

MAST. Bio-123

03

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Abou Berk Belkaïd Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers

Département de Biologie
Laboratoire « Antibiotiques, Antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique »

Inscrit Sous le N°: 1609
Date de: 2011 سبتمبر 25
Code:

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème



Optimisation de l'action de l'insuline sur la captation du glucose des adipocytes en cultures



Présenté par : M^{elle} **ARDJANI AMINA**

Soutenue devant le jury :

M^{ME} BOUCHERIT Z

Maître de Conférence

Présidente

M^R BEDRANE MA

Maitre assistant

Promoteur

M^{ME} BENMANSOUR M

Maitre assistante

Examineur

Année Universitaire : 2010-2011

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas

*En premier lieu, nous remercions **M^R BEDRANE A**, maitre assistant au département de biologie ; faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, d'abord pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ces précieux conseils, ces orientations et pour ces tous encouragements durant la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions profondément **M^{ME} BOUCHERIT Z**, maitre de conférence au département de biologie ; faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, pour sa générosité d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à **M^{ME} BENMANSOUR M**, maitre assistante au département de biologie ; faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid, d'avoir accepté d'examiner ce travail*

*Nous remercions infiniment **M^{ELLE} BENARIBA M** maitre assistante et **M^R AZZI R** maitre assistant aussi au département de biologie; faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou Bekr Belkaid.*



A tous ceux qui m'ont aidé . . . de près . . . ou de loin . . . merci.

Dédicace

Je dédie ce travail...

*À Mes très chers parents
Qu'ont ma donnés leurs confiance*

À Ma belle sœur... Soumia

À Mes chers frères... Oussama et El Hacene...

À Ma grand-mère...

À Mes amies Ilhem, Amina et Hanene

Résumé

Ce travail porte sur la recherche de l'effet de l'insuline sur la cinétique de consommation du glucose au niveau de tissu adipeux selon le protocole adopté au niveau du laboratoire, antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique.

L'effet a été analysé *in vitro* sur des coupes fines de tissu adipeux isolées des rats Wistar normaux misent dans un milieu d'incubation KRBA 4% glucosé (0.54g/l) en présence de différentes concentrations (1, 10, 50, 100, 200 et 300 μ U/ml) d'insuline durant 90minutes d'incubation à 37° C.

Les résultats obtenus montrent une consommation basale significative du glucose de l'ordre de 0.04g/l (7.4%) en présence des coupes de tissu dans le milieu d'incubation et en absence d'insuline.

De même, la stimulation de la captation du glucose au niveau des coupes de tissu adipeux est non significative entre 1 et 50 μ U/ml, significative à 100 μ U/ml et très significative, soit de 0.09 g/L (16.66%) en présence de 200 et 300 μ U/ml d'insuline pendant 60 minutes d'incubation à 37°C.

Mots clés : Diabète sucré, diabète de type 2, insuline, transport de glucose, adipocytes isolés, culture cellulaire, rats.

Sommaire

Sommaire	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	IV

1^{ère} Partie : Synthèse bibliographique

1. Introduction	1
2. Complication dues aux diabètes.....	2
3. Traitements du diabète	3
4. Signalisation insulinique	4
4.1. L'Insuline.	4
4.2. Voies de signalisation de l'insuline.....	9
4.2.1. Voie de La PI3 kinase	11
4.2.2. Voie MAP kinase	12
5. Physiopathologie de diabète de type2	14
6. Optimisation de l'action de l'insuline sur la captation du glucose des cellules en cultures	17

2^{ème} Partie : Partie expérimentale

Matériels et méthodes

1. Analyse biologique

1.1. Animaux et élevage	21
1.2. Préparation du milieu d'incubation KRBA	21
1.3. Isolements des adipocytes	22
1.4. Incubation des adipocytes	22
1.5. Prélèvement des puits	23
1.6. Dosage enzymatique du glucose	23

2. Analyse statistique

2.1. La moyenne	25
2.2. La variance	25
2.3. L'écart-type	25
2.4. L'erreur standard de la moyenne (Sm)	25
2.5. Test de Student	25

Résultats et discussion

1.1. Captation du glucose par les adipocytes isolées	27
1.2. Consommation basale du glucose	27
1.3. Effet d'insuline sur la captation du glucose par les adipocytes isolées.....	28
<i>Conclusion général</i>	36
<i>Références bibliographiques</i>	37



Liste des figures

FIGURE 01 : Schéma structurel de l'insuline	5
FIGURE 02 : Sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques	7
FIGURE 03 : translocation de transporteur du glucose (GLUT4) sous l'influence de l'insuline.....	9
FIGURE 04 : structure moléculaire du récepteur de l'insuline.	10
FIGURE 05 : Réseau de signalisation de l'insuline	13
FIGURE 06 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en absence et en présence des coupes de tissu.....	27
FIGURE 07 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 1 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	29
FIGURE 08 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 10 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	29
FIGURE 09 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 50 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	30
FIGURE 10 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 100 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	30
FIGURE 11 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 200 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	31
FIGURE 12 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 300 μ U/ml de l'insuline en fonction du temps.....	31
FIGURE 13 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de différentes concentrations d'insuline pendant 60min.....	32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Préparation du KRB.....	21
Tableau 2 : Concentrations d'insuline ajoutées au milieu d'incubation.....	23
Tableau 3 : Captation du glucose au niveau des coupes de tissu adipeux en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA 4%+glu 0.54g/...	28

Synthèse bibliographique

1. Introduction

Le diabète est un problème de santé publique majeur qui touche une large population (**Prudhomme M F; 2008**). L'incidence de cette pathologie augmente régulièrement au cours des dernières années en grande partie à cause des changements de mode de vie (**Ricordeau P et al, 2003; Harjutsalo V et al, 2008**).

Le diabète peut entraîner de graves complications et le décès prématuré ; parmi les adultes âgés de 20 ans et plus, les taux de mortalité chez les diabétiques étaient deux fois plus élevés que chez les non-diabétiques (**Le diabète au Canada, 2009**).

Les diabètes sucrés (types 1 et 2) touchent 284 millions de personnes en 2010, soit 6,6 % de la population mondiale selon les données de l'International Diabètes Fédérations, dont le diabète de type 2 (DT2) représente 85 à 95 % de tous les diabètes dans les pays industrialisés (**Thierry M et Harry D, 2010**).

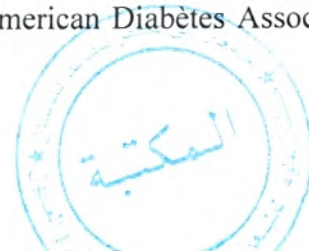
L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que cette incidence sera de 7,8 % de la population mondiale en 2030 soit 438 millions de personnes (**Thierry M et Harry D, 2010**).

Le diabète se définit par une glycémie à jeun > 7 mmol/L (1,26g/l) à 2 reprises, ou $> 11,1$ mmol/L (à 2g/l) à un moment quelconque de la journée ou après une hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO = 75 g de glucose). Si elle est comprise entre 7,6 et 11,1 mmol/L après une HGPO, il s'agit d'une intolérance au glucose (**Prudhomme M F, 2008; Thierry M et Harry D, 2010**).

Le diabète sucré n'est pas une maladie homogène. Il s'agit en fait d'un ensemble hétérogène de désordres métaboliques qui, néanmoins, ont comme caractéristique commune de permettre l'installation d'une hyperglycémie chronique à jeun et/ou postprandiale (**Portha B, 2003; Cerasi E et Ktorza A, 2007**).

C'est une affection chronique résultant d'un déficit sécrétoire d'insuline (carence partielle ou totale), et/ou de facteurs empêchant l'action normale de cette hormone (**Cruz M, Bergman R N et al, 2002; Giusti V, 2002**).

Une nouvelle classification du diabète a été proposée par l'American Diabètes Association (ADA) en 1997 comporte :



Le diabète de type 1, ou diabète insulino-dépendant (DID), (10 % des diabétiques), fait habituellement son apparition pendant l'enfance ou au début de l'adolescence (**Cerasi E et Ktorza A, 2007**). Il résulte un déficit primaire, en général absolu, en insuline, dû à la destruction auto-immune des cellules β et une forme idiopathique, plus rare. Le déclenchement de processus auto-immun de destruction des cellules β est contrôlé par des facteurs génétiques et environnementaux (**Rodier M, 2001; Portha B, 2003**).

L'hyperglycémie apparaît lorsqu'il ne reste plus que 10 à 20% de cellules B fonctionnelles. Le pancréas produit alors peu ou pas du tout d'insuline, ce qui nécessite un traitement à vie par injection d'insuline (**Mohammed I H et al, 2002; Zalloua P et al, 2002**).

Le diabète de type 2 (non insulino-dépendant, DNID); s'installe généralement lentement à l'âge adulte. Il représente plus de 90 % des cas de diabète diagnostiqués dont la physiopathologie est plus complexe (**Cerasi E et Ktorza A, 2007**).

C'est une maladie évolutive caractérisée par une obésité chez la majorité des patients, un défaut de l'effet de l'insuline sur les tissus cibles (insulinorésistance) et un déficit de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose (**Sobngwi E et Boudou P, 2003**). Il est sous l'influence de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux (l'obésité, le niveau socio-économique, les médicaments, l'âge, le sexe, le stress ou l'alimentation) (**Girard J, 2003; Yanick F et Denise A, 2008**).

Le diabète gestationnel (DG); fait son apparition chez certaines femmes pendant la grossesse, dans la plupart des cas, il disparaît après la naissance. Il représente un très important facteur de risque d'apparition du diabète de type 2 plus tard au cours de la vie : jusqu'à 40 % des femmes qui ont le DG peuvent être atteintes du diabète de type 2 en vieillissement (**Le diabète au Canada; 2002 et 2009**).

Autres types de diabète spécifiques (ex-secondaires) s'agit d'un ensemble hétérogène d'affections du pancréas exocrine, d'endocrinopathies, de diabètes médicamenteux ou chimiques, et d'affections génétiques, en particulier au niveau de la cellule β (diabète MODY [Maturity Onset Diabetes of the Young] et diabète mitochondrial) (**Buyschaert M et Hermans M P, 1998**).

2. Complications dues aux diabètes

Les complications du diabète sont étroitement reliées à l'hyperglycémie. Ils sont en fonction surtout de la durée du diabète. 63 % des adultes atteints de diabète avaient reçu un diagnostic

d'hypertension, soit 3 fois plus souvent que les adultes non diabétiques (**Le diabète au Canada, 2009**). Ils sont de deux types :

Les complications aiguës sont les décompensations hyperglycémiques (acidocétose et syndrome d'hyperglycémie hyperosmolaire), l'acidose lactique liée à la metformine et l'hypoglycémie (**Orban J C et Ichai C, 2008**).

Les complications chroniques induisent des altérations de grandes fonctions vitales. Celles-ci sont dues à l'hyperglycémie et donc aussi fréquentes dans les deux types de diabète. On les décrit habituellement comme complications microvasculaires (rétinopathie, néphropathie, neuropathie) et macrovasculaires (artériopathie et coronaropathie). Ces pathologies participent à la surmortalité liée au diabète (**Vinik A I et al, 2003; Manuel D G et Schultz S E, 2004**).

3. Traitements du diabète

Les traitements ne manquent pas aujourd'hui. Mais aucun ne permet de résoudre le vrai problème du diabète : suppléer l'absence d'insuline (DT1), remédier à sa mauvaise utilisation par l'organisme (DT2).

Un bon contrôle de la glycémie, de la tension artérielle et de la lipidémie par une alimentation saine, le contrôle du poids, l'activité physique régulière peut réduire le risque de complications découlant et accroître l'espérance de vie.

En dehors du régime, le traitement du diabète repose sur l'insuline, les antidiabétiques oraux ou l'association des deux.

- ✓ L'insuline ou ses analogues permet de suppléer la carence de cette hormone. On différencie les différents types d'insuline en fonction de leur profil d'action : ultrarapide (2 à 4 heures); rapide (4 à 6 heures);intermédiaire (10 à 16 heures); lentes (20 à 24 heures).
- ✓ Les antidiabétiques oraux regroupent de nombreuses molécules aux modes d'actions différents :

Les sulfonylurées ; se sont des secrétagogues, leur action sur la cellule bêta se fait par le biais de l'inhibition des canaux potassiques et de l'activation des canaux calciques aboutissant à l'insulino-sécrétion, ils améliorent les phases de la sécrétion insulinaire (**Korytkowski M, Thomas A et al, 2002**).

Les glinides ou méglitinides; Cette famille d'insulino-sécrétants est représentée par la répaglinide et la nateglinide. Ils agissent comme les sulfonylurées mais leur action est plus rapide (**Cozma L S, Luzio S D et al, 2002**).

Les biguanides ; la seule metformine représente cette famille d'antidiabétiques dont le mode d'action des tissus cibles de l'insuline (diminution de la production hépatique du glucose et augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline). Sa contre-indication absolue est l'insuffisance rénale (acidose lactique) (**Rosak C, Haupt E et al, 2002; Orban J C, Ghaddab A et al, 2006**).

Les inhibiteurs des alpha-glucosidases : L'alpha-glucosidase est une enzyme de l'intestin grêle, leur inhibition ralentit la digestion des glucides et diminue leur absorption, aboutissant à une baisse glycémie post-prandiale. Il existe peu d'effets secondaires et peu de contre-indications pour ces molécules (**Delgado H et al, 2002; Rosak C, Haupt E et al, 2002**).

4. La signalisation insulinaire

4.1. L'insuline

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante, a pour action principale de favoriser : le stockage énergétique du glucose, inhibition de la glycogénolyse, néoglucogénèse à partir des acides aminés et de la lipolyse; l'activation de la glycogénogénèse, la lipogénèse, la synthèse des protéines et la croissance cellulaire (régulation de la transcription) (**Fernandez R J et al, 2001; Jansson P A et al, 2002**).

L'insuline est une hormone peptidique sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans (pancréas endocrine). Un polypeptide de taille plutôt modeste, d'un poids moléculaire d'environ 6 kDa. Il est constitué de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne A (21 acides aminés) et la chaîne B (30 acides aminés), reliées entre elles par deux ponts disulfures qui relient la cystéine A7 et A20 de la chaîne A à leurs homologues B7 et B19 de la chaîne B; en plus d'un pont disulfure intrachaîne relie

les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A (Permulter L, Salan J L et Collin G0, 2003; Magnan C et Ktorza A, 2005). (Voir figure 1).

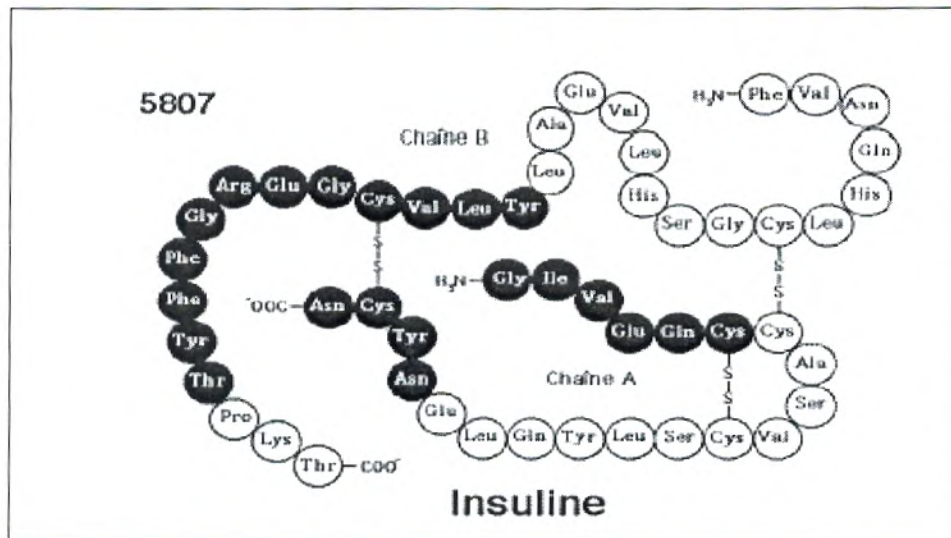


FIGURE (1) : Schéma structurelle d'insuline (Raisonnier M, 2004).

