'est pas détectée ou est très

faible par rapport à celle de la G6PC (Martin et al. 2002; Shieh et al. 2003). Elle serait impliquée dans les mécanismes de glycosylation (Hayee et al. 2011). La génération d'un modèle de souris invalidé pour le gène *G6pc3* a confirmé l'absence de la participation de la G6PC3 à la PEG (Wang et al. 2006; Cheung et al. 2007). Cependant, un phénotype de neutropénie associé à un dysfonctionnement des neutrophiles est développé par les souris *G6PC3^{-/-}* et les patients porteurs d'une mutation dans le gène *G6pc3* (Boztug & Klein 2009; McDermott et al. 2010). Il a été proposé que le complexe G6PC3-G6PT pourrait être impliqué dans la synthèse du glucose dans les neutrophiles, ce qui serait nécessaire au maintien de l'homéostasie énergétique de ces cellules et à leur survie (Jun et al. 2010).

II.2 La G6PT

Le site catalytique de la G6PC est situé du côté luminal du RE (Ghosh et al. 2002). Il est donc nécessaire que le substrat de la G6PC (G6P) soit amené au site catalytique grâce à un transporteur de G6P, la G6PT (Figure 8). La G6PT confère au complexe G6Pase sa spécificité à utiliser du G6P. En effet, lorsque la membrane du RE est perméabilisée, la G6PC peut alors déphosphoryler le mannose-6-phosphate, la glucosamine 6-phosphate et le 2-deoxyglucose 6-phosphate (Arion et al. 1972; Ajzannay et al. 1994). La G6PT peut également être un facteur limitant et ainsi jouer un rôle régulateur important du flux à travers le complexe G6Pase. En effet, la surexpression de G6PT dans des cellules Cos-1 (lignée issue de la lignée fibroblastique CV1 de rein de singe) induit une augmentation de la déphosphorylation du G6P (Hiraiwa et al. 1999). La G6PT est une protéine hydrophobe constituée de 429 acides aminés et de dix domaines transmembranaires enchassés dans la membrane du RE (Pan et al. 2009). La G6PT est une protéine ubiquitaire, ce qui suggère un rôle supplémentaire à celui de la production endogène de glucose. Les mutations rendant la G6PT inactive conduisent au développement de la glycogénose de type 1b ou GSD1b (pour Glycogen Storage Disease) (Chen et al. 2008). Cette pathologie présente les mêmes caractéristiques que la GSD1a, liées à l'absence de production de glucose. Ajoutés à ces symptômes communs, les patients atteints de GSD1b présentent des complications infectieuses provoquées par une déficience fonctionnelle des neutrophiles et des monocytes (Beaudet et al. 1980; Chou et al. 2010). Ce phénomène de neutropénie est lié à l'apoptose des neutrophiles induite par une augmentation du stress oxydant (Leuzzi et al. 2003) et du stress du RE (Kim et al. 2008b). Ce mécanisme illustre l'importance du rôle de la G6PT dans la régulation du stress oxydant. Par ailleurs, la G6PT joue un rôle important dans la production des glucocorticoïdes actifs (Bánhegyi et al., 2009). En effet, dans les hépatocytes, les adipocytes et les neutrophiles, le G6P fourni au sein de la lumière du RE par la G6PT est également utilisé par l'hexose-6-phosphate déshydrogénase pour régénérer le NADPH

dans le RE. Le NADPH produit est nécessaire à l'activité réductase de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β HSD1), permettant la conversion des corticoïdes inactifs en corticoïdes actifs. L'importance de la G6PT dans la régulation de cette activité a été mise en évidence chez les patients atteints de GSD1b (Walker et al. 2007). Cette activation des corticoïdes contre-régule l'action de l'insuline et d'autre part favorise le stockage énergétique.

II.3 La localisation tissulaire

Seule la G6PC a une expression tissulaire restreinte. Son expression a donc été plus précisément étudiée. Dans l'intestin, la G6PC est exprimée selon un gradient décroissant depuis le duodénum jusqu'au jéjunum chez le rat et du duodénum à l'iléon chez l'homme (Rajas et al. 1999; Mithieux et al. 2004). Plus précisément, la G6PC est située au niveau des sommets et des cryptes des villosités intestinales (Rajas et al. 2007). (Figure 9)

Dans le rein, la G6PC est exprimée au niveau des tubules proximaux du cortex, au niveau de l'épithélium urinaire des tubules collecteurs et des calices rénaux (Rajas et al. 2007).

Enfin, concernant le foie, elle est exprimée dans les cellules du parenchyme hépatique et dans les canaux biliaires intra-hépatiques (Rajas et al. 2007). De façon intéressante, la G6PC est plus fortement exprimée dans les hépatocytes périportaux que périveineux en accord avec un rôle néoglucogénique majoritaire des hépatocytes périportaux et un rôle glycogénolytique majoritaire des hépatocytes périveineux (Chen & Katz 1988; Agius et al. 1990).

Ces localisations pourraient être divisées en deux groupes avec, d'une part, une localisation compatible avec des mécanismes de production de glucose correspondant à une colocalisation avec la PEPCK (hépatocytes périportaux, sommets des villosités intestinales et tubules proximaux du cortex rénal) et, d'autre part, une localisation plus surprenante, compatible avec des mécanismes d'absorption du glucose (canaux biliaires intra-hépatiques, épithélium urinaire des tubules collecteurs et des calices rénaux). Ces localisations suggèrent un rôle possible de la G6Pase dans le transport de glucose.

II.4 La régulation à court terme de l'activité G6Pase

La G6Pase est une enzyme michaelienne avec un Km de 2-3 mM, supérieur à la concentration intracellulaire de son substrat, le G6P (0,05-1 mM). La G6Pase fonctionne ainsi à une vitesse très inférieure à sa capacité maximale et une faible variation de concentration de G6P induit une augmentation proportionnelle du flux enzymatique. De ce fait, les variations de concentration de G6P ont longtemps été considérées comme le seul élément régulateur de l'activité G6Pase (Hers &

Hue 1983). De plus, la régulation à court terme de la G6Pase a été très peu étudiée du fait des difficultés d'analyse inhérentes à sa forte hydrophobicité. Malgré ces difficultés, il paraît nécessaire d'étudier cette régulation étant donné son importance éventuelle durant les périodes de transition entre deux états nutritionnels. La régulation post-traductionnelle de la G6Pase a été suggérée pour la première fois par l'étude de Newgard et coll. en 1984, montrant l'inhibition de l'activité G6Pase, induite par le gavage de rats à jeun avec du glucose (Newgard et al. 1984a). Depuis, d'autres études ont mis en évidence certains mécanismes de régulation à court terme.

- **L'insuline**

In vitro, l'activité G6Pase est spécifiquement inhibée en présence de phosphoinositides, les produits lipidiques de la PI3K (Phosphoinositide 3 kinase), suggérant que le mécanisme impliqué dans la régulation de l'activité G6Pase par l'insuline pourrait mettre en jeu la PI3K (Mithieux et al. 1998). Il a pu être mis en évidence une diminution de l'activité G6Pase chez des rats réalimentés après 48 heures de jeûne, et ce, indépendamment de la biodisponibilité en G6P. Le mécanisme induit par la réalimentation implique l'insuline. La fixation de l'insuline à son récepteur permet l'activation d'IRS1 (Insulin receptor substrate-1) qui se dimérise avec la PI3K (Phosphatidylinositol-3 kinase). La membrane du réticulum endoplasmique contenant la G6Pase s'enrichit alors en complexe IRS1/PI3K (Daniele et al. 1999). Ce complexe induit un changement dans la composition lipidique de la membrane du réticulum endoplasmique et plus particulièrement un enrichissement en 3-phosphoinositides, ce qui *in fine* diminue l'activité de la G6Pase. Notre équipe a ainsi pu déterminer avec précision la capacité d'inhibition de chaque type de phosphoinositides et, par exemple, a montré que le PI3,4,5P₃ a une action trois fois plus importante que son précurseur le PI4,5P₂ (Mithieux et al. 1998). Les auteurs, grâce à des expérimentations en présence de détergent, ont déterminé que les phosphoinositides agissent de manière compétitive au niveau du site catalytique. (Daniele et al. 1999).

- **Les esters d'acétyl-coenzyme A**

Notre équipe (Mithieux & Zitoun 1996) et d'autres (Fulceri et al. 1995) ont montré que les esters d'acétyl-CoA inhibent l'activité G6Pase dans des microsomes de foie de rats. L'addition de palmitoyl-CoA induit une diminution de la V_{max} de la G6Pase sans modifier son K_m (Fulceri et al. 1995).

Cette inhibition, non compétitive lorsque les microsomes ne sont pas perméabilisés, est dépendante de : 1- la longueur de la chaîne de ces esters d'acétyl-CoA : plus la chaîne est longue et plus l'inhibition de l'activité G6Pase est forte. 2- la concentration de ces esters (Mithieux & Zitoun

1996). Les esters comprenant 10 à 14 carbones inhibent l'activité G6Pase avec des concentrations de 1 à 20 μ M. Les esters à chaînes longues supérieures ou égales à 16, inhibent l'activité G6Pase à des concentrations de 1 à 2 μ M mais cet effet est annulé voire inversé pour des concentrations supérieures.

L'activité G6Pase est également diminuée par les acides gras insaturés de manière non compétitive (Mithieux et al. 1993).

- **Le glucagon**

Les effets métaboliques du glucagon sur le métabolisme glucidique hépatique et notamment sur la dégradation du glycogène et l'activation de la pyruvate kinase, via la voie AMPc/PKA ont été largement documentés (Revue : Jiang & Zhang 2003). En revanche, son rôle dans la régulation de l'activité de la G6Pase a longtemps été suggéré mais jamais démontré.

Notre équipe a montré que des rats en situation post-absorptive perfusés avec du glucagon présentent une augmentation de la PEG sans modification de l'activité glucokinase, alors que la concentration hépatique de G6P est diminuée (Ichai et al. 2001). Cette augmentation de la PEG par le glucagon est retrouvée *in vitro*, à partir de la dihydroxyacétone, dans un modèle d'hépatocytes isolés de rat (Ichai et al. 2001). La PEG induite est due à une induction majeure du flux d'hydrolyse du G6P par le glucagon. Pourtant, aucune modification de l'activité enzymatique de la G6Pase n'a pu être détectée, probablement à cause du modèle utilisé qui présente une forte expression de la G6PC régulée au niveau transcriptionnel.

De façon originale, cette étude a également montré que l'effet du glucagon sur l'hydrolyse du G6P était sensible à la température et ne prenait plus place à 15°C, suggérant ainsi un mécanisme dépendant de mouvements membranaires. Les auteurs ont donc proposé que le mécanisme d'activation du flux d'hydrolyse du G6P par le glucagon pouvait réguler la sortie de glucose dépendante de mouvements membranaires décrite dans le modèle de souris GLUT2^{-/-} (Guillam et al. 1998).

III- Une voie de sortie du glucose alternative à GLUT2

III.1 Les mécanismes de transport du glucose

III.1.a Les transporteurs de glucose sodium dépendants (SGLTs)

Ces transporteurs sont dépendants d'un gradient de sodium créé par la pompe Na⁺/K⁺ ATPase afin de co-transporter le sodium et le glucose dans la cellule. Cette forme de transport a

principalement lieu au niveau de l'absorption intestinale du glucose luminal (essentiellement via SGLT1) et de la réabsorption rénale du glucose (essentiellement via SGLT2). La forme SGLT3, notamment exprimée au niveau intestinal, est impliquée dans la détection du glucose plutôt que dans son transport (Diez-Sampedro et al. 2003). Enfin d'autres formes (SGLT4-6) ont pu être mises en évidence mais leur rôle respectif n'a pas encore été déterminé (Revue : Wright et al. 2011).

III.1.b Les facilitateurs de transport du glucose (GLUTs)

Ces transporteurs utilisent la diffusion passive à travers les membranes pour transporter le glucose et d'autres oses. Les GLUTs sont composés de 12 domaines transmembranaires dont les extrémités N et C terminales sont situées du même côté de la membrane. Un motif particulier du transport des sucres, composé d'une région riche en glycine et en tryptophane, a pu être mis en évidence. Il est aujourd'hui considéré que tous les GLUTs ont pu être identifiés et qu'ils seraient au nombre de 13 (GLUT1 à 13). L'alignement des séquences de ces transporteurs a permis de mettre en évidence trois classes. (Revue : Joost & Thorens 2001; Augustin 2010).

- Les GLUTs de classe 1

Ce sont les GLUTs numérotés de 1 à 4. GLUT1 est exprimé dans le cerveau, les globules rouges et, dans une moindre mesure, le tissu adipeux, les muscles et le foie (Klepper & Voit 2002). GLUT2 est exprimé dans les cellules bêta pancréatiques, le foie et le rein. Il est aussi exprimé au niveau de la membrane basolatérale des entérocytes et des tubules rénaux proximaux. Il possède le plus haut K_m (17mM) de la famille des GLUTs et transporte aussi le galactose ($K_m = 92mM$), le mannose ($K_m = 125mM$), le fructose ($K_m = 76mM$) (Johnson et al. 1990) et la glucosamine ($K_m = 0,8mM$) (Uldry et al. 2002). GLUT3 est exprimé dans le cerveau et les cellules bêta pancréatiques chez l'homme et se caractérise par une très forte affinité pour le glucose (Shepherd et al. 1992; McCulloch et al. 2011). Enfin, GLUT4 est exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, le tissu adipeux et le cerveau (Huang & Czech 2007). GLUT4 a la particularité d'être la forme dont la translocation à la membrane plasmique et l'internalisation sont dépendantes de l'insuline. Cette hormone apparaît donc comme un régulateur du captage du glucose dans les tissus l'exprimant.

- Les GLUTs de classe 2

Cette famille comprend les GLUTs 5, 7, 9 et 11. GLUT5 est un transporteur de fructose exprimé majoritairement dans l'intestin, les testicules et les reins (Burant et al. 1992). GLUT7 est un transporteur de glucose et de fructose principalement exprimé dans l'intestin (Li et al. 2004). GLUT9 est exprimé dans les reins et le foie. C'est un transporteur d'acide urique dont la fonction de

transport du glucose et du fructose est encore discutée à ce jour. Un modèle suggère que GLUT9 ferait entrer le glucose et le fructose contre la sortie d'acide urique (Vitart et al. 2008). Enfin, GLUT11 présente trois isoformes exprimées chacune spécifiquement GLUT11-A : cœur, muscles squelettiques et rein ; GLUT11-B : placenta, tissu adipeux et rein et GLUT11-C : tissu adipeux, cœur, muscles squelettiques et pancréas (Wu et al. 2002). GLUT11 est un transporteur de glucose et de fructose.

- **Les GLUTs de classe 3**

Cette classe est composée des GLUTs 6, 8, 10, 12 et 13 ou HMIT. Toutes ces formes possèdent un signal d'internalisation (motif LL ou YSRI pour GLUT10) qui les maintient au niveau intracellulaire. GLUT6 est exprimé dans le cerveau, la rate et les leucocytes (Doege et al. 2000). GLUT8 est exprimé au niveau des testicules et dans une moindre mesure dans le cerveau, le foie, la rate, le tissu adipeux brun et les poumons (Ibberson et al. 2000). Ce transporteur est capable de transporter le glucose, le fructose et le galactose. GLUT10 est exprimé dans le foie, le cœur, les poumons, les muscles squelettiques, le pancréas, le placenta, les reins et le tissu adipeux. Il transporte le glucose et le galactose (McVie-Wylie et al. 2001; Dawson et al. 2001). GLUT12, exprimé dans les muscles squelettiques, le cœur, l'intestin et la prostate, transporte le glucose, le fructose et le galactose (Rogers et al. 2002). Comme GLUT4, GLUT12 est transloqué à la membrane plasmique sous l'action de l'insuline. Enfin, GLUT13 est majoritairement exprimé dans le cerveau (Uldry et al. 2001). Cependant, aucune activité de transport de sucre n'a pu être mise en évidence et il transporte le myo-inositol en même temps qu'un proton (d'où son autre nom : HMIT pour H⁺ myo-inositol Transporter) et l'inositol-3-phosphate.

III.2 GLUT2

Après la phase de production de glucose au niveau du réticulum endoplasmique par le complexe G6Pase, il est communément admis que le glucose produit est transporté du RE vers le cytoplasme par un mécanisme encore inconnu. Plusieurs travaux ont suggéré l'existence d'un transporteur spécifique responsable du transport hors du RE. Récemment, grâce à l'utilisation de sondes détectant le glucose en temps réel, il a été suggéré que le transport de glucose hors du RE était réalisé par les différents GLUTs au cours de leur synthèse (Takanaga & Frommer 2010).

Une fois libéré dans le cytoplasme celui-ci peut sortir de la cellule par un transporteur de glucose qui est situé au niveau de la membrane plasmique : GLUT2 (Figure 4). GLUT2 transporte le glucose à travers la membrane plasmique de manière passive avec une V_{max} et un K_m élevés pour le glucose (Gould et al. 1991; Colville et al. 1993). Il assure un flux bidirectionnel de glucose

pour le faire entrer et sortir selon son gradient de concentration.

Concernant la régulation de l'expression de GLUT2, les données disponibles à ce jour sont rares et contradictoires. Dans un modèle de rats diabétiques ayant une insulinémie faible et une hyperglycémie, l'expression de GLUT2 est augmentée au niveau du foie et de l'intestin (Yamamoto et al. 1991; Miyamoto et al. 1991). L'expression de GLUT2 est augmentée lors de la renutrition après un jeûne et lors d'un régime pauvre en sucres au niveau de l'intestin, du foie, des reins et du pancréas (Miyamoto et al. 1993; Thorens 1996). Ce modèle suggère que la régulation de GLUT2 implique l'insuline et le glucose. Cependant dans un modèle de souris diabétiques, l'expression de GLUT2 est fortement diminuée dans le pancréas (Thorens et al. 1992). Enfin, des rats nourris par voie parentérale présentent une diminution de l'expression de GLUT2 au niveau de l'intestin et du foie (Colomb et al. 1995). Ces deux dernières études suggèrent une régulation tissu-spécifique de GLUT2 et un effet différentiel du glucose en fonction de la concentration d'insuline.

L'activité de GLUT2 est également régulée à court terme par des mécanismes d'internalisation et de translocation à partir d'un pool intracellulaire vers la membrane plasmique apicale de l'entérocyte (Kellett & Helliwell 2000) et dans les cellules rénales (Marks et al. 2003). Dans les entérocytes, l'internalisation de GLUT2 est dépendante de mécanismes impliquant l'insuline (Tobin et al. 2008) et la translocation à la membrane apicale est dépendante du stress, des corticoïdes, et du GLP2 (glucagon-like peptide 2) (Kellett et al. 2008). Dans le foie, GLUT2 peut former un complexe avec le récepteur à l'insuline et être internalisé en même temps que lui après action de l'insuline (Eisenberg et al. 2005; González-Rodríguez et al. 2008), ce qui réduirait d'autant la sortie de glucose produit dans les hépatocytes.

III.3 GLUT2 et la détection du glucose

La faible affinité de GLUT2 pour le glucose empêche sa saturation en conditions de variations physiologiques, ce qui lui permet de transporter le glucose avec une vitesse proportionnelle à sa concentration extracellulaire (Gould et al. 1991). Plusieurs travaux, basés notamment sur l'étude de souris invalidées pour GLUT2, ont montré l'importance de ce transporteur dans les mécanismes de détection du glucose.

III.3.a La sécrétion d'insuline

L'inactivation pour le gène SLC2A2 codant pour GLUT2 chez la souris est, contrairement à l'homme, létale au moment du sevrage. Cette mortalité est due à un phénotype diabétique lié à un défaut de sécrétion d'insuline qui peut être contrecarré par un traitement à l'insuline (Guillam et al.

1997). En effet, *in vitro*, les îlots pancréatiques de souris invalidées pour GLUT2 présentent un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose et un défaut de synthèse de cette hormone (Guillam et al. 2000). Le traitement à l'insuline de ces souris au moment du sevrage permet de leur faire atteindre l'âge adulte, montrant que l'expression de GLUT2 extra pancréatique n'est pas vitale. La réexpression de GLUT2 dans ces cellules β par une technique adénovirale restaure leur sensibilité au glucose. Par la suite, afin de pallier le problème de mortalité des souris GLUT2^{-/-}, un modèle de souris RIP::GLUT1 \times GLUT2^{-/-} invalidé pour GLUT2 mais réexprimant un autre transporteur de glucose, GLUT1, uniquement dans les cellules β -pancréatiques sous le contrôle du promoteur de l'insuline de rat (RIP), a été développé (Thorens et al. 2000). Ce modèle restaure la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose et permet à ces souris d'atteindre l'âge adulte.

De manière indirecte, GLUT2 est également responsable de la régulation de la sécrétion d'insuline. En effet, GLUT2 est indispensable à la sécrétion du Glucagon-Like Peptide 1 (GLP1), une incrétine sécrétée par les cellules L intestinales (Cani et al. 2007). De plus, GLUT2 est indispensable au niveau central, dans le noyau arqué, pour la régulation nerveuse de la sécrétion d'insuline (Leloup et al. 1998).

III.3.b La détection du glucose central

Au niveau du système nerveux central, GLUT2 est exprimé dans les neurones et les astrocytes sensibles à la concentration du glucose, dans des régions très localisées et impliquées notamment dans le comportement alimentaire (Leloup et al. 1994, 1998; Arluison et al. 2004a, 2004b). Les souris invalidées pour GLUT2 ont une augmentation de la prise alimentaire qui serait due à une dérégulation du système hypothalamique mélanocortinergique (neuropeptides orexygènes : NPY et AgRP et anorexigènes : POMC et CART) (Bady et al. 2006). Cette expression de GLUT2 au niveau du système mélanocortinergique lui confère aussi un rôle dans la régulation de la thermogénèse et de la sensibilité à la leptine (Mounien et al. 2010). De plus, GLUT2 serait impliqué dans la régulation des neuropeptides anorexigènes CRH et TRH et le neuropeptide orexygène orexine (Stolarczyk et al. 2010).

Dans le cerveau, et plus précisément dans les cellules gliales, GLUT2 est aussi impliqué dans la régulation de la sécrétion de glucagon via le NTS et le dmX (Marty et al. 2005), des structures directement liées à la régulation de la fonction hormonale du pancréas (Jansen et al. 1997). En absence de GLUT2, ces cellules gliales ne sont plus capables de détecter le glucose et stimulent le système sympathique afin d'augmenter la sécrétion de glucagon par les cellules α .

Enfin, GLUT2 serait impliqué dans les mécanismes régulant les préférences alimentaires (Eny

et al. 2008) et le goût (Merigo et al. 2011)

III.3.c La détection du glucose hépatoportal

L'étude des souris invalidées pour GLUT2 a aussi permis de mettre en évidence un rôle de ce transporteur dans la détection du glucose, au niveau hépatoportal, et la régulation de l'homéostasie glucidique. Il a été montré que l'infusion de glucose dans la veine porte induit une augmentation du glucose au niveau périphérique, ce qui conduit à une hypoglycémie (Burcelin et al. 2000b). Ces résultats montrent que la veine porte représente un site majeur de la détection du glucose circulant. Cette détection du glucose portal n'a plus lieu chez le modèle murin invalidé pour GLUT2 montrant son implication dans ce mécanisme de détection (Burcelin et al. 2000c). Cette détection portale du glucose est un facteur clé dans la régulation de la prise alimentaire par la PIG et dans les effets bénéfiques du bypass sur le diabète de type 2 (Troy et al. 2008; Delaere et al. 2010).

III.4 Le syndrome de Fanconi-Bickel et son modèle murin

Chez l'homme, des mutations sur le gène SLC2A2 sont responsables du syndrome de Fanconi-Bickel (ou Glycogen storage disease type XI) (Revue : Leturque et al. 2009). L'insulinémie des patients atteints de ce syndrome ne présente pas de défaut majeur, contrairement au modèle murin qui meurt après sevrage à cause d'un manque d'insuline (cf. § III.3.a). En effet, dans les cellules β humaines, GLUT2 est minoritaire par rapport au transporteur GLUT3 (McCulloch et al. 2011). En revanche, comme le modèle murin GLUT2^{-/-}, les patients présentent une hyperglycémie post-prandiale, une hypoglycémie à jeun, une accumulation de glycogène au niveau du foie responsable d'hépatomégalie, une néphropathie, une intolérance au glucose et une sévère glycosurie (Manz et al. 1987). Cependant, il est important de noter que ces patients répondent à une injection de glucagon, d'adrénaline ou d'acides aminés glucoformateurs par une augmentation de la glycémie (Odievre 1966). De plus, une forte élévation de la glycosurie deux heures après une injection de glucagon a pu être mise en évidence (Brivet et al. 1983). L'élévation de la glycosurie suggère d'une part une implication de GLUT2 dans les mécanismes de réabsorption du glucose au niveau rénal et d'autre part une augmentation de la production de glucose. Dans le modèle murin GLUT2^{-/-}, l'injection de glucagon induit également une augmentation de la glycémie (Guillam et al. 1998). Ces données suggèrent que la production de glucose est compensée efficacement en absence de GLUT2 et que celle-ci serait sensible à une régulation hormonale. Les souris RIP::GLUT1 \times GLUT2^{-/-} présentent une glycémie postabsorptive normale mais une hypoglycémie à jeun. Elles présentent une glycosurie et un défaut de régulation de la sécrétion du glucagon (Marty et al. 2005). Contrairement au modèle ne réexprimant pas GLUT1 dans le pancréas, ce modèle ne présente pas

d'intolérance au glucose.

III.5 GLUT2 et le transport du glucose

III.5.a L'absorption intestinale du fructose et du glucose

La membrane basale des entérocytes contient le transporteur SGLT1, qui co-transporte le sodium et le glucose dans l'entérocyte, et GLUT5 qui y transporte le fructose (Figure 10). Une fois dans l'entérocyte, le glucose et le fructose sont transportés vers le sang par GLUT2.

Les études du transport à travers la barrière intestinale de souris invalidées pour GLUT2 a permis de préciser les mécanismes d'absorption intestinale des oses.

En effet, les souris GLUT2^{-/-} ne sont capables d'absorber que 50% de moins de fructose que les souris sauvages, montrant ainsi le rôle complémentaire de GLUT2 et de GLUT5 dans l'absorption intestinale de fructose (Gouyon et al. 2003). Ce rôle complémentaire est possible grâce au recrutement à la membrane apicale de GLUT2, induit par l'ingestion d'un régime riche en glucose et fructose et lorsque la capacité maximale de transport par GLUT5 est atteinte.

Par contre, les souris invalidées pour GLUT2 présentent une absorption intestinale de glucose équivalente aux souris sauvages (Stümpel et al. 2001). Cette absorption en l'absence de GLUT2 n'est pas le fruit d'une diffusion passive du glucose puisqu'elle peut être inhibée par un inhibiteur de SGLT1, la phloridzine. Plus surprenant, le mécanisme impliqué dans cette absorption est aussi inhibée par le S4048, un inhibiteur spécifique de la G6PT. Cette donnée montre que l'absorption intestinale de glucose en l'absence de GLUT2 nécessite que le glucose, une fois dans l'entérocyte, soit métabolisé en G6P avant d'être transformé de nouveau en glucose par la G6Pase et enfin exporté vers le sang. Une preuve supplémentaire de l'implication de la G6Pase dans l'absorption de glucose de ce modèle est l'utilisation du 3-O-méthylglucose (3-O-MG). Le 3-O-MG est une forme de glucose non métabolisable, c'est-à-dire qu'il ne peut pas être phosphorylé en G6P. Chez les souris sauvages, le 3-O-MG est absorbé normalement dans le sang grâce à la présence de GLUT2. Par contre, chez les souris invalidées pour GLUT2, le 3-O-MG n'est pas absorbé dans le sang et s'accumule dans l'entérocyte, preuve qu'une étape de phosphorylation du glucose est nécessaire à l'absorption du glucose chez les souris invalidées pour GLUT2 (Figure 11).

