

Université de Sherbrooke

Caractérisation du rôle du récepteur P2X7 dans le transport du glucose par les cellules épithéliales intestinales et le contrôle de la glycémie et du métabolisme.

Par

BOURZAC Jean-François

Programmes d'anatomie et biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada

Mois, Année

Membres du jury d'évaluation

Pr Fernand-Pierre Gendron, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Pr François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Pre Mélanie Plourde, Département de médecine, service de gériatrie

Pr Jean Buteau, Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, Faculty of
Agricultural, Life & Environmental Sciences, Université d'Alberta

© Jean-François Bourzac, 2015

*À mon fils Arnaud, ma femme Rebeca,
mes parents Chantal et Jean-Michel
et tous les membres de ma famille et mes amis qui m'ont soutenu.*

*À la mémoire de mon grand-père Guy.
À la mémoire de mon meilleur ami Matthieu.*

“Always look on the bright side of life.”
Graham Chapman

RESUME

Caractérisation du rôle du récepteur P2X7 dans le transport du glucose par les cellules épithéliales intestinales et le contrôle de la glycémie et du métabolisme.

Par

Jean-François Bourzac

Programmes de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Dans l'intestin, le récepteur P2X7, un membre unique de la famille P2X, est fortement exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales le long des villosités, ce qui suggère un autre rôle pour ce récepteur que l'induction de l'apoptose des cellules à l'apex des villosités. Dans des modèles de cellules intestinales, nous avons mis en évidence qu'à la suite de l'activation du récepteur P2X7, la translocation à la membrane de GLUT2, le transporteur facilité du glucose, du fructose et du galactose dans l'intestin, était diminuée. Cette diminution d'expression s'accompagne d'une diminution d'absorption dans les cellules IEC-6 et d'une diminution du transport transcellulaire à travers une monocouche de cellules Caco-2 différenciées. En fait, comme nous l'avons montrée, l'internalisation de GLUT2 est induite par une voie de signalisation impliquant les protéines PI4K, PLC γ -1, PKC δ et PKD1. Nous avons alors entrepris une série d'études pour déterminer quel était l'impact d'une délétion du gène *P2rx7* sur le métabolisme du glucose dans un modèle de souris pour lequel l'expression de *P2rx7* est invalidée (*P2rx7*^{-/-}). Dans ce modèle, nous avons mesuré que les souris *P2rx7*^{-/-} ont une masse significativement plus grande dès le sevrage. Des tests de tolérance au glucose sur des souris âgées de 3 semaines montrent une hyperglycémie qui se traduit par une concentration maximale de glucose sanguin plus élevé que le maximum de glycémie mesuré chez les souris normales. Cet état évolue à l'âge de 12 semaines avec une glycémie qui reste plus forte jusqu'à 90 min dans les souris *P2rx7*^{-/-} par rapport aux souris contrôles. Nous avons également observé chez ces souris un taux d'insuline et de triglycérides significativement plus haut. La glycémie à jeun est aussi plus haute de façon significative à partir de 12 semaines. Cette différence de glycémie peut s'expliquer par une expression plus importante du transporteur GLUT2 à la surface apicale des cellules épithéliales dans le jéjunum des souris mutantes. Cette insertion systématique du transporteur semble favoriser une absorption rapide du glucose et le transport transcellulaire de celui-ci dans le sang. Enfin, l'augmentation de la glycémie a des conséquences sur le foie puisque les souris *P2rx7*^{-/-} ont la voie de la lipogenèse active au sevrage et développent une stéatose hépatique avec accumulation croissante avec le temps de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules. L'ensemble des données suggère que le récepteur P2X7 joue un rôle majeur dans l'homéostasie du glucose. Mots clés : P2X7, GLUT2, homéostasie du glucose, intestin

TABLE DES MATIERES

Résumé	iv
Table des matières	v
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
Introduction.....	1
1.1 Introduction à la digestion des sucres	1
1.2 Structure de l'intestin grêle	1
1.2.1 Les trois segments de l'intestin grêle	1
1.2.2 La paroi intestinale.....	2
1.2.3 Renouvellement et différenciation des cellules de l'épithélium intestinal.....	5
1.3 Les transporteurs des sucres à la membrane des entérocytes	8
1.3.1 Le transporteur SGLT1	8
1.3.2 La famille des transporteurs membranaires SLC2 ou GLUT.....	11
1.3.2.1 Le transporteur GLUT5.....	13
1.3.2.2 Le transporteur GLUT2.....	14
1.4 Régulation du mécanisme d'absorption du glucose.....	16
1.5 Les facteurs à risque métabolique.....	19
1.5.1 L'intolérance au glucose et le prédiabète.....	20
1.5.2 La stéatose hépatique.....	20
1.6 Les nucléotides extracellulaires.....	21
1.7 Les récepteurs nucléotidiques.....	23
1.7.1 Propriétés des récepteurs P2X.....	24
1.7.2 Signalisation associée aux récepteurs P2X.....	27
1.8 Le récepteur P2X7	27
1.8.1 Le gène P2RX7, ses variants et ses polymorphismes.....	28
1.8.1.1 Le SNP perte de fonction rs3751143	28
1.8.1.2 SNP de P2X7 et pathologies.....	29
1.8.2 Structure de la protéine P2X7.....	30
1.8.3 Partenaires et régulation du récepteur P2X7.....	33
1.8.4 Fonctions et signalisations associées au récepteur P2X7	34
1.8.4.1 Rôle de P2X7 dans différents tissus et organes	34