Le gène de l'insuline est situé sur le bras court du chromosome 11. Ce gène contrôle la synthèse d'un précurseur de haut poids moléculaire, la pré-pro-insuline. Cette molécule est ensuite clivée en pro-insuline, et transportée dans l'appareil de Golgi, où elle est stockée dans des granules sécrétoires (Marie-Luce Guillermin Spahr, 2004).

La maturation de ces granules aboutit à l'insuline et à un petit peptide, le C-peptide. Les granules sont excrétées par exocytose. L'insuline circule sous forme libre dans le plasma et possède une courte demi-vie de l'ordre de quelques minutes (Marie-Luce Guillermin Spahr, 2004).

Le débit de sécrétion de l'insuline est ajusté à tout moment par des interactions métaboliques (concentration plasmatique des substrats énergétiques, en particulier du glucose), hormonales ou nerveuses (Magnan C et Ktorza A, 2005).

Toute molécule capable d'influencer la sécrétion de l'insuline est, par définition, une molécule qui agit en modulant le processus d'exocytose régulée. On peut classer les agents stimulants de la sécrétion d'insuline en deux grands groupes :

- Les stimuli primaires (ou déclencheurs) : les molécules du glucose ont la capacité de déclencher à eux seuls la sécrétion d'insuline, les acides aminés qui sont capables, dans leur majorité, de stimuler la sécrétion d'insuline ; les plus puissants sont l'arginine, la leucine et la lysine. Les acides aminés stimulent de façon modeste la sécrétion d'insuline en présence de

faibles concentrations de glucose, mais beaucoup plus fortement lorsque la concentration de glucose s'élève. Ce sont alors des amplificateurs très efficaces de la réponse sécrétoire à l'hexose et on a en plus le mannose, le glycéraldéhyde, les sulphonylurées et les glinides (**Magnan C et Ktorza A, 2005**).

- Les stimuli secondaires sont tous les agents stimulants physiologiques (substrats énergétiques, hormones digestives, acétylcholine...)

Un troisième groupe est constitué des agents dits atténuateurs de la sécrétion d'insuline, qui sont capables de diminuer l'intensité de la réponse sécrétoire au glucose. Il s'agit des neuromédiateurs libérés par les terminaisons nerveuses sympathiques de l'îlot, en particulier la noradrénaline, et de certaines hormones comme la somatostatine et Le glucagon qui stimulent et inhibent respectivement la sécrétion d'insuline (**Magnan C et Ktorza A, 2005**).

Un pancréas humain normal sécrète 40 à 50 unités d'insuline par jour (1UI= 6nM= 35 ng/ml). Un taux d'insuline basale à jeune est environ 0,4 ng/ml (ou 69 pmol/l) permet de maintenir l'équilibre métabolique en dehors de repas (**Marie-Luce Guillermin Spahr, 2004**).

Après une élévation aiguë et transitoire de la concentration extracellulaire de glucose, le niveau maximal de la sécrétion d'insuline (60, 80µu/ml de plasma) est atteint en quelques minutes, le retour au taux basale se fait en 2 heures (**Permulter L, Salan J L et Collin G, 2003**).

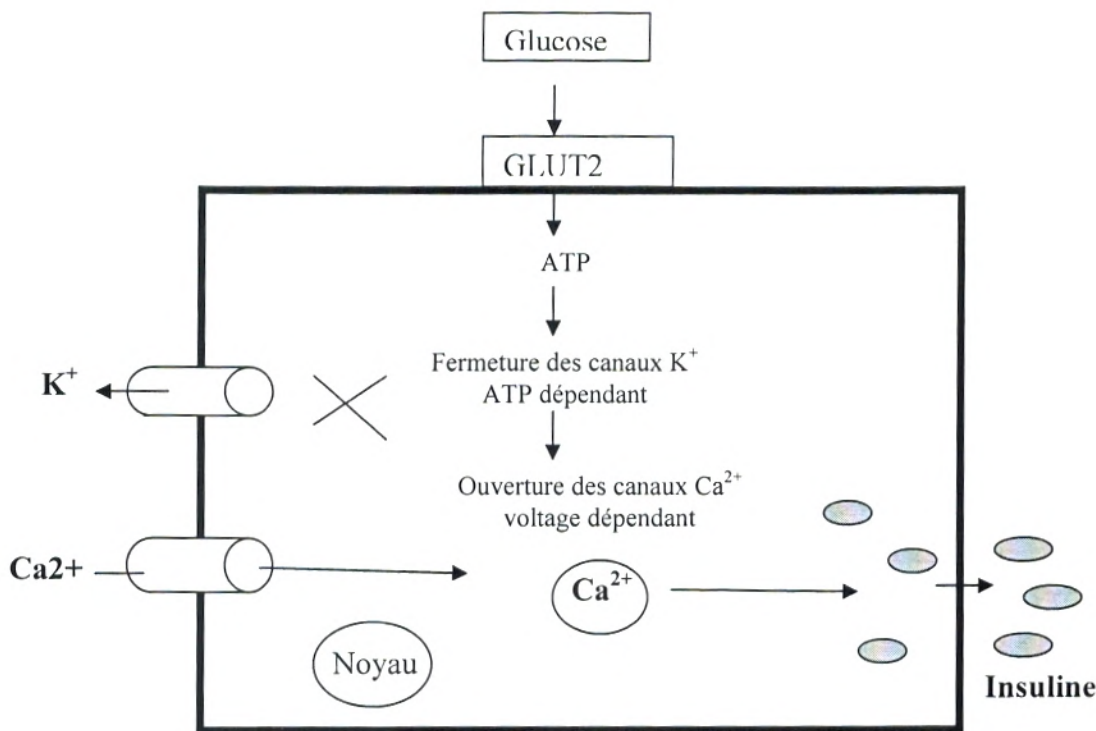
La première phase de la sécrétion (pic précoce) est suivie par une augmentation progressive de la libération d'insuline d'un niveau plus faible, qui tend lentement vers une valeur d'équilibre (pic tardif ou deuxième phase de sécrétion). Cette deuxième phase se maintient jusqu'à l'arrêt de la stimulation.

La signification physiologique du caractère biphasique de la sécrétion d'insuline n'apparaît encore pas tout à fait clairement, mais le rôle du pic précoce de sécrétion serait de sensibiliser les tissus cibles aux effets de l'hormone, et d'empêcher une hyperinsulinémie (un sujet est hyperinsulinique si son sang contient plus de 20µU d'insuline/ml) trop prononcée et une hypoglycémie réactionnelle (**Bataille D et Endosulfin N, 2000**).

Il est, de plus, notable que la disparition de la première phase de sécrétion est une caractéristique majeure de l'altération de la fonction pancréatique chez le diabétique de type 2 (**Magnan C et Ktorza A, 2005**).

Le mécanisme de sécrétion de cette hormone est lorsque la glycémie s'élève fait, schématiquement intervenir une augmentation de l'utilisation de glucose par la cellule béta-pancréatique.

Les molécules de glucose pénètrent dans les cellules β par diffusion passive, mais facilitée par l'existence d'un transporteur membranaire spécifique appelé GLUT2 (**Marie-Luce Guillermin Spahr, 2004**), une production accrue d'ATP et une diminution du rapport ADP/ATP conduisant à la fermeture des canaux K^+ ATP-dépendants. Cela entraîne une dépolarisation cellulaire qui permet l'ouverture des canaux Ca^{2+} dépendant du voltage (**Maechler P et Wollheim C B, 2000; Henquin J C, 2004**). L'augmentation massive de la concentration cytosolique de Ca^{2+} est, en définitive, le déclencheur de l'exocytose des grains de sécrétion d'insuline (**Aguilar B L, Bryan J et Nakazaki M, 2001; Ferré P, 2005**). (Voir figure 2).



FIGURE(2): Sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques (**Annicotte J S, 2004**).

L'action intracellulaire de l'insuline regroupe la stimulation du transport du glucose, des acides aminés et la modulation de l'activité d'enzyme de métabolisme (**Pinget M et Boullu S, 2002**).

Il agit à la fois au niveau hépatique en freinant la production du glucose (diminue la néoglucogenèse et la glycolyse) et de stimuler leur stockage se forme de glycogène; au niveau périphérique en stimulant l'utilisation du glucose par les tissus insulino-dépendant (foie, tissus adipeux, muscles).

Il stimule le captage du glucose dans les muscles squelettiques et le tissu adipeux, en favorisant leur stockage se forme de glycogène (**Perlemuter L, Salan J L et Collin G, 2003; Zierath J R et Kawano Y, 2003**). Il favorise la lipogenèse et inhibe la lipolyse dans les adipocytes (**Pinget M et Boullu S; 2002**).

Il participe à l'activation globale de la synthèse protéique, la différenciation cellulaire, la translocation des protéines, la modification du flux ioniques et l'activation du gène spécifiques (**Pinget M et Boullu S, 2002**).

L'entrée du glucose dans la cellule en suivant son gradient de concentration est assurée par les transporteurs (GLUTs) qui diffèrent selon leur localisation dans l'organisme (**Joost H G et Thorens B, 2001**).

Parmi Ces transporteurs ; GLUT1 : proche de la membrane plasmique ; assure principalement le transport basal du glucose.

GLUT2 : est majoritairement exprimé dans les cellules β du pancréas et au niveau du foie et de l'intestin.

GLUT3 : participe au transport du glucose au niveau des neurones (**Minokoshi Y, Kahn C R et Kahn B B, 2003**).

GLUT4 : est intracytoplasmique, forment une réserve importante de transporteurs et représente le principal « système » de transport du glucose recruté à la surface des cellules musculaires et adipeuses (**Bryant N J, Govers R et James D E, 2002; Permulter L, Salan J L et Collin G, 2003**).

En l'absence d'insuline, seuls les transporteurs GLUT1, présents sur la membrane des cellules musculaires et adipeuses, assurent l'entrée du glucose nécessaire au métabolisme cellulaire (**Antonescu C N et al, 2008; Vassilopoulos S et al, 2010**).

Suit d'une stimulation insulinique; une mobilisation des vésicules enrichies en GLUT4 vers la surface cellulaire nécessite l'interaction entre des protéines présentes sur les vésicules, et à la surface cellulaire, permettant ainsi la fusion des deux membranes (phénomène de translocation) (**Thurmond D C et Pessin J E, 2001**). L'insuline stimulait non seulement la translocation de

GLUT4 à la surface cellulaire, mais également l'activité de ces transporteurs (Somwar R, Perreault M et al, 2000). (Voir figure 3).

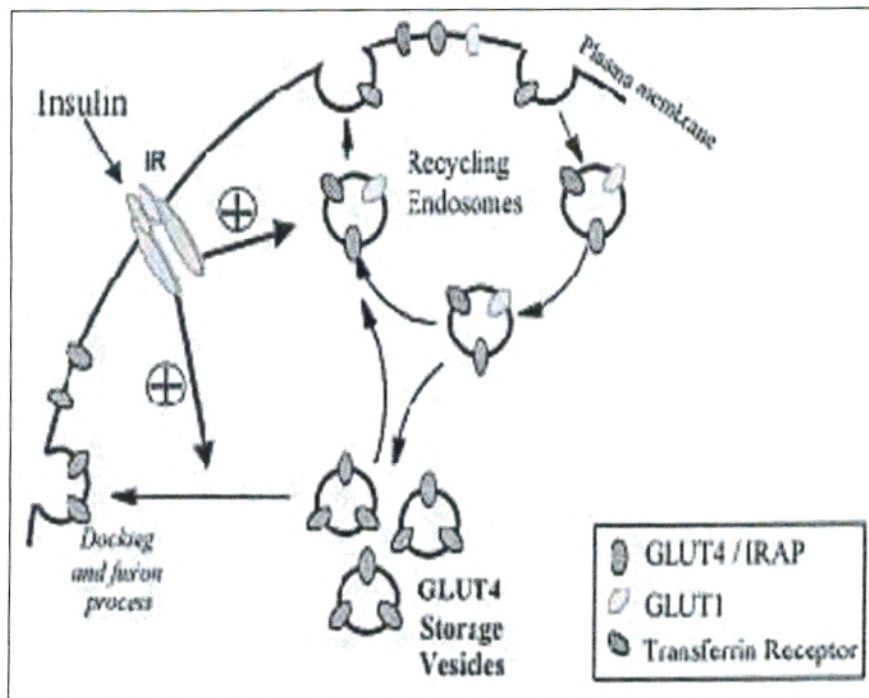


FIGURE (3) : Translocation de transporteur du glucose (GLUT4) sous l'influence de l'insuline (Ducluzeau P H et al, 2002).

4.2. Voies de signalisation de l'insuline

L'effet de l'insuline résulte de sa liaison à un récepteur membranaire spécifique exprimé en priorité sur ses trois tissus cibles, le foie, le muscle et le tissu adipeux.

Ce récepteur possède une activité tyrosine-kinase dans leur domaine intracellulaire. Il constitue le chef de file de la famille des récepteurs formés de quatre sous unités, dont l'autre membre important est le récepteur de l'IGF1 (*insulin-like growth factor* de type 1) (Frasca F, Pandini G et Scalia P, 1999).

On peut considérer le récepteur comme un hétérodimère préassocié dans la membrane. Il est formé de deux chaînes alpha extracellulaires reliées par des ponts disulfure à deux chaînes bêta transmembranaires.

Chaque sous-unité alpha possède un domaine de liaison de l'hormone situé de part et d'autre d'une séquence riche en cystéines permettant l'établissement de ponts disulfure structurant ce domaine. Les deux sous-unités bêta ont chacune un domaine transmembranaire donnant au récepteur une mobilité latérale (Kido Y, Nakae J et Accili D, 2001). (Voir figure 4).