III.5.b La sortie du glucose issu de la PEG

Au niveau hépatique, GLUT2 est exprimé pareillement dans les hépatocytes périportaux et périverneux. Il est impliqué dans la production de glucose en permettant la sortie du glucose produit par le foie. Il permet aussi l'entrée du glucose dans le foie, *i.e.* dans la voie de la glycolyse lors

d'épisodes hyperglycémiques. Dans les reins, GLUT2 possède un double rôle à la fois dans la production de glucose néoglucogénique et dans la réabsorption du glucose urinaire (Guillam et al. 1998; Burcelin et al. 2000a). Dans l'intestin, GLUT2 est impliqué, comme dans tous les organes producteurs de glucose, dans la sortie du glucose vers le sang.

Les souris invalidées pour GLUT2 ont une très faible capacité à mobiliser le glycogène. Elles présentent la même quantité de glycogène hépatique après 6h de jeûne par rapport à l'état nourri alors que les souris sauvages ont déjà quasiment épuisé leur stock.

A l'inverse, la libération de glucose néosynthétisé à partir de pyruvate et de lactate est équivalente dans les hépatocytes de souris invalidées pour GLUT2 par rapport à des souris sauvages et est sensible au glucagon (Guillam et al. 1998). L'absence de GLUT2 pourrait être compensée par les autres transporteurs de glucose. Cependant, l'absence d'augmentation ou d'expression au niveau du foie de leurs ARNm, a permis de démontrer que cette sortie de glucose en l'absence de GLUT2 ne dépend pas d'autres transporteurs de la famille des GLUTs tels que GLUT 1, 3, 4 et 5 ou encore des SGLT1 ou 2. L'implication d'autres GLUTs dans la production de glucose hépatique des souris GLUT2^{-/-} a été écartée par l'absence d'effet de la cytochalasine B (Guillam et al. 1998), un inhibiteur de la majorité des GLUTs (1-5, 8, 12 et 13 et faiblement 6 et 11) (Colville et al. 1993).

Cependant, cette sortie de glucose, contrairement au transport facilité via GLUT2, est sensible à la baisse de température (12°C vs 37°C), ce qui suggère l'implication de mouvements membranaires (Guillam et al. 1998).

Le transport de molécules du RE vers la membrane plasmique dépend généralement d'un transport antérograde vers le Golgi puis du Golgi vers la membrane plasmique, via différentes vésicules migrant grâce au cytosquelette. Cependant, la sortie de glucose des hépatocytes des souris RIP::GLUT1×GLUT2^{-/-} n'est affectée ni par la brefeldine A (inhibiteur du transport du RE vers l'appareil de Golgi) ni par la monensine (inhibiteur du transport du Golgi vers la membrane plasmique). Ces résultats suggèrent que le glucose est transporté directement du RE (lieu de sa production) vers la membrane plasmique (Guillam et al. 1998). Concernant le cytosquelette, seule l'inhibition des microtubules affecte le transport de glucose indépendant de GLUT2 (Hosokawa & Thorens 2002). La production de glucose hépatique des souris GLUT2^{-/-} est inhibée par la progestérone (Guillam et al. 1998), une molécule connue pour bloquer le transport du cholestérol nouvellement synthétisé du RE vers la membrane plasmique (Smart et al. 1996). L'ensemble de ces données suggère que la sortie de glucose en l'absence de GLUT2 est dépendante de mouvements membranaires et des microtubules. De plus, ces données suggèrent fortement l'existence d'un lien entre la sortie de glucose en l'absence de GLUT2 et l'export de cholestérol nouvellement synthétisé.

Enfin, une troisième voie mineure a pu être mise en évidence dans les souris invalidées pour GLUT2, sensible à la phloretine, à la température et au FCCP, un dépolarisant des mitochondries. Les hépatocytes de souris invalidées pour GLUT2 présentent également une faible accumulation de glucose au niveau du cytosol libérable par un traitement à la streptolysine O, un perméabilisant de la membrane plasmique (Hosokawa & Thorens 2002). L'accumulation de glucose suggère que ce transport est lent par rapport au transport impliquant les mouvements membranaires développés par les souris GLUT2^{-/-}. Cette voie, très lente, ne joue pas un rôle quantitatif significatif. Elle ne serait pas le simple fait d'une diffusion passive mais impliquerait un transporteur inconnu selon les auteurs (Hosokawa & Thorens 2002). Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette), eux aussi sensibles à la phloretine et à la déplétion énergétique, sont présentés comme de possibles candidats.

IV- Cavéoline-1, transport et métabolisme

IV.1 Les cavéolines

Trois formes de cavéoline ont été identifiées. La cavéoline-1 (Cav1) et la Cav2 (38% d'identité i.e. d'acides aminés identiques et 58% de similarité, i.e. d'acides aminés ayant les mêmes propriétés physico-chimiques avec la Cav1 (Scherer et al. 1996)) sont exprimées dans de nombreuses cellules excepté les cellules des muscles squelettiques et certains muscles lisses dans lesquels la forme Cav3 (65% d'identité et 85% de similarité avec la Cav1 (Tang et al. 1996)) est exprimée. Les Cav1 et Cav3 sont des protéines indispensables à la formation des cavéoles (vésicules riches en cholestérol), et des radeaux lipidiques (plateformes de signalisation riches en cholestérol situées dans la membrane plasmique). Ces deux structures sont stabilisées par la Cavin-1 (ou PTRF) (Hayer et al. 2010b). La formation des cavéoles implique l'oligomérisation de la Cav1 ou de la Cav3 et le recrutement de cholestérol et de certains sphingolipides (Hayer et al. 2010a). La Cav2, souvent co-exprimée avec la Cav1 et pouvant former des hétéro-oligomères avec celle-ci, n'est pas nécessaire à la formation des cavéoles (Razani et al. 2002b). Lorsqu'elle est exprimée avec l'une des deux autres formes, la Cav2 est située au niveau des cavéoles et dans les autres cas, au niveau du Golgi (Parolini et al. 1999). Cav2 pourrait avoir un rôle dans la formation et la dynamique des cavéoles mais aussi un rôle propre comme le suggère l'apparition de dysfonctions pulmonaires chez les souris invalidées pour la Cav2 (Razani et al. 2002b).

IV.1.a La synthèse des cavéolines et des cavéoles

Les cavéolines sont des protéines membranaires synthétisées dans le RE. Une étude menée sur des cellules CV1 (lignée fibroblastique issue de rein de singe) a permis de préciser la biogenèse de

la Cav1 et des cavéoles (Figure 12) (Hayer et al. 2010a), que l'on peut supposer identiques pour la Cav3.

Les protéines de cavéolines 1 et 3 nouvellement synthétisées s'oligomérisent rapidement pour former des oligomères de petite taille stabilisés par l'interaction avec le cholestérol. Immédiatement après la synthèse, les Cav sont recrutées dans les sites de sortie du RE (ERES pour ER Exit Sites) et leur transport vers le Golgi est réalisé grâce à la protéine COPII. Ce transport rapide des Cav dans la voie d'exocytose réduit le niveau du cholestérol néosynthétisé dans la membrane du RE. Ensuite, le transport de Cav à travers le Golgi est relativement plus lent et des pools de Cav sont observés. La sortie des Cav du Golgi est associée à la formation d'oligomères de plus grande taille et à l'incorporation dans des radeaux lipidiques riches en cholestérol et en glycosylphosphatidylinositol (GPI). Finalement, les cavéoles « matures » sortent du Golgi de façon dépendante du phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) (Hayer et al. 2010a) et de la protéine Syntaxine-6 (Choudhury et al. 2006). Ces cavéoles vont alors fusionner avec la membrane plasmique où ces radeaux lipidiques vont former des invaginations stabilisées par une protéine auxiliaire, la cavin-1 (Liu et al. 2008).

IV.1.b La structure des différentes cavéolines

Les cavéolines sont des protéines membranaires en forme d'épingle à cheveux ayant leurs deux extrémités N et C terminales dans le cytoplasme (Spisni et al. 2005). (Figure 13A) Les cavéolines possèdent une partie centrale hydrophobe de 33 acides aminés qui s'insère dans la membrane au niveau du feuillet externe de la double couche lipidique et induit sa courbure conduisant, pour les Cav1 et 3, à la formation des cavéoles et aux radeaux lipidiques. Les trois cavéolines possèdent, dans la partie N terminale, une séquence spécifique aux cavéolines : FEDVIAEP.

Il existe deux isoformes de la Cav1, la Cav1 α de 24kDa (résidus 1 à 178) et la Cav1 β de 21kDa (résidus 32 à 178) issues d'un épissage alternatif de l'ARNm mais qui n'ont pas de réelle différence dans leur capacité à former des cavéoles (Scherer et al. 1995; Fujimoto et al. 2000) (Figure 13B). La Cav2 possède aussi deux isoformes issues d'un épissage alternatif de l'ARNm.

Les cavéolines sont décrites comme des protéines « plateformes » qui interagissent directement avec d'autres protéines par l'intermédiaire d'un domaine spécifique CSD (Caveolin Scaffolding Domain), domaine nécessaire également à la formation des oligomères. L'étude des séquences des protéines capables d'interagir avec la Cav1, la forme la plus étudiée, a permis de mettre en évidence deux sites consensus d'interaction directe : $\phi X \phi X X X X \phi$ et $\phi X X X X \phi X X \phi$ où ϕ est un acide aminé aromatique (Tryptophane, Phénylalanine, Tyrosine ou Histidine) et X est un acide aminé

quelconque (Couet et al. 1997). Dans la partie C-terminale, la Cav1 possède six cystéines, sites de palmitoylation, indispensables pour la fixation de la Cav1 à la membrane plasmique (Han et al. 2002). La palmitoylation de la Cav1 est indispensable à la fixation du cholestérol et à l'export du Golgi (Uittenbogaard & Smart 2000). Enfin, la tyrosine-14 est un site de phosphorylation de la Cav1 par une src-kinase. Cette phosphorylation est impliquée dans l'internalisation de la Cav1 et la régulation de signaux au niveau des radeaux lipidiques (Goetz et al. 2008).

IV.2 Les fonctions de la Cavéoline-1

IV.2.a Le trafic vésiculaire

La Cav1 a été impliquée dans les mécanismes de transcytose des LDL à travers les cellules endothéliales (Sun et al. 2010, 2011) et dans la réabsorption de l'albumine. Il a notamment été montré au niveau de l'épithélium de la vessie des souris invalidées pour la Cav1 que l'albumine ne peut pas être captée par transcytose, contrairement à ce qui se passe chez les souris sauvages (Schubert et al. 2001). La Cav1 semble également être impliquée dans les mécanismes de transcytose dans les cellules polarisées endothéliales du poumon (McIntosh et al. 2002). En effet, un anticorps dirigé contre une protéine spécifique des cavéoles pulmonaires peut être transporté de manière polarisée. Cette propriété a été proposée comme stratégie thérapeutique pour délivrer efficacement certains traitements à travers les épithéliums. Cependant ce rôle dans la transcytose est remis en question par certaines études qui montrent que l'absence de Cav1 augmente le transport à travers l'endothélium (Miyawaki-Shimizu et al. 2006; Rosengren et al. 2006). Cela serait dû à la dilatation des jonctions entre les cellules de l'épithélium en absence de Cav1 et serait en accord avec la quantité normale d'albumine chez les souris invalidées pour la Cav1 (Drab et al. 2001).

L'implication des cavéoles dans l'endocytose a été largement décrite car c'est le mécanisme d'entrée de très nombreux virus, bactéries, champignons, parasites, toxines et enfin du Prion (Revue : Cohen et al. 2004b). La Cav1 est aussi impliquée dans la migration des lymphocytes à travers l'endothélium (Millán et al. 2006).

Ces mécanismes de transcytose et d'endocytose sont notamment régulés par la phosphorylation de la Cav1 par la Src kinase, la PKC, l'état de polymérisation du réseau d'actine, les microtubules et de la quantité de cholestérol (Pelkmans et al. 2002; Sharma et al. 2004; Hu & Minshall 2009). L'implication des microtubules et de l'actine dans ces mécanismes dynamiques est confortée par une étude qui a mis en évidence, dans des cellules CHO exprimant constitutivement la Cav1-GFP, que les cavéoles ont des mouvements d'environ 0,3 à 2 $\mu\text{m}/\text{seconde}$, constitutifs, bidirectionnels (membrane plasmique \leftrightarrow membranes intracellulaires) et dépendants des microtubules (Mundy et al.

2002). Lors de cette étude, les auteurs ont pu observer que la désorganisation du réseau d'actine par la latrunculine A augmente fortement les mouvements vésiculaires de la Cav1.

La transcytose et l'endocytose ont en commun la dépendance aux dynamines (Schnitzer et al. 1995, 1996; Henley et al. 1998; Oh et al. 1998; McIntosh et al. 2002) et plus précisément à la dynamine 2 (Yao et al. 2005). Les dynamines sont des GTPases qui permettent la scission membranaire et la libération des vésicules (Revue : Ramachandran 2011). (Figure 14)

Une fois la vésicule d'endocytose formée et libérée, celle-ci est acheminée dans la zone périnucléaire. Il a longtemps été considéré que les vésicules pouvaient, en tant qu'étape intermédiaire dans l'endocytose, fusionner ensemble dans un compartiment appelé cavéosome (Pelkmans et al. 2001; Revue : Nichols 2003). Cependant, neuf ans après sa découverte, le groupe ayant identifié ce compartiment a publié des résultats montrant que le cavéosome serait en fait un endosome précoce où fusionneraient les cavéolines ubiquitinylées pour être dégradées (Parton & Howes 2010; Hayer et al. 2010b).

Les études effectuées avec un virus internalisé par les cavéoles, le SV40, montrent que les cavéoles fusionnent avec le RE après être passées par les endosomes précoces et tardifs et les endolysosomes (Engel et al. 2011). Cependant, d'autres études utilisant cette fois la toxine du choléra ont pu observer une endocytose vers le Golgi dépendante de la Cav1 et non des cavéoles (Lajoie et al. 2009). Malgré une étude exhaustive, l'implication des cavéoles dans les mécanismes d'endocytose est encore mal caractérisée et est actuellement remise en cause par certains auteurs (Sandvig et al. 2011). Ces auteurs se basent sur la relative stabilité des cavéoles à la membrane (Thomsen et al. 2002) et sur le fait que les études mettant en évidence l'endocytose par les cavéoles ne sont pas réalisées en conditions physiologiques mais sont basées sur des conditions pathologiques d'utilisation de particules virales.

IV.2.b L'homéostasie du cholestérol

- Cav1 et les gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques contenues principalement dans les adipocytes sont les réservoirs principaux du cholestérol et des acides gras du corps (Krause & Hartman 1984). La Cav1, extrêmement abondante dans les adipocytes, et présente à la surface des gouttelettes lipidiques (Robenek et al. 2004), participe à leur formation. Le cholestérol exogène ou l'oléate pourraient stimuler en quelques minutes l'association de la cavéoline aux gouttelettes lipidiques (Le Lay et al. 2006). Ce trafic est dépendant de la dynamine et la protéine kinase C (PKC), processus qui sont modulés par l'activation de la tyrosine kinase Src (Le Lay et al. 2009). Cela indique que

l'association de la cavéoline aux gouttelettes lipidiques des adipocytes partage de nombreuses caractéristiques communes avec la voie endocyttaire des cavéoles (Le Lay et al. 2006). En effet, le pool de Cav1 des gouttelettes lipidiques est organisé comme un complexe multi-protéique contenant la Cavin-1, avec une dynamique similaire à ceux trouvés dans les cavéoles (Blouin et al. 2010). Ces complexes seraient impliqués dans la composition des phospholipides et des protéines présents à la surface des gouttelettes lipidiques et dans leur capacité d'extension (Blouin et al. 2010). La Cav1 présente à la surface des gouttelettes serait également impliquée dans la synthèse de TG (Ortegren et al. 2007) et dans l'activité lipolytique en régulant l'activité de la périlipine via la PKA (Cohen et al. 2004a). Chez l'Homme les mutations inactivant la Cav1 sont responsables de sévères lipodystrophies (Garg & Agarwal 2008) et les souris Cav1^{-/-} présentent également une faible adiposité ainsi qu'une résistance à l'obésité induite par un régime gras (Razani et al. 2002a). En parallèle, les souris Cav1^{-/-} présentent une élévation massive des acides gras libres et une hypertriglyceridémie plasmatique (Le Lay et al. 2009). La faible adiposité des souris Cav1^{-/-} serait due à l'incapacité du tissu adipeux à stocker les lipides qui resteraient dans la circulation (Le Lay et al. 2009), (cf § IV.3.b).

- **La synthèse et l'export du cholestérol néosynthétisé**

Le cholestérol est essentiel au maintien de nombreuses fonctions biologiques au sein de la cellule, notamment de la composition des membranes. Il est produit au sein de la cellule au niveau du RE puis est exporté vers la membrane plasmique par une voie dépendante de la température (Urbani & Simoni 1990). La quantité de cholestérol intracellulaire est faible au niveau de la membrane du RE (0,5-1% du cholestérol cellulaire) (Lange et al. 1999) et forte au niveau de la membrane plasmique où il représente de 30 à 40% des lipides membranaires (Liscum & Munn 1999), suggérant qu'il existe un mécanisme de transport très efficace du RE vers la membrane plasmique.

Ce mécanisme d'export du cholestérol se fait majoritairement directement entre le RE et la membrane plasmique sans passer par l'appareil de Golgi (Urbani & Simoni 1990; Heino et al. 2000). Ce mécanisme est encore mal connu mais certaines données suggèrent un rôle de la cavéoline dans cet export. En effet, en diminuant l'expression de la cavéoline (Fielding et al. 1999) ou en transfectant un dominant négatif de la cavéoline-1 (Roy et al. 1999), on observe une diminution de l'export du cholestérol vers la membrane plasmique. A l'inverse, la transfection d'ADNc de cavéoline induit une augmentation du transport du cholestérol vers la membrane plasmique (Fielding et al. 1999; Fu et al. 2004).

Le cholestérol peut aussi se fixer directement avec la cavéoline qui à son tour formerait un complexe avec des protéines chaperonnes (cyclophilin A, cyclophilin 40 et HSP 56), ce qui permettrait un transport direct du RE vers la membrane plasmique (Uittenbogaard et al. 1998; Ikonen & Parton 2000). En accord avec ce transport direct, la cavéoline-1 interagit avec la protéine SCP2 (Sterol Carrier Protein 2), qui est elle-même impliquée dans le transfert du cholestérol du RE vers la membrane plasmique (Zhou et al. 2004).

- **L'endocytose et le recyclage du cholestérol**

Il est important d'être conscient que le cholestérol de la membrane plasmique n'est pas statique mais dynamique entre la membrane plasmique et le RE (Smart et al. 1994). La Cav1 semble également être impliquée dans ces mécanismes de recyclage (Smart et al. 1996). Dans les fibroblastes, la progestérone induit une relocalisation de la Cav1 de la membrane plasmique vers les membranes intracellulaires et induit une diminution du cholestérol au niveau des radeaux lipidiques de manière réversible (Smart et al. 1996). De plus, l'oxydation du cholestérol dans les cavéoles de la membrane plasmique induit une relocalisation réversible de la Cav1 dans le RE et le Golgi sans modification de la structure des cavéoles. La caractérisation de ce mécanisme montre que la Cav1 issue de la membrane plasmique apparaît d'abord dans le RE puis dans le Golgi (Smart et al. 1994).

Un cycle mettant en jeu la Cav1 a aussi pu être mis en évidence entre la membrane plasmique, le RE et le Golgi (Conrad et al. 1995). Dans cette étude, les auteurs utilisent la cholestérol oxydase et remarquent qu'après traitement, le retour de la Cav1 vers le RE est sensible à la température et se ferait donc grâce à des mouvements vésiculaires. Une phase de transfert entre le RE et le Golgi se ferait ensuite de façon sensible au nocodazole et ferait donc intervenir des microtubules.

IV.2.c La régulation de la transduction des signaux

Les radeaux lipidiques riches en Cav1 sont des structures dans lesquelles se concentreraient plusieurs acteurs de la transduction des signaux, notamment les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les protéines G. Les RCPG et les protéines G pourraient interagir directement au sein de ces radeaux qui formeraient ainsi des « plateformes de signalisation » dans la membrane plasmique.

Cependant les résultats obtenus sont très controversés et contradictoires. En effet, les méthodes de purification des radeaux lipidiques impliquant la Cav1 purifiaient jusqu'alors aussi les radeaux lipidiques indépendants de la Cav1. Afin de s'affranchir de cette étape de purification, un groupe a utilisé des méthodes d'immunofluorescence. Ils ont ainsi pu montrer que les protéines Gq sont liées aux radeaux lipidiques riches en Cav1 tandis que les protéines Gi et Gs s'accumulent dans des radeaux lipidiques n'impliquant pas la Cav1 (Oh & Schnitzer 2001). Cette étude permet également

d'expliquer les résultats contradictoires obtenus précédemment, liés aux rôles différents des protéines G (Cabrera-Vera et al. 2003). Depuis, de nombreux récepteurs et protéines G ont été identifiés dans les radeaux lipidiques impliquant la Cav1 (Chini & Parenti 2004; Ostrom & Insel 2004; Insel et al. 2005). Par exemple, la transduction de signaux via les récepteurs β adrénergiques, situés dans les radeaux lipidiques, est ainsi régulée par la Cav1 dans l'intestin (El-Yazbi et al. 2006) et dans les adipocytes (Cohen et al. 2004a) où la Cav1 permet la transduction du signal en formant des complexes comprenant les récepteurs, l'adénylate cyclase et la PKA.

Par ailleurs, le rôle de Cav1 dans la transduction de signaux n'est pas toujours liée aux cavéoles ou aux radeaux lipidiques. L'implication de la Cav1 dans la transduction de signaux est basée sur sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines via son domaine plateforme (CDS). Cependant, cette interaction n'est pas nécessaire à la localisation de ces protéines dans les cavéoles ou les radeaux lipidiques (Gonzalez et al. 2004). Un des mécanismes de régulation de voie de signalisation impliquant la Cav1 le mieux caractérisé est celui impliquant eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) dans les cellules épithéliales. En effet, la Cav1 interagit avec la protéine eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) (Feron et al. 1996). Le monoxyde d'azote produit par eNOS est impliqué dans la régulation de la pression vasculaire, l'angiogenèse, l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Andrew & Mayer 1999). L'interaction d'eNOS avec la Cav1 induit l'inhibition de la production de monoxyde d'azote (García-Cardena et al. 1997). L'absence de Cav1 chez les souris Cav1^{-/-} induit une absence d'inhibition d'eNOS et *in fine* une vasodilatation. Cette vasodilatation extrême induit une hypertrophie cardiaque et des troubles pulmonaires (Drab et al. 2001). Ces différents symptômes sont totalement contrebalancés par une ré-expression de la Cav1 spécifiquement dans les cellules endothéliales (Briand et al. 2011).

En plus des voies impliquant eNOS et les protéines G, la Cav1 est également impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation (Krajewska & Masłowska 2004) :

- les récepteurs tyrosines kinases (récepteur à l'insuline, à EGF, PDGF) et les protéines G associées (H-Ras et Raf-1)
- les récepteurs Src, Fyn, Bmx, Btk et Fak
- les récepteurs Ser/Thr kinases (TGF β)
- les récepteurs stéroïdiens (AR et ER)

IV.2.d « Mécano-sensing »

Le mécano-sensing consiste à la détection des modifications des forces appliquées à une cellule. Les cavéoles semblent être impliquées dans ce mécanisme, soit en permettant le couplage du sensing avec des voies de signalisation cellulaires, soit en modifiant la plasticité membranaire. Dans l'endothélium, une exposition chronique des cellules à un stress mécanique induit une augmentation de la Cav1 à la membrane plasmique (Rizzo et al. 2003). Ces changements sont accompagnés par l'activation de la voie eNOS et de la voie de signalisation Ras/Raf/ERK (Rizzo et al. 2003). L'utilisation de souris Cav1^{-/-} et de souris Cav1^{-/-} réexprimant Cav1 uniquement dans l'endothélium a permis de démontrer que la Cav1 est nécessaire au remodelage vasculaire induit par le changement de pression via un signal dépendant de eNOS (Yu et al. 2006). De plus, le phénotype des souris Cav1^{-/-} est équivalent à celui observé chez les souris invalidées pour eNOS, i.e. une absence de réponse des cellules épithéliales à un stress mécanique (Rudic et al. 1998). Ceci est cependant en contradiction avec la vision de la cavéoline inhibant eNOS présentée dans le chapitre précédent. Pour expliquer ce paradoxe, les auteurs proposent que le couplage de la détection des contraintes mécaniques à l'activation d'eNOS dépend de la Cav1, tandis que l'activation d'eNOS par d'autres agonistes, telle que l'acétylcholine, dépend d'autres processus. Ces processus sont en effet suractivés dans les cellules endothéliales des souris Cav1^{-/-} (Yu et al. 2006). Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la Cav1 est également nécessaire au couplage de la détection du stress mécanique à la voie intégrine/PI3K/AKT (Sedding et al. 2005).

Les cavéoles formant des invaginations au niveau de la membrane plasmique peuvent aussi agir en formant une réserve de membrane rendant les cellules moins sensibles à des phénomènes d'étirements qui augmentent les tensions (Kozera et al. 2009). Cette plasticité membranaire en présence de cavéoles est possible lors d'épisodes de stress mécaniques grâce au désassemblage rapide des cavéoles en Cav1 libres dans la membrane plasmique (Sinha et al. 2011). Cette réserve membranaire permet par exemple de limiter l'activité des canaux membranaires sensibles aux forces d'étirement comme les canaux chlore (Kozera et al. 2009).

IV.3 Cavéoline-1 : pathologie humaine et modèle murin

La Cav1 étant exprimée dans de nombreuses cellules, différentes pathologies sont associées à cette protéine et diminuent la durée de vie des souris invalidées d'environ 50% (Park et al. 2003).

IV.3.a Tumorigénèse et cancer

La Cav1 semble avoir un rôle inhibiteur sur le cycle cellulaire (Scheel et al. 1999; Galbiati et al. 2001) et inhibe la cascade pré-proliférative p42/p44 MAPK (Galbiati et al. 1998). Elle semble donc

rassembler les caractéristiques d'un gène suppresseur de tumeur. L'absence de Cav1 entraîne une hyperplasie des cellules des glandes mammaires et accélère le développement des glandes mammaires durant la gestation (Lee et al. 2002; Park et al. 2002). Chez les souris MMTV-PyMT, qui développent spontanément des cancers mammaires, l'inactivation de Cav1 accélère la formation de lésions, augmente le développement prématuré de tumeurs mammaires et accroît leur potentiel métastatique (Williams et al. 2003, 2004). Chez l'Homme, malgré de nombreuses publications impliquant la Cav1 dans le développement du cancer du sein (Revue : Bouras et al. 2004), les publications les plus récentes ne trouvent aucun lien entre les mutations de cette protéine et les cancers mammaires (Patani et al. 2012). Au niveau de la peau, les souris Cav1^{-/-} ont une hypersensibilité aux cancérogènes (comme le DMBA : 7,12-Diméthylbenzanthracène) provoquant une augmentation du nombre de tumeurs et de la surface des tumeurs comparé aux souris sauvages (Capozza et al. 2003). Selon ces données, la Cav1 aurait un effet suppresseur de tumeurs mais cette propriété n'est pas retrouvée dans toutes les cellules. En effet, chez des souris développant des cancers de la prostate (TRAMP), la Cav1 est surexprimée par rapport aux souris sauvages et l'inactivation de la Cav1 diminue l'incidence des cancers prostatiques et réduit leur pouvoir métastatique (Williams et al. 2005). Chez les patients atteints de tumeurs prostatiques, les cellules de la tumeur ont une expression de la Cav1 augmentée par rapport aux cellules saines (Yang et al. 1999) et une forte expression de la Cav1 est corrélée à un taux de survie diminué (Rajjayabun et al. 2001).