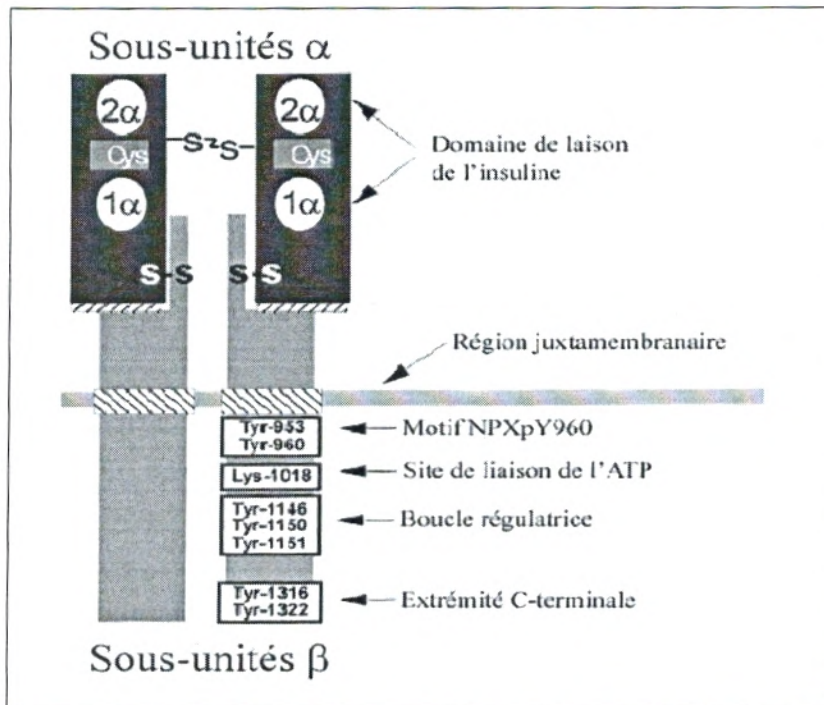


FIGURE (4) : Structure moléculaire du récepteur de l'insuline (White M F, 1997).

Une seule molécule d'insuline, en se liant avec une haute affinité sur les deux sous-unités alpha, permet un rapprochement des deux sous-unités bêta et l'activation du récepteur (Kido Y, Nakae J et Accili D, 2001; Le Roith D et Zick Y, 2001).

Lors de l'activation du récepteur, la liaison de l'ATP sur son site consensus permet sa transphosphorylation (c'est-à-dire la phosphorylation d'une sous-unité bêta par l'autre) (Capeau J, 2003).

Le domaine tyrosine kinase est alors complètement activé et peut ainsi phosphoryler d'autres tyrosines présentes sur les chaînes bêta, conduisant à une autophosphorylation du récepteur, mais aussi sur des protéines substrats.

Au moins 9 substrats intracellulaires communs aux récepteurs de l'insuline et de l'IGF1 ont été identifiés. La première famille, qui compte 4 membres, est celle des IRS (*insulin receptor substrat*); ses principaux représentants, IRS1 et IRS2 (**White M F, 2002**).

Le domaine tyrosine kinase du récepteur phosphoryle des résidus tyrosines spécifiques sur les IRS; ainsi phosphorylées; elles sont à leur tour reconnues par des domaines de protéines relais (**White M F, 2002**).

Les principales voies de la signalisation insulinaire sont celles de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase); impliquée en priorité dans les effets métaboliques et la voie des MAP (*mitogenactivated protein kinases*); impliquée en priorité dans les effets nucléaires, la croissance et la différenciation cellulaire (**Saltiel A R et Kahn C R, 2001; Bryant N J, Govers R et James D E, 2002**).

Cependant, l'activation d'un effet spécifique de l'insuline met fréquemment en jeu une conjonction de ces deux voies ainsi que d'autres voies intracellulaires, rendant ainsi compte de la pléiotropie et de la spécificité du signal.

4.2.1. La PI3 kinase (Phosphatidylinositol-3 kinase)

La PI3 kinase est l'une des protéines importantes activées par cette liaison des IRS1 et 2; elle phosphoryle en position 3 les phosphoinositides membranaires, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la protéine kinase B (PKB) ou la PDK1/2 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1/2). (**Voir figure 5**)

La PKB activée par phosphorylation va à son tour phosphoryler et activer d'autres protéines relais intracellulaires impliqués en priorité dans les effets métaboliques de l'hormone comme la phosphorylation du glycogène synthase 3 kinase (GSK3)-b en favorisant la synthèse du glycogène.

La voie PI3 kinase/PKB intervient également dans le contrôle négatif de l'expression génique des gènes cibles tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (**Capeau J, 2003**).



La stimulation par l'insuline, via les voies de signalisation PI3K produit une augmentation de l'exocytose de GLUT4 accompagné d'une réduction de son endocytose (Saltiel A R et Kahn C R, 2001; Bryant N J et Govers R, 2002; Bose A, Guilherme A et Robida S I, 2002). Le résultat est une augmentation nette de la quantité de transporteurs à la membrane cellulaire de deux à huit fois dans muscle squelettique ou dans l'adipocyte (Furtado L M, Somwar R et al, 2002).

Toujours par la voie PKB, l'insuline exerce un effet anti-apoptotique en phosphorylant et inhibant des facteurs pro-apoptotiques (Le Roith D et Zick Y, 2002).

4.2.2. Voie MAP kinase (*Mitogenactivated Protein kinase*)

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase exprimée dans un grand nombre de tissus. Il est activé par différent stress induisant une déplétion de la cellule en énergie et une augmentation du rapport AMP/ATP (Fryer L G et al, 2000; Zhou G, Myers R et al, 2001; Minokoshi Y et al, 2004).

Au départ du récepteur de l'insuline, deux voies aboutissent à l'activation de la voie MAP kinase: via les protéines IRS, la liaison de l'adaptateur Grb2 (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*) sur des phosphotyrosines spécifiques permet d'activer le facteur d'échange nucléotidique SOS (*son of sevenless*) qui active la petite protéine G Ras dans la membrane plasmique en stimulant l'échange du GDP contre le GTP (Capeau J, 2003). (Voir figure 5)

Ras active la kinase Raf, qui phosphoryle alors et active la MAP kinase (MAPK). Celles-ci vont activer certain kinase impliquée dans la synthèse protéique et vont entrer dans le noyau afin de phosphoryler et activer des facteurs de transcription tels impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire.

Une deuxième possibilité de mise en route de la voie MAP kinase recrute sur les protéines adaptatrices de la famille SHC (*src homologous and collagen protein*), elles-mêmes reconnues par la protéine Grb2 activant la voie Ras (Capeau J, 2003). (Voir figure 5)

Une fois activée, l'AMPK modifie l'activité et l'expression de différentes protéines cibles afin de rétablir l'homéostasie énergétique cellulaire en activant les voies métaboliques productrices d'énergie et en inhibant les voies consommatrices.

En effet, elle stimule le transport de glucose dans le muscle et dans l'adipocyte, en induisant la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique (Carling D, 2004).

Parallèlement à la translocation de GLUT4, dans le muscle, l'AMPK inhibe le glycogène synthase diminuant ainsi la synthèse de glycogène et permettant à la cellule d'orienter le glucose vers la production d'énergie (glycolyse) (Klaman L D et al, 2000; Marette A, 2002).

Dans le foie, l'AMPK inhibe l'expression de la phosphoénolpyruvate carboxykinase et de la glucose-6-phosphatase, deux enzymes clés de la néoglucogenèse (Zick Y, 2003; Lee Y H, Giraud J et al, 2003).

Elle joue aussi un rôle clé dans la régulation du métabolisme lipidique à la fois en terme de synthèse et d'utilisation des acides gras.

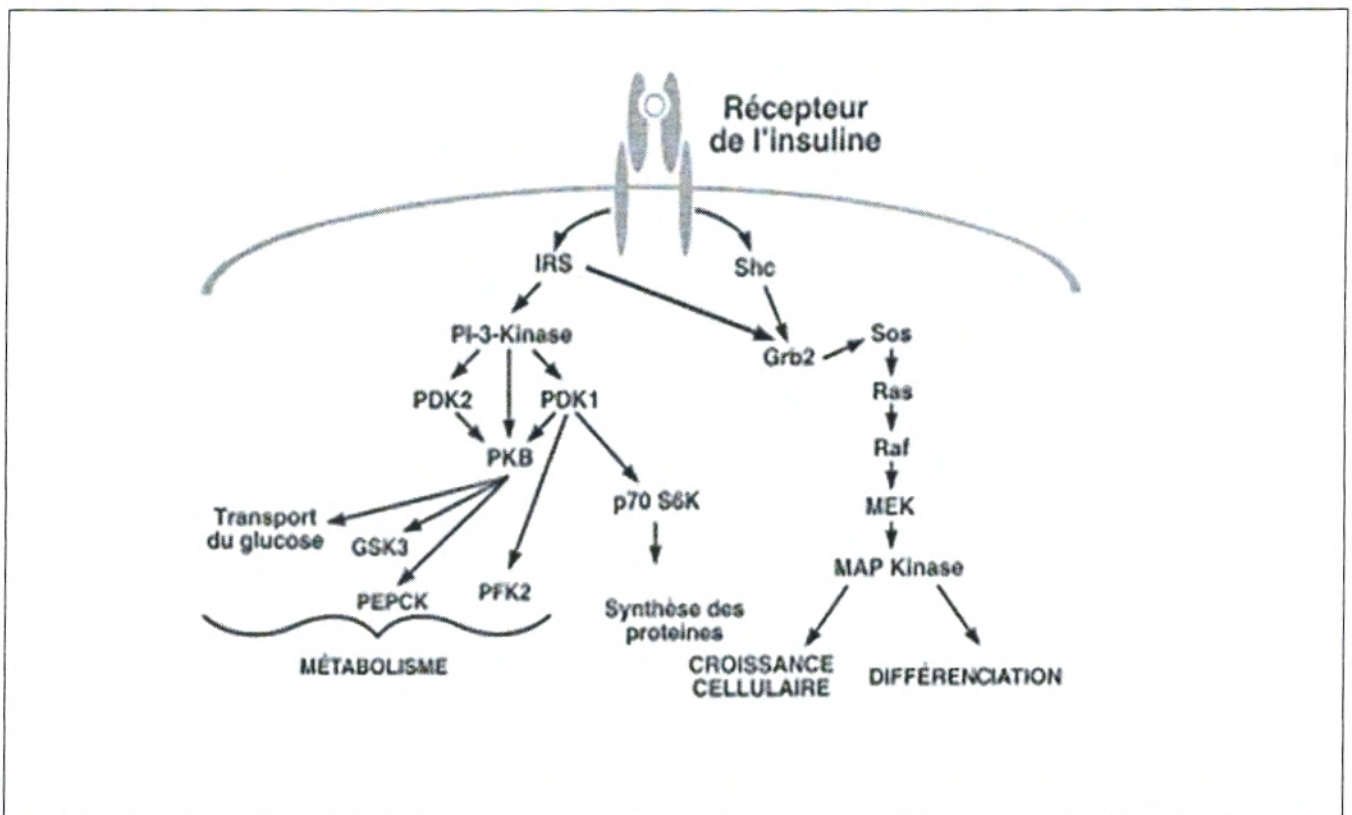


FIGURE (5) : Réseau de signalisation de l'insuline (Avruch J, 1998).

Grb2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2	PI3K : Phosphatidyl Inositol-3 Kinase
GSK-3b : Glycogène Synthase 3 Kinase b	PDK : Phosphoinositide-Dependent Protein
IRS : Insulin Receptor Substrate	PKB : Protéine Kinase B
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinases	PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase
SHC : Src Homologous and Collagen protein	SOS : Son Of Sevenless

5. Physiopathologie du Diabète de type 2

Le DT2 est une maladie complexe s'inscrivant généralement dans le cadre plus large du syndrome métabolique.

Notre compréhension actuelle de la physiopathologie du DT2 inclut la diminution de l'efficacité biologique de l'insuline vis-à-vis de ses tissus cibles (insulinorésistance) et la diminution de la capacité de la cellule β à sécréter l'hormone (**Girard J, 2003; Cerasi E et Ktorza A, 2007**).

L'importance respective de la résistance à l'insuline et de l'altération de sa sécrétion n'est pas clairement définie, ni les mécanismes, ni la physiopathologie du dysfonctionnement des cellules β ne sont clairement élucidés (**Cerasi E et Ktorza A, 2007**).

Il existe une perte de la première phase de l'insulinosécrétion, une disparition des oscillations sécrétoires, une sécrétion retardée et réduite d'insuline en réponse au repas et une augmentation de la sécrétion de pro-insuline.

Des anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles se traduisent par une diminution du captage de glucose par les muscles et par une augmentation de la production hépatique du glucose (**McGarry J D, 2002**).

Des altérations possibles vont se situer à plusieurs niveaux de la voie de signalisation de l'insuline :

- **Au niveau pré-récepteur**

Une anomalie qualitative et quantitative du signal de l'insuline, une dégradation de l'hormone, intervention de facteur antagonistes à l'insuline (anticorps anti-insuline, hormone de contre régulation) (**Wilcox G, 2005; Ravichandran L V et al, 2001; Liu Y F, Paz K et al, 2001**).

- **Au niveau récepteur**

Diminution de nombre et/ou de la concentration des récepteurs, une altération de leur affinité, une anomalie de phosphorylation de récepteur et de son activité tyrosine kinase (**Wilcox G, 2005**).

La fin du signal insulinique implique la dégradation de l'hormone après internalisation des complexes insuline-récepteurs dans les endosomes, la majorité des récepteurs est recyclée au niveau de la membrane, tandis que d'autres sont dégradés. Dans des conditions physiologiques, les récepteurs nouvellement synthétisés permettent de restaurer un nombre normal de récepteurs sur la cellule.

En présence d'une hyperinsulinémie persistante, en revanche, les cycles d'internalisation/recyclage peuvent aboutir à une diminution du nombre de récepteurs à la surface, processus de régulation négatif participant de façon secondaire à l'installation du phénotype de résistance à l'insuline (**Kido Y, Nakae J et Accili D, 2001**).

Les tyrosines phosphatases

Une anomalie de la transduction du signal se traduit par une déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur et des protéines IRS sous l'action des protéines tyrosines phosphatases (PTPases). Une augmentation de leur activité dans les muscles des patients diabétiques a été observée et participerait à la résistance de ces tissus à l'insuline (**Tanti J F et al, 2004**).

Le rôle des phosphorylations en sérine/thréonine

La phosphorylation des résidus sérine ou thréonine semble jouer, vis-à-vis du récepteur et des protéines IRS, un rôle antagoniste de celui de la phosphorylation des résidus tyrosine intervient ainsi de façon majeure dans les mécanismes de résistance à l'insuline (**Tanti J F et al, 2004**).

En situation physiologique, cette phosphorylation des résidus sérine ou thréonine permettrait de mettre fin à l'activation du récepteur, son exacerbation en pathologie ayant en revanche un rôle délétère induisant une résistance à l'hormone. Plusieurs études se sont intéressées à la phosphorylation sur sérine/thréonine des protéines IRS1 et 2 qui découplerait ces protéines du récepteur et arrêterait la transduction du signal insuline (**Le Roith D et Zick Y, 2001; Marette A, 2002; Zick Y, 2003**).

De nombreux signaux sont capables d'induire cette phosphorylation, tels le diacylglycérol, les acyl-CoA (**Liu S et Manson J E, 2001**). Des sécrétions adipocytaires comme les acides gras libres, le TNF (TNF α *tumor necrosis factor* α) ou d'autres cytokines inflammatoires comme l'interleukine 1, sont fortement impliquées dans ce type de phosphorylations inhibitrices du signal insulinique (**White M F, 2002**).



Certain enzymes sont capables de phosphoryler les IRS en serine/thréonine ; une enzyme est activée même par l'insuline, ce qui pourrait expliquer l'insulinorésistance associée aux états d'hyperinsulinisme (Lee Y H, Giraud J et White M F ; 2003).

- **Au niveau post-récepteur**

Une altération du système effecteurs de cellules cibles(en particulier le transport du glucose) ou de voies intracellulaires (activité enzymatique) (Wilcox G, 2005).

Une diminution de l'habileté de l'insuline à stimuler le transport du glucose pourrait être l'expression prédominante de la résistance à l'insuline (Zierath J R et Kawano Y, 2003). Une diminution d'expression ou d'activité de GLUT 4 dans les tissus musculaires et adipeux pourrait être envisagée pour expliquer, au moins en partie cette résistance. Ceci pourrait être la conséquence soit d'une signalisation de l'insuline défectueuse, l'hormone étant alors incapable d'activer la translocation des vésicules de GLUT4, soit d'un défaut dans le mécanisme de translocation des vésicules (Chen H S, Jia J et Su H F, 2006).

Cependant, lorsqu'on compare les sujets obèses aux patients obèses diabétiques, la clairance maximale adipocytaire du glucose baisse d'environ 70% tandis que la quantité de GLUT4 dans le tissu adipeux est réduite approximativement de 35 % (Bastard J P, 2004).

- **Mécanisme métabolique**

Les acides gras libres sont considérés (AGL) comme des facteurs importants participant à l'étiologie du diabète de type 2 (McGarry J D, 2002).

Dans les muscles et le foie ; l'élévation des acides gras libres résultant d'une lipolyse accrue en cas de résistance à l'insuline pourrait conduire à une accumulation de diacylglycérol et d'acyl-CoA inhibant ainsi le signal insulinique (notamment pour le transport du glucose dans le muscle).

Dans le tissu adipeux; les anomalies des taux d'adipocytokines, leptine et adiponectine, (hormones produit par ce tissu) aggraveraient cette accumulation en inhibant l'oxydation intramitochondriale des acides gras (Butler A E, Janson J et al, 2003).

Dans îlots de Langerhans ; L'exposition chronique de la cellule β à une concentration anormalement élevée d'acides gras conduit à des altérations morphologiques et fonctionnelles

(lipotoxicité), surtout si hyperlipidémie et hyperglycémie sont associées (gluco-lipotoxicité) (Cerasi E et Ktorza A, 2007).

L'accumulation de triglycérides est associée à de très nombreuses anomalies : diminution de l'expression du transporteur de glucose GLUT2 et de la sécrétion d'insuline (Unger R H, 2002; Prentki M, Joly E et al, 2002; Unger R H, 2003).

Les effets des AGL pourraient aussi être médités par les acyl-CoA à longue chaîne puisque ces métabolites résultant d'une mauvaise oxydation des AGL activent les canaux K⁺ ATP-dépendant ce qui hyperpolarise la cellule bêta pancréatique rendant la dépolarisation de cette cellule par le glucose plus difficile et entraînant un défaut dans la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Rohl M, Pasparakis M et al, 2004).

La culture à long-terme d'îlots humains avec de fortes concentrations de glucose augmente considérablement le taux d'apoptose (Frederici M, Hribal M et al, 2001; Maedler K, Sergeev P et al, 2002; Laybutt D R, 2007). Des données récentes ou plus anciennes, obtenues sur pancréas de patients DT2, montrent que la masse β -cellulaire est réduite d'environ 30 à 60 % chez le diabétique (Butler A E, Janson J et al, 2003).

6. Optimisation de l'action de l'insuline sur la captation du glucose des cellules en cultures

Les cellules en cultures ont permis d'approfondir nos connaissances sur la physiologie cellulaire, notamment sur la réponse des cellules vis-à-vis de leur environnement et sur les chaînes de signalisation intracellulaire.

La culture cellulaire correspond au maintien en dehors de l'organisme des cellules non organisées en tissu, capable de se diviser et d'exprimer in vitro des métabolismes et fonctions spécifiques.

Dans les dernières années du 19^{ème} siècle, Wilhelm Roux semble avoir réussi à maintenir des tissus embryonnaires en survie hors de l'organisme dans un milieu artificiel, mais pour parler réellement de culture cellulaire, il faut cependant attendre les expériences de Ross Harrison (20^{ème}) avec de petits fragments de tissus d'embryons de grenouille prélevés stérilement et placés dans de la lymphe coagulée de grenouille adulte, d'où la notion de la nécessité d'un support solide. Avec la

découverte en 1913 de la nécessité d'un extrait embryonnaire, Alexie Carrel (1873-1944) réussit à cultiver des fibroblastes. La première lignée cellulaire humaine à avoir été maintenue en culture a été la lignée de HeLa (1952) à partir de cellules d'un cancer du col de l'utérus (**Brown D, 1997**).

De nos jours des dizaines de lignées de cellules eucaryotes sont disponibles et peuvent être utilisées comme matériel d'expérimentation.

Une des principales méthodes de mise en culture est réalisée à partir d'un explant d'organe ou de tissu dont des fragments, découpés et fixés sur un support solide, baignent dans un milieu nutritif (**Thouvenot D, Billaud G et Marfin F, 2004**).

Une autre méthode consiste à soumettre les fragments d'organe ou de tissu à une digestion enzymatique en libérant les cellules de leurs connexions intercellulaires. L'enzyme la plus utilisée est la trypsine, d'où le nom de trypsination, mais d'autres enzymes peuvent convenir, comme la collagénase. Leur choix dépend du tissu à digérer (**Thouvenot D, Billaud G et Marfin F, 2004**).

Les supports pour culture cellulaire sont constitués à l'heure actuelle de matériel en polystyrène à usage unique : support statique, plaque, boîte de Pétri, flacons ou tubes roulants pour augmenter le rapport cellules/milieu et l'oxygénation du milieu (**Masters J R et al, 2000**).

On dispose des milieux de base, solutions complexes contenant sels, acides aminés, vitamines, sucres et solutions tampon (bicarbonate ou HEPES).

De tels milieux, suffisants pour la survie cellulaire, ne permettent la multiplication cellulaire que s'ils sont additionnés de diverses protéines, apportées le plus souvent par des sérums d'origine animale, hormones, facteurs de croissance et facteurs d'adhésion (**Garner C M, Hubbold L M et Chakraborti P R; 2000**).

Cependant, l'ajout de ces sérums risque d'apporter des anticorps ainsi que des virus animaux et d'autres agents infectieux contaminants. Cela a conduit au développement des milieux sans sérum qui sont définis pour un système cellulaire donné (**Kessler N et al, 1999**).

Il est impératif de travailler stérilement, d'où l'utilisation de postes de sécurité microbiologique. Les milieux sont stérilisés par microfiltration et conservés à +4°C. Lors de leur emploi, des antibiotiques

peuvent y être incorporé (Masters J R et al, 2000; Garner C M, Hubbard L M et Chakraborti P R, 2000).

La température de croissance optimale des cellules de mammifères est de 37°C et elle doit être contrôlée en permanence.

Le milieu de culture doit réguler le pH et l'osmolarité, et fournir les gaz essentiels (O₂ et CO₂). Pour les cultures réalisées en conditions non hermétiques (plaques, boîtes de Pétri). Un tampon à base de CO₂ - bicarbonate ou un tampon organique, comme l'HEPES, est utilisé pour aider à conserver le pH du milieu dans une plage comprise entre 7,0 et 7,4 suivant le type de cellules cultivées.

Des flacons à bouchons ventilés permettent, grâce à une membrane hydrophobe au niveau du bouchon, de préserver les échanges gazeux alors que le flacon reste hermétiquement bouché ; cela a l'avantage de réduire les contaminations, à la fois de la culture et de l'environnement (Brown D, 1997).

Notre partie expérimentale concerne l'étude de l'action de l'insuline sur des cellules en culture selon le protocole adopté au niveau du laboratoire, antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique.

Ce travail est dans le but de mieux comprendre l'action insulinique au niveau des tissus insulinosensibles (muscles, foie et tissus adipeux).

Nous envisageons d'étudier l'effet dose réponse sur la cinétique de consommation du glucose sous l'action de l'insuline au niveau des coupes fines de tissu adipeux isolées des rats Wistar et misent dans un milieu d'incubation. Pour ce faire, ces cellules sont supplémentées ou non en insuline et/ou en glucose à différentes doses.

Nous proposons un protocole expérimental pour :

- Mesurer la captation basale de glucose en présence des coupes du tissu adipeux dans le milieu d'incubation en absence d'insuline.
- Etudier l'effet de différentes concentrations (1, 10, 50, 100, 200 et 300 μ U/ml) d'insuline sur la captation de glucose au niveau des coupes fines de tissu adipeux isolées des rats Wistar normaux misent dans un milieu d'incubation KRBA 4% glucosé (0.54g/l) en présence durant 90minutes d'incubation.

Partie expérimentale

1. Analyse biologique

Notre étude a pour le but d'analyser l'effet dose réponse sur la cinétique de consommation du glucose sous l'action de l'insuline au niveau des coupes fines de tissu adipeux épидидymal et surrénal isolés à partir des rats wistar mâles selon la méthode de **Rodbell (1964)** très peu modifiée.

1.1. Les animaux

Dans ce travail, nous avons utilisé des rats blancs (*Rattus norvegicus*) variété *Wistar* de sexe mâle âgé de 6 mois ayant un poids de 170 à 180 g.

Les rats sont maintenus dans les conditions favorables d'élevage (au niveau de l'animalerie du département de biologie, faculté des sciences, université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen) ; température (25 à 30°C), taux d'humidité entre 60 et 70% et une photopériode de 12 heures le jour et 12 heures la nuit.

Ces animaux sont nourris avec un aliment complet sous forme de granulés fabriqués par l'O.N.A.B. Remchi Wilaya Tlemcen. Il est composé de maïs, tourteaux de soja, issus de meunerie, plus un complexe minéralo- vitaminiques.

L'eau et l'aliment leur sont fournis ad libitum.

1.2. Préparation du milieu d'incubation KRBA

KRBA (Krebs-Ringer Bicarbonaté Albuminé) est constitué des solutions mères isotoniques au sérum, qui va être utilisé comme milieu d'incubation pour les coupes de tissu adipeux isolés.

Ce milieu est préparé à partir du KRB (Krebs-Ringer Bicarbonaté) à pH 7.4 et de l'albumine Bovine.

Le KRB est conservé à 4°C.

Tableau 1: Préparation du KRB

N°	Solutions mères isotoniques au sérum	Concentration [M]	Concentration [g/L]	Volume nécessaire (ml)
01	Na Cl	0.154	9	1000
02	Ca Cl ₂	0.110	12.2	15
03	K Cl	0.154	11.5	40
04	KH ₂ PO ₄	0.154	21.1	10
05	MgSO ₄	0.154	38.2	10
06	NaHCO ₃	0.150	13	210

On prépare à partir du KRBA 4%; le KRBA 4% glucosé à 0,54 g/l (3mM).

Le KRBA 4% est utilisé comme milieu d'incubation de nos coupes de tissu adipeux, tandis que le KRBA 1% est utilisé juste pour le lavage.

1.3. Isolement des adipocytes de rats

✓ Les rats et dissection

Nous avons utilisé 05 rats Wistar mâles âgés de 6 mois ayant un poids moyen de 175 g.

Ils sont sacrifiés et disséqués.

✓ Récupération de tissu adipeux et lavage

Le tissu adipeux épидидymal et surrénale est rapidement prélevé, déposé dans une boîte de pétri en polyéthylène contenant du sérum physiologique, nettoyé des vaisseaux sanguins et caillot de sang et puis pesé et découpé en petits morceaux sous forme de coupes très fines.

Les coupes sont lavées 2 à 3 fois avec le KRBA 1%.

1.4. Incubation des adipocytes

Les coupes sont mises à incuber dans différents intervalles de temps (30min, 45min, 60min et 90min) à 37°C sous agitation dans des boîtes de culture cellulaire en polyéthylène.

Dans chaque puits, nous avons une masse définie de coupes de tissu (0.6g) avec 2 ml de KRBA 4% contenant du glucose 3mM (0.54g/l).

Des différentes concentrations d'insuline sont ajoutées aux puits expérimentaux. (**Tableau 2**)

➤ *Remarque :*

L'insuline utilisée est une solution d'insuline humaine bio synthétique à 100UI/ml (Actrapide HM, MOVO Nordisk).

Deux témoins sont utilisés :

- ✓ Le milieu d'incubation KRBA 4% contenant du glucose 3mM est incubé en absence des coupes de tissu adipeux et de l'insuline.
- ✓ Le milieu d'incubation KRBA 4% contenant du glucose 3mM est incubé en présence des coupes de tissu adipeux et en absence d'insuline.

Tableau 2 : Concentrations d'insuline ajoutées au milieu d'incubation.

	Concentrations	KRBA4%+ Glucose 3mM (ml)	Masse de coupes de tissu adipeux (g)
Témoins		2	0.6
		2	
Insuline	1 μ UI/ml	2	
	10 μ UI/ml	2	
	50 μ UI/ml	2	
	100 μ UI/ml	2	
	200 μ UI/ml	2	
	300 μ UI/ml	2	

1.5. Prélèvement des puits

Après chaque intervalle de temps proposé (30min, 45min, 60min et 90min) l'incubation est stoppée, on prélève rapidement à partir du contenu de chaque puits 10 μ l pour le dosage de glucose restant dans le milieu d'incubation.

1.6. Dosage enzymatique du glucose

Le dosage du glucose restant dans les milieux d'incubation précédemment prélevés se fait à l'aide d'un Kit de dosage enzymatique selon la méthode de **Trinder [1969]**.

Le dosage de glucose est fait en triplicates à chaque temps d'incubation.

✓ Principe

En présence de glucose-oxydase (**GOD**), le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de peroxyde (**POD**) et phénol, oxyde un chromogène (4-aminoantipyrine) incolore en un colorant rouge à structure quinoneimie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de glucose.

- $\text{Glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Gluconate} + \text{H}_2\text{O}_2$
- $2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Amino-4 antiipyrine} + \text{phénol} \xrightarrow{\text{POD}} \text{monoamino-p-benzoquinone-4-phenazone} + 4\text{H}_2\text{O}$

Réactif1 : Etalon de glucose à 1g/l.

Réactif2 : solution phénolique.

Réactif3 : Enzyme + amino-4-antipyrine + tampon phosphate 0.1M.

✓ **Solution de travail**

Dans une fiole de 500 ml, on verse le contenu du réactif 3, on ajoute 100ml d'eau distillée. Puis on rince le flacon. On ajoute le contenu du flacon2. On rince le flacon2. En fin on complète à 500 ml avec l'eau distillée. La solution du travail est stable un mois à -4°C.

✓ **Méthode de dosage**

	Blanc	Etalon	Dosage
Solution du travail	2 ml	2ml	2ml
Sérum		10µl	10µl

On mélange, et on attend 20 mn à température ambiante. Puis on lit la densité optique de dosage à 520 nm (D_0D) contre la densité optique de l'étalon (D_0E).

✓ **Calcul :**

$$\text{Taux de glucose} = (D_0 D / D_0 E) \times 1g/l$$

Les teneurs en glucose sont exprimées en g/l.



2. Analyse statistique

Les calculs statistiques sont souvent utiles aux biologistes pour la détermination des valeurs normales ou plus exactement des valeurs de référence. Comme pour l'évaluation de précision et l'exactitude d'analyse.