Dans le foie, une surexpression de Cav1 conduit à la formation de carcinomes et de métastases (Tse et al. 2011).

IV.3.b L'insulino-résistance et le métabolisme des lipides et du glucose

La résistance à l'insuline des souris Cav1^{-/-} a été attribuée à un défaut de captage du glucose notamment dû au défaut de signalisation du récepteur de l'insuline dans le tissu adipeux (Cohen et al. 2003b). En effet, non seulement la quantité de récepteur à l'insuline au niveau de la membrane plasmique est diminuée de 90% mais le traitement à l'insuline n'induit pas d'activation du signal de transduction de la voie PKB/Akt (Cohen et al. 2003b). La réexpression du « scaffolding domain » de Cav1 suffit à stabiliser le récepteur de l'insuline au niveau de la membrane plasmique (Cohen et al. 2003c). Chez l'homme, deux mutations du récepteur à l'insuline (W1193L et W1200S) au niveau du site d'interaction avec la Cav1 induisent une forte insulino-résistance (Moller et al. 1990; Iwanishi et al. 1993). D'autres études montrent que dans les adipocytes, un traitement à l'insuline induit la phosphorylation de la Cav1 et la translocation de GLUT4 au niveau des domaines riches en Cav1 dans la membrane plasmique permettant ainsi une augmentation de la capture du glucose (Scherer

et al. 1994, 1994; Mastick et al. 1995; Mastick & Saltiel 1997; Kimura et al. 2002). De façon intéressante, dans les adipocytes, seule l'insuline permet la phosphorylation de la Cav1 sur la tyrosine 14, indispensable à sa translocation, et non l'EGF, le PDGF, le TNF alpha ou l'IL6 (Lee et al. 2000).

L'une des principales caractéristiques des souris Cav1^{-/-} est l'atrophie de leur tissu adipeux dû à un défaut de stockage des lipides (cf. §IV.2.b). Ce modèle murin est résistant à l'obésité malgré une légère hyperphagie probablement due à un plus faible taux de leptine circulante (Razani et al. 2002a). Le tissu adipeux viscéral de ces souris semble normal tandis qu'il y a peu, voire pas de tissu adipeux sous cutané (Figure 15) (Razani et al. 2001, 2002a). Cette absence de stockage modifie les lipides circulants, plus précisément induit une augmentation des chylomicrons et des VLDL riches en TG, plus particulièrement à l'état post-prandial (Razani et al. 2002a; Cohen et al. 2004a; Frank et al. 2006). Cette élévation serait due à un défaut de clairance des TG absorbés. A l'inverse, le taux d'acides gras libres n'est pas diminué après le repas. De façon surprenante, l'absence de stockage de lipides dans le tissu adipeux ne se traduit pas par une stéatose hépatique, probablement à cause du défaut de formation des gouttelettes lipidiques en l'absence de Cav1. Les taux plasmatiques de glucose, d'insuline et de cholestérol sont identiques chez les souris Cav1^{-/-} par rapport aux sauvages (Razani et al. 2002a).

L'absence de Cav1 semble altérer le métabolisme des hépatocytes différemment selon le fond génétique (Fernandez-Rojo et al. 2011). En effet, l'absence de Cav1 dans un fond génétique C57Bl6J conduit à une induction de la voie des pentoses phosphates et de la lipogenèse. Par ailleurs, ces souris utilisent préférentiellement les glucides plutôt que les acides gras comme source d'énergie. L'activation de la voie des pentoses phosphates et de la lipogenèse et la préférence pour l'utilisation des glucides ne se retrouvent pas dans un fond génétique Balbc. Cette modification du métabolisme permettrait aux souris Cav1^{-/-} C57Bl6J de survivre à une hépatectomie partielle grâce à la régénération hépatique, contrairement aux souris Cav1^{-/-} Balbc (Fernandez-Rojo et al. 2011). Ce phénotype a aussi été mis en évidence chez l'Homme lorsque le gène de la Cav1 est muté (Kim et al. 2008a). D'un point de vue histologique, ces altérations se traduisent par une réduction du diamètre des adipocytes.

Une surexpression hépatique de la Cav1 induit une libération accrue de sels biliaires et de cholestérol de type HDL (High Density Lipoprotein). Ces souris présentent également une accumulation de cholestérol hépatique (Moreno et al. 2003).

Enfin, dans le foie de souris, une surexpression de la Cav3 par adénovirus induit une augmentation du métabolisme du glucose dans le foie via une augmentation de la transduction du

signal du récepteur à l'insuline (Otsu et al. 2010).

IV.3.c Les pathologies cardio-vasculaires

Plusieurs études biochimiques ou cellulaires réalisées *in vitro* suggéraient l'effet inhibiteur de la Cav1 sur la voie de signalisation Ras-p42/p44 MAPK (Gosens et al. 2006). L'analyse du phénotype vasculaire des souris Cav1^{-/-} a permis de confirmer ce rôle. Le tissu cardiaque des souris Cav1^{-/-} présente une hyperactivation de la voie p42/p44 MAPK. Les souris Cav1^{-/-} ont une hypertrophie ventriculaire gauche et une dilatation du ventricule droit (Zhao et al. 2002; Cohen et al. 2003a). La Cav1 n'est pas exprimée dans les cardiomyocytes mais dans les cellules supportant ces cellules musculaires i.e. dans les fibroblastes et les cellules endothéliales. L'hypertrophie cardiaque serait due à une régulation paracrine des cellules musculaires par une activation excessive de la voie p42/44 MAP kinase, dans les cellules exprimant normalement la Cav1, agissant sur le système rénine/angiotensine (Booz et al. 1999).

L'activation excessive de la voie p42/44 serait également responsable de l'hyperplasie de l'intima des souris Cav1^{-/-} liée à une prolifération des cellules musculaires lisses (Kohler et al. 1991; Ross 1993; Hassan et al. 2004).

Enfin, le modèle murin invalidé pour la Cav1 est protégé du développement des plaques d'athérome. En effet, la perte de la Cav1 est associée à une diminution de deux molécules proathérogéniques que sont la CD36 et VCAM-1 (Frank et al. 2004).

IV.3.d Les pathologies pulmonaires

La Cav1 est fortement exprimée dans les poumons, les cellules endothéliales et les pneumocytes. Les souris invalidées pour la Cav1 présentent de grandes modifications au niveau de leurs poumons avec une diminution des espaces alvéolaires, un épaississement de leur paroi, une fibrose et une hyper cellularité (Drab et al. 2001; Razani et al. 2001). De plus, une hypertension pulmonaire est observée chez les souris invalidées pour la Cav1 et chez les humains ayant une forme mutée de la Cav1 en plus d'une fibrose et d'un important syndrome respiratoire (Zhao et al. 2002; Jasmin et al. 2004).

Démarche expérimentale

Nous l'avons vu dans les données bibliographiques, la PEG est un mécanisme vital pour l'organisme. En effet, cette fonction, lorsqu'elle est dérégulée, est impliquée dans l'apparition de deux pathologies « miroirs » : le diabète de type 2 et la Glycogénose de type 1. Une augmentation de la PEG notamment au niveau du foie, suffit à induire un état prédiabétique (Trinh et al. 1998) et la PEG est augmentée chez les diabétiques de type 2 (Clare et al. 2000). A l'inverse, une absence de PEG caractérise la GSD1, maladie rare qui induit de forts épisodes hypoglycémiques interprandiaux et une accumulation de glycogène induisant à terme le développement d'adénomes nécessitant souvent une intervention chirurgicale. Au niveau cellulaire, la PEG peut être divisée en une phase de production dépendante de la G6Pase et une phase d'export de glucose dépendante de GLUT2.

La G6Pase est une enzyme clé au carrefour des deux voies de la PEG (glycogénolyse et néoglucogénèse). Elle est constituée de deux sous-unités : la G6PT, qui permet l'accessibilité du G6P à la seconde sous-unité, et la G6PC, qui transforme le G6P en glucose et phosphate. Le rôle de la G6Pase dans la PEG est crucial et l'étude de ses régulations est nécessaire à la compréhension des mécanismes de production de glucose. A cause de son K_m élevé, il a longtemps été considéré que la régulation de la G6Pase se faisait uniquement par la biodisponibilité de son substrat. Des études menées au laboratoire sur l'effet des hormones comme l'adrénaline et le glucagon ont permis de mettre en évidence des régulations post-traductionnelles de l'activité G6Pase (Ichai et al. 2001; Bady et al. 2002). Les mécanismes de cette régulation sont dépendants de l'AMPc, de la température et impliquent des mouvements membranaires. De plus, la régulation de la G6Pase via l'AMPc est inhibée en présence d'un inhibiteur de la G6PT (S4048) suggérant un rôle de cette sous-unité dans la régulation du complexe G6Pase (Soty 2008).

Par ailleurs, concernant la sortie du glucose de la cellule une fois produit, le dogme actuel est que cette sortie se fait uniquement via GLUT2. Cependant, grâce à l'étude des souris invalidées pour GLUT2, il a pu être mis en évidence un mécanisme de sortie du glucose indépendant de GLUT2 et dépendant également de la température (Guillam et al. 1998). Les études réalisées chez les souris GLUT2^{-/-} ont permis de suggérer une voie vésiculaire dans la voie de sortie du glucose.

Mon premier objectif est de définir les mécanismes de régulation de la G6Pase par l'AMPc, produit de la voie de signalisation de l'adrénaline et du glucagon. La première hypothèse est que l'AMPc pourrait induire la phosphorylation des sous-unités de la G6Pase via la PKA. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons recherché des sites de phosphorylation potentiels sur les séquences de la G6PC et de la G6PT. Nous avons ensuite étudié : 1- l'effet de la mutation de ces sites sur l'activité G6Pase ; 2- la phosphorylation basale de la G6PC grâce à une analyse par spectrométrie de masse ;

3- la phosphorylation *in vitro* de la G6PC par la PKA après immunoprécipitation.

La seconde hypothèse se base sur le fait que la régulation de la G6Pase par l'AMPc est inhibée par un inhibiteur de la G6PT. La G6PT pourrait réguler l'activité du complexe G6Pase en interagissant avec la G6PC. C'est pourquoi nous avons étudié l'interaction des deux sous-unités par co-immunoprécipitation.

Mon second objectif est de caractériser la voie de sortie de glucose indépendante de GLUT2 afin de la corrélérer à la production de glucose par la G6Pase. Dans un premier temps, nous avons étudié l'hypothèse d'une voie de sortie vésiculaire du glucose en inhibant la formation des vésicules dans chacune des deux voies de la PEG. Par la suite, nous avons tenté d'identifier les vésicules impliquées dans la sortie du glucose. L'étude des souris invalidées pour GLUT2 a permis de mettre en évidence que dans ce modèle, la sortie de glucose est dépendante du cholestérol. Etant donné que la cavéoline-1 est impliquée dans l'homéostasie du cholestérol et qu'elle est la protéine structurante majeure de vésicules appelées cavéoles, nous avons testé l'implication de cette protéine dans les mécanismes de sortie du glucose grâce à un modèle murin transgénique. Enfin, afin de corrélérer le mécanisme de production à celui de sortie du glucose, nous avons analysé l'interaction potentielle entre la cavéoline 1 et la G6Pase par des approches d'imagerie dans les hépatocytes ou dans des lignées cellulaires.

I- Etude de la régulation post-traductionnelle de la G6Pase

Julien Chilloux¹, Maud Soty¹, François Delalande², Fabrice Bertile², Alain Van Dorsselaer²,
Gilles Mithieux¹ et Amandine Gautier-Stein¹

¹Inserm U855

²CNRS-UdS Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178

I.1 Introduction

La régulation à court terme de la G6Pase a été très peu étudiée. En effet, il a longtemps été admis que l'activité de la G6Pase était régulée à court terme uniquement par la biodisponibilité de son substrat, le G6P. Cependant, plusieurs études de notre laboratoire démontrent que les hormones impliquées dans la régulation de la glycémie (insuline et glucagon) régulent à court terme l'activité G6Pase par des mécanismes post-traductionnels. L'insuline diminue l'activité G6Pase par un mécanisme faisant intervenir la PI3K et ses produits lipidiques (Daniele et al. 1999), tandis que l'adrénaline et le glucagon augmentent son activité (Ichai et al. 2001; Bady et al. 2002). En effet, une étude du laboratoire montre que la perfusion d'adrénaline chez des rats induit une augmentation de l'activité G6Pase (Bady et al. 2002). L'activation de la G6Pase par l'hypoglycémie, période où l'adrénaline est augmentée, est perdue chez des rats adrénalectomisés. Ces données montrent que l'inhibition à court terme de la G6Pase par l'hypoglycémie est dépendante de l'adrénaline. Notre équipe a montré également l'existence d'une régulation à court terme de la G6Pase par le glucagon (Ichai et al. 2001). Dans cette étude, la production de glucose a été étudiée dans des hépatocytes périsfusés. Les auteurs ont ainsi pu montrer que la présence de glucagon augmente le flux de glucose. L'utilisation de substrats de différentes étapes de la néoglucogenèse a permis de démontrer que le glucagon régule le flux de glucose à travers la G6Pase. Cependant, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité propre de la G6Pase par le glucagon. De façon intéressante, les deux hormones (adrénaline et glucagon) qui régulent l'augmentation du flux à travers la G6Pase partagent le même second messager, l'AMPc.

Afin de caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation hormonale de la G6Pase, notre laboratoire a étudié l'effet de la forskoline, qui mime les effets de ces hormones en augmentant la concentration intracellulaire d'AMPc (Soty 2008). Les cellules Caco-2 différenciées (lignée à caractères entérocytaires) utilisées dans cette étude présentent deux avantages pour l'étude de la PEG et la mesure des flux à travers la G6Pase : elles stockent du glycogène et expriment la G6Pase. Cette étude a permis de montrer un effet activateur de la forskoline sur l'activité G6Pase, qui est inhibé en présence d'H89, un inhibiteur de la PKA. La régulation de l'activité de la G6Pase par le glucagon dépendrait donc de l'AMPc et de la PKA.

Le but de mon étude est de confirmer l'implication de la PKA dans l'activation de la G6Pase et de mettre en évidence son mécanisme d'action. Nous avons, dans un premier temps, vérifié l'implication de la PKA dans l'activation de la G6Pase et avons fait l'hypothèse d'une phosphorylation directe de la sous-unité G6PC ou de la sous-unité G6PT par la PKA. Nous avons

alors recherché les sites "consensus", potentiellement phosphorylables par la PKA sur ces protéines. Les acides aminés accepteurs de phosphate (thréonine ou sérine) de ces sites ont ensuite été mutés de manière à mimer soit une forme constitutivement phosphorylée, soit une forme non phosphorylable, en les remplaçant respectivement par un aspartate (D) ou une alanine (A) (Léger et al. 1997). En effet, l'aspartate présente une charge négative équivalente à celle d'une sérine ou thréonine phosphorylée. L'alanine, quant à elle, est un acide aminé non phosphorylable car elle ne possède pas de fonction alcool sur sa chaîne latérale.

Pour compléter cette étude, l'utilisation de techniques plus résolutive était nécessaire et, pour ce faire, une étape d'immunoprécipitation de la G6PC a été mise au point. Grâce à cette purification de la G6PC, nous avons pu analyser la séquence de cette protéine par spectrométrie de masse et sa capacité à être phosphorylée *in vitro*.

I.2 Matériels et méthodes

I.2.a Analyse informatique et sites de phosphorylation

La PKA est une protéine cytoplasmique qui phosphoryle spécifiquement les résidus sérine et thréonine situés dans une séquence consensus Arg-Arg- X-Ser/Thr-Y, dans laquelle Ser/Thr est l'acide aminé phosphorylé, X est un acide aminé quelconque de petite taille et Y un acide aminé hydrophobe. Nous avons donc étudié les séquences de la G6PC et de la G6PT à l'aide de bases de données telle que KinasePhos 2.0 (kinasephos2.mbc.nctu.edu.tw) (Huang et al. 2005) pour déterminer les sites de phosphorylation potentiels.

I.2.b Mutagenèse dirigée

Les ADNc de la G6PC (GeneID : 2538) et de la G6PT (GeneID : 2542) humaines ont été clonés dans le plasmide pcDNA3 (Invitrogen). La mutagenèse dirigée de ces ADNc a été effectuée avec le kit : QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis de Stratagene. La séquence des amorces a été déterminée grâce au logiciel *QuikChange Primer Design Program* et synthétisée par Eurogentec S.A. (les parties soulignées représentent les nucléotides mutés) :

T255D

Sens : 5' -TGGGTCCACATTGACGACCACACCCTTTGCCAGCAGCC

Anti-sens : 5' -GGCTGCTGGCAAAGGGTGTGTCGTCAATGTGGACCCA

T255A

Sens : 5' -TGGGTCCACATTGACGCAACACCCTTTGCCAGCAGCC

Anti-sens : 5' -GGCTGCTGGCAAAGGGTGTTGCGTCAATGTGGACCCA

T145D

Sens : 5' -CAGGGAAAAGATAAAAGCCGGACTACAGATTTCCGGTGCTTGAATGCT

Anti-sens : 5' -AGCATTCAAGCACCGAAATCTGTAGTCCGGCTTTATCTTTCCCTG

T145A

Sens : 5' -CAGGGAAAAGATAAAAGCCGGCATACAGATTTCCGGTGCTTGAATGCT

Anti-sens : 5' -AGCATTCAAGCACCGAAATCTGTATTGCGGCTTTATCTTTCCCTG

La mutagenèse dirigée de l'ADNc de la G6PT humaine (GeneID : 2542), cloné dans le plasmide pSVK3, a été effectuée selon le même protocole avec les amorces suivantes :

S210D

Sens : 5' -GACGGCAAGAAGGGCGACTTGAAGGAGGAGAGC

Anti-sens : 5' -GCTCTCCTCCTTCAAGTGCGCCTTCTTGCCCTC

S210A

Sens : 5' -GAGGGCAAGAAGGGCGCCTTGAAGGAGGAGAGC

Anti-sens : 5' -GCTCTCCTCCTTCAAGGCGCCCTTCTTGCCCTC

La présence de la mutation souhaitée et l'absence d'autres mutations ont été confirmées par séquençage d'ADN par la société Biofidal (Vaulx-en-Velin).

1.2.c Culture cellulaire et Transfection

Les cellules de la lignée humaine HeLa sont des cellules épithéliales issues d'un cancer du col de l'utérus, obtenues auprès de l'ECACC (European Collection of Cell Cultures ref. 93021013). Ces cellules sont cultivées à 37°C et en présence de 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen) à 1g/L de D-glucose et contenant 2mM de glutamine et 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont trypsinées tous les 4 ou 5 jours et sont utilisées entre les passages 5 et 18.

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sontensemencées à environ 13000 cellules par cm². Une quantité de 5µg d'ADN total est transfectée (5µg de pcDNA3-G6PC dans le cas des mutations sur la G6PC; 2,5µg de pcDNA3-G6PC et 2,5µg de pcDNA3-G6PT dans le cas de la

mutation de la G6PT) grâce à l'Exgen 500 (Euromedex). Après 24 heures d'incubation, les cellules sont récupérées par trypsination. Le culot cellulaire est lavé trois fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, Promega) et conservé à -80°C jusqu'au dosage de l'activité de la G6Pase.

1.2.d Western Blot

Les protéines à analyser sont dénaturées et réduites dans un tampon de dénaturation composé de β -mercaptoéthanol (5% V/V), SDS (5% P/V), glycérol (10% V/V), Tris-HCl (31,25 mM), pH 6,8 pendant 10 min à 100°C.

Trente microgrammes de protéines sont séparées par migration sur un gel de polyacrylamide (9% P/V, Acrylamide/ Bis-Acrylamide Ratio 37,5/1) SDS-PAGE contenant : SDS (0,1% P/V), Tris-HCl (37,5mM), pH 8,8. La migration s'effectue à 200V dans un tampon Tris-HCl (25mM), glycine (192mM) et SDS (0,1% P/V), pH 8,3.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane d'Immobilon-P (polyvinylidène fluorure, Millipore), dans un tampon Tris-HCl (25mM), glycine (192mM) et méthanol (20% V/V), pH 8-8,4, à 90V pendant 1h. Les membranes sont saturées par incubation dans un tampon TBST [tween 20 (0,2% V/V), Tris-HCl (25mM), NaCl (137mM), KCl (2,68mM), pH 7,5], en présence de lait écrémé (2%) pendant 1h à température ambiante, sous agitation. Les membranes sont ensuite incubées 1h à température ambiante en présence de l'anticorps primaire. Après 3 lavages successifs de 10 min, dans du TBST, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué au 1/10000 (anti-immunoglobulines de lapin ou de souris couplées à la peroxydase produites chez la chèvre, BIORAD) pendant 1h. Après 3 lavages successifs de 10 min dans du TBST, les membranes sont incubées en présence d'un substrat couplé au luminol, conduisant à la production de chimiluminescence sous l'action de la peroxydase (kit ECL plus, GE Healthcare). L'émission de lumière engendrée est détectée par le système d'acquisition FUSION SL (Vilbert Lourmat).

1.2.e Anticorps primaires

L'anticorps anti-G6PC produit chez le lapin est ciblé contre l'extrémité C-terminale de la G6PC de rat (motif cible : CLARLLGQTHKSL), purifié sur colonne d'affinité et dilué au 1/5000. L'anticorps anti-G6PT produit chez le lapin est ciblé contre une boucle cytoplasmique de la G6PT humaine (motif cible : LRNLDPMPSEGKKGSLK), purifié sur colonne d'affinité et dilué au 1/5000. L'anticorps anti- β actine dilué au 1/40000 est produit chez la souris (A2228, Sigma-Aldrich).

1.2.f Dosages d'activité G6Pase

L'activité de la G6Pase est déterminée par la méthode de Baginski, basée sur la détermination colorimétrique spécifique du phosphate inorganique (Pi) libéré par la réaction d'hydrolyse du G6P. En parallèle, la mesure de l'hydrolyse d'un autre substrat, le β -glycérophosphate (β -Gly), permet de déterminer l'activité des phosphatases non spécifiques. L'activité spécifique de la G6Pase est donc obtenue par soustraction de l'activité phosphatase non spécifique à l'activité G6Pase totale.

Le culot cellulaire conservé à -80°C est repris dans $150\mu\text{l}$ d'Hépès 10mM pH 7,3 puis les cellules sont homogénéisées par sonication. Le milieu réactionnel, composé de $100\mu\text{L}$ de Tris-HCl 100mM pH 7,3 et de $100\mu\text{L}$ d'homogénat cellulaire préalablement dilué au 1/20 dans du tampon Hépès-sucrose (Hépès 10mM , sucrose $0,25\text{mM}$, pH 7,3), est incubé à 37°C durant 15 minutes. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de $100\mu\text{L}$ de G6P (100mM) ou $100\mu\text{L}$ de β -Gly (100mM) dans le milieu de réaction. Après 15min d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 2 mL d'un mélange d'acide trichloroacétique/ acide ascorbique (10%, 2% P/V) qui précipite les protéines. Après une centrifugation à 800g à 4°C durant 10 minutes, le Pi libéré est dosé sur 1mL de surnageant, par complexation avec $500\mu\text{L}$ de molybdate d'ammonium (1% P/V). Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique. L'ajout de 1mL d'arsénite (2% P/V) citrate (2% P/V) permet de lier le molybdène libre en excès. La DO est lue à 700 nm et 30 min d'incubation à température ambiante. L'activité spécifique G6Pase est exprimée en μmol de Pi libéré par minute et par gramme de protéines ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ prot).

1.2.g Isolement des hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires sont isolés sur des souris âgées de 5 à 8 semaines en utilisant la technique précédemment décrite de la collagénase (Berry & Friend 1969). Les souris sont anesthésiées avec du pentobarbital, le foie est alors perfusé et rincé via la veine cave avec 30mL de HBSS ($5,4\text{mM}$ KCl, $0,44\text{mM}$ KH_2PO_4 , $0,14\text{M}$ NaCl, $4,2\text{mM}$ NaHCO_3 , 50mM Hepes et $0,34\text{mM}$ Na_2HPO_4) contenant $0,5\text{mM}$ d'EGTA tamponné à pH 7,4. Après rinçage, le foie est perfusé avec 40mL de HBSS contenant $0,67\text{mM}$ de CaCl_2 et $0,25\text{mg}/\text{ml}$ de collagénase de type IV (Sigma Aldrich). Les hépatocytes sont alors collectés dans une boîte de Pétri, rincés avec du PBS et congelés à -80°C .

1.2.h Immunoprécipitation de la G6PC

- Préparation des billes

$30\mu\text{L}$ de billes protein A – Sepharose (Sigma Aldrich P9424) sont diluées au 1/2 dans du PBS-

BSA 0,1% dans 500µl de PBS froid et incubées en présence d'1µg d'anticorps G6PC ou G6PT 1h à 4°C sous agitation. Les complexes billes-anticorps sont récupérés par centrifugation durant 2sec à 16000 g à 4°C puis rincés deux fois dans du tampon de lyse non dénaturant. 10µl de BSA 10% sont enfin ajoutés aux billes couplées aux anticorps.

- **Préparation des échantillons**

L'immunoprécipitation est effectuée sur un culot sec de cinq millions d'hépatocytes primaires de souris. Les cellules sont lysées 20 minutes sur glace avec un tampon de lyse non dénaturant (1% Triton X100, 50mM Tris, 300mM NaCl et 5mM EDTA). Le lysat est ensuite centrifugé 15 minutes à 16000 g à 4°C. Le surnageant est prélevé 30 minutes à 4°C avec 30µl de billes protein A – sepharose (P9424, Sigma Aldrich) diluées au 1/2 dans du PBS-BSA 0,1% sous agitation. Ce surnageant est utilisé pour l'immunoprécipitation.

- **Immunoprécipitation**

L'échantillon est mis en présence des billes couplées aux anticorps durant 1h30 à 4°C sous agitation puis centrifugé 5sec à 16000G et rincé 3 fois avec du tampon de lavage (0,1% Triton X100, 50mM Tris, 300mM NaCl et 5mM EDTA). Enfin l'immunoprécipitat est rincé une dernière fois avec du PBS.

1.2.i Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec François Delalande, Fabrice Bertile et Alain Van Dorsselaer de l'IPHC (Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien) à Strasbourg.

Les extraits protéiques sont séparés sur gel 1D. Après découpe systématique des bandes protéiques (2mm) puis digestion « in-gel » (trypsine), les peptides issus de la digestion sont extraits et analysés par spectrométrie de masse nanoLC-MS/MS à l'IPHC (Strasbourg)

1.2.j Phosphorylation ³²P

La phosphorylation est réalisée *in vitro* sur un immunoprécipitat de la G6PC en présence de la sous-unité catalytique de la PKA (2µl de NEB P6000/µg de protéine), de 200µM d'ATP et de 300µCi/µmol d'AT³²P selon les instructions du fournisseur.