2.1. La moyenne

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_i x_i$$

2.2. La variance

$$V_x = \frac{1}{n} \sum_i (x_i - \bar{x})^2$$

2.3. L'écart-type

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

2.4. L'erreur standard de la moyenne (S_m)

$$S_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

2.5. Test de Student

Dans les études biologiques il est important de savoir si deux échantillons d'individus ou encore deux ou plusieurs séries de résultats d'expériences ou d'observations doivent être considérés comme réellement différents. On a impliqué ce test à but pour comparer deux moyennes

- En cas de petits échantillons (n_1 et/ou $n_2 < 30$)

Comme notre cas on a 4 rats dans chaque lot, on applique cette loi ; Dans un premier temps on calcule la variance commune comme suit :

$$\sigma^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 = \frac{\sum (x - m_1)^2 + \sum (x - m_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \Leftrightarrow \sigma^2 = \frac{n_1 \sigma_1^2 + n_2 \sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

- Dans ces conditions. La variance standard de la différence des moyennes est :

$$S_d^2 = \sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]$$

Pour comparer les deux moyennes on applique le teste de Student, à ν degrés de liberté qui dépend de la taille de l'échantillon :

$$\nu = d.l.l = n_1 + n_2 - 2$$

$$t_e = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

Si le t calculé ou expérimentale est plus élevé que t_ν de la table de Student, la différence entre les moyennes des deux échantillons est significative [Schwartz D, 1992 ; Amotte M, 1971].

La valeur de « t » nous donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

- Peu significative : $P < 0.05$ (*) ;
- Significative : $P < 0.01$ (**) ;
- Très significative : $P < 0.001$ (***) ;
- Hautement Significative : $P < 0.0001$ (****).

1. Captation du glucose par les adipocytes isolées

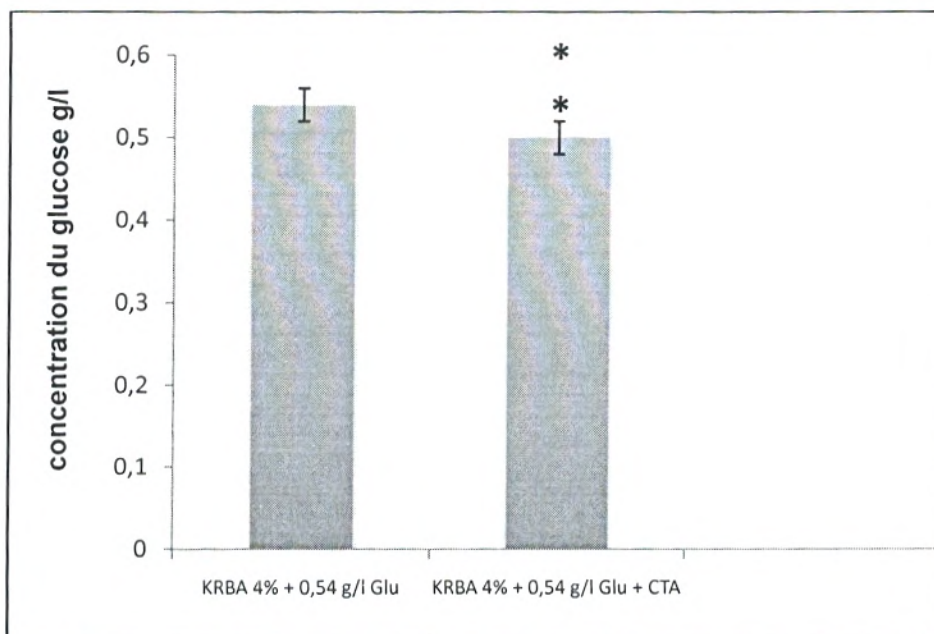
Cette étude est réalisée, *in vitro*, sur des coupes fines de tissu adipeux isolées à partir de rat mâle.

L'effet de la captation ou consommation du glucose par les coupes de tissu isolé a été évalué en absence ou en présence d'insuline à des concentrations et temps d'incubation variables.

2. Consommation basale du glucose

La figure 06 présente la concentration de glucose restant dans le milieu d'incubation (KRBA 4% avec 3 mM du glucose: état physiologique normal), en absence et en présence des coupes de tissu adipeux incubées pendant 90minutes. Ces essais nous ont permis de vérifier le bon état métabolique de nos cellules isolées.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($P < 0.01$) du glucose restant dans le milieu d'incubation en présence des coupes de tissu par rapport au témoin (milieu d'incubation avec 3 mM du glucose en absence des coupes), ce qui montre que les adipocytes ont une consommation basale du glucose relativement importante, qui peut se faire en absence d'insuline de l'ordre de 7.40%, soit 0.04 g/l.



CTA : coupes de tissu adipeux.

Glu : Glucose

* : degré signification des résultats par rapport au milieu KRBA 4% + 0.54 g/l Glu

FIGURE 06 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0.54g/l du glucose en absence et en présence des coupes de tissu adipeux et en absence d'insuline.

3. Effet d'insuline sur la captation du glucose par les adipocytes

Tableau 3 : Captation du glucose au niveau des coupes de tissu adipeux en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA 4% + glu 0.54g/l durant 90min.

[Insuline μUI/ml]	[glucose restant dans le milieu après incubation g/l] +SEM					[glucose capté par les adipocytes g/l]				
	T ₀	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₉₀	T ₀	T ₃₀	T ₄₅	T ₆₀	T ₉₀
1	0.540	0.520	0.520	0.510	0.510	0.000	0.020	0.020	0.030	0.030
	±0.02	±0.02	±0.03	±0.02	±0.05	0%	3.70%	3.70%	5.55%	5.55%
10	0.540	0.520	0.520	0.500	0.500	0.000	0.020	0.020	0.040	0.040
	±0.01	±0.03	±0.03	±0.02	±0.04	0%	3.70%	3.70%	7.40%	7.40%
50	0.540	0.500	0.490	0.490	0.490	0.000	0.040	0.050	0.050	0.050
	±0.01	±0.03	±0.02	±0.02	±0.05	0%	7.40%	9.25%	9.25%	9.25%
100	0.540	0.480	0.470	0.460	0.470	0.000	0.060	0.070	0.080	0.070
	±0.01	±0.03	±0.04	±0.03	±0.05	0%	11.11%	12.96%	14.81%	12.96%
200	0.540	0.480	0.470	0.450	0.470	0.000	0.060	0.070	0.090	0.070
	±0.02	±0.02	±0.04	±0.05	±0.04	0%	11.11%	12.96%	16.66%	12.96%
300	0.540	0.470	0.460	0.450	0.470	0.000	0.070	0.080	0.090	0.070
	±0.01	±0.03	±0.02	±0.03	±0.06	0%	12.96%	14.81%	16.66%	12.96%

SEM : Erreur standard du moyen

Les résultats obtenus en faisant varier la concentration de l'insuline, en maintenant la concentration de glucose de l'ordre de 0.54 g/l et celles des coupes de tissu adipeux à 0.6g, sont représentés sur les figures 7, 8, et 9.

Sur la base des résultats **des figures 7, 8 et 9** résultant de l'addition d'insuline à une concentration de 1 μ U/ml, 10 μ U/ml et 50 μ U/ml ; la diminution de concentration de glucose restant dans le milieu est non significative durant 90 minutes d'incubation à 37° C..

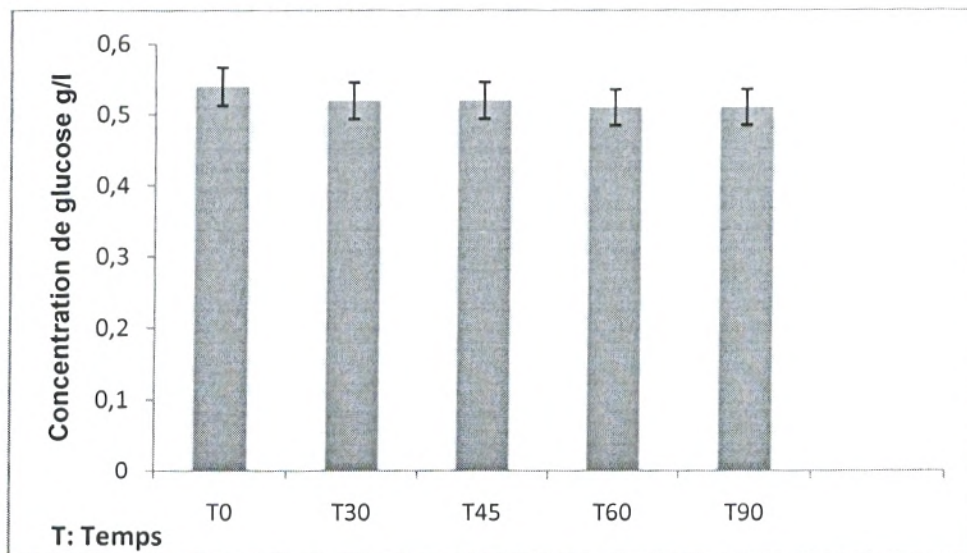


FIGURE 07 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 1 μ U/ml d'insuline.

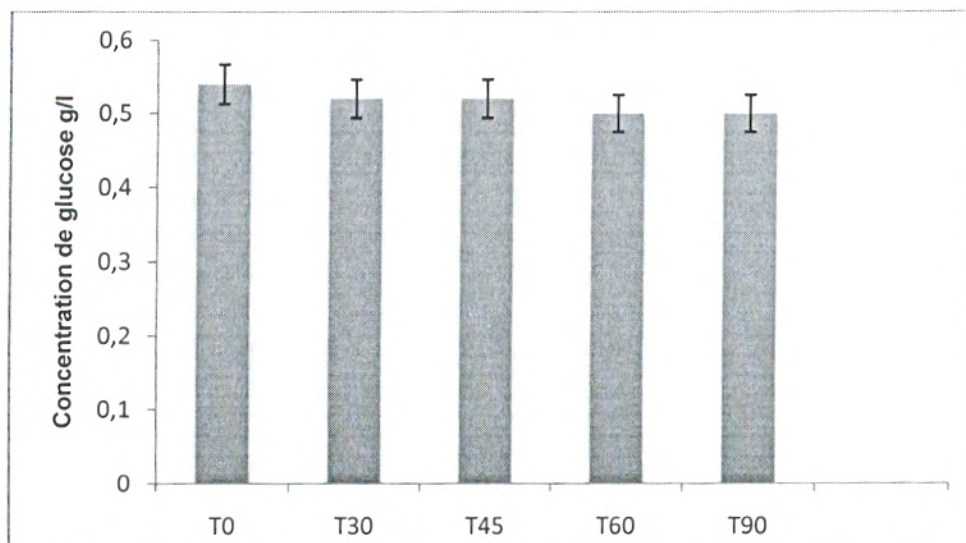


FIGURE 08 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 10 μ U/ml d'insuline.

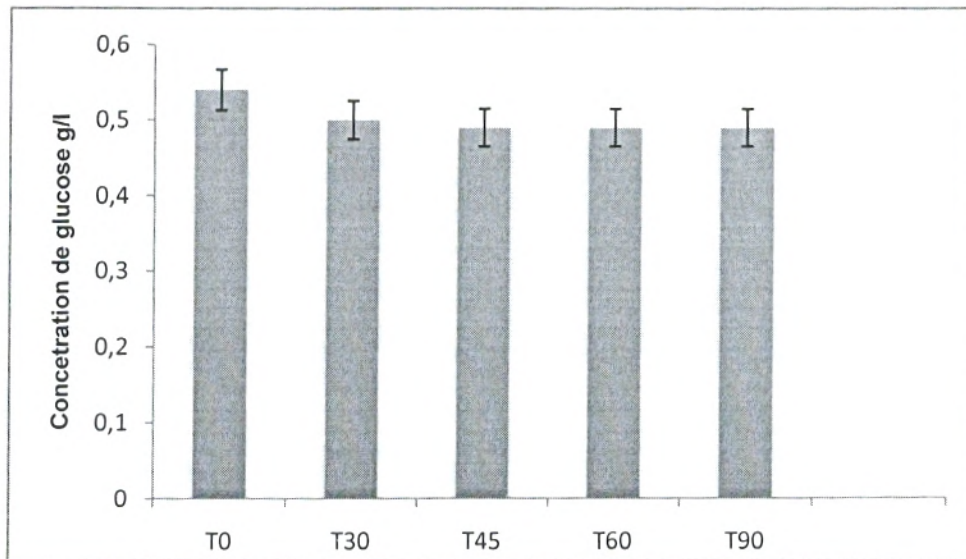
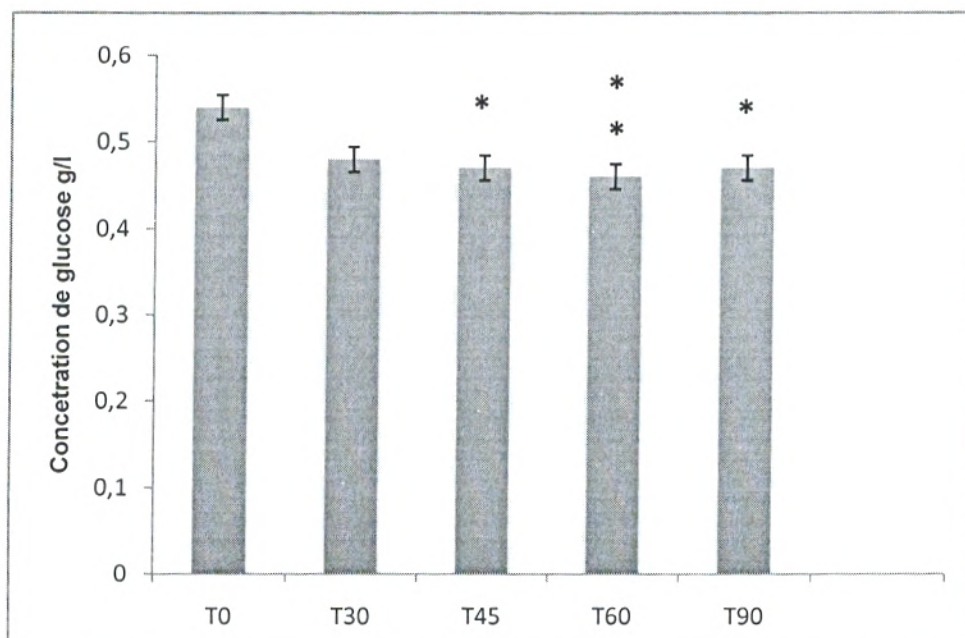


FIGURE 09 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 50 μ U/ml d'insuline.

La figure 10 représente les résultats notés après l'addition de 100 μ U/ml de l'insuline. Cette concentration est capable d'induire une captation significative ($p < 0.01$) soit de 14.81% pendant 60 minutes d'incubation par apport au milieu en présence des coupes de tissu et en absence d'insuline.



* : degré signification des résultats par rapport au milieu KRBA 4% + 0.54 g/l Glu + CTA.

FIGURE 10 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de 100 μ U/ml d'insuline.

Après 60 minutes d'incubation des coupes du tissu, on remarque qu'on en présence d'insuline à $200\mu\text{U/ml}$ ou bien à $300\mu\text{U/ml}$ la cinétique d'entrée du glucose est modifiée de manière très significative ($p < 0.001$) de l'ordre de 16.66% par rapport au témoin (KRBA 4% + 0.54 g/l Glu +CTA). (Figure 11 et 12).