Les protéines sont ensuite séparées par migration sur un gel de polyacrylamide (cf. Western Blot). Le gel est séché avec un SpeedVac Thermo et mis en contact avec une cassette d'exposition (Biorad) sensible aux radiations de ³²P. La révélation est ensuite réalisée sur un Phosphorimager.

I.3 Résultats - Discussion

Les précédents résultats du laboratoire (Soty 2008) démontrent l'implication de l'AMPc dans la régulation post-traductionnelle de la G6Pase par le glucagon. La PKA est la protéine majoritairement impliquée dans les régulations impliquant ce second messager intracellulaire.

1.3.a Identification et étude de sites potentiels de phosphorylation par la PKA

- La PKA augmente l'activité de la G6Pase

Dans notre étude, nous avons vérifié si la PKA avait bien un effet direct sur l'activité de la G6Pase. Pour vérifier l'implication de la PKA dans l'activation de cette enzyme, nous avons utilisé des clones stables de cellules Caco-2, développés au laboratoire, surexprimant le gène humain G6pc sous le contrôle du promoteur CMV. Dans ces cellules, la surexpression de la sous-unité catalytique de la PKA (constitutivement active), entraîne une augmentation de plus de 45% de l'activité de la G6Pase (Figure 16). La PKA est donc capable de réguler l'activité G6Pase.

- Identification des sites de phosphorylation potentiels sur le complexe G6Pase

Nous avons fait l'hypothèse que la PKA pourrait moduler l'activité G6Pase via une phosphorylation directe d'une ou des deux sous-unités. L'analyse de leur séquence a permis d'identifier deux sites potentiellement phosphorylables sur la G6PC : les thréonines 145 et 255 et un site sur la G6PT : la sérine 210. La thréonine 145 se situe dans l'exon 3 du gène G6pc et sur la deuxième boucle cytoplasmique de la protéine (Figure 17). La thréonine 255 se situe dans la lumière du réticulum endoplasmique au niveau de la troisième boucle (Figure 17). Enfin, la sérine 210 de la G6PT se trouve dans la deuxième boucle cytoplasmique (Figure 18). Comme on peut le voir sur la figure 19, ces trois acides aminés sont très conservés chez les mammifères (Homme, Rat, Souris et Chien), les oiseaux (Poulet), les amphibiens (Xénope) et les poissons (Poisson Zèbre).

La suite de l'étude a été effectuée dans des cellules HeLa. En effet, la G6PC étant absente de cette lignée cellulaire (Figure 20), ce modèle permet de mesurer l'activité G6Pase correspondant aux protéines mutées sans biais induits par une activité G6Pase endogène.

- Effets des mutations de ces sites de phosphorylation sur l'activité G6Pase

Les sites potentiels de phosphorylation S210, T145 et T255 ont été mutés par un aspartate et par une alanine dans le but d'obtenir respectivement soit une forme constitutivement active, soit une forme incapable d'être phosphorylée. En effet, par ses propriétés électriques, l'aspartate mime la charge apportée par une phosphorylation. A l'inverse, une alanine, ne possédant pas de groupement alcool sur sa chaîne latérale, ne peut pas être phosphorylée. Cette approche a déjà été utilisée, par

exemple, dans le cas de la protéine Tau, afin d'identifier des sites de phosphorylation par la PKA (Léger et al. 1997). Les auteurs ont ainsi pu montrer que la mutation en alanine du résidu sérine ne changeait ni la conformation ni l'activité de la protéine. La mutation en aspartate induisait un changement de conformation et d'activité similaires à ceux observés lors de la phosphorylation de ce résidu par la PKA.

Le transport de G6P par la G6PT n'étant pas mesurable directement, la modification de l'activité de la G6PT est donc mesurée indirectement par l'étude de l'activité G6Pase. Afin d'étudier l'activité de la G6PT mutée au niveau de la S210, nous avons surexprimé la G6PT mutée et la G6PC sauvage. Comme décrit dans la littérature (An et al. 2001), l'activité G6Pase est plus élevée dans les homogénats de cellules surexprimant les deux sous-unités par rapport aux cellules surexprimant la G6PC seule (données non illustrées). L'activité G6Pase mesurée dans les cellules surexprimant la G6PC et la G6PT ($17,37 \pm 0,63$ $\mu\text{mol/h/mg}$ de protéines) a donc été prise comme référence dans cette expérience. La mutation mimant la phosphorylation (S210D) et celle empêchant la phosphorylation (S210A) n'induisent aucune variation de l'activité de la G6Pase (Figure 21). La mutation S210 n'affecte pas la quantité de la protéine G6PT ni celle de la G6PC (Figure 21). Ces résultats montrent que la mutation de la S210 n'affecte pas la stabilité de la G6PT et que ce site ne semble pas être un site de régulation de l'activité de la G6Pase. Cependant, comme le montre la figure 20, la quantité de G6PT endogène exprimée par les cellules HeLa n'est pas négligeable par rapport aux cellules HeLa surexprimant la G6PT. L'activité de la G6PT endogène pourrait donc compenser l'activité d'une G6PT mutée inactive. Par ailleurs, la surexpression de la G6PT n'affecte pas la quantité de protéines de la G6PC (An et al. 2001). La mutation du résidu 210 de la G6PT n'affecte pas la quantité de protéines G6PT et G6PC.

La mutation de la thréonine 255 de la G6PC induit, quelque soit l'acide aminé, une diminution de l'activité G6Pase (Figure 22). La mutation en aspartate (T255D) induit une perte totale d'activité. La mutation en alanine (T255A), quant à elle, induit une diminution de 40% de l'activité de l'enzyme. Ces variations d'activité pourraient être dues à une variation de la quantité protéique. En effet, les mutations de la G6PC pourraient conduire à une conformation défectueuse, conduisant à une diminution de sa stabilité. Cette diminution pourrait par exemple provenir d'une plus grande sensibilité à la dégradation de la protéine mutée. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la quantité de protéines mutées produite. Nous avons ainsi pu montrer que la diminution de l'activité des mutants T255 de la G6PC n'est pas due à une perte de stabilité de la protéine (Figure 22). De façon intéressante, la mutation T255I (thréonine en isoleucine) est responsable d'un cas de GDS1a. L'effet de cette mutation a été étudié *in vitro* par surexpression en modèle cellulaire (Shieh

et al. 2002). Conformément à nos résultats, la mutation T255I diminue fortement l'activité G6Pase (elle conserve 2,5 % de l'activité de la forme sauvage) sans affecter la stabilité de la G6PC. Ajoutées à nos résultats, ces données suggèrent donc que la thréonine 255 est nécessaire à l'activité G6Pase, mais que cet acide aminé ne joue pas un rôle prépondérant dans la stabilité de la protéine. Enfin, l'importance de cet acide aminé dans l'activité de la G6PC est confortée par la conservation de la thréonine 255 dans différentes espèces (Figure 19). Etant donné que toute mutation de la T255 de la G6PC affecte l'activité G6Pase, nos résultats ne nous permettent pas de conclure si cet acide aminé est un site de phosphorylation par la PKA. Cependant, sa position dans la lumière du réticulum endoplasmique n'est pas nécessairement compatible avec une phosphorylation par cette kinase.

Les mutations T145A et T145D n'affectent ni l'activité G6Pase ni la quantité de protéines G6PC et G6PT (Figure 23). Ces résultats suggèrent que ce site n'est probablement pas un site de phosphorylation de la G6PC. Ce site est pourtant le meilleur candidat pour être phosphorylé par la PKA étant donné sa localisation sur une boucle intracytoplasmique. L'absence d'effet des mutations T145 sur l'activité G6Pase pourrait être liée au modèle cellulaire utilisé. En effet, la régulation de l'activité G6Pase par l'AMPc a été mise en évidence dans les cellules néogluco-géniques HepG2 et Caco-2 mais n'a pas pu être observée dans les cellules épithéliales HeLa (Soty 2008). Un environnement néogluco-génique pourrait donc être nécessaire à l'identification des régulations de la G6Pase par la PKA.

1.3.b Analyse de la séquence de la G6PC par MS

L'utilisation d'un anticorps dirigé spécifiquement contre les résidus sérine et thréonine phosphorylés pourrait nous permettre de déterminer si la G6Pase est phosphorylée de façon endogène notamment sur les résidus 145 et 255. Les anticorps actuellement commercialisés reconnaissent spécifiquement certaines séquences consensus. Par exemple, l'anticorps Abcam 17464 reconnaît les sérines et thréonines phosphorylées uniquement si elles sont précédées de résidus Tyrosine, Tryptophane ou Phénylalanine ou si elles sont suivies de la Phénylalanine. Cependant, les séquences peptidiques situées autour des résidus 145 et 255 de la G6PC ou 210 de la G6PT ne correspondent pas aux séquences consensus reconnues par les différents anticorps commerciaux (Figures 17 et 18).

Afin d'analyser la séquence entière de la G6PC endogène et non de manière ciblée, nous avons utilisé une technique de spectrométrie de masse. Les premières analyses effectuées sur des microsomes de foie (Figure 24) n'ont permis d'identifier qu'un seul peptide de la G6PC dans la

bande contenant les protéines de 34kDa. De ce fait, il était nécessaire à la fois de décomplexifier l'échantillon et d'augmenter spécifiquement la quantité de G6PC. Dans cette optique, nous avons mis au point l'immunoprécipitation de la G6PC. Concernant la G6PT, l'anticorps développé au laboratoire permet d'immunoprécipiter la forme humaine mais n'est pas capable de reconnaître la forme murine. Pour la suite des travaux, nous nous sommes donc focalisés sur la G6PC.

L'immunoprécipitation de la G6PC est une étape particulièrement délicate et jusqu'alors jamais réalisée sans dénaturation étant donné sa forte hydrophobicité (9 domaines transmembranaires). Pour réaliser cette immunoprécipitation, j'ai choisi d'utiliser un protocole sous condition détergente afin d'isoler les sous-unités des membranes, mais en condition non dénaturante pour les protéines, afin de conserver au maximum l'intégrité de la G6PC. Comme le montre la figure 25, l'immunoprécipitation de la G6PC sur des hépatocytes primaires de souris permet d'isoler et de révéler deux bandes avec l'anticorps anti-G6PC (la bande à 55kDa étant composée des IgG). Ces deux bandes correspondent exactement au profil obtenu avec un anticorps anti-G6PC sur du foie de souris, suggérant que l'immunoprécipitation permet effectivement de purifier la G6PC (données non représentées). Afin de confirmer la spécificité de l'immunoprécipitation, nous avons répété le protocole à partir d'hépatocytes de souris invalidées pour la G6PC dans le foie (Mutel et al. 2011a). Les bandes caractéristiques de la G6PC ne sont alors pas détectées après immunoprécipitation (Figure 25). Nos conditions nous ont donc permis d'immunoprécipiter spécifiquement la G6PC à partir d'hépatocytes murins.

L'immunoprécipitat obtenu a ensuite été soumis à une analyse MSMS. Cette analyse a permis l'identification, à des niveaux quantifiables, de seulement deux protéines : la G6PC et l'Uricase. Cette donnée nous confirme, à un degré de précision plus important, la spécificité de l'immunoprécipitation.

L'analyse par MS de l'immunoprécipitat nous a permis d'identifier 6 peptides recouvrant environ 30% de la protéine G6PC. Ces 6 peptides sont entourés en rouge sur la figure 26. Nous avons ainsi pu analyser la séquence contenant la thréonine 255 située au niveau de la lumière du RE et identifiée comme étant un site potentiel de phosphorylation. Cependant, nous n'avons pas pu identifier de phosphorylation de ce résidu sur les échantillons analysés. En effet, la faible quantité de matériel disponible ne nous a pas permis de détecter chaque peptide plus de 10 fois. Cette faible détection ne permet aucunement de conclure quant à une éventuelle phosphorylation de la G6PC. Le peptide contenant la thréonine 145 n'a pas pu être détecté. En effet, pour l'analyse par MS, il est indispensable de digérer la protéine afin de la découper en peptides séquençables par le spectromètre de masse. Cependant, l'enzyme de digestion utilisée (trypsine) digère la G6PC au

niveau des acides aminés lysine (K) et arginine (R) représentés en rouge sur la figure 26. La digestion se fait donc autour du peptide contenant la thréonine 145 et le peptide restant – (K)PTY(R)- d'une taille de trois acides aminés, est difficilement identifiable par MS.

1.3.c Phosphorylation *in vitro*

Les différentes méthodes utilisées précédemment ne nous ont pas permis de conclure sur la phosphorylation de la G6PC. Si celle-ci était phosphorylée par la PKA après activation par le glucagon, cette phosphorylation pourrait être induite *in vitro*.

Afin de déterminer si la G6PC peut être phosphorylée par la PKA, nous avons réalisé des expériences de phosphorylation *in vitro* par la sous-unité catalytique de la PKA, en présence d'ATP marqué au ^{32}P . Nous avons étudié en parallèle la phosphorylation de CREB comme contrôle positif. Nous avons également réalisé cette expérience dans des hépatocytes de souris G6PC^{-/-} comme contrôle négatif.

Dans un premier temps, nous avons effectué, sur des lysats d'hépatocytes de souris à jeun, une phosphorylation en présence de PKA et de ^{32}P -ATP puis une immunoprécipitation de la G6PC. Ceci nous permet de phosphoryler la G6PC dans sa conformation native avant immunoprécipitation. Cependant, cette technique ne nous a pas permis de détecter la présence de ^{32}P dans l'immunoprécipitat de la G6PC (données non présentées).

Nous avons ensuite effectué la manipulation inverse, i.e. une immunoprécipitation de la G6PC ou de CREB puis une phosphorylation en présence de PKA et de ^{32}P -ATP sur la G6PC purifiée. Comme attendu, la présence de PKA est indispensable à l'obtention de protéines phosphorylées par le ^{32}P (Figure 27). Nos conditions d'immunoprécipitation et de phosphorylation semblent permettre d'induire la phosphorylation de CREB. En effet, une bande radioactive est détectée à la taille attendue de la protéine (environ 37kDa) (Figure 27). Ces conditions permettent également de détecter une bande à la taille attendue de la G6PC soit environ 34kDa (Figure 27). Cependant, cette bande est également présente après l'immunoprécipitation réalisée à partir d'hépatocytes de souris G6PC^{-/-} (Figure 27). Ce résultat suggère que la bande radioactive, présente dans les échantillons sauvages, ne serait pas la G6PC. La bande radioactive détectée pourrait correspondre à la PKA puisque sa taille théorique est de 38kDa et qu'elle est capable d'autophosphorylation (Pickin et al. 2008).

En conclusion, dans le premier protocole utilisé, lorsque l'immunoprécipitation est réalisée après la phosphorylation, la technique n'est pas assez sensible pour détecter une G6PC phosphorylée avant immunoprécipitation. Dans le second protocole, lorsque la phosphorylation est réalisée après

immunoprécipitation, les conditions ne nous permettent pas de discriminer la G6PC phosphorylée de la PKA.

I.3.d Interaction G6PC-G6PT

Aucune des méthodes utilisées ne nous a permis de démontrer que la PKA peut induire une phosphorylation directe de la G6PC. La régulation de l'activité G6Pase pourrait donc dépendre d'un autre mécanisme. Les études préliminaires du laboratoire ont montré que l'induction de l'activité G6Pase par l'AMPc dépend de la G6PT puisque cette activation est inhibée en présence d'un inhibiteur de la G6PT (S4048). L'interaction entre les deux protéines a également été étudiée par FRET mais n'a pas été concluante (Soty et al. 2011). Dans ce travail, nous avons étudié l'interaction entre les deux sous-unités de la G6Pase par des expériences de co-immunoprécipitation. Pour cela, nous avons surexprimé les formes humaines de la G6PC et de la G6PT dans les cellules HepG2, une lignée d'hépatocytes humains. Comme le montre la figure 28 et comme attendu, la G6PC est révélée après IP G6PC uniquement lorsque la G6PC est surexprimée (Figure 28). En revanche, la G6PC ne peut pas être mise en évidence dans l'immunoprécipitat de la G6PT (Figure 28).

Concernant la G6PT, plusieurs bandes sont détectées après immunoprécipitation (Figure 28). En plus des IgG à 55 kDa, les bandes à 40 et 30 kDa se retrouvent dans tous les échantillons et sont révélées par les anticorps anti-G6PC et anti-G6PT. Ces bandes ne correspondent donc pas spécifiquement à la G6PT. En revanche, une bande à 17kDa est observée uniquement après surexpression de la G6PT et détection avec l'anticorps anti-G6PT (Figure 28). Le profil obtenu dans les cellules HepG2 est différent du profil obtenu dans les cellules HeLa, dans lesquelles une bande spécifique à 34kDa peut être identifiée (Figure 21).

I.4 Conclusion et perspectives

Cette étude nous a permis de conclure que la PKA est impliquée dans l'activation de la G6Pase. En revanche, elle ne nous a pas permis de déterminer le mécanisme impliqué dans cette régulation : soit une phosphorylation directe des sous-unités de la G6Pase par la PKA soit une modification de l'interaction entre les deux sous-unités de la G6Pase. En revanche, les conditions d'expérimentations peuvent être améliorées et complétées afin de conclure définitivement.

Dans un premier temps, nous allons concentrer nos efforts à la vérification de la possibilité d'une phosphorylation de la G6PC *in vitro*. Afin d'augmenter le nombre de peptides de la G6PC détectés par MS, notamment celui entourant la T145, nous pouvons utiliser la chymotrypsine pour digérer la G6PC. Cette digestion permettrait d'obtenir des peptides différents pour l'analyse par MS.

En effet, la chymotrypsine digère les résidus phenylalanine (F), tyrosine (Y), tryptophane (W) et leucine (L), ce qui conduit à obtenir notamment un peptide théorique contenant la thréonine 145 : (F)QGKIKPT(Y).

L'analyse par MS de la G6PC pourrait être effectuée après phosphorylation in vitro de la G6PC par la PKA. Cette analyse permettrait de conclure sur la capacité de la G6PC à être phosphorylée. Dans ce cas, l'analyse effectuée sur la protéine phosphorylée permettrait d'obtenir la signature du peptide phosphorylé. Cette signature serait plus aisément identifiable par la suite sur la protéine endogène.

Ensuite, si la possibilité d'une phosphorylation de la G6PC est confirmée par la spectrométrie de masse, nous étudierons sa phosphorylation endogène. Afin d'augmenter la quantité de matériel à analyser, nous effectuerons plusieurs IP à partir de foie de souris à jeun depuis 24h ayant une forte expression de la G6PC ou traitées au glucagon pour induire une phosphorylation potentielle maximale.

Enfin, notre laboratoire a montré que l'effet du glucagon sur l'activité G6Pase ne prenait plus place à 15°C (Ichai et al. 2001). Cela suggère que l'activation de la G6Pase par le glucagon met en jeu des processus de fusion membranaire impliquant peut-être 1- une interaction entre les deux sous-unités de la G6Pase (Soty et al. 2011) ou 2- la modification de la localisation de la G6Pase au niveau intracellulaire. Afin de montrer une régulation de l'activité G6Pase impliquant l'interaction entre les deux sous-unités, nous allons utiliser un agent chimique pontant afin de lier fortement les deux sous-unités si elles sont assez proches. Une fois liées, les protéines formant un oligomère seront immunoprécipitées et analysées par Western-Blot. Enfin, certains résultats de la seconde partie de ce travail suggèrent que la G6Pase pourrait être régulée via une modification de sa localisation.

II- Mise en évidence d'une voie de sortie de glucose indépendante de GLUT2 impliquant la cavéoline-1

Julien Chilloux, Maud Soty, Gilles Mithieux et Amandine Gautier-Stein

II.1 Introduction

La PEG, plus précisément les réactions enzymatiques permettant la production de glucose, est un mécanisme relativement bien connu mais l'étape cellulaire reliant production et sortie de glucose a été peu étudiée. En effet, il est admis que le glucose produit est exporté hors de la cellule par un transport facilité via GLUT2. Toutes les cellules productrices de glucose (hépatocytes, entérocytes et cellules rénales) expriment la protéine GLUT2, un transporteur de glucose très efficace et non limitant. Cependant, l'étude des souris invalidées pour GLUT2 a remis en cause ce modèle établi en montrant qu'une sortie de glucose néoglucogénique est possible en absence de GLUT2. En effet, dans ce modèle, 1- une injection intrapéritonéale de glucagon induit une réponse hyperglycémique avec la même cinétique que chez les souris sauvages ; 2- la sortie du glucose néosynthétisé à partir de pyruvate et de lactate par les hépatocytes en culture primaire est identique chez les souris GLUT2^{-/-} et GLUT2^{+/+} (entre 150 et 200 pmoles/mg de protéines/h) ; 3- ce transport serait indépendant de l'induction d'un autre transport facilité (GLUT 1, 3, 4 et 5 et SGLT1 et 2) (Guillam et al. 1998).

Les différents travaux effectués sur ces souris ont permis une première caractérisation du transport de glucose en absence de GLUT2. Les auteurs ont ainsi pu déterminer que cette sortie ferait intervenir des mouvements membranaires (Guillam et al. 1998) et les microtubules (Hosokawa & Thorens 2002) et serait reliée à l'homéostasie du cholestérol membranaire (Guillam et al. 1998; Hosokawa & Thorens 2002).

Mes travaux ont consisté à mieux caractériser cette voie de sortie de glucose, notamment son importance chez les souris sauvages et son rôle dans les deux voies de la PEG, la glycogénolyse et la néoglucogénèse. Afin d'étudier le rôle et l'importance de cette sortie de glucose dans chacune des voies de la PEG, nous avons utilisé deux modèles cellulaires : des hépatocytes de souris nourries contenant un fort taux de glycogène comme modèle de glycogénolyse et des hépatocytes de souris à jeun sans glycogène comme modèle de néoglucogénèse. En se basant sur les résultats précédemment obtenus chez les souris GLUT2^{-/-}, nous avons fait l'hypothèse de l'existence d'une voie vésiculaire transportant le glucose du RE (son lieu de production) vers la membrane plasmique (son lieu de sortie).

II.2 Matériels et méthodes

II.2.a Animaux

Les souris invalidées pour la Cav1 (B6.Cg-Cav1tm1Mls/J), obtenues auprès du Jackson

Laboratory, ont été développées au laboratoire de M. Lisanti (Razani et al. 2001) sur un fond génétique mixte SV129 et C57Bl6J. Le fond génétique de ces souris a été purifié par 6 croisements avec des souris C57Bl6J dans les locaux du Jackson Laboratory et 4 croisements au laboratoire. Tous les animaux sont hébergés dans l'Animalerie Lyon Est Conventiionnelle et SPF (ALECS) à la température de 21°C avec un cycle jour-nuit alterné de 12h. Les souris ont un accès permanent à l'eau et à une nourriture standard pour rongeur (SAFE). Les souris à jeun ont un accès continu à l'eau. Toutes les manipulations sont en accord avec les principes édictés par la convention européenne pour la protection des animaux de laboratoire. Le génotypage est effectué par PCR à partir d'ADN génomique avec les amorces spécifiques préconisés par Jackson Laboratory. L'ADN génomique est extrait de tissus par lyse dans le tampon Direct PCR Lysis Reagent (Viagen). La glycémie des animaux est mesurée à l'aide d'un glucomètre Roche à partir d'une goutte de sang prélevée au bout de la queue.

II.2.b Isolement et culture des hépatocytes primaires

Les hépatocytes primaires sont isolés sur des souris âgées de 5 à 8 semaines en utilisant la technique de la collagénase (Dentin et al. 2004) inspirée d'une technique d'isolement précédemment mise au point (Berry & Friend 1969). Les souris sont anesthésiées avec du pentobarbital, le foie est alors perfusé et rincé via la veine cave avec 30mL de HBSS (5.4mM KCl, 0.44mM KH₂PO₄, 0.14M NaCl, 4.2mM NaHCO₃, 50mM HEPES et 0.34mM Na₂HPO₄) contenant 0,5mM d'EGTA tamponné à pH 7,4. Après rinçage, le foie est perfusé avec 40mL de HBSS contenant 0,67mM de CaCl₂ et 0,25mg/mL de collagénase de type IV (Sigma Aldrich). Les hépatocytes sont alors collectés dans une boîte de Pétri et rincés avec du DMEM sans glucose (Sigma Aldrich).

II.2.c Production de glucose et glucose intracellulaire

Les hépatocytes sont ensemencés à $6,4 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans du DMEM sans glucose contenant le solvant comme contrôle négatif (DMSO) ou les différents inhibiteurs : 80μM dynasore (Enzo Life Sciences), 50μM cytochalasine B, 10μM forskoline et 50μM CI976 (Sigma Aldrich). Dans le cas des hépatocytes provenant de souris à jeun, le milieu est supplémenté avec 10mM de lactate, un précurseur de la néoglucogenèse. Le surnageant est collecté après 1h de production et la concentration en glucose est déterminée en évaluant la production de NADPH à partir de NADP en présence d'hexokinase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (Sigma-Aldrich) (Bergmeyer et al. 1974).

Afin de doser le glucose intracellulaire et l'activité G6Pase, les cellules sont récoltées puis rincées avec du PBS et homogénéisées par ultrasonication dans 10mM d'Hépès. Le lysat est ensuite

resuspendu dans un tampon (10mM d'Hépès et 0,25mM sucrose) et utilisé pour les dosages.

II.2.d Dosage du glycogène

Le dosage du glycogène est basé sur le même protocole que le dosage du glucose intracellulaire sur lysat déprotéinisé avec une étape supplémentaire de transformation du glycogène en glucose par l'enzyme amyloglucosidase (Cf. § II.2.c ci-dessus).

II.2.e Extraction d'ARNm et quantification

L'ARN total est extrait à partir de foie de souris grâce aux colonnes d'extraction Qiagen Rneasy (Qiagen). La rétro-transcription et la PCR en temps réel sont réalisées comme décrit précédemment (Pillot et al. 2009).

Les amorces spécifiques suivantes sont utilisées :

pour *Glut1* : 5'-CGTGGTGAGTGTGGTGGATG-3' (sens) et 5'-GCCCCAGAAGGTTATTGA-3' (antisens)

pour *Glut2* : 5'-CCTCAAGAGGTAATAATATCCC-3' (sens) et 5'-CCATCAAGAGGGCTCCAGTC-3' (antisens).

II.2.f Western Blot, Dosage d'activité G6Pase et immunoprécipitation

Cf. Matériels et Méthodes de la partie 1 § I.2

II.2.g Anticorps primaires

L'anticorps anti-G6PC produit chez le lapin est ciblé contre l'extrémité C-terminale de la G6PC de rat (motif cible : CLARLLGQTHKSL), purifié sur colonne d'affinité et dilué au 1/5000, pour le Western-Blot. L'anticorps anti-Cav1, dilué au 1/5000 pour le Western-Blot, est produit chez le lapin (610060, BD Biosciences).

II.2.h Microscopie

Concernant la culture cellulaire et la transfection, se référer à la partie matériels et méthodes de la partie 1 § I.2

Plasmides

L'ADNc de la G6PC (GeneID : 2538) humaine a été cloné dans le plasmide pmCherry-N1 Vector (Clontech 632523). Cette construction permet d'obtenir la G6PC avec le fluorophore mCherry en position N-terminale. L'ADNc de la Cav1 canine a été cloné dans le plasmide pEGFP-

N1 par l'équipe du Pr Helenius (Pelkmans et al. 2001) qui nous l'a gracieusement fourni.

Marqueurs d'organites

Les marqueurs spécifiques du RE (ENZ-51025) et du Golgi (ENZ-51028) ont été obtenus chez Enzo Life Sciences et utilisés selon les préconisations fournies.

Immunohistochimie

Les hépatocytes sont ensemencés comme décrit dans la partie culture cellulaire mais cette fois sur lamelles. Les cellules sont fixées au PFA 4% puis perméabilisées dans du PBS-Triton 0,3%. Les cellules sont incubées 1h avec les anticorps primaires (1/2000 pour l'anticorps anti-G6PC et 1/600 pour l'anticorps anti-Cav1), rincées puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 555 (A21429, Invitrogen).

Microscopie

La visualisation des échantillons s'est déroulée au PLATIM (Plateau Technique Imagerie Microscopie UMS3444). Les images sont obtenues grâce à l'utilisation d'un microscope confocal Zeiss LSM 710. Lors du visionnage, les cellules vivantes sont maintenues à 37°C à 5% de CO₂. L'observation est réalisée à l'aide d'un objectif 63x à immersion huile. Les films ont été obtenus grâce à l'utilisation d'un confocal de type « spinning-disk » avec une prise d'image toutes les 0,15s.

Analyse des images

Le coefficient de Pearson est calculé grâce au plugin pour ImageJ : JACoP (Bolte & Cordelières 2006).

II.2.i Mutagenèse dirigée de la G6PC

La mutagenèse dirigée de l'ADNc de la G6PC humaine (GeneID : 2538), cloné dans le plasmide pmCherry-N1 Vector, a été effectuée avec le kit : QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis de Stratagene. La séquence des amorces a été déterminée grâce au logiciel *QuikChange® Primer Design Program* et synthétisée par Eurogentec S.A. :

F195A et H197A

Sens : 5'-CAGGCATTGCTGTTACAGAAACTGCCAGCGCCATCCACAGCATCTATAATGCCA-3'

Anti-sens : 5'-TGGCATTATAGATGCTGTGGATGGCGCTGGCAGTTTCTGTAACAGCAATGCCTG-3'

La présence de la mutation souhaitée et l'absence d'autres mutations ont été confirmées par séquençage d'ADN par la société Biofidal (Vaulx-en-Velin).

II.3 Résultats - Discussion

II.3.a Existence d'une voie vésiculaire impliquée dans le transport du glucose produit de novo

- Transport de glucose selon la voie de production

Afin d'étudier la production de glucose uniquement à partir de la glycogénolyse, nous avons mesuré la sortie de glucose d'hépatocytes de souris nourries, dans un milieu de culture dépourvu de glucose et de précurseurs néoglucogéniques. En effet, ces hépatocytes ont une forte quantité de glycogène ($46,1 \pm 7,5 \mu\text{g/g}$ de tissu) qui leur permet de produire du glucose par la glycogénolyse (Figure 29). Pour inhiber la formation de vésicules dans la cellule, nous avons traité les hépatocytes avec du dynasore, un inhibiteur de dynamines. En effet, les dynamines sont des GTPases indispensables à la libération de la majorité des vésicules car elles permettent la scission de la vésicule au niveau de la membrane (Figure 14).

Comme le montre la figure 30A, la sortie du glucose glycogénolytique, n'est pas diminuée en présence de dynasore. En accord avec ce résultat, le dynasore n'induit pas d'accumulation du glucose intracellulaire (Figure 30B). Cependant, le dynasore inhibe d'environ 20% l'activité G6Pase, sans impact sur la sortie de glucose (Figure 31).

Afin d'étudier la production de glucose uniquement à partir de la néoglucogénèse, nous avons mesuré la sortie de glucose d'hépatocytes de souris à jeun depuis 16h, qui n'ont plus de glycogène (Figure 29) (Fosgerau et al. 2002), dans un milieu de culture dépourvu de glucose et supplémenté en lactate. Dans ces conditions, la production de glucose est possible uniquement à partir de ce substrat. Le dynasore diminue de 50% la sortie de glucose néoglucogénique (Figure 30C). L'effet inhibiteur du dynasore ne dépend pas du substrat utilisé car les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant l'alanine comme substrat néoglucogénique (données non représentées). La diminution de la quantité de glucose extracellulaire par le dynasore pourrait être due à une diminution de l'activité G6Pase. Cependant, dans les hépatocytes de souris nourries, la même diminution de l'activité G6Pase (20%) n'est pas suffisante pour diminuer la sortie du glucose glycogénolytique (Figure 31). Cette diminution de l'activité G6Pase ne peut donc pas expliquer la diminution de la sortie du glucose néoglucogénique induite par le dynasore. En parallèle, le traitement au dynasore induit une accumulation du glucose intracellulaire (Figure 30D). Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de la formation des vésicules diminue la sortie du glucose uniquement lorsqu'il est produit par la néoglucogénèse.

Afin de déterminer les rôles respectifs de GLUT2 et des vésicules dans la sortie du glucose

néoglucogénique, nous avons inhibé ces deux voies dans les hépatocytes de souris à jeun (seules à mettre en place les deux mécanismes de sortie) par un traitement au dynasore et à la cytochalasine B. La cytochalasine B est un inhibiteur de la majorité des transports facilités de glucose via les GLUTs (Colville et al. 1993). Le traitement par la cytochalasine B des hépatocytes de souris à jeun induit également une inhibition d'environ 50% de la sortie de glucose (Figure 32). De façon intéressante, lorsque ces deux inhibiteurs sont utilisés simultanément, la sortie du glucose est diminuée de plus de 80%.

Ces résultats suggèrent donc que le glucose glycogénolytique sort des hépatocytes par une voie indépendante de mouvements membranaires, principalement via GLUT2, tandis que le glucose néoglucogénique sortirait à la fois par GLUT2 et par une voie vésiculaire dépendante des dynamines.

- **Régulation hormonale de la G6Pase et de la sortie de glucose vésiculaire**

L'induction de l'hydrolyse du G6P par la G6Pase par le glucagon (Ichai et al. 2001) et par l'AMPc (Soty 2008) dépendent de mouvements membranaires. Nous avons donc étudié le rôle de la voie vésiculaire dans la régulation de la sortie de glucose par l'AMPc. Cette voie ne prenant place que pendant la néoglucogénèse, nous avons étudié le lien entre l'activation de la sortie de glucose par l'AMPc et la voie vésiculaire dans les hépatocytes de souris à jeun.

Comme attendu, la forskoline induit une augmentation de la production de glucose, ce qui se traduit par une augmentation de 23% de la sortie de glucose dans le milieu extracellulaire (Figure 33A). Lorsque les hépatocytes sont traités avec de la forskoline en présence de dynasore, on n'observe aucune augmentation de la sortie de glucose.

Dans les hépatocytes de souris à jeun, la forskoline induit une augmentation de la sortie de glucose de 60%. Lorsque les hépatocytes sont traités avec de la forskoline en présence de dynasore, on observe une augmentation relative de la sortie de glucose de 60% (Figure 33B). Ces résultats sont en accord avec une régulation du flux de l'hydrolyse du G6P dépendant de mouvements membranaires (Ichai et al. 2001). Cependant, ils suggèrent que l'activation du flux par l'AMPc ne dépend pas des dynamines.

II.3.b Rôle de la cavéoline-1 dans la sortie vésiculaire du glucose

Les résultats obtenus à partir des souris GLUT2^{-/-} suggèrent que la voie vésiculaire de sortie du glucose dépend de la température, des microtubules et est impliquée dans l'homéostasie du cholestérol. Les cavéoles qui possèdent toutes ces caractéristiques sont donc de bonnes candidates.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons étudié la sortie de glucose chez des souris invalidées pour la cavéoline 1, protéine nécessaire à la formation des cavéoles (Razani et al. 2001). Les modifications du métabolisme des souris Cav1^{-/-} (cf. §IV.3.b) pourraient affecter les mesures de PEG réalisées *in vivo*. Nous avons donc étudié la production de glucose par les hépatocytes en culture primaire *in vitro*.

L'absence de GLUT2 induit une accumulation de G6P dans les hépatocytes conduisant à une modification du métabolisme du glycogène (Burcelin et al. 2000a). Ainsi, le foie des souris GLUT2^{-/-} contient encore une quantité significative de glycogène après 24h de jeûne ce qui est cohérent avec nos observations d'une sortie de glucose glycolytique fortement dépendante de GLUT2. Par contre, le foie des souris Cav1^{-/-} nourries contient la même quantité de glycogène que les souris sauvages nourries, et le foie des souris Cav1^{-/-} à jeun ne contient plus de glycogène comme celui des souris sauvages à jeun (Figure 34). Nous avons donc considéré que les hépatocytes Cav1^{-/-} à jeun pouvaient être utilisés comme modèle de néoglucogenèse.

Les hépatocytes de souris Cav1^{-/-} nourries présentent une sortie de glucose glycolytique équivalente à celle des souris sauvages, qui n'est pas affectée par un traitement au dynasore (Figure 35A). En accord avec ces résultats, la quantité de glucose intracellulaire est similaire dans les hépatocytes de souris sauvages et Cav1^{-/-} nourries en présence ou non de dynasore (Figure 35B). Ces résultats suggèrent que la Cav1 n'est pas impliquée dans la sortie du glucose glycolytique.

Les hépatocytes de souris Cav1^{-/-} à jeun présentent une sortie de glucose néoglucogénique 50% plus basse que les souris sauvages (Figure 35C). De façon intéressante, cette production est équivalente à la sortie de glucose des hépatocytes de souris sauvages à jeun traités au dynasore (Figure 35C). La diminution de la sortie du glucose n'est pas due à une diminution de l'activité G6Pase. En effet, l'activité G6Pase est équivalente dans les hépatocytes de souris sauvages et Cav1^{-/-} (Figure 36). Ces résultats suggèrent que les vésicules impliquées dans la sortie de glucose, dont la formation est inhibée par le dynasore chez les souris sauvages, sont dépendantes de la présence de Cav1. En accord avec cette hypothèse, le dynasore n'a pas d'effet inhibiteur supplémentaire sur la sortie du glucose en absence de Cav1 (Figure 35C). Par ailleurs, la quantité de glucose intracellulaire des hépatocytes Cav1^{-/-} est environ deux fois plus élevée que dans les hépatocytes de souris sauvages (Figure 35D).

La diminution de la sortie de glucose des hépatocytes de souris Cav1^{-/-} pourrait être liée à une modification de la capacité de transport, par exemple de la quantité de GLUT1 ou GLUT2. Cependant, la quantité d'ARNm des ces transporteurs de glucose hépatiques est équivalente chez les souris Cav1^{-/-} et les sauvages (Figure 37).

Afin d'estimer le rôle de GLUT2 dans la sortie de glucose chez les souris Cav1^{-/-}, nous avons traité les hépatocytes Cav1^{-/-} avec la cytochalasine B. L'inhibition de GLUT2 induit une très forte accumulation du glucose intracellulaire, suggérant que la sortie de glucose des hépatocytes de souris Cav1^{-/-} dépend uniquement de GLUT2 (Figure 38).

Nos résultats montrent que la sortie du glucose néoglucogénique hépatique des souris Cav1^{-/-} est 50% plus faible que celle des souris sauvages. Cependant, cette diminution n'a aucun impact sur la glycémie des souris (Données non illustrées et Fernandez-Rojo et al. 2011). Nous avons récemment publié que l'absence de PHG est compensée par les productions rénale et intestinale au cours du jeûne (Mutel et al. 2011a). Cependant, cette compensation ne semble pas responsable du maintien de la glycémie des souris Cav1^{-/-} car l'activité G6Pase rénale et intestinale des souris Cav1^{-/-} est similaire à celles des souris sauvages (Figure 39). Les souris Cav1^{-/-} ont cependant une inhibition du signal de l'insuline et une diminution de la translocation de GLUT4 dans les adipocytes (Kimura et al. 2002; Cohen et al. 2003b). Ces défauts pourraient induire une diminution de la consommation de glucose par ces tissus permettant de compenser la diminution du glucose produit par le foie.

II.3.c Relations entre production de glucose dans le RE et voie vésiculaire de sortie

Le glucose est produit par la G6Pase dans le RE. Son export vers le milieu extracellulaire par une voie vésiculaire pourrait impliquer 1- la voie classique d'exocytose des protéines sécrétées ; 2- des vésicules composées de Cav1 contenant du glucose ; 3- des vésicules composées de Cav1 et de la G6Pase.

- Export des vésicules via le TGN (Trans Golgi Network)

Le transport vésiculaire entre le RE et le Golgi nécessite notamment la formation d'un manteau de coatomères COPII lors du bourgeonnement de la vésicule dans le RE. L'inhibition de la formation de ces vésicules par le CI976 n'a pas d'effet sur la sortie de glucose glycolytique ou néoglucogénique, suggérant ainsi un transport direct du glucose entre le RE et la membrane plasmique (Figure 40).

- Localisation intracellulaire de Cav1

Nos résultats suggèrent que le glucose peut être exporté par des vésicules dépendantes de la Cav1, du RE vers la membrane plasmique. Dans un premier temps, nous avons analysé le

mouvement de la Cav1 en temps réel afin de déterminer si la Cav1 pouvait être impliquée dans cet export. La position de protéines chimères Cav1 fusionnées au fluorophore GFP a été suivie au cours du temps après surexpression dans les cellules HepG2 (lignée hépatomateuse humaine). Dans ces conditions, i.e. 24H après transfection, deux populations de Cav1 sont observées. Une population peu mobile à la membrane plasmique et une population mobile répartie dans l'ensemble de la cellule (Figure 41A et Film 1). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui montrent que la majorité de la Cav1 synthétisée est présente de façon stable à la membrane (Tagawa et al. 2005). Dans un second temps, nous avons analysé la localisation de la Cav1 par immuno-fluorescence dans les hépatocytes isolés de souris à jeun (Figure 41B). Dans les hépatocytes, la Cav1 a une localisation ponctuée dans l'ensemble de la cellule, semblable à celle observée dans les cellules HepG2. Cette localisation, similaire à la localisation de la protéine chimère Cav1-GFP observée dans d'autres types cellulaires (Hayer et al. 2010a), est compatible avec un transport du RE vers la membrane plasmique.

- **Localisation intracellulaire de la G6PC**

La G6Pase pourrait être directement impliquée dans les mécanismes de sortie du glucose. En effet, l'absorption intestinale de glucose chez les souris GLUT2^{-/-} dépend, comme dans les hépatocytes, d'une voie vésiculaire, mais également de l'étape de déphosphorylation du glucose par la G6Pase. Notre hypothèse est que la G6Pase pourrait interagir directement avec les cavéoles afin de produire du glucose au niveau de la membrane plasmique directement dans le milieu extracellulaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons développé une protéine chimère composée de la G6PC couplée en N-terminal au fluorophore mCherry. Nous avons démontré dans un premier temps que la localisation de cette protéine surexprimée dans les cellules HepG2 correspond à la localisation endogène de la G6PC. La G6PC est principalement localisée autour du noyau et de façon ponctuée dans l'ensemble du cytoplasme (Figure 42).

Cette construction nous a permis d'étudier la colocalisation de la G6PC-mCherry avec des marqueurs fluorescents spécifiques du RE et du Golgi dans les cellules HepG2 (Figure 43). La figure 43A montre que la G6PC-mCherry ne présente aucune colocalisation avec le Golgi tandis que la G6PC-mCherry co-localise avec le RE (Figure 43B). Cette donnée est appuyée par le calcul du coefficient de Pearson (Figure 43D). Plus la co-localisation est linéaire, plus la valeur du coefficient de Pearson est éloignée de 0. Le coefficient de Pearson concernant le RE est proche de 1 à l'inverse de celui du Golgi proche de 0,3. La figure 43B montre également que si la majorité de la G6PC co-localise avec le RE, une partie est située en dehors de cette structure et semble être proche de la membrane plasmique (Figure 43C). Cette localisation n'avait encore jamais été décrite pour la

G6PC. De plus, l'analyse en temps réel de la G6PC-mCherry dans les cellules HepG2 montre que cette protéine n'est pas immobile au sein du RE mais est capable de suivre des trajectoires vers la membrane plasmique à des vitesses moyennes de 0,5µm/s (Soty et al. 2011 et Film 2). L'ensemble de ces résultats basés sur des protéines chimères fluorescentes suggère fortement que la G6PC peut être présente dans des vésicules circulant du RE vers la membrane plasmique.

- **G6Pase et trafic vésiculaire**

A partir des résultats obtenus sur la production de glucose, nous avons fait l'hypothèse que la G6PC circule dans des vésicules sensibles au dynasore et dépendante de la Cav1. Nous avons donc, dans un premier temps, testé l'effet du dynasore sur la localisation de la G6PC-mCherry. Après traitement au dynasore, dans 40% des cellules, la localisation de la G6PC est restreinte à une zone péri-nucléaire (Figure 44B). Ces résultats suggèrent donc que la localisation ponctuelle de la G6PC pourrait dépendre de la formation de vésicules. Dans un second temps, nous avons testé l'hypothèse d'une localisation de la G6PC au sein de vésicules riches en Cav1. Dans ce cas, les deux protéines devraient être co-localisées ou avoir une localisation très proche. Dans les cellules HepG2, les deux protéines chimères ont une distribution vésiculaire dans toute la cellule. Certaines de ces vésicules révèlent une co-localisation des deux protéines ou une localisation très proche (Figure 45). Dans les hépatocytes primaires, dans lesquels le RE représente une grande partie du cytoplasme, les distributions de la G6PC et de la Cav1 semblent recouvrir des régions communes (Figure 46A vs 41B). Cependant, une étude de leur colocalisation par immunofluorescence n'a pour l'instant pas été réalisée car les deux anticorps primaires mis au point dans ces expériences sont élaborés dans la même espèce.

Enfin, pour confirmer l'importance de la Cav1 dans la localisation de la G6PC, nous avons étudié la localisation endogène de la G6PC dans des hépatocytes de souris Cav1^{-/-}. L'absence de Cav1 ne modifie pas la localisation de la G6PC hépatique (Figure 46B). Les études de co-localisation des protéines chimères G6PC et Cav1 dans les cellules HepG2 suggèrent qu'une partie seulement (relativement faible) de la G6PC co-localise avec la Cav1. Dans le foie des souris Cav1^{-/-}, la mauvaise localisation de cette faible population de G6PC pourrait être masquée par la forte expression de la G6PC hépatique.

- **Interaction Cav1-G6PC**

La Cav1 est décrite comme une protéine de liaison capable d'interagir directement avec certaines protéines (cf. IV.1 des données bibliographiques).

L'analyse des séquences de la G6PT et de la G6PC montre la présence d'un site de liaison

potentiel à la Cav1 très conservé au cours de l'évolution (Figure 47). Afin de tester l'hypothèse d'une interaction entre la Cav1 et la G6PC nous avons muté spécifiquement les deux premiers acides aminés aromatiques du site de liaison supposé sur la G6PC en alanine. Cette mutation empêcherait la liaison potentielle entre la G6PC et la Cav1. Nous avons ensuite étudié la localisation intracellulaire de la protéine mutée. Malheureusement, les mutations effectuées sur la G6PC semblent modifier l'expression de la protéine. En effet, la protéine mutée est faiblement exprimée dans les cellules transfectées et n'est presque pas détectable.

Afin d'analyser l'interaction physique potentielle entre la G6PC et la Cav1, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations sur des foies de souris sauvages et G6PC^{-/-}. Après immunoprécipitation de la Cav1 et révélation de l'immunoprécipitat avec un anticorps anti-G6PC, le profil est identique entre les souris G6PC^{-/-} et les souris sauvages, suggérant que l'immunoprécipitation Cav1 n'a pas permis de précipiter la G6PC (Figure 48). Etant donné la faible expression de la Cav1 dans les hépatocytes, nous avons utilisé des cellules HepG2 surexprimant la G6PC et/ou la Cav1. Cependant, aucune interaction n'est observée même après une surexpression des deux protéines (données non présentées).

II.4 Conclusion et perspectives

Dans ces travaux, nous avons pu mettre en évidence une voie vésiculaire de sortie du glucose impliquant la Cav1 qui serait uniquement liée à la néoglucogenèse. Cette voie ne semble pas compensée par GLUT2 car l'absence de Cav1 induit une diminution de 50% de la sortie de glucose. Nos résultats suggèrent également que la sortie de glucose néoglucogénique dépendrait uniquement de GLUT2 et de la Cav1. Cette identification d'une nouvelle voie de sortie du glucose pourrait être intéressante d'un point de vue pathologique. En effet, chez les patients atteints de diabète de type 2, la PEG, et plus particulièrement la néoglucogenèse, est augmentée (Clore et al. 2000; Beck-Nielsen et al. 2002). Chez ces patients, la Cav1 pourrait donc représenter une cible thérapeutique potentielle permettant de contribuer à inhiber la sortie du glucose et de limiter l'hyperglycémie.

Pour confirmer ces données *in vivo*, nous générons actuellement des souris invalidées pour la Cav1 et pour GLUT2 spécifiquement dans le foie (en collaboration avec B. Thorens). Ces souris seront générées à partir de croisement de souris GLUT2^{lox/lox} avec des souris exprimant une Cre recombinase inducible par le tamoxifène sous le contrôle d'un promoteur hépatospcifique (serum albumine : SA^{Cre/+}). Ce protocole a déjà été utilisé dans notre laboratoire pour l'invalidation hépatospcifique de la G6PC (Mutel et al. 2011a). Nous obtiendrons ainsi des souris GLUT2^{lox/lox}.SA^{Cre/+} dont le gène GLUT2 sera invalidé spécifiquement dans le foie. Ces souris seront

ensuite croisées avec des souris Cav-1^{-/-} afin d'obtenir des souris GLUT2^{lox/lox}.SA-CRE.Cav-1^{-/-}. Selon nos précédents résultats, les hépatocytes de ces souris seraient dépourvus de voie de sortie de glucose et donc dans l'incapacité de libérer du glucose dans le milieu extracellulaire. Le phénotype attendu est celui d'une glycogénose de type Ia, maladie caractérisée par un défaut de production de glucose (Mutel et al. 2011a).

Afin de caractériser le mécanisme responsable de la sortie de glucose, nous réaliserons différentes expériences basées sur l'utilisation de protéines chimères Cav1 et G6PC. Nous étudierons la localisation en temps réel de ces protéines au cours de leur synthèse afin d'identifier des trajectoires communes. La sensibilité au dynasore de ces trajectoires potentielles sera également étudiée. En parallèle, nous réaliserons de nouvelles mutations de la G6PC en remplaçant les acides aminés aromatiques par des acides aminés de taille et de propriétés physico-chimiques plus proche afin de ne pas déstabiliser la protéine. Nous espérons ainsi pouvoir étudier la localisation de la protéine mutée en comparaison de la Cav1 sauvage.

III- Discussion Générale

La PEG est une fonction cruciale de l'organisme dont les régulations ont été principalement abordées du point de vue enzymatique. Dans ce travail, nous avons décomposé la PEG en une phase de production, finalisée par la G6Pase et une phase de sortie du glucose, réalisée par GLUT2 majoritairement. Les caractéristiques enzymatiques de la G6Pase sont bien documentés. Cependant, l'étude de sa régulation à court terme a permis au laboratoire de mettre en évidence un mécanisme de régulation de la G6Pase dépendant de mouvements membranaires. En parallèle, l'étude des souris GLUT2^{-/-} a démontré l'existence d'une voie de sortie du glucose dépendant également de mouvements membranaires. L'objectif de ce travail de thèse consistait à caractériser les mécanismes impliqués dans ces processus et leur interaction potentielle.

III.1 Caractérisation de la voie vésiculaire de sortie du glucose : implication de la cavéoline 1

- La sortie de glucose chez les souris Glut2^{-/-} est indépendante d'autres GLUTs

L'étude des souris invalidées pour GLUT2 a remis en cause le dogme d'une sortie du glucose effectuée uniquement par GLUT2. Cette étude a mis en évidence que l'absence de GLUT2 ne diminue pas la sortie de glucose néoglucogénique chez la souris (Guillam et al. 1998). Les auteurs ont pu mettre en évidence que cette sortie ne faisait pas intervenir d'autres transporteurs de la famille des GLUTs tels que GLUT1, 3, 4 et 5 ni les transporteurs SGLT1 et 2. Cependant, les auteurs de cette étude réalisée en 1998 n'ont pas vérifié le rôle potentiel des GLUTs 8, 9 et 10 exprimés dans le foie mais qui n'étaient pas encore identifiés.

Les GLUTs 8 et 10 font partis de la classe 3 des transporteurs GLUTs et sont donc des formes intracellulaires. La localisation intracellulaire de GLUT8 a été confirmée par immunofluorescence au niveau des endosomes tardifs et l'insuline n'induit pas de translocation de GLUT8 à la membrane plasmique (Augustin et al. 2005). De plus, GLUT8 est principalement localisé dans les hépatocytes périveineux, i.e. non localisé avec le système G6Pase (Gorovits et al. 2003). La localisation intracellulaire de GLUT10 a été démontrée par immuno-fluorescence confirmant ainsi les prédictions faites à partir de sa séquence contenant un motif de rétention intracellulaire YSRI au niveau C terminal (Coucke et al. 2006). De plus, GLUT10 ne semble pas impliqué dans le transport de glucose car il semble être un transporteur d'acide ascorbique dans la membrane mitochondriale (Lee et al. 2010). GLUT8 et 10 ne semblent donc pas impliqués directement dans les mécanismes de sortie du glucose. GLUT9 fait partie de la classe 2 de la famille des GLUTs et est localisé au niveau de la membrane plasmique. Cependant le rôle de cette protéine dans le transport de glucose

est encore incertain. En effet, GLUT9 a d'abord été décrit comme un transporteur de glucose/fructose mais serait en fait un uniporteur d'acide urique et ne transporterait pas de glucose (Bibert et al. 2009). L'ensemble des membres identifiés de la famille des GLUTs ne semblent donc pas être de bons candidats responsables de la sortie normale du glucose chez les souris GLUT2^{-/-}. Ces données bibliographiques couplées aux données obtenues à basse température dans les hépatocytes GLUT2^{-/-} permettent d'éliminer l'hypothèse d'un transport facilité (Guillam et al. 1998).

- **Une voie vésiculaire impliquée dans la sortie du glucose néoglucogénique**

Les différentes études effectuées sur les souris GLUT2^{-/-} ont démontré que la voie de sortie du glucose indépendante de GLUT2 impliquerait des mouvements membranaires (Guillam et al. 1998; Hosokawa & Thorens 2002). Nous avons émis l'hypothèse que ces mouvements correspondent à des vésicules de transport. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons inhibé la formation de la majorité des vésicules grâce au dynasore, un inhibiteur spécifique des dynamines (Macia et al. 2006; Kirchhausen et al. 2008).

L'utilisation du dynasore a permis de mettre en évidence que la sortie du glucose provenant de la glycogénolyse n'est pas dépendante des dynamines et serait donc probablement indépendante de mouvements vésiculaires. A l'inverse, la sortie du glucose provenant de la néoglucogénèse est inhibée de 50% par le dynasore, qui conduit à une forte accumulation de glucose à l'intérieur de la cellule. Ces données suggèrent que la sortie du glucose néoglucogénique (dépendant des dynamines) ferait intervenir des vésicules. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les observations réalisées sur les souris GLUT2^{-/-}. En effet, les souris GLUT2^{-/-} à l'état nourri présentent un défaut de dégradation du glycogène qui commence seulement à diminuer après 24h de jeûne ce qui pourrait correspondre à la mise en place de la voie vésiculaire. De plus, chez ces souris, la sortie de glucose a été étudiée uniquement après 24h de jeûne et sous traitement à l'IBMX qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc (Guillam et al. 1998). Cela suggère que cette voie vésiculaire a été mise en évidence lorsque la néoglucogénèse était en place et de plus, fortement stimulée. La cohérence de nos résultats avec les études précédentes se vérifie aussi avec la dépendance aux microtubules de la voie vésiculaire mise en évidence chez les GLUT2^{-/-}. En effet, de nombreuses vésicules se déplacent le long des microtubules. L'utilisation de la cytochalasine B, un inhibiteur de la majorité des transporteurs de glucose de type GLUT inhibe la sortie du glucose néoglucogénique dans les mêmes proportions que le dynasore. Ces résultats suggèrent que chaque voie (GLUT2 et la voie vésiculaire) participerait à la moitié de la sortie du glucose néoglucogénique. En accord avec cette hypothèse, l'utilisation de ces deux inhibiteurs simultanément annule quasiment la sortie du glucose néoglucogénique. Cette donnée est en accord

avec la diminution de 80% de la sortie de glucose des hépatocytes GLUT2^{-/-} placés à 12°C, condition connue pour inhiber les mouvements membranaires. Nos résultats suggèrent donc qu'il existerait deux voies distinctes, indépendantes, complémentaires et quantitativement équivalentes dans la sortie du glucose néoglucogénique. La voie vésiculaire de sortie du glucose néoglucogénique est dépendante de la Cav1.