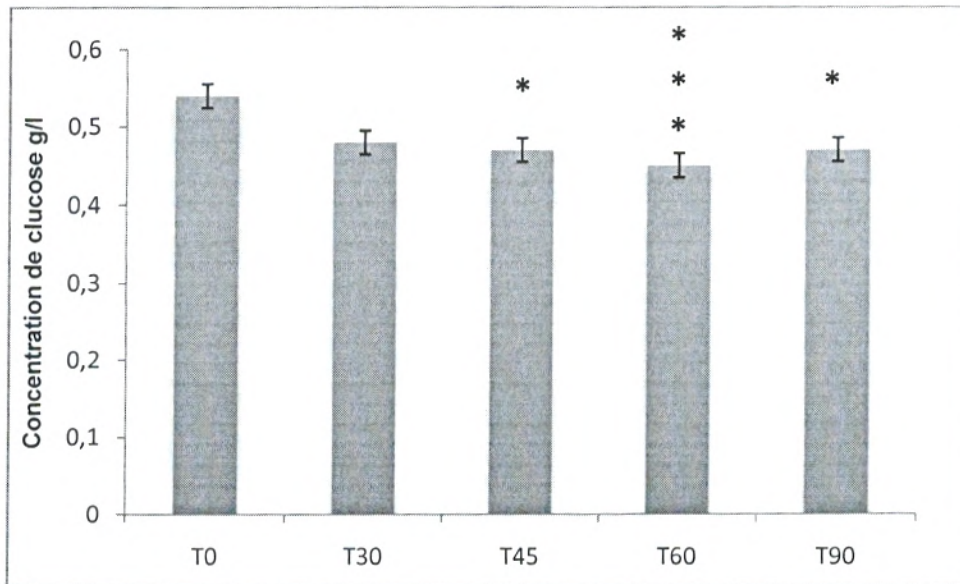


FIGURE 11 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de $200\mu\text{U/ml}$ d'insuline.

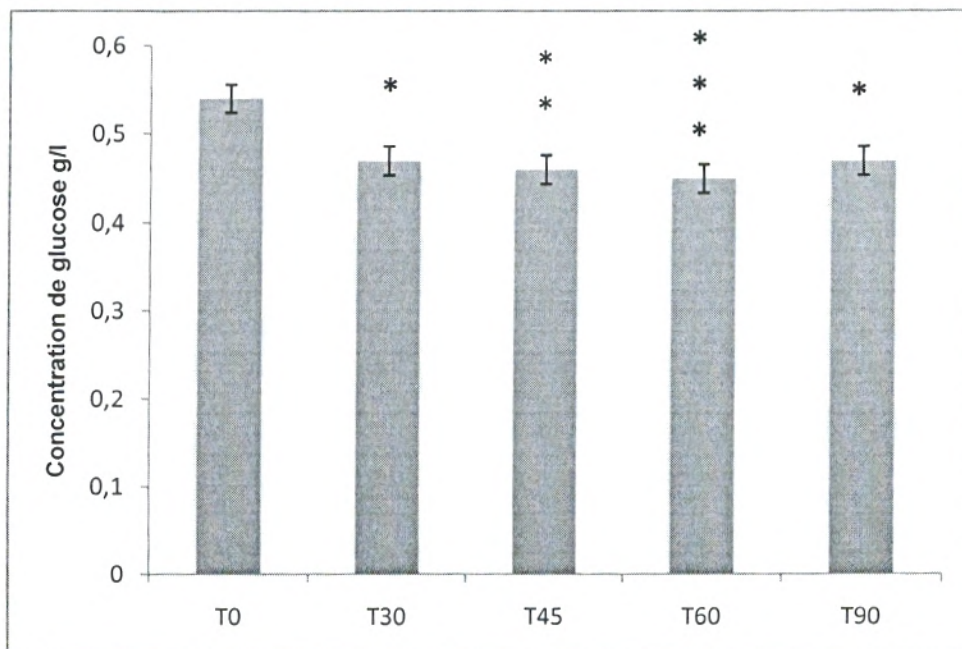


FIGURE 12 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de $300\mu\text{U/ml}$ d'insuline.

La figure 13 montre la captation du glucose restant dans le milieu d'incubation à 0.54 g/l en présence d'insuline de 1 à 300 μ U/ml pendant 90minutes.

On peut conclure que la consommation du glucose extracellulaire augmente proportionnellement avec la concentration d'insuline dans le milieu, pour devenir constante à partir de 200 μ U/ml. Ce qui confirme que l'insuline active la pénétration du glucose dans les adipocytes.

Cette augmentation est très significative ($p < 0.001$) à la concentration 200 et 300 μ UI/ml durant 60min; soit de 16.66% par rapport au milieu contenant des coupes de tissu adipeux incubés avec 0.54g/l du glucose en absence d'insuline.

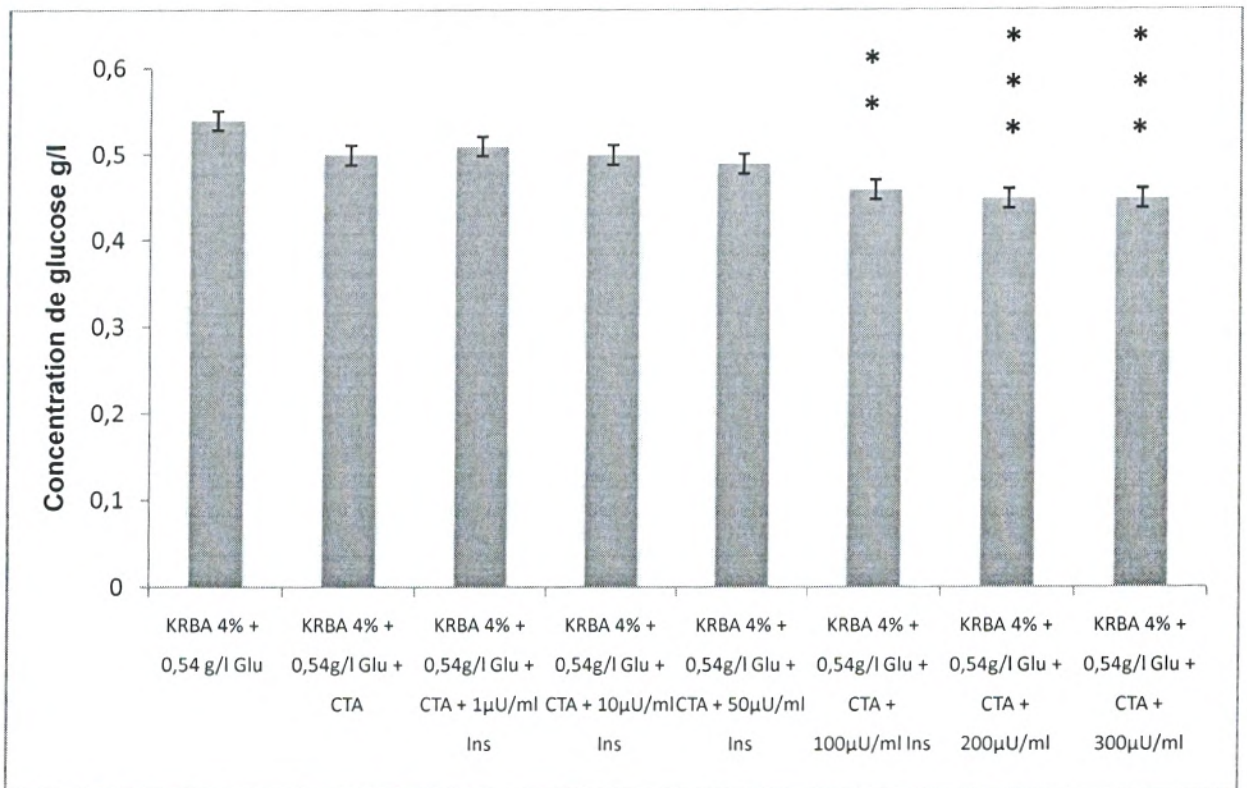


FIGURE 13 : Concentration du glucose restant dans le milieu d'incubation avec 0,54g/l du glucose en présence de différentes concentrations d'insuline pendant 60min.



L'effet de la captation du glucose sous l'action de l'insuline sur des coupes de tissu adipeux a été analysé selon le protocole adopté au niveau du laboratoire, antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activité biologique.

Cette étude réalisée *in vitro* sur des coupes de tissu adipeux épидидymal et surrénal isolées du tissu du rats wistar mâles normaux misent dans un milieu d'incubation KRBA 4% glucosé (0.54g/l) en présence de différentes concentrations (1, 10, 50, 100, 200 et 300 μ U/ml) d'insuline durant 90minutes d'incubation à 37 ° C.

Les résultats des analyses biologiques *in vitro* que nous avons obtenues sont comme suit :

En absence d'insuline :

On observe une diminution significative du glucose restant dans le milieu d'incubation en présence des coupes de tissu de l'ordre de **7.40%**, soit **0.04 g/l** par rapport au témoin (milieu d'incubation avec 3 mM du glucose en absence des coupes). (**Figure 06**)

Ces résultats obtenus montrent que les adipocytes ont une consommation basale du glucose relativement importante, qui peut se faire en absence d'insuline. Cette diminution est probablement liée au transport basal de glucose non insulino-dépendant.

Dans les conditions basales et en absence d'insuline, seul les transporteurs GLUT1 avec un Km de 1 à 2Mm, localisés au niveau de la membrane plasmique des adipocytes, assurant l'entrée du glucose nécessaire au métabolisme (**Ducluzeau et al, 2002; Antonescu C N et al, 2008; Vassilopoulos S et al, 2010**)

En présence d'insuline :

On a noté que, la consommation du glucose restant augmente proportionnellement à la concentration d'insuline dans le milieu d'incubation de 1 à 300 μ UI/ml. Cette augmentation est très significative ($p < 0.001$) à la concentration 200 et 300 μ UI/ml durant 60min; soit de 16.66% par rapport au milieu contenant des coupes de tissu adipeux incubés durant 90min avec 0.54g/l du glucose en absence d'insuline. (**Figure 13**), cependant à des concentrations inférieures à 50 μ U/ml est quasi nulle.

Cette diminution est liée à l'effet de l'insuline sur la pénétration du glucose dans les adipocytes. Cette captation est due à la présence de nombreux transporteurs spécifiques, GLUT4 localisés dans

des vésicules intracellulaires contrôlée par l'insuline (insulino-sensible) avec un Km de 3 à 5Mm (**LE Marchard-Brustel, 1999**).

A la lumière de certains travaux qui ont été réalisés au niveau de notre laboratoire nous représentons les résultats suivants :

Azzi Rachid en 2007, a noté que l'insuline active la pénétration du glucose dans les adipocytes isolées du tissu épидидymal des rats mâles en présence des différentes concentrations d'insulines dans un milieu d'incubation KRBA 4% + 0.45g/l de glucose durant 1h.

Il a été constaté une diminution très significative du glucose restant dans le milieu d'incubation en présence des adipocytes par rapport au témoin (milieu d'incubation avec 2.5mM glucose en absence des adipocytes), ce qui montre que les adipocytes ont une consommation basale du glucose relativement importante, qui peut se faire en absence d'insuline de l'ordre de 9%, soit 0.04 g/l.

Dans le milieu d'incubation en présence de 10 à 1000 μ UI/ml d'insuline, il a montré que la consommation du glucose restant augmente proportionnellement à la concentration d'insuline. Cette augmentation est hautement significative ($p < 0.0001$) à la concentration 500 et 1000 μ UI/ml soit 17.32 et 34.65ng/ml avec un taux de captation de 17.1 et 14.6% respectivement par rapport au milieu contenant des adipocytes incubés durant 1h avec 0.45g/l du glucose en absence d'insuline.

Toul F en 2009, a noté une captation basale en glucose très significative dans un milieu d'incubation (KRBA 4% + 0.54g/l) en présence des adipocytes isolées des rats wistar et en absence d'insuline qui est de l'ordre de 0.05g/l.

De même, les adipocytes incubés à différentes concentrations d'insuline (100, 500 et 1000 μ U/ml) et à différents temps (30, 1 et 2h), montrent une augmentation de la captation de glucose avec un taux de 16.66% pour une concentration d'insuline de 100 et 500 μ U/ml et a été maximale (22.22%) à la concentration de 1000 μ U/ml durant 1h.

Après incubation des adipocytes isolées des rats wistar males et femelles dans un milieu d'incubation KRBA 4% + 0.54 g/l pendant 1h30min, **Mazari K et Khelefaoui Z** ont obtenu une diminution significative ($p < 0.01$) de la concentration du glucose en absence d'insuline.

En présence de différentes concentrations de 10 à 1000 μ U/l d'insuline, une augmentation de la consommation du glucose restant dans le milieu d'incubation a été constatée. Le taux de captation obtenue est significatif à 100, 500 et 1000 μ U/ml.

Galton et Fain en 1966 ont observé une augmentation du métabolisme du glucose dans des adipocytes isolées après 4h d'incubation en présence d'insuline ; ainsi que ceux de **Kuroda et al**, 1987.

Conclusion générale

A la lumière des résultats préliminaires obtenus, nous pouvons conclure que certaines concentrations d'insuline stimuleraient la captation du glucose au niveau des coupes de tissu adipeux isolées des rats wistar, incubés dans un milieu KBRA 4% glucosé (0.54g/l) pendant 90 minutes à 37°C.

Les adipocytes ont une capacité de capter le glucose indépendamment de la présence d'insuline et est une consommation relativement importante de l'ordre de 0.04g/l.

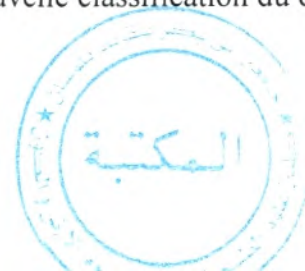
La captation est proportionnelle à la concentration d'insuline ajoutée au milieu. Le taux de captation de glucose est de l'ordre de 0.09 g/l (16.66%) en présence de 200µU/ml ou de 300µU/ml pendant 60 minutes d'incubation par rapport au témoin.

Ces résultats mériteraient d'être approfondis, des travaux complémentaires seraient nécessaires tels que :

- ❖ Estimer la quantité active (UI) d'insuline sur le nombre connu (N) de cellules isolées du tissu cible à différentes concentrations de glucose en fonction du temps.
- ❖ Étude *in vitro* sur des coupes ou de suspensions cellulaires isolées à partir des rats diabétiques et/ou obèses.
- ❖ Caractériser d'autres paramètres pouvons influencer en plus de glucose la captation tissulaire comme le cas acides gras
- ❖ Étude *in vitro* de l'action stimulatrice de l'insuline au niveau des coupes ou de suspensions cellulaires issus du tissu musculaires.
- ❖ Étude similaire *in vivo* pour faire le dosage d'autres paramètres plasmatiques.