- **La voie vésiculaire de sortie du glucose néoglucogénique est dépendante de la Cav1**

Les études des souris GLUT2^{-/-} ajoutées à nos résultats montrent que le glucose peut être exporté par un transport vésiculaire dépendant des microtubules et lié au transport intracellulaire du cholestérol (Hosokawa & Thorens 2002). En analysant le « portrait robot » de ce transport, nous avons émis l'hypothèse qu'il impliquerait la Cavéoline-1 (dont la biogenèse débute au niveau du RE rugueux). La Cav1 est une protéine indispensable à la formation des vésicules appelées cavéoles (Razani et al. 2001). Ces cavéoles se déplacent dans la cellule le long des microtubules de façon chronique, rapide et bidirectionnellement (Mundy et al. 2002). Les cavéoles et la Cav1 sont impliquées dans le transport du cholestérol du RE, lieu de sa production, vers la membrane plasmique (Smart et al. 1996). Enfin, la formation des cavéoles est dépendante d'un membre de la famille des dynamines, la dynamine 2 (Oh et al. 1998; Yao et al. 2005; Senju et al. 2011) qui est inhibée par le dynasore (Macia et al. 2006). Les cavéoles regroupent donc toutes les caractéristiques du transport vésiculaire de glucose.

Afin de vérifier si la voie vésiculaire de sortie du glucose implique la Cav1, nous avons utilisé un modèle murin invalidé pour la Cav1, dont tous les tissus sont dépourvus de cavéoles, exceptés les tissus exprimant la Cav3 (principalement les muscles squelettiques).

En accord avec les résultats obtenus dans les hépatocytes sauvages traités au dynasore, la sortie de glucose glycogénolytique n'est pas affectée par l'absence de Cav1.

Les hépatocytes de souris Cav1^{-/-} ont en revanche une sortie du glucose néoglucogénique diminuée de moitié en condition basale. Cette diminution est du même ordre de grandeur que l'inhibition par le dynasore chez les souris sauvages. Cela suggère que le dynasore inhibe, chez les souris sauvages, la voie dépendante de la Cav1. Cette hypothèse est renforcée par l'absence d'effet du dynasore sur la sortie de glucose néoglucogénique chez les souris Cav1^{-/-}. Cependant, la diminution du glucose extracellulaire pourrait être due à une augmentation de la consommation du glucose. En effet, en absence de Cav1, les hépatocytes augmentent leur glycolyse anaérobie par effet Warburg (Fernandez-Rojo et al. 2011). Cependant, si tel était le cas, la diminution de la quantité de glucose extracellulaire serait également observée lors de la glycogénolyse. La

diminution du glucose extracellulaire observée dans les hépatocytes Cav1^{-/-} est donc plus probablement liée à une diminution de la sortie du glucose. De plus, en accord avec une diminution basale de la sortie du glucose, la concentration de glucose intracellulaire est plus élevée dans les hépatocytes Cav1^{-/-} et du même ordre de grandeur que celle observée chez les souris sauvages traitées au dynasore. Ces résultats suggèrent que la voie vésiculaire de sortie de glucose est dépendante de la Cav1.

Ces données sont également en accord avec les précédentes études basées sur les souris GLUT2^{-/-}. En effet, la sortie de glucose de leurs hépatocytes est sensible à la progestérone (Guillam et al. 1998; Hosokawa & Thorens 2002), une molécule qui induit une redistribution et une séquestration de la Cav1 dans le RE (Smart et al. 1996). De plus, le foie des souris GLUT2^{-/-} présente une hyperplasie (Burcelin et al. 2000a). Or, la Cav1 est nécessaire à la régénération du foie (Fernandez-Rojo et al. 2011) et son expression est augmentée lors du développement de carcinomes hépatiques (Cokakli et al. 2009).

III.2 Mécanismes de sortie du glucose par la voie vésiculaire impliquant la Cav1

- Une voie directe du RE vers la membrane plasmique

Nos résultats ont mis en évidence que le transport du glucose à partir du réticulum endoplasmique ne faisait pas intervenir la protéine COPII, responsable du trafic entre le RE et le Golgi. Les mêmes résultats ont été obtenus sur les souris GLUT2^{-/-} avec la brefeldin A, un autre inhibiteur du transport du RE vers le Golgi (Guillam et al. 1998). L'ensemble de ces résultats suggère que le transport du glucose par des vésicules impliquant la Cav1 ne serait pas un mécanisme trans-golgien mais direct entre le RE et la membrane plasmique. Ce transport pourrait être mis en parallèle avec le mécanisme, Cav1 dépendant, du transport direct du cholestérol entre le RE et la membrane plasmique (Urbani & Simoni 1990). Le mécanisme cellulaire suggéré par notre étude est cependant différent des résultats obtenus par une étude récente, portant sur la biogenèse des cavéoles et le transport de la Cav1 vers la membrane plasmique (Hayer et al. 2010a). Cette étude montre que lors de sa biogenèse, la Cav1 est transportée du RE vers le Golgi puis vers la membrane plasmique. Selon ces travaux, la dynamine 2, une GTPase impliquée dans l'étape finale de la genèse de la majorité des vésicules, ne serait pas impliquée dans le transport de la Cav1 associée au GPI (Glycosylphosphatidyl Inositol) du Golgi vers la membrane plasmique. Dans l'étude de Hayer et coll., seule une voie trans-golgiennne est mise en évidence pour l'export de la Cav1. Les divergences de nos résultats avec l'étude de Hayer et al. peuvent être liées à l'existence de

deux populations de Cav1, différemment ciblées dans nos études. En effet, l'étude de Hayer et al. porte sur la biogenèse de la Cav1, i.e. le devenir des protéines Cav1 nouvellement synthétisées qui seront associées avec les cavéoles. Les auteurs ne s'intéressent qu'au trafic de Cav1 entre le RE et le Golgi puis entre le Golgi et la membrane plasmique. Par exemple, leurs données montrent que l'inhibition de COPII empêche la localisation de la Cav1 dans le Golgi mais elles ne démontrent pas que cette inhibition empêche la localisation de Cav1 à la membrane plasmique. De plus, une fois à la membrane, les cavéoles ou certaines populations de Cav1 pourraient former un cycle entre le RE et la membrane plasmique indépendant du Golgi comme observé dans d'autres études (Conrad et al. 1995; Mundy et al. 2002).

- **Relation Cav1, G6Pase et voie vésiculaire**

Le métabolisme du glucose est indispensable à l'absorption intestinale de glucose en absence de GLUT2. Plus précisément, en absence de GLUT2, l'absorption de glucose dépend d'une étape de phosphorylation du glucose et d'une étape de déphosphorylation par le complexe G6Pase (Stümpel et al. 2001). En effet, l'utilisation d'acide chlorogénique, un inhibiteur spécifique de la G6PT induit une forte diminution de l'absorption intestinale du glucose chez les souris sauvages (Bassoli et al. 2008) et chez les souris GLUT2^{-/-} (Stümpel et al. 2001). Ces résultats mettent donc en relation la dernière étape enzymatique de la PEG, i.e. la production du glucose par la G6Pase et la sortie du glucose vésiculaire.

Nous avons fait l'hypothèse que cette relation pourrait jouer un rôle dans la sortie du glucose produit par la néoglucogenèse hépatique. L'utilisation de protéines chimériques nous a permis de montrer que la G6PC est présente dans des vésicules mobiles capables de se diriger du RE vers la membrane plasmique. De plus, la G6PC présente également une localisation proche de la Cav1 dans certaines régions à proximité de la membrane plasmique. La Cav1 pourrait donc interagir avec la G6Pase afin de la transloquer du RE vers la membrane plasmique et ainsi produire du glucose directement hors de la cellule.

En accord avec les résultats de microscopie, l'analyse des séquences des complexes de la G6Pase (G6PC et G6PT) a permis d'identifier un secteur riche en acides aminés aromatiques de type $\phi X\phi XXXX\phi$ où ϕ est un acide aminé aromatique. Ce motif est strictement identique au motif de liaison à la Cav1. Cependant, nous n'avons pas pu observer l'importance de ce site dans la localisation et/ou la mobilité de la G6PC car la G6PC mutée obtenue ne s'exprimait pas. De plus, la technique de co-immunoprécipitation entre la Cav1 et la G6PC mise au point ne nous a pas permis de mettre en évidence une interaction entre ces protéines.

III.3 Voie vésiculaire et néoglucogenèse : implication de deux pools de G6P

Nos résultats couplés à ceux obtenus par le groupe de B. Thorens permettent d'établir un nouveau modèle de PEG où le glucose glycogénolytique pourrait sortir uniquement par GLUT2 tandis que le glucose néoglucogénique sortirait à la fois par GLUT2 et par une voie vésiculaire. En effet, de façon surprenante, l'absence de Cav1 induit une diminution de moitié de la sortie du glucose qui n'est pas compensée par GLUT2, suggérant qu'au moins 50% du glucose néoglucogénique destiné à sortir par la voie vésiculaire est inaccessible à GLUT2. A l'inverse, le défaut de dégradation du glycogène et l'accumulation de G6P dans le foie des souris GLUT2^{-/-} suggère que la majorité du glucose glycogénolytique est inaccessible à la voie de sortie vésiculaire. Ce modèle de PEG implique donc deux voies distinctes de production associées à deux voies distinctes de sortie de glucose.

De façon simple, le glucose glycogénolytique pourrait ne pas avoir accès à la voie de sortie du glucose impliquant la Cav1 uniquement parce que celle-ci ne se mettrait pas en place à l'état nourri et serait déclenchée lors du jeûne. Une autre hypothèse basée sur l'existence de deux pools distincts de G6P pourrait expliquer ces résultats. En effet, plusieurs études suggèrent fortement l'existence de ces deux pools (Marcus & Kalant 1977; Christ & Jungermann 1987; Kalant et al. 1988; Seoane et al. 1996; Gomis et al. 2002). L'une d'elle a permis de montrer que : 1- la formation de glucose marqué à partir de glycogène marqué ne peut pas être dilué par du G6P froid exogène 2- la formation de glucose marqué à partir de G6P exogène marqué ne dépend pas de la quantité de glycogène intracellulaire (Christ & Jungermann 1987). Ces données suggèrent l'existence d'un pool de G6P alimenté par le glycogène et non accessible au G6P exogène et d'un autre non alimenté par le G6P produit par le glycogène et probablement alimenté par la néoglucogenèse. Les mêmes conclusions ont été obtenues récemment par l'étude de l'incidence d'une surexpression de la glycogène synthase sur la glycogénolyse. L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse qu'une partie du glycogène est produit à partir du G6P provenant d'une source indirecte i.e. la néoglucogenèse (Newgard et al. 1984b; Greenberg et al. 2006). Des travaux plus récents réalisés à partir d'hépatocytes (primaires et issus de lignées cellulaires) confortent l'idée de deux pools distincts de G6P. Ces travaux ont montré que la glycogène synthase hépatique est capable de discriminer le G6P issu de la glucokinase de celui de l'hexokinase (Seoane et al. 1996; Gomis et al. 2002).

Enfin, l'étude d'autres mécanismes hors PEG a suggéré l'existence de pools de G6P isolés entre

la glycogénolyse et la néoglucogénèse. En effet, les mécanismes de glucuronidation et de production d'acide ascorbique sont des mécanismes dépendant de la production de G6P. La glucuronidation est une méthode de détoxification de l'organisme qui convertit des molécules « toxiques » en glucuronides (Revue : Kaivosari et al. 2011). La première étape de ce mécanisme est la production du glucose-1-phosphate à partir du glycogène. De façon intéressante, le G6P issu de la néoglucogénèse ne peut pas être utilisé pour la formation dans cette voie malgré sa capacité à donner du G1P, suggérant une dichotomie entre le G6P provenant de la glycogénolyse et celui provenant de la néoglucogénèse (Bánhegyi et al. 1988, 1991; Mandl et al. 1995; Braun et al. 1997). Enfin, la synthèse d'acide ascorbique se déroule à partir des mêmes précurseurs et donc selon les mêmes modalités (Braun et al. 1994, 1996).

Ces deux mécanismes apportent donc la preuve qu'un métabolite provenant du glycogène et utilisé dans le réticulum endoplasmique peut être totalement isolé de la néoglucogénèse (Bánhegyi & Mándl 2001). Ceci renforce donc notre hypothèse de deux pools de G6P différents provenant de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. Au niveau cellulaire, notre hypothèse est que ces deux pools pourraient être représentés par les deux réticulums endoplasmiques lisse et rugueux. En effet, le glycogène est synthétisé uniquement à proximité du RE lisse qui contient les enzymes du métabolisme du glycogène. De plus, la glycogénolyse est associée à une augmentation de la surface du RE lisse à proximité des granules de glycogène (Fawcett 1955; Cardell 1971; Bernaert et al. 1977; Margolis et al. 1979; Jerome & Cardell 1983). Ces données permettent donc de faire l'hypothèse que le RE lisse contiendrait le G6P provenant de la glycogénolyse constituant ainsi un pool de G6P relativement isolé du RE rugueux. Cette organisation spatiale du G6P serait en accord avec une voie vésiculaire de sortie du glucose associée uniquement à la néoglucogénèse (Figure 49).

III.4 Régulations de la voie vésiculaire de sortie du glucose ; Relation avec l'activité G6Pase

Nos résultats montrent que les deux voies de la PEG ne se croisent pas forcément à l'étape de production du glucose par la G6Pase et possèdent des voies majoritaires de sortie de glucose distinctes. Nous pouvons donc imaginer des mécanismes de régulations hormonales différentes entre les deux voies de production. Dans ce travail, nous avons ciblé la régulation de la néoglucogénèse par le glucagon. Le glucagon augmente le flux d'hydrolyse du G6P issu de la néoglucogénèse par un mécanisme dépendant de mouvements membranaires (Ichai et al. 2001).

L'AMPC induit l'activité de la G6Pase via la PKA et par des mécanismes impliquant des mouvements membranaires (Soty 2008). Les différentes études moléculaires que nous avons réalisées n'ont pas pu mettre en évidence de phosphorylation directe de la PKA sur la G6PC (Cf. résultats de la partie I). Les mécanismes de la régulation de la néoglucogenèse par le glucagon pourraient donc lier production (activité G6Pase) et sortie (Cav1). En effet, la Cav1 est nécessaire à la régulation de l'activité de la périlipine dans les adipocytes (Cohen et al. 2004a). Cependant, l'inhibition de la formation des vésicules par le dynasore n'a aucun effet sur l'induction de la néoglucogenèse par l'AMPC (Figure 33). La voie de sortie vésiculaire du glucose néoglucogénique ne semble donc pas constituer un point de régulation de la PEG par l'AMPC.

Dans ce cas, le mécanisme vésiculaire de sortie de glucose prendrait place de manière constitutive lors de la synthèse de la Cav1 et serait un transport opportuniste du glucose régulé indirectement, i.e. en amont. La première régulation indirecte possible serait une régulation de la production de glucose, plus particulièrement de la G6Pase. Les données précédentes soutiennent effectivement cette hypothèse. En effet, même si le volume transporté par la Cav1 est constant, si la concentration du glucose augmente au sein de la lumière du RE, la quantité de glucose transporté sera plus importante. La seconde régulation indirecte pourrait être une régulation de la production de Cav1 par le glucose. En effet, le glucose inhibe l'expression de la Cav1 (Hayashi et al. 2007) ce qui pourrait contribuer à diminuer la sortie du glucose lors d'épisodes hyperglycémiques.

L'ensemble de nos résultats propose l'existence de voies cellulaires distinctes de production de glucose. Une voie issue de la glycogénolyse impliquant Glut2 uniquement et une voie issue de la néoglucogenèse impliquant Glut2 et la Cav1 de manière équivalente. Cependant, nos résultats préliminaires ne mettent pas en évidence de régulations de ces voies de sortie. La caractérisation des régulations de la voie de sortie de glucose par la Cav1 et sa relation avec l'activité de production (G6Pase) sera donc nécessaire afin de comprendre l'ensemble des mécanismes cellulaires de la PEG.

Travaux Personnels

Articles

M. Soty , **J. Chilloux** , S. Casteras , A. Grichine, G. Mithieux & A. Gautier-Stein. New insights into the structure and organisation of the two subunits of Glucose-6-phosphatase. *Biochimie*, 2012, 94(3):695-703.

A. Gautier-Stein, M. Soty, **J. Chilloux**, C. Zitoun, F. Rajas & G. Mithieux : Glucotoxicity induces Glucose-6-Phosphatase Catalytic unit (G6PC) expression by acting on the interaction of HIF-1 α with CBP. Soumis à *Diabetes* en février 2012.

A.L. Huber, J. Lebeau, P. Guillaumot, V. Pétrilli, M. Malek, **J. Chilloux**, F. Fauvet, T. Renno & S.N. Manié. The endoplasmic reticulum acts as a sensor of glucose limitation during malignant transformation. En préparation.

Communications orales

Julien Chilloux, Maud Soty, Gilles Mithieux, Amandine Gautier-Stein. Gluconeogenic glucose output could involve caveolin-1 dependent vesicles. EASD 2011, Lisbonne, Portugal, *Communication orale*

Julien Chilloux, Maud Soty, Gilles Mithieux, Amandine Gautier-Stein. La sortie du glucose néoglucogénique est dépendante d'une voie vésiculaire. SFD 2011, Geneve, Suisse, *Communication orale*

Julien Chilloux, Maud Soty, Gilles Mithieux, Amandine Gautier-Stein. Identification et caractérisation d'une voie vésiculaire de sortie du glucose indépendante de GLUT2. SFD 2010, Lille, France, *Communication orale*

Posters commentés

Julien Chilloux, Maud Soty, François Delalande, Fabrice Bertile, Alain Van Dorsselaer, Gilles Mithieux, Amandine Gautier-Stein. Etude de la régulation post-traductionnelle de la glucose-6-phosphatase par mutagenèse dirigée et spectrométrie de masse après immunoprécipitation. SFD 2011, Genève, Suisse, *Poster commenté*

Amandine Gautier-Stein, Maud Soty, Carine Zitoun, **Julien Chilloux**, Fabienne Rajas et Gilles Mithieux. Régulation transcriptionnelle de la glucose-6-phosphatase par le glucose : implication des espèces actives de l'oxygène selon un mécanisme semblable à la régulation génique par l'hypoxie. SFD 2011, Genève, Suisse, *Poster commenté*

Posters

Anne-Laure Huber, Virginie Pétrilli, Justine Lebeau, Patricia Guillaumot, Mouhannad Malek, **Julien Chilloux**, Frédérique Fauvet, Anne-Pierre Morel and Serge N Manié. The endoplasmic reticulum senses cellular glucose limitation and engages the unfolded protein response to suppress the emergence of tumour cells. CLARA 2011, Lyon, France, Poster

Valerie Large, **Julien Chilloux**, Gilles Mithieux. Régulation hépatique et intestinale de PepT1 par le jeûne et le régime hyperprotéique. ALFEDIAM 2008, Bruxelles, Belgique, *Poster*

Références bibliographiques

- Agius, L., Peak, M. & Alberti, K. G.** 1990. Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *The Biochemical Journal*, **266**, 91–102.
- Ajzannay, A., Minassian, C., Riou, J. P. & Mithieux, G.** 1994. Glucose-6-phosphatase specificity after membrane solubilization by detergent treatment. *Journal of Biochemistry*, **116**, 1336–1340.
- An, J., Li, Y., van De Werve, G. & Newgard, C. B.** 2001. Overexpression of the P46 (T1) translocase component of the glucose-6-phosphatase complex in hepatocytes impairs glycogen accumulation via hydrolysis of glucose 1-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 10722–10729.
- Andrew, P. J. & Mayer, B.** 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, **43**, 521–531.
- Arden, S. D., Zahn, T., Steegers, S., Webb, S., Bergman, B., O'Brien, R. M. & Hutton, J. C.** 1999. Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes*, **48**, 531–542.
- Argaud, D., Kirby, T. L., Newgard, C. B. & Lange, A. J.** 1997. Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 12854–12861.
- Arion, W. J., Wallin, B. K., Carlson, P. W. & Lange, A. J.** 1972. The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, **247**, 2558–2565.
- Arluison, M., Quignon, M., Nguyen, P., Thorens, B., Leloup, C. & Penicaud, L.** 2004a. Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **28**, 117–136.
- Arluison, M., Quignon, M., Thorens, B., Leloup, C. & Penicaud, L.** 2004b. Immunocytochemical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain. II. Electron microscopic study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **28**, 137–146.
- Augustin, R.** 2010. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, **62**, 315–333.
- Augustin, R., Riley, J. & Moley, K. H.** 2005. GLUT8 contains a [DE]XXXL[LI] sorting motif and localizes to a late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **6**, 1196–1212.
- Bady, I., Zitoun, C., Guignot, L. & Mithieux, G.** 2002. Activation of liver G-6-Pase in response to insulin-induced hypoglycemia or epinephrine infusion in the rat. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **282**, E905–910.
- Bady, I., Marty, N., Dallaporta, M., Emery, M., Gyger, J., Tarussio, D., Foretz, M. & Thorens, B.** 2006. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes*, **55**, 988–995.
- Bánhegyi, G. & Mándl, J.** 2001. The hepatic glycogenoreticular system. *Pathology Oncology Research: POR*, **7**, 107–110.

- Bánhegyi, G., Garzó, T., Antoni, F. & Mandl, J.** 1988. Glycogenolysis--and not gluconeogenesis--is the source of UDP-glucuronic acid for glucuronidation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **967**, 429–435.
- Bánhegyi, G., Puskás, R., Garzó, T., Antoni, F. & Mandl, J.** 1991. High amounts of glucose and insulin inhibit p-nitrophenol conjugation in mouse hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, **42**, 1299–1302.
- Bánhegyi, G., Csala, M. & Benedetti, A.** 2009. Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. *Journal of Molecular Endocrinology*, **42**, 283–289.
- Bassoli, B. K., Cassolla, P., Borba-Murad, G. R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C. L., Bazotte, R. B., da Silva, R. S. dos S. F. & de Souza, H. M.** 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycaemia. *Cell Biochemistry and Function*, **26**, 320–328.
- Beudet, A. L., Anderson, D. C., Michels, V. V., Arion, W. J. & Lange, A. J.** 1980. Neutropenia and impaired neutrophil migration in type IB glycogen storage disease. *The Journal of Pediatrics*, **97**, 906–910.
- Beck-Nielsen, H., Hother-Nielsen, O. & Staehr, P.** 2002. Is hepatic glucose production increased in type 2 diabetes mellitus? *Current Diabetes Reports*, **2**, 231–236.
- Bergmeyer, H. U., Bernt, E., Schmidt, F. & Stork, H.** 1974. D-Glucose determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Dans: *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic edn. pp. 1196–1201. New York: Bergmeyer H. U.
- Bernaert, D., Wanson, J. C., Drochmans, P. & Popowski, A.** 1977. Effect of insulin on ultrastructure and glycogenesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *The Journal of Cell Biology*, **74**, 878–900.
- Berry, M. N. & Friend, D. S.** 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of Cell Biology*, **43**, 506–520.
- Bertrand, L., Alessi, D. R., Deprez, J., Deak, M., Viaene, E., Rider, M. H. & Hue, L.** 1999. Heart 6-phosphofructo-2-kinase activation by insulin results from Ser-466 and Ser-483 phosphorylation and requires 3-phosphoinositide-dependent kinase-1, but not protein kinase B. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 30927–30933.
- Bibert, S., Hess, S. K., Firsov, D., Thorens, B., Geering, K., Horisberger, J.-D. & Bonny, O.** 2009. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, **297**, F612–619.
- Bizeau, M. E., Thresher, J. S. & Pagliassotti, M. J.** 2001. Sucrose diets increase glucose-6-phosphatase and glucose release and decrease glucokinase in hepatocytes. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, **91**, 2041–2046.
- Blouin, C. M., Le Lay, S., Eberl, A., Köfeler, H. C., Guerrero, I. C., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J.-F., Ferré, P., Hajduch, E. & Dugail, I.** 2010. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *Journal of Lipid Research*, **51**, 945–956.

- Bollen, M., Keppens, S. & Stalmans, W.** 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *The Biochemical Journal*, **336 (Pt 1)**, 19–31.
- Bolte, S. & Cordelières, F. P.** 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, **224**, 213–232.
- Booz, G. W., Dostal, D. E. & Baker, K. M.** 1999. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes: implications for the cardiac renin-angiotensin system. *The American Journal of Cardiology*, **83**, 44H–47H.
- Bouras, T., Lisanti, M. P. & Pestell, R. G.** 2004. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biology & Therapy*, **3**, 931–941.
- Boztug, K. & Klein, C.** 2009. Novel genetic etiologies of severe congenital neutropenia. *Current Opinion in Immunology*, **21**, 472–480.
- Braun, L., Garzó, T., Mandl, J. & Bánhegyi, G.** 1994. Ascorbic acid synthesis is stimulated by enhanced glycogenolysis in murine liver. *FEBS Letters*, **352**, 4–6.
- Braun, L., Csala, M., Poussu, A., Garzó, T., Mandl, J. & Bánhegyi, G.** 1996. Glutathione depletion induces glycogenolysis dependent ascorbate synthesis in isolated murine hepatocytes. *FEBS Letters*, **388**, 173–176.
- Braun, L., Kardon, T., Puskás, F., Csala, M., Bánhegyi, G. & Mandl, J.** 1997. Regulation of glucuronidation by glutathione redox state through the alteration of UDP-glucose supply originating from glycogen metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **348**, 169–173.
- Briand, N., Le Lay, S., Sessa, W. C., Ferré, P. & Dugail, I.** 2011. Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1 in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity. *Diabetes*, **60**, 448–453.
- Brivet, M., Moatti, N., Corriat, A., Lemonnier, A. & Odievre, M.** 1983. Defective galactose oxidation in a patient with glycogen storage disease and Fanconi syndrome. *Pediatric Research*, **17**, 157–161.
- Burant, C. F., Takeda, J., Brot-Laroche, E., Bell, G. I. & Davidson, N. O.** 1992. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 14523–14526.
- Burcelin, R., Katz, E. B. & Charron, M. J.** 1996. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes & Metabolism*, **22**, 373–396.
- Burcelin, R., del Carmen Muñoz, M., Guillam, M. T. & Thorens, B.** 2000a. Liver hyperplasia and paradoxical regulation of glycogen metabolism and glucose-sensitive gene expression in GLUT2-null hepatocytes. Further evidence for the existence of a membrane-based glucose release pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 10930–10936.
- Burcelin, R., Dolci, W. & Thorens, B.** 2000b. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes*, **49**, 1635–1642.
- Burcelin, R., Dolci, W. & Thorens, B.** 2000c. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is

GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes*, **49**, 1643–1648.

Cabrera-Vera, T. M., Vanhauwe, J., Thomas, T. O., Medkova, M., Preininger, A., Mazzoni, M. R. & Hamm, H. E. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Reviews*, **24**, 765–781.

Cani, P. D., Holst, J. J., Drucker, D. J., Delzenne, N. M., Thorens, B., Burcelin, R. & Knauf, C. 2007. GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **276**, 18–23.

Capozza, F., Williams, T. M., Schubert, W., McClain, S., Bouzahzah, B., Sotgia, F. & Lisanti, M. P. 2003. Absence of caveolin-1 sensitizes mouse skin to carcinogen-induced epidermal hyperplasia and tumor formation. *The American Journal of Pathology*, **162**, 2029–2039.

Cardell, R. R., Jr. 1971. Action of metabolic hormones on the fine structure of rat liver cells. I. Effects of fasting on the ultrastructure of hepatocytes. *The American Journal of Anatomy*, **131**, 21–53.

Cersosimo, E., Garlick, P. & Ferretti, J. 1999. Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia in humans. *Diabetes*, **48**, 261–266.

Chatelain, F., Pégorier, J. P., Minassian, C., Bruni, N., Tarpin, S., Girard, J. & Mithieux, G. 1998. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes*, **47**, 882–889.

Chen, K. S. & Katz, J. 1988. Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *The Biochemical Journal*, **255**, 99–104.

Chen, S.-Y., Pan, C.-J., Lee, S., Peng, W. & Chou, J. Y. 2008. Functional analysis of mutations in the glucose-6-phosphate transporter that cause glycogen storage disease type Ib. *Molecular Genetics and Metabolism*, **95**, 220–223.

Cheung, Y. Y., Kim, S. Y., Yiu, W. H., Pan, C.-J., Jun, H.-S., Ruef, R. A., Lee, E. J., Westphal, H., Mansfield, B. C. & Chou, J. Y. 2007. Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta. *The Journal of Clinical Investigation*, **117**, 784–793.

Chini, B. & Parenti, M. 2004. G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *Journal of Molecular Endocrinology*, **32**, 325–338.

Chou, J. Y. & Mansfield, B. C. 2008. Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Human Mutation*, **29**, 921–930.

Chou, J. Y., Jun, H. S. & Mansfield, B. C. 2010. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Current Opinion in Hematology*, **17**, 36–42.

Choudhury, A., Marks, D. L., Proctor, K. M., Gould, G. W. & Pagano, R. E. 2006. Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface. *Nature Cell Biology*, **8**, 317–328.

Christ, B. & Jungermann, K. 1987. Sub-compartmentation of the « cytosolic » glucose 6-phosphate pool in cultured rat hepatocytes. *FEBS Letters*, **221**, 375–380.

- Clore, J. N., Glickman, P. S., Nestler, J. E. & Blackard, W. G.** 1991. In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal humans. *The American Journal of Physiology*, **261**, E425–429.
- Clore, J. N., Stillman, J. & Sugerman, H.** 2000. Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**, 969–974.
- Cohen, A. W., Park, D. S., Woodman, S. E., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., Pereira de Souza, A., Kitsis, R. N., Russell, R. G., Weiss, L. M., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Shtutin, V., Tanowitz, H. B. & Lisanti, M. P.** 2003a. Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **284**, C457–474.
- Cohen, A. W., Razani, B., Wang, X. B., Combs, T. P., Williams, T. M., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2003b. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **285**, C222–235.
- Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2003c. Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **285**, E1151–1160.
- Cohen, A. W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T. M., Wang, X. B., Iyengar, P., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2004a. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes*, **53**, 1261–1270.
- Cohen, A. W., Hnasko, R., Schubert, W. & Lisanti, M. P.** 2004b. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological Reviews*, **84**, 1341–1379.
- Cokakli, M., Erdal, E., Nart, D., Yilmaz, F., Sagol, O., Kilic, M., Karademir, S. & Atabey, N.** 2009. Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion. *BMC Cancer*, **9**, 65.
- Colomb, V., Leturque, A., Guihot, G., Loizeau, M., Lavie, S., Colomer, S., Ricour, C. & Girard, J.** 1995. Route of nutrient delivery affects insulin sensitivity and liver glucose transporter expression in rat. *The American Journal of Physiology*, **269**, E827–833.
- Colville, C. A., Seatter, M. J., Jess, T. J., Gould, G. W. & Thomas, H. M.** 1993. Kinetic analysis of the liver-type (GLUT2) and brain-type (GLUT3) glucose transporters in *Xenopus* oocytes: substrate specificities and effects of transport inhibitors. *The Biochemical Journal*, **290 (Pt 3)**, 701–706.
- Conrad, P. A., Smart, E. J., Ying, Y. S., Anderson, R. G. & Bloom, G. S.** 1995. Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *The Journal of Cell Biology*, **131**, 1421–1433.
- Coucke, P. J., Willaert, A., Wessels, M. W., Callewaert, B., Zoppi, N., De Backer, J., Fox, J. E., Mancini, G. M. S., Kambouris, M., Gardella, R., Facchetti, F., Willems, P. J., Forsyth, R., Dietz, H. C., Barlati, S., Colombi, M., Loeys, B. & De Paepe, A.** 2006. Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nature Genetics*, **38**, 452–457.

- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. & Lisanti, M. P.** 1997. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 6525–6533.
- Croniger, C., Leahy, P., Reshef, L. & Hanson, R. W.** 1998. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 31629–31632.
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J. M., Montano, S. & Mithieux, G.** 2001. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes*, **50**, 740–746.
- Dalle, S., Longuet, C., Costes, S., Broca, C., Faruque, O., Fontés, G., Hani, E. H. & Bataille, D.** 2004. Glucagon promotes cAMP-response element-binding protein phosphorylation via activation of ERK1/2 in MIN6 cell line and isolated islets of Langerhans. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 20345–20355.
- Daniele, N., Rajas, F., Payrastra, B., Mauco, G., Zitoun, C. & Mithieux, G.** 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates onto liver endoplasmic reticulum and may account for the inhibition of glucose-6-phosphatase during refeeding. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 3597–3601.
- Dawson, P. A., Mychaleckyj, J. C., Fossey, S. C., Mihic, S. J., Craddock, A. L. & Bowden, D. W.** 2001. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Molecular Genetics and Metabolism*, **74**, 186–199.
- Delaere, F., Magnan, C. & Mithieux, G.** 2010. Hypothalamic integration of portal glucose signals and control of food intake and insulin sensitivity. *Diabetes & Metabolism*, **36**, 257–262.
- Dentin, R., Pégorier, J.-P., Benhamed, F., Fougelle, F., Ferré, P., Fauveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J. & Postic, C.** 2004. Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 20314–20326.
- Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J., 3rd & Montminy, M.** 2008. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science (New York, N.Y.)*, **319**, 1402–1405.
- Diez-Sampedro, A., Hirayama, B. A., Osswald, C., Gorboulev, V., Baumgarten, K., Volk, C., Wright, E. M. & Koepsell, H.** 2003. A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 11753–11758.
- Doerge, H., Bocianski, A., Joost, H. G. & Schürmann, A.** 2000. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *The Biochemical Journal*, **350 Pt 3**, 771–776.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., Schedl, A., Haller, H. & Kurzchalia, T. V.** 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 2449–2452.

- Eisenberg, M. L., Maker, A. V., Slezak, L. A., Nathan, J. D., Sritharan, K. C., Jena, B. P., Geibel, J. P. & Andersen, D. K.** 2005. Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, **15**, 51–58.
- El-Yazbi, A. F., Cho, W. J., Schulz, R. & Daniel, E. E.** 2006. Caveolin-1 knockout alters beta-adrenoceptors function in mouse small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **291**, G1020–1030.
- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A. & Helenius, A.** 2011. Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *Journal of Virology*, **85**, 4198–4211.
- Eny, K. M., Wolever, T. M. S., Fontaine-Bisson, B. & El-Soheby, A.** 2008. Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations. *Physiological Genomics*, **33**, 355–360.
- Fawcett, D. W.** 1955. Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. *Journal of the National Cancer Institute*, **15**, 1475–1503.
- Fernandez-Rojo, M. A., Restall, C., Ferguson, C., Martel, N., Martin, S., Bosch, M., Kassan, A., Leong, G. M., Martin, S. D., McGee, S. L., Muscat, G. E., Anderson, R. L., Enrich, C., Pol, A. & Parton, R. G.** 2011. Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. *Hepatology (Baltimore, Md.)*,
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. & Michel, T.** 1996. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 22810–22814.
- Fielding, C. J., Bist, A. & Fielding, P. E.** 1999. Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts. *Biochemistry*, **38**, 2506–2513.
- Fosgerau, K., Breinholt, J., McCormack, J. G. & Westergaard, N.** 2002. Evidence against glycogen cycling of gluconeogenic substrates in various liver preparations. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 28648–28655.
- Frank, P. G., Lee, H., Park, D. S., Tandon, N. N., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2004. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **24**, 98–105.
- Frank, P. G., Cheung, M. W.-C., Pavlides, S., Llaverias, G., Park, D. S. & Lisanti, M. P.** 2006. Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **291**, H677–686.
- Fu, Y., Hoang, A., Escher, G., Parton, R. G., Krozowski, Z. & Sviridov, D.** 2004. Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14140–14146.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R. & Une, T.** 2000. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *Journal of Cell Science*, **113 Pt 19**, 3509–3517.
- Fulceri, R., Gamberucci, A., Scott, H. M., Giunti, R., Burchell, A. & Benedetti, A.** 1995. Fatty

acyl-CoA esters inhibit glucose-6-phosphatase in rat liver microsomes. *The Biochemical Journal*, **307** (Pt 2), 391–397.

Galbiati, F., Volonte, D., Engelman, J. A., Watanabe, G., Burk, R., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P. 1998. Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *The EMBO Journal*, **17**, 6633–6648.

Galbiati, F., Volonté, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P. G., Zhu, L., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P. 2001. Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 2229–2244.

García-Cardena, G., Martasek, P., Masters, B. S., Skidd, P. M., Couet, J., Li, S., Lisanti, M. P. & Sessa, W. C. 1997. Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 25437–25440.

Garg, A. & Agarwal, A. K. 2008. Caveolin-1: a new locus for human lipodystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 1183–1185.

Gautier-Stein, A., Mithieux, G. & Rajas, F. 2005. A distal region involving hepatocyte nuclear factor 4alpha and CAAT/enhancer binding protein markedly potentiates the protein kinase A stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **19**, 163–174.

Gautier-Stein, A., Zitoun, C., Lalli, E., Mithieux, G. & Rajas, F. 2006. Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4alpha, CREM, HNF1alpha, and C/EBPalpha. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 31268–31278.

Gevrey, J.-C., Cordier-Bussat, M., Némoy-Gaillard, E., Chayvialle, J.-A. & Abello, J. 2002. Co-requirement of cyclic AMP- and calcium-dependent protein kinases for transcriptional activation of cholecystokinin gene by protein hydrolysates. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 22407–22413.

Gevrey, J.-C., Malapel, M., Philippe, J., Mithieux, G., Chayvialle, J.-A., Abello, J. & Cordier-Bussat, M. 2004. Protein hydrolysates stimulate proglucagon gene transcription in intestinal endocrine cells via two elements related to cyclic AMP response element. *Diabetologia*, **47**, 926–936.

Ghosh, A., Shieh, J.-J., Pan, C.-J., Sun, M.-S. & Chou, J. Y. 2002. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 32837–32842.

Goetz, J. G., Joshi, B., Lajoie, P., Strugnell, S. S., Scudamore, T., Kojic, L. D. & Nabi, I. R. 2008. Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. *The Journal of Cell Biology*, **180**, 1261–1275.

Gomis, R. R., Cid, E., García-Rocha, M., Ferrer, J. C. & Guinovart, J. J. 2002. Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 23246–23252.

- Gonzalez, E., Nagiel, A., Lin, A. J., Golan, D. E. & Michel, T.** 2004. Small interfering RNA-mediated down-regulation of caveolin-1 differentially modulates signaling pathways in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 40659–40669.
- González-Rodríguez, A., Nevado, C., Escrivá, F., Sesti, G., Rondinone, C. M., Benito, M. & Valverde, A. M.** 2008. PTP1B deficiency increases glucose uptake in neonatal hepatocytes: involvement of IRA/GLUT2 complexes. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **295**, G338–347.
- Gorovits, N., Cui, L., Busik, J. V., Ranalletta, M., Hauguel de-Mouzon, S. & Charron, M. J.** 2003. Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology*, **144**, 1703–1711.
- Gosens, R., Stelmack, G. L., Dueck, G., McNeill, K. D., Yamasaki, A., Gerthoffer, W. T., Unruh, H., Gounni, A. S., Zaagsma, J. & Halayko, A. J.** 2006. Role of caveolin-1 in p42/p44 MAP kinase activation and proliferation of human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **291**, L523–534.
- Gould, G. W., Thomas, H. M., Jess, T. J. & Bell, G. I.** 1991. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*, **30**, 5139–5145.
- Gouyon, F., Caillaud, L., Carriere, V., Klein, C., Dalet, V., Citadelle, D., Kellett, G. L., Thorens, B., Leturque, A. & Brot-Laroche, E.** 2003. Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *The Journal of Physiology*, **552**, 823–832.
- Greenberg, C. C., Jurczak, M. J., Danos, A. M. & Brady, M. J.** 2006. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **291**, E1–8.
- Guillam, M. T., Hümmler, E., Schaerer, E., Yeh, J. I., Birnbaum, M. J., Beermann, F., Schmidt, A., Dériaz, N., Thorens, B. & Wu, J. Y.** 1997. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nature Genetics*, **17**, 327–330.
- Guillam, M. T., Burcelin, R. & Thorens, B.** 1998. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 12317–12321.
- Guillam, M. T., Dupraz, P. & Thorens, B.** 2000. Glucose uptake, utilization, and signaling in GLUT2-null islets. *Diabetes*, **49**, 1485–1491.
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R. & Granner, D. K.** 2000. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 30169–30175.
- Han, J. M., Kim, Y., Lee, J. S., Lee, C. S., Lee, B. D., Ohba, M., Kuroki, T., Suh, P.-G. & Ryu, S. H.** 2002. Localization of phospholipase D1 to caveolin-enriched membrane via palmitoylation: implications for epidermal growth factor signaling. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 3976–3988.

- Hassan, G. S., Jasmin, J.-F., Schubert, W., Frank, P. G. & Lisanti, M. P.** 2004. Caveolin-1 deficiency stimulates neointima formation during vascular injury. *Biochemistry*, **43**, 8312–8321.
- Hayashi, T., Juliet, P. A. R., Miyazaki, A., Ignarro, L. J. & Iguchi, A.** 2007. High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: implications for atherosclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1772**, 364–372.
- Hayee, B., Antonopoulos, A., Murphy, E. J., Rahman, F. Z., Sewell, G., Smith, B. N., McCartney, S., Furman, M., Hall, G., Bloom, S. L., Haslam, S. M., Morris, H. R., Boztug, K., Klein, C., Winchester, B., Pick, E., Linch, D. C., Gale, R. E., Smith, A. M., Dell, A. & Segal, A. W.** 2011. G6PC3 mutations are associated with a major defect of glycosylation: a novel mechanism for neutrophil dysfunction. *Glycobiology*, **21**, 914–924.
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C. & Helenius, A.** 2010a. Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **11**, 361–382.
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H. H. & Helenius, A.** 2010b. Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *The Journal of Cell Biology*, **191**, 615–629.
- Heino, S., Lusa, S., Somerharju, P., Ehnholm, C., Olkkonen, V. M. & Ikonen, E.** 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 8375–8380.
- Hemrika, W. & Wever, R.** 1997. A new model for the membrane topology of glucose-6-phosphatase: the enzyme involved in von Gierke disease. *FEBS Letters*, **409**, 317–319.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J. & McNiven, M. A.** 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *The Journal of Cell Biology*, **141**, 85–99.
- Hers, H. G. & Hue, L.** 1983. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. *Annual Review of Biochemistry*, **52**, 617–653.
- Hiraiwa, H., Pan, C. J., Lin, B., Moses, S. W. & Chou, J. Y.** 1999. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 5532–5536.
- Hosokawa, M. & Thorens, B.** 2002. Glucose release from GLUT2-null hepatocytes: characterization of a major and a minor pathway. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **282**, E794–801.
- Hu, G. & Minshall, R. D.** 2009. Regulation of transendothelial permeability by Src kinase. *Microvascular Research*, **77**, 21–25.
- Huang, S. & Czech, M. P.** 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, **5**, 237–252.
- Huang, H.-D., Lee, T.-Y., Tzeng, S.-W. & Horng, J.-T.** 2005. KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites. *Nucleic Acids Research*, **33**, W226–229.
- Ibberson, M., Uldry, M. & Thorens, B.** 2000. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *The Journal of Biological*

Chemistry, **275**, 4607–4612.

Ichai, C., Guignot, L., El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Guigas, B., Chauvin, C., Fontaine, E., Mithieux, G. & Leverve, X. M. 2001. Glucose 6-phosphate hydrolysis is activated by glucagon in a low temperature-sensitive manner. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 28126–28133.

Ikonen, E. & Parton, R. G. 2000. Caveolins and cellular cholesterol balance. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **1**, 212–217.

Insel, P. A., Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Bunday, R. A. & Swaney, J. S. 2005. Compartmentation of G-protein-coupled receptors and their signalling components in lipid rafts and caveolae. *Biochemical Society Transactions*, **33**, 1131–1134.

Iwanishi, M., Haruta, T., Takata, Y., Ishibashi, O., Sasaoka, T., Egawa, K., Imamura, T., Naitou, K., Itazu, T. & Kobayashi, M. 1993. A mutation (Trp1193-->Leu1193) in the tyrosine kinase domain of the insulin receptor associated with type A syndrome of insulin resistance. *Diabetologia*, **36**, 414–422.

Jansen, A. S., Hoffman, J. L. & Loewy, A. D. 1997. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Research*, **766**, 29–38.

Jasmin, J.-F., Mercier, I., Hnasko, R., Cheung, M. W.-C., Tanowitz, H. B., Dupuis, J. & Lisanti, M. P. 2004. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovascular Research*, **63**, 747–755.

Jerome, W. G. & Cardell, R. R. 1983. Observations on the role of smooth endoplasmic reticulum glucocorticoid-induced hepatic glycogen deposition. *Tissue & Cell*, **15**, 711–727.

Jiang, G. & Zhang, B. B. 2003. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **284**, E671–678.

Jitrapakdee, S., Booker, G. W., Cassady, A. I. & Wallace, J. C. 1997. The rat pyruvate carboxylase gene structure. Alternate promoters generate multiple transcripts with the 5'-end heterogeneity. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20522–20530.

Johnson, J. H., Newgard, C. B., Milburn, J. L., Lodish, H. F. & Thorens, B. 1990. The high Km glucose transporter of islets of Langerhans is functionally similar to the low affinity transporter of liver and has an identical primary sequence. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 6548–6551.

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

Jun, H. S., Lee, Y. M., Cheung, Y. Y., McDermott, D. H., Murphy, P. M., De Ravin, S. S., Mansfield, B. C. & Chou, J. Y. 2010. Lack of glucose recycling between endoplasmic reticulum and cytoplasm underlies cellular dysfunction in glucose-6-phosphatase-beta-deficient neutrophils in a congenital neutropenia syndrome. *Blood*, **116**, 2783–2792.

Kaivosaari, S., Finel, M. & Koskinen, M. 2011. N-glucuronidation of drugs and other xenobiotics by human and animal UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, **41**, 652–669.

- Kalant, N., Parniak, M. & Lemieux, M.** 1988. Compartmentation of glucose 6-phosphate in hepatocytes. *The Biochemical Journal*, **252**, 932–933.
- Kellett, G. L. & Helliwell, P. A.** 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *The Biochemical Journal*, **350 Pt 1**, 155–162.
- Kellett, G. L., Brot-Laroche, E., Mace, O. J. & Leturque, A.** 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annual Review of Nutrition*, **28**, 35–54.
- Kim, C. A., Delépine, M., Boutet, E., El Mourabit, H., Le Lay, S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C. C., Bertola, D. R., Semple, R. K., O’Rahilly, S., Dugail, I., Capeau, J., Lathrop, M. & Magré, J.** 2008a. Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **93**, 1129–1134.
- Kim, S. Y., Jun, H. S., Mead, P. A., Mansfield, B. C. & Chou, J. Y.** 2008b. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*, **111**, 5704–5711.
- Kimura, A., Mora, S., Shigematsu, S., Pessin, J. E. & Saltiel, A. R.** 2002. The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 30153–30158.
- Kirchhausen, T., Macia, E. & Pelish, H. E.** 2008. Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods in Enzymology*, **438**, 77–93.
- Klepper, J. & Voit, T.** 2002. Facilitated glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain-- a review. *European Journal of Pediatrics*, **161**, 295–304.
- Kohler, T. R., Kirkman, T. R., Kraiss, L. W., Zierler, B. K. & Clowes, A. W.** 1991. Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts. *Circulation Research*, **69**, 1557–1565.
- Kozera, L., White, E. & Calaghan, S.** 2009. Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PloS One*, **4**, e8312.
- Krajewska, W. M. & Maslowska, I.** 2004. Caveolins: structure and function in signal transduction. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **9**, 195–220.
- Krause, B. R. & Hartman, A. D.** 1984. Adipose tissue and cholesterol metabolism. *Journal of Lipid Research*, **25**, 97–110.
- Kuo, M., Zilberfarb, V., Gangneux, N., Christeff, N. & Issad, T.** 2008. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Letters*, **582**, 829–834.
- Lajoie, P., Kojic, L. D., Nim, S., Li, L., Dennis, J. W. & Nabi, I. R.** 2009. Caveolin-1 regulation of dynamin-dependent, raft-mediated endocytosis of cholera toxin-B sub-unit occurs independently of caveolae. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **13**, 3218–3225.

- Lam, T. K. T., Carpentier, A., Lewis, G. F., van de Werve, G., Fantus, I. G. & Giacca, A.** 2003. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **284**, E863–873.
- Lange, Y., Ye, J., Rigney, M. & Steck, T. L.** 1999. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *Journal of Lipid Research*, **40**, 2264–2270.
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M. R., Le Lièvre, X., Thiele, C., Ferré, P., Parton, R. G., Kurzchalia, T., Simons, K. & Dugail, I.** 2006. Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, **7**, 549–561.
- Le Lay, S., Blouin, C. M., Hajduch, E. & Dugail, I.** 2009. Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1791**, 514–518.
- Lee, H., Volonte, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D. M., Bregman, D. B., Wilson, M. T., Campos-Gonzalez, R., Bouzahzah, B., Pestell, R. G., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2000. Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **14**, 1750–1775.
- Lee, H., Park, D. S., Razani, B., Russell, R. G., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P.** 2002. Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *The American Journal of Pathology*, **161**, 1357–1369.
- Lee, Y.-C., Huang, H.-Y., Chang, C.-J., Cheng, C.-H. & Chen, Y.-T.** 2010. Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Human Molecular Genetics*, **19**, 3721–3733.
- Léger, J., Kempf, M., Lee, G. & Brandt, R.** 1997. Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 8441–8446.
- Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferré, P. & Pénicaud, L.** 1994. Glucose transporter 2 (GLUT 2): expression in specific brain nuclei. *Brain Research*, **638**, 221–226.
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaïdis, S. & Pénicaud, L.** 1998. Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Research. Molecular Brain Research*, **57**, 275–280.
- Leturque, A., Brot-Laroche, E. & Le Gall, M.** 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **296**, E985–992.
- Leuzzi, R., Bánhegyi, G., Kardon, T., Marcolongo, P., Capecchi, P.-L., Burger, H.-J., Benedetti, A. & Fulceri, R.** 2003. Inhibition of microsomal glucose-6-phosphate transport in human neutrophils results in apoptosis: a potential explanation for neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b. *Blood*, **101**, 2381–2387.
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J. D., Chen, X.-Z. &**

- Cheeseman, C. I.** 2004. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, **287**, G236–242.
- Lin, B., Morris, D. W. & Chou, J. Y.** 1998. Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA and Cell Biology*, **17**, 967–974.
- Liscum, L. & Munn, N. J.** 1999. Intracellular cholesterol transport. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1438**, 19–37.
- Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H., Ravid, K. & Pilch, P. F.** 2008. Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metabolism*, **8**, 310–317.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. & Kirchhausen, T.** 2006. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental Cell*, **10**, 839–850.
- Mandl, J., Bánhegyi, G., Kalapos, M. P. & Garzó, T.** 1995. Increased oxidation and decreased conjugation of drugs in the liver caused by starvation. Altered metabolism of certain aromatic compounds and acetone. *Chemico-Biological Interactions*, **96**, 87–101.
- Manz, F., Bickel, H., Brodehl, J., Feist, D., Gellissen, K., Geschöll-Bauer, B., Gilli, G., Harms, E., Helwig, H. & Nützenadel, W.** 1987. Fanconi-Bickel syndrome. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, **1**, 509–518.
- Marcus, O. & Kalant, N.** 1977. Cytoplasmic compartmentation of glucose 6-phosphate. *Canadian Journal of Biochemistry*, **55**, 31–34.
- Margolis, R. N., Cardell, R. R. & Curnow, R. T.** 1979. Association of glycogen synthase phosphatase and phosphorylase phosphatase activities with membranes of hepatic smooth endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, **83**, 348–356.
- Marks, J., Carvou, N. J. C., Debnam, E. S., Srail, S. K. & Unwin, R. J.** 2003. Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *The Journal of Physiology*, **553**, 137–145.
- Martin, C. C., Bischof, L. J., Bergman, B., Hornbuckle, L. A., Hilliker, C., Frigeri, C., Wahl, D., Svitek, C. A., Wong, R., Goldman, J. K., Oeser, J. K., Leprêtre, F., Froguel, P., O'Brien, R. M. & Hutton, J. C.** 2001. Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 25197–25207.
- Martin, C. C., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Hunter, S. I., Hutton, J. C. & O'Brien, R. M.** 2002. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Journal of Molecular Endocrinology*, **29**, 205–222.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F. & Thorens, B.** 2005. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *The Journal of Clinical Investigation*, **115**, 3545–3553.

- Massillon, D.** 2001. Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 4055–4062.
- Massillon, D., Barzilai, N., Chen, W., Hu, M. & Rossetti, L.** 1996. Glucose regulates in vivo glucose-6-phosphatase gene expression in the liver of diabetic rats. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 9871–9874.
- Massillon, D., Barzilai, N., Hawkins, M., Prus-Wertheimer, D. & Rossetti, L.** 1997. Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes*, **46**, 153–157.
- Mastick, C. C. & Saltiel, A. R.** 1997. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20706–20714.
- Mastick, C. C., Brady, M. J. & Saltiel, A. R.** 1995. Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *The Journal of Cell Biology*, **129**, 1523–1531.
- McCulloch, L. J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K. N., Clark, A. & Gloyn, A. L.** 2011. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Molecular Genetics and Metabolism*, **104**, 648–653.
- McDermott, D. H., De Ravin, S. S., Jun, H. S., Liu, Q., Priel, D. A. L., Noel, P., Takemoto, C. M., Ojode, T., Paul, S. M., Dunsmore, K. P., Hilligoss, D., Marquesen, M., Ulrick, J., Kuhns, D. B., Chou, J. Y., Malech, H. L. & Murphy, P. M.** 2010. Severe congenital neutropenia resulting from G6PC3 deficiency with increased neutrophil CXCR4 expression and myelokathexis. *Blood*, **116**, 2793–2802.
- McGuinness, O. P., Shau, V., Benson, E. M., Lewis, M., Snowden, R. T., Greene, J. E., Neal, D. W. & Cherrington, A. D.** 1997. Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *The American Journal of Physiology*, **273**, E674–681.
- McIntosh, D. P., Tan, X.-Y., Oh, P. & Schnitzer, J. E.** 2002. Targeting endothelium and its dynamic caveolae for tissue-specific transcytosis in vivo: a pathway to overcome cell barriers to drug and gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 1996–2001.
- McManus, E. J., Sakamoto, K., Armit, L. J., Ronaldson, L., Shpiro, N., Marquez, R. & Alessi, D. R.** 2005. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *The EMBO Journal*, **24**, 1571–1583.
- McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R. & Chen, Y. T.** 2001. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, **72**, 113–117.
- Merigo, F., Benati, D., Cristofolletti, M., Osculati, F. & Sbarbati, A.** 2011. Glucose transporters are expressed in taste receptor cells. *Journal of Anatomy*, **219**, 243–252.
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P. & Ridley, A. J.** 2006. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-

rich domains. *Nature Cell Biology*, **8**, 113–123.