Références bibliographiques

01. **Aguilar B L, Bryan J et Nakazaki M; 2001.** Of mice and men: K (ATP) channels and insulin secretion. *Recent Prog Horm Res*; 56: 47-68.
02. **Amotte M; 1971.** Initiation aux méthodes statistiques en biologie 2^{ème} edit. Paris ; Masson et Cie.
03. **Annicotte J S; 2004.** Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de transcription E2F1. Thèse de Doctorat en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, l'Université Strasbourg 1 (Louis Pasteur) : 31-55.
04. **Antonescu C N, Diaz M, Femia G, Planas JV et Klip A; 2008.** Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts: regulation by mitochondrial uncoupling; 9: 1173-90.
05. **Avruch J; 1998.** Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem*; 182 : 31-48.
06. **AZZI Rachid, 2007,** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques des alcaloïdes et glycosides cucurbitacines extraits des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat rendu diabétique par la Streptozotocine. Mémoire de magister en Biologie Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
07. **Bastard J P ; 2004.** Résistance à l'insuline et expression des gènes du tissu adipeux chez l'homme. *Ann Biol Clin*; 62 (1): 25-30.
08. **Bataille D, Endosulfin N; 2000.** Regulators of insulin secretion. *Drug News Perspect*; 13: 453-62.
09. **Bose A, Guilherme A et Robida S I; 2002.** Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature*; 420: 821-4.
10. **Brown; 1997.** Threat to humans from virus infections of non-human primates. *Rev Med Virol*; 7 : 239-46.
11. **Bryant N J, Govers R et James D E; 2002.** Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:267-77.
12. **Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S et al; 2003.** β -cell deficit and increased β - cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*; 52 : 102-10.
13. **Buyschaert M et Hermans M P; 1998.** Critères révisés et nouvelle classification du diabète sucré. *Louvin MED*; 117: 1-6.



14. **Capeau, 1994.** Transport du glucose la cellule : physiologie et pathologie, métabolisme des glucides et des méthodes d'exploration chez l'homme.nut. 10-361-A-10.
15. **Capeau J; 2003.** Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance. *Med Sci (Paris)*; 19 (8-9): 834-839.
16. **Capeau J; 2003.** Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance » *M/S : médecine sciences*, vol. 19, n° 8-9 p. 834-839.
17. **Carling D; 2004.** The AMP-activated protein kinase cascade; unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18-24.
18. **Cerasi E et Ktorza A; 2007.** Plasticité anatomique et fonctionnelle des cellules béta du pancréas endocrine et diabète de type; 23 : 885-94 *M/S n° 10*, vol. 23.
19. **Chen H S, Jia J, Su H F et al; 2006.** Down regulation of the constitutively expressed Hsc70 in diabetic myocardium is mediated by insulin deficiency. *J Endocrinol*; 190: 433-40.
20. **Cozma L S, Luzio S D, Dunseath G J, Langendorg K W, Pieber T et Owens David R; 2002.** Comparison of the effects of three insulinotropic drugs on plasma insulin levels after a standard meal. *ISSN 0149-5992; Vol: 25; No. 8.*
21. **Cruz Martha L, Bergman Richard N et Goran Michael I; 2002.** Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *ISSN 0149-5992; Vol: 25; No. 9.*
22. **Delgado H, Lehmann T, Bobbioni-Harsch E, Ybarra J et Golay A; 2002.** Acarbose improves indirectly both insulin resistance and secretion in obese type 2 diabetic patients ; *ISSN 1262-3636; France; Da. 2002; Vol. 28; No. 3.*
23. **Ducluzeau P H, Fletcher L M, Vidal H, Laville M et Tavaré J M; 2002.** Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabetes Metab (Paris)*;28, 85-92.
24. **Fernandez R J, Pugeat Michel et Emptoz-Bonneton Agnés ; 2001.** Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance. *ISSN 0026-0495; Etats-Unis; Da; Vol. 50; No. 10.*
25. **Ferré P; 2005.** Action et sécrétion de l'insuline Double jeu pour les canaux potassiques ; *M/S n° 8-9*, vol. 2.
26. **Ferre F, Birnbaum P et al; 2004.** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus . *Nature* 428:569-574.

27. **Frasca F, Pandini G, Scalia P, et al; 1999.** Insulin receptor isoform A, a newly recognized , high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*; 19: 3278-88.
28. **Frederici M, Hribal M, Perego L et al; 2001.** High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program; 50: 1290-301.
29. **Fryer L G, Hajduch E, Rencurel F, Salt I P, Hundal H S, Hardie D G and Carling D; 2000.** Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes* 49:1978-1985.
30. **Furtado L M, Somwar R, Sweeney G, Niu W and Klip A; 2002.** Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol*; 80:569-578.
31. **Garner C M, Hubbard L M et Chakraborti P R; 2000.** Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci*; 57: 295-301.
32. **Girard J; 2003.** Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline: mécanismes de la lipotoxicité; 19 : 827-33 ; M/S n° 8-9, vol : 19.
33. **Giusti V; 2002.** Obésité, surpoids et alimentation: Diabète et syndrome métabolique. ISSN 0035-3655; Suisse; Vol. 122; No. 5.
34. **Gulton et Fain, 1966.**effets of prolonged incubation of isilated fat cells on their reponse to hormones stimulating lipolysis andglucose .métabolism biochem 98-575.
35. **Halban P; 2002.** Insulinothérapie par les cellules bêta; Vol.47; No. 4.
36. **Harjutsalo V, Sjöberg L et Tuomilehto J; 2008.** Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*; 371: 1777-82.
37. **Henquin J C; 2004.** Pathways in b-cell stimulus secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues; 53(suppl3):S48–58.
38. **Jansson P A, Eliasson B, Lindmark S et Eriksson J W; 2002.** Endocrine abnormalities in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes patients: potential role of steroid hormones and leptin in the development of insulin resistance; ISSN 0014-2972; Royaume-Uni; Da; Vol. 32; No.
39. **Joost H G et Thorens B; 2001.** The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*; 18:247-256.
40. **Karp G; 1996.** Cell and Molecular Biology: concepts and experiment. Edit. DeBoek University US: 669-671.

41. **Kessler N, Thomas-Roche G, Gérentes L et Aymard M; 1999.** Suitability of MDCK cells grown in a serum-free medium for Influenza production. *Dev Biol Stand*; 98: 13-21.
42. **Kido Y, Nakae J et Accili D; 2001.** The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 972-9.
43. **Klaman L D, Boss O, Peroni O D, Kim J K, Martino J L, Zabolotny J M, Moghal N, Lubkin M, Kim Y B, Sharpe A H, et al; 2000.** Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*; 20:5479-5489.
44. **Koistinen H A, Chibalin AV et Zierath J R; 2003.** Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients; 46:1324-1328.
45. **Korytkowski M, Thomas A, Reid L, Tedesco M B, Gooding W E et Gerich J; 2002.** Glimepiride improves both first and second phases of insulin secretion in type 2 diabetes. *ISSN 0149-5992; Vol. 25; No. 9.*
46. **Laybutt D R, Preston A M, Akerfeldt M C, et al; 2007.** Endoplasmic reticulum stress contributes to beta-cell apoptosis in type 2 diabetes; 50: 752-63.
47. **Le diabète au Canada : Rapport du Système national de surveillance du diabète.** No de cat : H49-121/2002F ; ISBN 0-662-88134-6.
47. **Le diabète au Canada : Rapport du Système national de surveillance du diabète, 2009 .Cat. :** HP32-2/1-2009 ; ISBN : 978-1-100-50509-1.
48. **LE Marchard-Brustel Y, 1999.** Molecular mechanisms of insulin action in normal and insulin resistant. . *Exp. clin Endocrinologie* 107:126-132.
49. **Le Roith D et Zick Y; 2001.** Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance; 24: 588-97.
50. **Lee Y H, Giraud J, Davis R J et White M F; 2003.** C-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*; 278: 2896- 2902.
51. **Liu Y F, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson S R, Ohba M, Kuroki T, Le Roith D et Zick Y; 2001.** Insulin stimulates PKC –mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem*; 276:14459-14465.
52. **Liu S et Manson J E; 2001.** Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*; 12:395-404.

- 53. Maechler P et Wollheim C B; 2000.** Mitochondrial signals in glucose stimulated insulin secretion in the beta cell. *J Physiol*; 529(Pt1):49–56.
- 54. Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al; 2002.** Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J ClinInvest*; 110: 851-60.
- 55. Magnan C et Ktorza A; 2005.** Production et sécrétion de l'insuline par la cellule béta pancréatique; 2 (2005) 241–264.
- 56. Manuel D G et Schultz S E; 2004.** Health-related quality of life and health-adjusted life expectancy of people with diabetes in Ontario; 27: 407-14.
- 57. Marette A; 2002.** Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 5:377-383.
- 58. Marie-Luce Guillermin Spahr ; 2004.** Facteurs prédictifs d'une intolérance au glucose après un diabète gestationnel. Thèse Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine, Présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève : 4-9.
- 59. Masters J R, Thomson J A, Daly-Burns B et al; 2001.** Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 8012-7.
- 60. Mazari Khadidja et Khelefaoui Zahéra, 2005.** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques d'extrait brut des alcaloïdes des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des adipocytes ésoles des rats wistar Mémoire de master en Biologie, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
- 61. McGarry J D; 2002.** Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*; 51: 7-18.
- 62. Minokoshi Y, Kahn C R, Kahn B B; 2003.** Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem*; 278:33609-33612.
- 63. Minokoshi, Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y B, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al; 2002.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*; 8:1288-1295.
- 64. Mohammed I H, Beyan H, Buckley Lisa R, Leslie R D et Bartsocas C S; 2002.** Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. ISSN 0148-7299; Vol. 115; No. 1.

65. **Orban J C, Ichai C; 2008.** Complications métaboliques aiguës du diabète. *Réanimation Urgences*; 17: 761-7.
66. **Orban J C, Ghaddab A, Chatti O et Ichai C; 2006.** Acidose lactique et metformine. *Ann Fr Anesth Réanim*; 25: 1046-52.
67. **Perlemuter L, Sélam J L et Collin G; 2003.** Diabète et maladies métaboliques. ISBN ; 2-294-01047-7.
68. **Pinget M et Boullu-Sanchis S; 2002.** Les bases physiologiques des troubles de l'insulinosecretion diabètes et métabolisme (Paris);28: 4S21-4S32.
70. **Portha B; 2003.** Anomalies programmées de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2:le paradigme du rat GK; 19 : 847-53 71183 847-853 Page 847.
71. **Prentki M, Joly E, El-Assaad W et Roduit R; 2002.** Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning , and glucolipototoxicity: role in béta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes; 51 (suppl3): S405-13.
72. **Prudhomme M F; 2008.** Diabétologie endocrinologie métabolisme. ISBN 978-2-224-02870-1
73. **Raisonnier A, Kottler M L et Wright F; 2004.** Réserves Energétiques. Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie métabolique et Régulations C1 2003 – 2004. Université Paris-VI : 37-38.
74. **Ravichandran LV, Esposito D L, Chen J et Quon M J; 2001.** Protein kinase C phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem*; 276:3543-3549.
75. **Ricordeau P, Weill A, Vallier N et al; 2003.** The prevalence and cost of diabetes in metropolitan France; 29: 497-504.
76. **Robertson R P; 2004.** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet β -cells in diabetes. *J Biol Chem*; 279: 42351-4.
78. **Rodbell M, 1964.** metabolism of isolated Fat cells. Effects of Hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*; 239 : 375-380
79. **Rodier M ; 2001.** Le diabète de type 1 : imagerie fonctionnelle et métabolique. *Médecine Nucléaire*; 25-2 : 95-101.
80. **Rohl M, Pasparakis M, Baudler S, Baumgartl J, Gautam D, Huth M, De Lorenzi R, Krone W, Rajewsky K et Bruning J C; 2004.** Conditional disruption of IkappaB kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest*; 113:474-481.

- 82. Rosak C, Haupt E, Walter T et Werner J; 2002.** The effect of combination treatment with acarbose and glibenclamide on postprandial glucose and insulin profiles: Additive blood glucose lowering effect and decreased hypoglycaemia; ISSN 0394-3402; Italie; Da. 2002; Vol. 15; No. 3.
- 83. Saltiel A R et Kahn C R; 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*; 414: 799-806
- 84. Schwartz D; 1992.** Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3^{ème} edit. Paris ; Flammarion medecine-Sciences.
- 85. Sobngwi E et Boudou P; 2003.** Effect of a diabetic environment in utero on Predisposition to type 2 diabetes. INSERM CIC9504; vol 361, n°9372.
- 86. Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Cote CH, Klip A et Marette A; 2000.** Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. 49:1794-800.
- 87. Tanti J F, Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T et Barrès R; 2004.** Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann. Endocrinol*; 64, 43-48.
- 88. Thierry M et Harry D; 2010.** (Pre)type 2 diabetes and MODY : pediatric diabetology future .*Rev Med Brux*; 31 (Suppl) : S 113-23.
- 89. Thouvenot D, Billaud G et Morfin F; 2004.** Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. Volume 8, Numéro 4, 297-309.
- 90. Thurmond D C et Pessin J E; 2001.** Molecular machinery involved in the insulinregulated fusion of GLUT4-containing vesicles with the plasma membrane (review). *Mol Membr Biol* 18:237-245.
- 91. Toul Fethi, 2009.** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques de l'épicarpe de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des coupes de tissu adipeux isolées de rats wistar. Mémoire de master en Biologie, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
- 92. Trinder P; 1969.** Determiation of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann clin Biochem*; 6: 24-27.
- 93. Unger R H; 2002.** Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*; 53: 319-36.
- 94. Unger R H; 2003.** The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol*; 65: 333-47.
- 95. Vassilopoulos S, Christopher E et Sachiko H; 2010.** Clathrine CHC22, trafic intracellulaire de GLUT4 et diabète de type 2; Volume 1. N° 26.
- 96. Vinik A I, Maser R E, Mitchell B D et Freeman R; 2003.** Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*; 26: 1553-79.

97. **White M F; 2002.** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 283: E413-22.
98. **White M F; 1997.** The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17
99. **Wilcox G; 2005.** Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*; Vol 26; 19 39.
100. **Yanick F et Denise A; 2008.** La composante génétique du diabète de type 2 : suivi des progrès scientifiques du projet DGD; Volume 53. Numéro 1.
101. **Zalloua P, Shbaklo H, Halaby G, Terwedow H et Azar S T; 2002.** Type-2 diabetes family history delays the onset of type-1 diabetes. ISSN 0021-972X; Coden JCEMAZ; Etats-Unis; Da; Vol: 87.N: 7.
102. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N et al; 2001.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*; 108:1167-1174.
103. **Zick Y; 2003.** Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S56-60.
104. **Zierath J R et Kawano Y; 2003.** The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle; 17(3): p. 385-98.



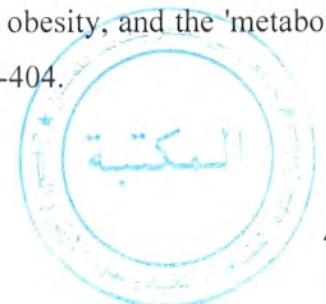
Références bibliographiques

01. **Aguilar B L, Bryan J et Nakazaki M; 2001.** Of mice and men: K (ATP) channels and insulin secretion. *Recent Prog Horm Res*; 56: 47-68.
02. **Amotte M; 1971.** Initiation aux méthodes statistiques en biologie 2^{ème} edit. Paris ; Masson et Cie.
03. **Annicotte J S; 2004.** Etude des fonctions pancréatiques du récepteur nucléaire orphelin Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) et du facteur de transcription E2F1. Thèse de Doctorat en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, l'Université Strasbourg 1 (Louis Pasteur) : 31-55.
04. **Antonescu C N, Diaz M, Femia G, Planas JV et Klip A; 2008.** Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts: regulation by mitochondrial uncoupling; 9: 1173-90.
05. **Avruch J; 1998.** Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem*; 182 : 31-48.
06. **AZZI Rachid, 2007,** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques des alcaloïdes et glycosides cucurbitacines extraits des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat rendu diabétique par la Streptozotocine. Mémoire de magister en Biologie Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
07. **Bastard J P ; 2004.** Résistance à l'insuline et expression des gènes du tissu adipeux chez l'homme. *Ann Biol Clin*; 62 (1): 25-30.
08. **Bataille D, Endosulfin N; 2000.** Regulators of insulin secretion. *Drug News Perspect*; 13: 453-62.
09. **Bose A, Guilherme A et Robida S I; 2002.** Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. *Nature*; 420: 821-4.
10. **Brown; 1997.** Threat to humans from virus infections of non-human primates. *Rev Med Virol*; 7 : 239-46.
11. **Bryant N J, Govers R et James D E; 2002.** Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 3:267-77.
12. **Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S et al; 2003.** β -cell deficit and increased β - cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*; 52 : 102-10.
13. **Buyschaert M et Hermans M P; 1998.** Critères révisés et nouvelle classification du diabète sucré. *Louvin MED*; 117: 1-6.