Minassian, C., Zitoun, C. & Mithieux, G. 1996. Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during long-term fasting in rat correlates with differential time course of messenger RNA level. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **155**, 37–41.

Mithieux, G. & Zitoun, C. 1996. Mechanisms by which fatty-acyl-CoA esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, **235**, 799–803.

Mithieux, G., Bordeto, J. C., Minassian, C., Ajzannay, A., Mercier, I. & Riou, J. P. 1993. Characteristics and specificity of the inhibition of liver glucose-6-phosphatase by arachidonic acid. Lesser inhibitability of the enzyme of diabetic rats. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, **213**, 461–466.

Mithieux, G., Vidal, H., Zitoun, C., Bruni, N., Daniele, N. & Minassian, C. 1996. Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes*, **45**, 891–896.

Mithieux, G., Daniele, N., Payrastra, B. & Zitoun, C. 1998. Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 17–19.

Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F. & Zitoun, C. 2004. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **286**, E370–375.

Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F. & Zitoun, C. 2005. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metabolism*, **2**, 321–329.

Mithieux, G., Gautier-Stein, A., Rajas, F. & Zitoun, C. 2006. Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, **143**, 195–200.

Miyamoto, K., Hase, K., Taketani, Y., Minami, H., Oka, T., Nakabou, Y. & Hagihira, H. 1991. Diabetes and glucose transporter gene expression in rat small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **181**, 1110–1117.

Miyamoto, K., Hase, K., Takagi, T., Fujii, T., Taketani, Y., Minami, H., Oka, T. & Nakabou, Y. 1993. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *The Biochemical Journal*, **295 (Pt 1)**, 211–215.

Miyawaki-Shimizu, K., Predescu, D., Shimizu, J., Broman, M., Predescu, S. & Malik, A. B. 2006. siRNA-induced caveolin-1 knockdown in mice increases lung vascular permeability via the junctional pathway. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **290**, L405–413.

Moller, D. E., Yokota, A., Ginsberg-Fellner, F. & Flier, J. S. 1990. Functional properties of a naturally occurring Trp1200----Ser1200 mutation of the insulin receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **4**, 1183–1191.

- Moore, M. C., Connolly, C. C. & Cherrington, A. D.** 1998. Autoregulation of hepatic glucose production. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, **138**, 240–248.
- Moreno, M., Molina, H., Amigo, L., Zanlungo, S., Arrese, M., Rigotti, A. & Miquel, J. F.** 2003. Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **38**, 1477–1488.
- Mounien, L., Marty, N., Tarussio, D., Metref, S., Genoux, D., Preitner, F., Foretz, M. & Thorens, B.** 2010. Glut2-dependent glucose-sensing controls thermoregulation by enhancing the leptin sensitivity of NPY and POMC neurons. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **24**, 1747–1758.
- Mounier, C. & Posner, B. I.** 2006. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **84**, 713–724.
- Mundy, D. I., Machleidt, T., Ying, Y., Anderson, R. G. W. & Bloom, G. S.** 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, **115**, 4327–4339.
- Mutel, E., Abdul-Wahed, A., Ramamonjisoa, N., Stefanutti, A., Houberton, I., Cavassila, S., Pilleul, F., Beuf, O., Gautier-Stein, A., Penhoat, A., Mithieux, G. & Rajas, F.** 2011a. Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *Journal of Hepatology*, **54**, 529–537.
- Mutel, E., Gautier-Stein, A., Abdul-Wahed, A., Amigó-Correig, M., Zitoun, C., Stefanutti, A., Houberton, I., Tourette, J.-A., Mithieux, G. & Rajas, F.** 2011b. Control of Blood Glucose in the Absence of Hepatic Glucose Production During Prolonged Fasting in Mice: Induction of Renal and Intestinal Gluconeogenesis by Glucagon. *Diabetes*,
- Newgard, C. B., Foster, D. W. & McGarry, J. D.** 1984a. Evidence for suppression of hepatic glucose-6-phosphatase with carbohydrate feeding. *Diabetes*, **33**, 192–195.
- Newgard, C. B., Moore, S. V., Foster, D. W. & McGarry, J. D.** 1984b. Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 6958–6963.
- Nichols, B.** 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *Journal of Cell Science*, **116**, 4707–4714.
- Nonogaki, K.** 2000. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, **43**, 533–549.
- Nordlie, R. C., Foster, J. D. & Lange, A. J.** 1999. Regulation of glucose production by the liver. *Annual Review of Nutrition*, **19**, 379–406.
- Odievre, M.** 1966. [Hepato-renal glycogenosis with complex tubulopathy. 2. Cases of a new entity]. *Revue Internationale D'hépatologie*, **16**, 1–70.
- Oh, P. & Schnitzer, J. E.** 2001. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Molecular Biology of the Cell*, **12**, 685–698.

- Oh, P., McIntosh, D. P. & Schnitzer, J. E.** 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *The Journal of Cell Biology*, **141**, 101–114.
- Ortegren, U., Aboulaich, N., Ost, A. & Strålfors, P.** 2007. A new role for caveolae as metabolic platforms. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, **18**, 344–349.
- Ostrom, R. S. & Insel, P. A.** 2004. The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, **143**, 235–245.
- Otsu, K., Toya, Y., Oshikawa, J., Kurotani, R., Yazawa, T., Sato, M., Yokoyama, U., Umemura, S., Minamisawa, S., Okumura, S. & Ishikawa, Y.** 2010. Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **298**, C450–456.
- Pan, C. J., Lei, K. J., Annabi, B., Hemrika, W. & Chou, J. Y.** 1998. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 6144–6148.
- Pan, C.-J., Chen, S.-Y., Lee, S. & Chou, J. Y.** 2009. Structure-function study of the glucose-6-phosphate transporter, an eukaryotic antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib. *Molecular Genetics and Metabolism*, **96**, 32–37.
- Park, D. S., Lee, H., Frank, P. G., Razani, B., Nguyen, A. V., Parlow, A. F., Russell, R. G., Hult, J., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P.** 2002. Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 3416–3430.
- Park, D. S., Cohen, A. W., Frank, P. G., Razani, B., Lee, H., Williams, T. M., Chandra, M., Shirani, J., De Souza, A. P., Tang, B., Jelicks, L. A., Factor, S. M., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B. & Lisanti, M. P.** 2003. Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry*, **42**, 15124–15131.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C. & Lisanti, M. P.** 1999. Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 25718–25725.
- Parton, R. G. & Howes, M. T.** 2010. Revisiting caveolin trafficking: the end of the caveosome. *The Journal of Cell Biology*, **191**, 439–441.
- Patani, N., Lambros, M. B., Natrajan, R., Dedes, K. J., Geyer, F. C., Ward, E., Martin, L.-A., Dowsett, M. & Reis-Filho, J. S.** 2012. Non-existence of caveolin-1 gene mutations in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, **131**, 307–310.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, **3**, 473–483.
- Pelkmans, L., Püntener, D. & Helenius, A.** 2002. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science (New York, N.Y.)*, **296**, 535–539.
- Penhoat, A., Mutel, E., Amigo-Correig, M., Pillot, B., Stefanutti, A., Rajas, F. & Mithieux, G.**

2011. Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis. *Physiology & Behavior*, **105**, 89–93.
- Petersen, K. F., Laurent, D., Rothman, D. L., Cline, G. W. & Shulman, G. I.** 1998. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1203–1209.
- Pickin, K. A., Chaudhury, S., Dancy, B. C. R., Gray, J. J. & Cole, P. A.** 2008. Analysis of protein kinase autophosphorylation using expressed protein ligation and computational modeling. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 5667–5669.
- Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., McGrane, M., Pilkis, J. & Claus, T. H.** 1982. Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo 1-kinase, and fructose-1,6-bisphosphatase. *Federation Proceedings*, **41**, 2623–2628.
- Pillot, B., Soty, M., Gautier-Stein, A., Zitoun, C. & Mithieux, G.** 2009. Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology*, **150**, 616–624.
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C. & Mithieux, G.** 1999. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology*, **117**, 132–139.
- Rajas, F., Gautier, A., Bady, I., Montano, S. & Mithieux, G.** 2002. Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 15736–15744.
- Rajas, F., Jourdan-Pineau, H., Stefanutti, A., Mrad, E. A., Iynedjian, P. B. & Mithieux, G.** 2007. Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochemistry and Cell Biology*, **127**, 555–565.
- Rajjayabun, P. H., Garg, S., Durkan, G. C., Charlton, R., Robinson, M. C. & Mellon, J. K.** 2001. Caveolin-1 expression is associated with high-grade bladder cancer. *Urology*, **58**, 811–814.
- Ramachandran, R.** 2011. Vesicle scission: dynamin. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **22**, 10–17.
- Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Hou, H., Jr, Kneitz, B., Lagaud, G., Christ, G. J., Edelman, W. & Lisanti, M. P.** 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 38121–38138.
- Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E. & Lisanti, M. P.** 2002a. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 8635–8647.
- Razani, B., Wang, X. B., Engelman, J. A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X. L., Kneitz, B., Hou, H., Jr, Christ, G. J., Edelman, W. & Lisanti, M. P.** 2002b. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Molecular and Cellular*

Biology, **22**, 2329–2344.

Rizzo, V., Morton, C., DePaola, N., Schnitzer, J. E. & Davies, P. F. 2003. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **285**, H1720–1729.

Robenek, M. J., Severs, N. J., Schlattmann, K., Plenz, G., Zimmer, K.-P., Troyer, D. & Robenek, H. 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **18**, 866–868.

Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R., Nowotny, P., Waldhäusl, W. & Shulman, G. I. 2000. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes*, **49**, 701–707.

Rogers, S., Macheda, M. L., Docherty, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., Gibbs, E. M., James, D. E. & Best, J. D. 2002. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **282**, E733–738.

Rosengren, B.-I., Rippe, A., Rippe, C., Venturoli, D., Swärd, K. & Rippe, B. 2006. Transvascular protein transport in mice lacking endothelial caveolae. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, **291**, H1371–1377.

Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801–809.

Rossetti, L., Giaccari, A., Barzilai, N., Howard, K., Sebel, G. & Hu, M. 1993. Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats. Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, **92**, 1126–1134.

Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F. & Parton, R. G. 1999. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nature Cell Biology*, **1**, 98–105.

Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S. & Sessa, W. C. 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**, 731–736.

Sandvig, K., Pust, S., Skotland, T. & van Deurs, B. 2011. Clathrin-independent endocytosis: mechanisms and function. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**, 413–420.

Scheel, J., Srinivasan, J., Honnert, U., Henske, A. & Kurzchalia, T. V. 1999. Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology*, **1**, 127–129.

Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C. C. & Lodish, H. F. 1994. Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *The Journal of Cell Biology*, **127**, 1233–1243.

- Scherer, P. E., Tang, Z., Chun, M., Sargiacomo, M., Lodish, H. F. & Lisanti, M. P.** 1995. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 16395–16401.
- Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F. & Lisanti, M. P.** 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 131–135.
- Schmoll, D., Wasner, C., Hinds, C. J., Allan, B. B., Walther, R. & Burchell, A.** 1999. Identification of a cAMP response element within the glucose-6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *The Biochemical Journal*, **338 (Pt 2)**, 457–463.
- Schnitzer, J. E., Liu, J. & Oh, P.** 1995. Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 14399–14404.
- Schnitzer, J. E., Oh, P. & McIntosh, D. P.** 1996. Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science (New York, N.Y.)*, **274**, 239–242.
- Schubert, W., Frank, P. G., Razani, B., Park, D. S., Chow, C. W. & Lisanti, M. P.** 2001. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 48619–48622.
- Sedding, D. G., Hermsen, J., Seay, U., Eickelberg, O., Kummer, W., Schwencke, C., Strasser, R. H., Tillmanns, H. & Braun-Dullaeus, R. C.** 2005. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circulation Research*, **96**, 635–642.
- Senju, Y., Itoh, Y., Takano, K., Hamada, S. & Suetsugu, S.** 2011. Essential role of PACSIN2/syndapin-II in caveolae membrane sculpting. *Journal of Cell Science*, **124**, 2032–2040.
- Seoane, J., Gómez-Foix, A. M., O’Doherty, R. M., Gómez-Ara, C., Newgard, C. B. & Guinovart, J. J.** 1996. Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23756–23760.
- Sharma, D. K., Brown, J. C., Choudhury, A., Peterson, T. E., Holicky, E., Marks, D. L., Simari, R., Parton, R. G. & Pagano, R. E.** 2004. Selective stimulation of caveolar endocytosis by glycosphingolipids and cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, **15**, 3114–3122.
- Shepherd, P. R., Gould, G. W., Colville, C. A., McCoid, S. C., Gibbs, E. M. & Kahn, B. B.** 1992. Distribution of GLUT3 glucose transporter protein in human tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **188**, 149–154.
- Shieh, J.-J., Terzioglu, M., Hiraiwa, H., Marsh, J., Pan, C.-J., Chen, L.-Y. & Chou, J. Y.** 2002. The molecular basis of glycogen storage disease type 1a: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5047–5053.
- Shieh, J.-J., Pan, C.-J., Mansfield, B. C. & Chou, J. Y.** 2003. A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 47098–47103.

- Shiota, M., Green, R., Colburn, C. A., Mitchell, G. & Cherrington, A. D.** 1996. Inability of hyperglycemia to counter the ability of glucagon to increase net glucose output and activate glycogen phosphorylase in the perfused rat liver. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **45**, 481–485.
- Shulman, G. I., Liljenquist, J. E., Williams, P. E., Lacy, W. W. & Cherrington, A. D.** 1978. Glucose disposal during insulinopenia in somatostatin-treated dogs. The roles of glucose and glucagon. *The Journal of Clinical Investigation*, **62**, 487–491.
- Sinha, B., Köster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L., Morone, N., Parton, R. G., Raposo, G., Sens, P., Lamaze, C. & Nassoy, P.** 2011. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*, **144**, 402–413.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. & Anderson, R. G.** 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *The Journal of Cell Biology*, **127**, 1185–1197.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Donzell, W. C. & Anderson, R. G.** 1996. A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 29427–29435.
- Soty, M.** 2008. Mécanismes de régulation post-traductionnelle de la glucose-6-phosphatase par l'AMPC. *Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard Lyon 1*, **2008LYO10012**,
- Soty, M., Chilloux, J., Casteras, S., Grichine, A., Mithieux, G. & Gautier-Stein, A.** 2011. New insights into the organisation and intracellular localisation of the two subunits of glucose-6-phosphatase. *Biochimie*,
- Spisni, E., Tomasi, V., Cestaro, A. & Tosatto, S. C. E.** 2005. Structural insights into the function of human caveolin 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 1383–1390.
- Stafford, J. M., Wilkinson, J. C., Beechem, J. M. & Granner, D. K.** 2001. Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 39885–39891.
- Stolarczyk, E., Guissard, C., Michau, A., Even, P. C., Grosfeld, A., Serradas, P., Lorsignol, A., Pénicaud, L., Brot-Laroche, E., Leturque, A. & Le Gall, M.** 2010. Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, **298**, E1078–1087.
- Stümpel, F., Burcelin, R., Jungermann, K. & Thorens, B.** 2001. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 11330–11335.
- Sun, S., Zu, X., Tuo, Q., Chen, L., Lei, X., Li, K., Tang, C. & Liao, D.** 2010. Caveolae and caveolin-1 mediate endocytosis and transcytosis of oxidized low density lipoprotein in endothelial cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, **31**, 1336–1342.
- Sun, Y., Minshall, R. D. & Hu, G.** 2011. Role of caveolin-1 in the regulation of pulmonary endothelial permeability. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, **763**, 303–317.

- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L. & Helenius, A.** 2005. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *The Journal of Cell Biology*, **170**, 769–779.
- Takanaga, H. & Frommer, W. B.** 2010. Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **24**, 2849–2858.
- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. & Lisanti, M. P.** 1996. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 2255–2261.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. & van Deurs, B.** 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, **13**, 238–250.
- Thorens, B.** 1996. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *The American Journal of Physiology*, **270**, G541–553.
- Thorens, B., Wu, Y. J., Leahy, J. L. & Weir, G. C.** 1992. The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *The Journal of Clinical Investigation*, **90**, 77–85.
- Thorens, B., Guillam, M. T., Beermann, F., Burcelin, R. & Jaquet, M.** 2000. Transgenic reexpression of GLUT1 or GLUT2 in pancreatic beta cells rescues GLUT2-null mice from early death and restores normal glucose-stimulated insulin secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 23751–23758.
- Tobin, V., Le Gall, M., Fioramonti, X., Stolarczyk, E., Blazquez, A. G., Klein, C., Prigent, M., Serradas, P., Cuif, M.-H., Magnan, C., Leturque, A. & Brot-Laroche, E.** 2008. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes*, **57**, 555–562.
- Trinh, K. Y., O’Doherty, R. M., Anderson, P., Lange, A. J. & Newgard, C. B.** 1998. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 31615–31620.
- Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., Pillot, B., Fauveau, V., Aubert, R., Viollet, B., Foretz, M., Leclerc, J., Duchamp, A., Zitoun, C., Thorens, B., Magnan, C., Mithieux, G. & Andreelli, F.** 2008. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metabolism*, **8**, 201–211.
- Tse, E. Y. T., Ko, F. C. F., Tung, E. K. K., Chan, L. K., Lee, T. K. W., Ngan, E. S. W., Man, K., Wong, A. S. T., Ng, I. O.-L. & Yam, J. W. P.** 2011. Caveolin-1 Overexpression is Associated With Hepatocellular Carcinoma Tumorigenesis and Metastasis. *The Journal of Pathology*,
- Uittenbogaard, A. & Smart, E. J.** 2000. Palmitoylation of caveolin-1 is required for cholesterol binding, chaperone complex formation, and rapid transport of cholesterol to caveolae. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25595–25599.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y. & Smart, E. J.** 1998. Characterization of a cytosolic heat-shock

protein-caveolin chaperone complex. Involvement in cholesterol trafficking. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 6525–6532.

Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J. D., Chatton, J. Y., Riederer, B. M. & Thorens, B. 2001. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *The EMBO Journal*, **20**, 4467–4477.

Uldry, M., Ibberson, M., Hosokawa, M. & Thorens, B. 2002. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Letters*, **524**, 199–203.

Urbani, L. & Simoni, R. D. 1990. Cholesterol and vesicular stomatitis virus G protein take separate routes from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**, 1919–1923.

Vander Kooi, B. T., Onuma, H., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Allen, S. R., Vander Kooi, C. W., Chazin, W. J. & O'Brien, R. M. 2005. The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, **19**, 3001–3022.

Vidal-Alabró, A., Gómez-Valadés, A. G., Méndez-Lucas, A., Llorens, J., Bartrons, R., Bermúdez, J. & Perales, J. C. 2011. Liver Glucokinase(A456V) Induces Potent Hypoglycemia without Dyslipidemia through a Paradoxical Induction of the Catalytic Subunit of Glucose-6-Phosphatase. *International Journal of Endocrinology*, **2011**, 707928.

Vitart, V., Rudan, I., Hayward, C., Gray, N. K., Floyd, J., Palmer, C. N. A., Knott, S. A., Kolcic, I., Polasek, O., Graessler, J., Wilson, J. F., Marinaki, A., Riches, P. L., Shu, X., Janicijevic, B., Smolej-Narancic, N., Gorgoni, B., Morgan, J., Campbell, S., Biloglav, Z., Barac-Lauc, L., Pericic, M., Klaric, I. M., Zgaga, L., Skaric-Juric, T., Wild, S. H., Richardson, W. A., Hohenstein, P., Kimber, C. H., Tenesa, A., Donnelly, L. A., Fairbanks, L. D., Aringer, M., McKeigue, P. M., Ralston, S. H., Morris, A. D., Rudan, P., Hastie, N. D., Campbell, H. & Wright, A. F. 2008. SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout. *Nature Genetics*, **40**, 437–442.

Walker, E. A., Ahmed, A., Lavery, G. G., Tomlinson, J. W., Kim, S. Y., Cooper, M. S., Ride, J. P., Hughes, B. A., Shackleton, C. H. L., McKiernan, P., Elias, E., Chou, J. Y. & Stewart, P. M. 2007. 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Regulation by Intracellular Glucose 6-Phosphate Provides Evidence for a Novel Link between Glucose Metabolism and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Function. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**, 27030–27036.

Wang, Y., Oeser, J. K., Yang, C., Sarkar, S., Hackl, S. I., Hasty, A. H., McGuinness, O. P., Paradee, W., Hutton, J. C., Powell, D. R. & O'Brien, R. M. 2006. Deletion of the gene encoding the ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (UGRP)/glucose-6-phosphatase catalytic subunit-beta results in lowered plasma cholesterol and elevated glucagon. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 39982–39989.

Wang, Y., Inoue, H., Ravnskjaer, K., Viste, K., Miller, N., Liu, Y., Hedrick, S., Vera, L. & Montminy, M. 2010. Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 3087–3092.

Williams, T. M., Cheung, M. W.-C., Park, D. S., Razani, B., Cohen, A. W., Muller, W. J., Di Vizio, D., Chopra, N. G., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P. 2003. Loss of caveolin-1 gene expression

accelerates the development of dysplastic mammary lesions in tumor-prone transgenic mice. *Molecular Biology of the Cell*, **14**, 1027–1042.

Williams, T. M., Medina, F., Badano, I., Hazan, R. B., Hutchinson, J., Muller, W. J., Chopra, N. G., Scherer, P. E., Pestell, R. G. & Lisanti, M. P. 2004. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 51630–51646.

Williams, T. M., Hassan, G. S., Li, J., Cohen, A. W., Medina, F., Frank, P. G., Pestell, R. G., Di Vizio, D., Loda, M. & Lisanti, M. P. 2005. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: genetic ablation of Cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**, 25134–25145.

Wright, E. M., Loo, D. D. F. & Hirayama, B. A. 2011. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiological Reviews*, **91**, 733–794.

Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A. & Freeze, H. H. 2002. Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Molecular Genetics and Metabolism*, **76**, 37–45.

Yabaluri, N. & Bashyam, M. D. 2010. Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *Journal of Biosciences*, **35**, 473–484.

Yamamoto, T., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Yasuda, K., Masuda, K., Ikeda, H., Imura, H. & Seino, Y. 1991. Liver and muscle-fat type glucose transporter gene expression in obese and diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **175**, 995–1002.

Yang, G., Truong, L. D., Wheeler, T. M. & Thompson, T. C. 1999. Caveolin-1 expression in clinically confined human prostate cancer: a novel prognostic marker. *Cancer Research*, **59**, 5719–5723.

Yao, Q., Chen, J., Cao, H., Orth, J. D., McCaffery, J. M., Stan, R.-V. & McNiven, M. A. 2005. Caveolin-1 interacts directly with dynamin-2. *Journal of Molecular Biology*, **348**, 491–501.

Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I. F., Bauer, M. P., Lin, M. I., Drab, M., Kurzchalia, T. V., Stan, R. V. & Sessa, W. C. 2006. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *The Journal of Clinical Investigation*, **116**, 1284–1291.

Zhao, Y.-Y., Liu, Y., Stan, R.-V., Fan, L., Gu, Y., Dalton, N., Chu, P.-H., Peterson, K., Ross, J., Jr & Chien, K. R. 2002. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 11375–11380.

Zhou, M., Parr, R. D., Petrescu, A. D., Payne, H. R., Atshaves, B. P., Kier, A. B., Ball, J. M. & Schroeder, F. 2004. Sterol carrier protein-2 directly interacts with caveolin-1 in vitro and in vivo. *Biochemistry*, **43**, 7288–7306.

RESUME en français

La production endogène de glucose est une fonction cruciale au maintien de l'homéostasie glucidique dont les 2 dernières étapes sont la production de glucose par la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la sortie du glucose hors de la cellule par le transporteur facilité GLUT2. Les mécanismes dépendants de mouvements membranaires régulant ces deux étapes ont été étudiés.

La régulation de la G6Pase par l'AMPc dépend de mouvements membranaires. Cependant les mécanismes moléculaires de cette régulation restaient à caractériser. Nous avons étudié l'hypothèse d'une phosphorylation directe des sous-unités de la G6Pase par la PKA. La PKA est capable d'induire l'activité G6Pase. Cependant, aucune phosphorylation des sous-unités G6Pase n'a pu être mise en évidence par phosphorylation *in vitro*, mutations dirigées de sites potentiels de phosphorylation ou analyse par spectrométrie de masse.

En absence de Glut2, le glucose produit *de novo* sort des hépatocytes par une voie dépendante de mouvements membranaires, dont le mécanisme moléculaire n'est pas caractérisé. Cette voie vésiculaire n'est pas impliquée dans la sortie du glucose glycogénolytique. A l'inverse, 50% du glucose néoglucogénique sort des hépatocytes par une voie vésiculaire, probablement dépendante de la cavéoline-1. Par microscopie confocale à fluorescence, nous avons montré que la G6Pase se déplace dans la cellule vers la membrane plasmique et co-localise avec une partie de la cavéoline1 cellulaire. Les vésicules composées de cavéoline-1 et contenant la G6Pase pourrait donc constituer un lien entre le réticulum endoplasmique, lieu de production du glucose et la membrane plasmique, lieu de libération du glucose.

TITRE en anglais

Role of membrane movements in the regulation of endogenous glucose production

RESUME en anglais

Endogenous glucose production is a crucial function to maintain glucose homeostasis whose last two steps are glucose production by glucose-6-phosphatase (G6Pase) and glucose output by GLUT2. Regulations of both steps depend on membrane movements. In this work, we characterized the mechanisms of these regulations.

Regulation of G6Pase by cAMP depends on membrane movements; however the molecular mechanisms of this regulation still have to be characterized. We hypothesized that PKA directly phosphorylated G6Pase subunits. We showed that PKA was able to enhance G6Pase activity. However, no phosphorylation of G6Pase subunits was evidenced by *in vitro* phosphorylation, directed mutagenesis of potential phosphorylation sites or mass spectrometry.

In the absence of Glut2, the gluconeogenic glucose produced by hepatocytes is released through a pathway depending on membrane movements, which has not been characterised yet. This vesicular pathway was not involved in the output of glycogenolytic glucose. However, half of gluconeogenic glucose was released through a vesicular pathway, probably depending on caveolin-1. By confocal microscopy, we showed that G6Pase moved in cells and co-localized in part with cellular caveolin-1. Caveolin-1 vesicles containing G6Pase could thus constitute a link between the endoplasmic reticulum, site of glucose production, and the plasma membrane, site of glucose output.

DISCIPLINE

Métabolisme et Biologie Cellulaire

MOTS-CLES

Glucose, Néoglucogénèse, Cavéoline-1, Glucagon, GLUT2, Glucose-6-phosphatase, Phosphorylation, PKA

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

INSERM U855, Nutrition et cerveau, Faculté de Médecine Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08