14. **Capeau, 1994.** Transport du glucose la cellule : physiologie et pathologie, métabolisme des glucides et des méthodes d'exploration chez l'homme. *nut.* 10-361-A-10.
15. **Capeau J; 2003.** Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance. *Med Sci (Paris)*; 19 (8-9): 834-839.
16. **Capeau J; 2003.** Voies de signalisation de l'insuline : mécanismes affectés dans l'insulino-résistance » *M/S : médecine sciences*, vol. 19, n° 8-9 p. 834-839.
17. **Carling D; 2004.** The AMP-activated protein kinase cascade; unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29:18-24.
18. **Cerasi E et Ktorza A; 2007.** Plasticité anatomique et fonctionnelle des cellules béta du pancréas endocrine et diabète de type; 23 : 885-94 *M/S n° 10*, vol. 23.
19. **Chen H S, Jia J, Su H F et al; 2006.** Down regulation of the constitutively expressed Hsc70 in diabetic myocardium is mediated by insulin deficiency. *J Endocrinol*; 190: 433-40.
20. **Cozma L S, Luzio S D, Dunseath G J, Langendorg K W, Pieber T et Owens David R; 2002.** Comparison of the effects of three insulinotropic drugs on plasma insulin levels after a standard meal. *ISSN 0149-5992; Vol: 25; No. 8.*
21. **Cruz Martha L, Bergman Richard N et Goran Michael I; 2002.** Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *ISSN 0149-5992; Vol: 25; No. 9.*
22. **Delgado H, Lehmann T, Bobbioni-Harsch E, Ybarra J et Golay A; 2002.** Acarbose improves indirectly both insulin resistance and secretion in obese type 2 diabetic patients ; *ISSN 1262-3636; France; Da. 2002; Vol. 28; No. 3.*
23. **Ducluzeau P H, Fletcher L M, Vidal H, Laville M et Tavaré J M; 2002.** Molecular mechanisms of insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes. *Diabetes Metab (Paris)*;28, 85-92.
24. **Fernandez R J, Pugeat Michel et Emptoz-Bonneton Agnés ; 2001.** Study of the effect of changing glucose, insulin, and insulin-like growth factor-I levels on serum corticosteroid binding globulin in lean, obese, and obese subjects with glucose intolerance. *ISSN 0026-0495; Etats-Unis; Da; Vol. 50; No. 10.*
25. **Ferré P; 2005.** Action et sécrétion de l'insuline Double jeu pour les canaux potassiques ; *M/S n° 8-9*, vol. 2.
26. **Ferre F, Birnbaum P et al; 2004.** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus . *Nature* 428:569-574.

27. **Frasca F, Pandini G, Scalia P, et al; 1999.** Insulin receptor isoform A, a newly recognized , high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*; 19: 3278-88.
28. **Frederici M, Hribal M, Perego L et al; 2001.** High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program; 50: 1290-301.
29. **Fryer L G, Hajduch E, Rencurel F, Salt I P, Hundal H S, Hardie D G and Carling D; 2000.** Activation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via stimulation of nitric oxide synthase. *Diabetes* 49:1978-1985.
30. **Furtado L M, Somwar R, Sweeney G, Niu W and Klip A; 2002.** Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol*; 80:569-578.
31. **Garner C M, Hubbard L M et Chakraborti P R; 2000.** Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci*; 57: 295-301.
32. **Girard J; 2003.** Rôle des acides gras libres dans la sécrétion et l'action de l'insuline: mécanismes de la lipotoxicité; 19 : 827-33 ; M/S n° 8-9, vol : 19.
33. **Giusti V; 2002.** Obésité, surpoids et alimentation: Diabète et syndrome métabolique. ISSN 0035-3655; Suisse; Vol. 122; No. 5.
34. **Gulton et Fain, 1966.**effets of prolonged incubation of isilated fat cells on their reponse to hormones stimulating lipolysis andglucose .métabolism *biochem* 98-575.
35. **Halban P; 2002.** Insulinothérapie par les cellules bêta; Vol.47; No. 4.
36. **Harjutsalo V, Sjöberg L et Tuomilehto J; 2008.** Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. *Lancet*; 371: 1777-82.
37. **Henquin J C; 2004.** Pathways in b-cell stimulus secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues; 53(suppl3):S48–58.
38. **Jansson P A, Eliasson B, Lindmark S et Eriksson J W; 2002.** Endocrine abnormalities in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes patients: potential role of steroid hormones and leptin in the development of insulin resistance; ISSN 0014-2972; Royaume-Uni; Da; Vol. 32; No.
39. **Joost H G et Thorens B; 2001.** The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*; 18:247-256.
40. **Karp G; 1996.** Cell and Molecular Biology: concepts and experiment. Edit. DeBoek University US: 669-671.

41. **Kessler N, Thomas-Roche G, Gérentes L et Aymard M; 1999.** Suitable of MDCK cells grown in a serum-free medium for Influenza production. *Dev Biol Stand*; 98: 13-21.
42. **Kido Y, Nakae J et Accili D; 2001.** The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 972-9.
43. **Klaman L D, Boss O, Peroni O D, Kim J K, Martino J L, Zabolotny J M, Moghal N, Lubkin M, Kim Y B, Sharpe A H, et al; 2000.** Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol*; 20:5479-5489.
44. **Koistinen H A, Chibalin AV et Zierath J R; 2003.** Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients; 46:1324-1328.
45. **Korytkowski M, Thomas A, Reid L, Tedesco M B, Gooding W E et Gerich J; 2002.** Glimepiride improves both first and second phases of insulin secretion in type 2 diabetes. *ISSN 0149-5992; Vol. 25; No. 9.*
46. **Laybutt D R, Preston A M, Akerfeldt M C, et al; 2007.** Endoplasmic reticulum stress contributes to beta-cell apoptosis in type 2 diabetes; 50: 752-63.
47. **Le diabète au Canada : Rapport du Système national de surveillance du diabète.** No de cat : H49-121/2002F ; ISBN 0-662-88134-6.
47. **Le diabète au Canada : Rapport du Système national de surveillance du diabète, 2009 .Cat. :** HP32-2/1-2009 ; ISBN : 978-1-100-50509-1.
48. **LE Marchard-Brustel Y, 1999.** Moléculars mechanisms of insulin action in normal and insulin resistantes. . *Exp. clin Endocrinologie* 107:126-132.
49. **Le Roith D et Zick Y; 2001.** Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance; 24: 588-97.
50. **Lee Y H, Giraud J, Davis R J et White M F; 2003.** C-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*; 278: 2896- 2902.
51. **Liu Y F, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson S R, Ohba M, Kuroki T, Le Roith D et Zick Y; 2001.** Insulin stimulates PKC –mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem*; 276:14459-14465.
52. **Liu S et Manson J E; 2001.** Dietary carbohydrates, physical inactivity, obesity, and the 'metabolic syndrome' as predictors of coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*; 12:395-404.



- 53. Maechler P et Wollheim C B; 2000.** Mitochondrial signals in glucose stimulated insulin secretion in the beta cell. *J Physiol*; 529(Pt1):49–56.
- 54. Maedler K, Sergeev P, Ris F, et al; 2002.** Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J ClinInvest*; 110: 851-60.
- 55. Magnan C et Ktorza A; 2005.** Production et sécrétion de l'insuline par la cellule bêta pancréatique; 2 (2005) 241–264.
- 56. Manuel D G et Schultz S E; 2004.** Health-related quality of life and health-adjusted life expectancy of people with diabetes in Ontario; 27: 407-14.
- 57. Marette A; 2002.** Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*; 5:377-383.
- 58. Marie-Luce Guillermin Spahr ; 2004.** Facteurs prédictifs d'une intolérance au glucose après un diabète gestationnel. Thèse Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine, Présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève : 4-9.
- 59. Masters J R, Thomson J A, Daly-Burns B et al; 2001.** Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 8012-7.
- 60. Mazari Khadidja et Khelefaoui Zahéra, 2005.** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques d'extrait brut des alcaloïdes des graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des adipocytes ésoles des rats wistar Mémoire de master en Biologie, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
- 61. McGarry J D; 2002.** Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*; 51: 7-18.
- 62. Minokoshi Y, Kahn C R, Kahn B B; 2003.** Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem*; 278:33609-33612.
- 63. Minokoshi, Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y B, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, et al; 2002.** Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*; 8:1288-1295.
- 64. Mohammed I H, Beyan H, Buckley Lisa R, Leslie R D et Bartsocas C S; 2002.** Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. ISSN 0148-7299; Vol. 115; No. 1.

65. **Orban J C, Ichai C; 2008.** Complications métaboliques aiguës du diabète. *Réanimation Urgences*; 17: 761-7.
66. **Orban J C, Ghaddab A, Chatti O et Ichai C; 2006.** Acidose lactique et metformine. *Ann Fr Anesth Réanim*; 25: 1046-52.
67. **Perlemuter L, Sélam J L et Collin G; 2003.** Diabète et maladies métaboliques. ISBN ; 2-294-01047-7.
68. **Pinget M et Boullu-Sanchis S; 2002.** Les bases physiologiques des troubles de l'insulinosecretion diabètes et métabolisme (Paris);28: 4S21-4S32.
70. **Portha B; 2003.** Anomalies programmées de la sécrétion d'insuline dans le diabète de type 2:le paradigme du rat GK; 19 : 847-53 71183 847-853 Page 847.
71. **Prentki M, Joly E, El-Assaad W et Roduit R; 2002.** Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning , and glucolipototoxicity: role in béta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes; 51 (suppl3): S405-13.
72. **Prudhomme M F; 2008.** Diabétologie endocrinologie métabolisme. ISBN 978-2-224-02870-1
73. **Raisonnier A, Kottler M L et Wright F; 2004.** Réserves Energétiques. Objectifs au cours de Biochimie PCEM2 Biochimie métabolique et Régulations C1 2003 – 2004. Université Paris-VI : 37-38.
74. **Ravichandran LV, Esposito D L, Chen J et Quon M J; 2001.** Protein kinase C phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem*; 276:3543-3549.
75. **Ricordeau P, Weill A, Vallier N et al; 2003.** The prevalence and cost of diabetes in metropolitan France; 29: 497-504.
76. **Robertson R P; 2004.** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet β -cells in diabetes. *J Biol Chem*; 279: 42351-4.
78. **Rodbell M, 1964.** metabolism of isolated Fat cells. Effects of Hormones on glucose metabolism and lipolysis. *Journal of Biological Chemistry*; 239 : 375-380
79. **Rodier M ; 2001.** Le diabète de type 1 : imagerie fonctionnelle et métabolique. *Médecine Nucléaire*; 25-2 : 95-101.
80. **Rohl M, Pasparakis M, Baudler S, Baumgartl J, Gautam D, Huth M, De Lorenzi R, Krone W, Rajewsky K et Bruning J C; 2004.** Conditional disruption of IkappaB kinase 2 fails to prevent obesity-induced insulin resistance. *J Clin Invest*; 113:474-481.

- 82. Rosak C, Haupt E, Walter T et Werner J; 2002.** The effect of combination treatment with acarbose and glibenclamide on postprandial glucose and insulin profiles: Additive blood glucose lowering effect and decreased hypoglycaemia; ISSN 0394-3402; Italie; Da. 2002; Vol. 15; No. 3.
- 83. Saltiel A R et Kahn C R; 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*; 414: 799-806
- 84. Schwartz D; 1992.** Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. 3^{ème} edit. Paris ; Flammarion medecine-Sciences.
- 85. Sobngwi E et Boudou P; 2003.** Effect of a diabetic environnement in utero on Predisposition to type 2 diabetes. INSERM CIC9504; vol 361, n°9372.
- 86. Somwar R, Perreault M, Kapur S, Taha C, Sweeney G, Ramlal T, Kim DY, Keen J, Cote CH, Klip A et Marette A; 2000.** Activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha and beta by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. 49:1794-800.
- 87. Tanti J F, Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T et Barrès R; 2004.** Alteration in insulin action: role of IRS-1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signalling. *Ann. Endocrinol*; 64, 43-48.
- 88. Thierry M et Harry D; 2010.** (Pre)type 2 diabetes and MODY : pediatric diabetology future .*Rev Med Brux*; 31 (Suppl) : S 113-23.
- 89. Thouvenot D, Billaud G et Morfin F; 2004.** Actualité de la culture cellulaire et de son application au diagnostic des infections virales. Volume 8, Numéro 4, 297-309.
- 90. Thurmond D C et Pessin J E; 2001.** Molecular machinery involved in the insulinregulated fusion of GLUT4-containing vesicles with the plasma membrane (review). *Mol Membr Biol* 18:237-245.
- 91. Toul Fethi, 2009.** Contribution à la recherche des effets antidiabétiques de l'épicarpe de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) sur des coupes de tissu adipeux isolées de rats wistar. Mémoire de master en Biologie, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.
- 92. Trinder P; 1969.** Determination of Glucose in Blood using Glucose Oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann clin Biochem*; 6: 24-27.
- 93. Unger R H; 2002.** Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*; 53: 319-36.
- 94. Unger R H; 2003.** The physiology of cellular liporegulation. *Annu Rev Physiol*; 65: 333-47.
- 95. Vassilopoulos S, Christopher E et Sachiko H; 2010.** Clathrine CHC22, trafic intracellulaire de GLUT4 et diabète de type 2; Volume 1. N° 26.
- 96. Vinik A I, Maser R E, Mitchell B D et Freeman R; 2003.** Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*; 26: 1553-79.

97. **White M F; 2002.** IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 283: E413-22.
98. **White M F; 1997.** The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2:S2-17
99. **Wilcox G; 2005.** Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev*; Vol 26; 19-39.
100. **Yanick F et Denise A; 2008.** La composante génétique du diabète de type 2 : suivi des progrès scientifiques du projet DGD; Volume 53. Numéro 1.
101. **Zalloua P, Shbaklo H, Halaby G, Terwedow H et Azar S T; 2002.** Type-2 diabetes family history delays the onset of type-1 diabetes. *ISSN 0021-972X; Coden JCEMAZ; Etats-Unis; Da; Vol: 87.N: 7.*
102. **Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N et al; 2001.** Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*; 108:1167-1174.
103. **Zick Y; 2003.** Role of Ser/Thr kinases in the uncoupling of insulin signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S56-60.
104. **Zierath J R et Kawano Y; 2003.** The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle; 17(3): p. 385-98.