1.8.4.2 Rôle de P2X7 dans l'intestin	37
Hypothèse/problématique	39
Objectifs	39
Chapitre I	41
Article	41
Chapitre II	82
Matériel et méthodes	82
4.1 Modèle murin	82
4.1.1 Génotypage des souris	82
4.2 Validation du modèle de souris <i>P2rx7^{-/-}</i> par immunobuvardage de type Western sur un enrichissement de CEI	83
4.3 Test de tolérance au glucose oral	84
4.4 Analyse des sérums des souris	84
4.5 Tomographie par émission de positrons (TEP) et biodistribution du fluorodésoxyglucose (¹⁸F) (¹⁸F-FDG)	85
4.6 Prélèvements, fixations et colorations des tissus	86
4.6.1 Quantification de la coloration Oil Red O	86
4.7 Immunofluorescences indirectes sur les coupes de jéjunums de souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	87
4.7.1 Expression de P2X7 dans le jéjunum de souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	87
4.7.2 Expression et localisation de GLUT2 dans le jéjunum de souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	87
4.7.3 Décompte du nombre de cellules entéroendocrines chromogranine A positives de l'épithélium intestinal dans les souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	87
4.8 Analyse de l'expression en ARN de gènes d'intérêts dans le foie des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	88
4.9 Analyses statistiques	88
Résultats	89
5.1 Effets de la perte du gène <i>P2rx7</i> sur l'axe crypte villosité du jéjunum de souris ..	89
5.1.1 Validation de notre modèle de souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	89
5.1.2 Localisation du transporteur GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i> ..	92
5.1.3 Conséquences de la perte du gène <i>P2rx7</i> sur le nombre de cellules entéroendocrines dans les villosités des souris.....	94

5.2 Conséquences de la perte du gène <i>P2rx7</i> sur la physiologie des souris	97
5.2.1 Effet de la perte du récepteur P2X7 sur la masse et la glycémie des souris.....	97
5.2.2 Évaluation de la tolérance au glucose dans les souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	100
5.2.3 Analyses sanguines des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	103
5.2.4 Tomographie par émission de positrons (TEP) et biodistribution du fluorodésoxyglucose (¹⁸ F) (¹⁸ F-FDG) dans les souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	107
5.2.5 La perte du récepteur P2X7 mène-t-elle à une stéatose du foie?.....	112
5.2.5.1 Accumulation de lipides dans le foie des souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	112
5.2.5.2 Etude de la transcription de deux enzymes de la lipogenèse dans les foies des souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	114
Discussion	118
6.1 Signalisation et mécanismes cellulaires activés par P2X7 dans les CEI	118
6.1.1 Les deux isoformes majeures de P2X7	118
6.1.2 Signalisation activée par le récepteur P2X7 dans les CEI.....	119
6.2 Conséquences de la perte du gène <i>P2rx7</i> sur la villosité intestinale	121
6.3 Changements physiologiques dans les souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	123
6.3.1 Masse et glycémie	123
6.3.2 P2X7 et homéostasie du glucose.....	124
6.3.3 Les souris <i>P2rx7^{-/-}</i> développent une stéatose du foie.....	129
6.4 Forces et limites des travaux	130
6.4.1 Modèles cellulaires.....	130
6.4.2 Modèle murin	131
6.5 Conclusions et perspectives	132
Liste des références	136
Annexes	159
8.1 Localisation du transporteur GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	159
8.1.1 Souris contrôle au grossissement 20x.....	159
8.1.2 Souris contrôles au grossissement 63x.....	160
8.1.3 Souris <i>P2rx7^{-/-}</i> au grossissement 20x.....	161
8.1.4 Souris <i>P2X7^{-/-}</i> au grossissement 63x	162
8.2 Schéma bilan	163
8.2.1 La voie PI4K-PLC γ -PKC activée par P2X7	163
8.3 Autorisation de reproduire les figures	163

8.3.1 Pour la figure 1 :	163
8.3.2 Pour la figure 2 :	164
8.3.3 Pour la figure 3 :	177
8.3.4 Pour la figure 5 :	188

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Structure de l'intestin grêle.	4
Figure 2 : Distribution des cellules principales de l'épithélium intestinal.	7
Figure 3 : Absorption du glucose et du fructose par les entérocytes	10
Figure 4 : Modèle de l'absorption du glucose par GLUT2 dans l'intestin avant et après un repas.	18
Figure 5 Structure d'une sous-unité des récepteurs P2X.....	26
Figure 6 : Représentation schématique de l'extrémité C-terminale du récepteur P2X7 avec ses domaines putatifs et les mutations non synonymes.	32
Figure 7 : Expression du récepteur P2X7 dans le jéjunum des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i> . 91	
Figure 8 Localisation du transporteur facilité du glucose GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	93
Figure 9 : Décompte du nombre de cellules chromogranine A positives dans le jéjunum de souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i> âgées de douze semaines	96
Figure 10 : Courbe de croissance de souris contrôles et de souris <i>P2rx7^{-/-}</i> et évolution de la glycémie après 6 h de jeûne dans les souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i> dans le temps.	99
Figure 11 : Évaluation de la tolérance orale au glucose des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	102
Figure 12 Concentration d'insuline et de glucose dans le sérum des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i> et mesure de l'indice de résistance à l'insuline et de la fonction des cellules β	105
Figure 13 : Dosage de la concentration de cholestérol total et des triglycérides dans le sérum des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	106
Figure 14 : Suivi de l'absorption du glucose par l'intestin par tomographie par émission de positrons à l'aide de la sonde ^{18}F -FDG.....	109
Figure 15 : Biodistribution du marqueur radioactif ^{18}F -FDG dans les organes des souris contrôles et <i>P2rx7^{-/-}</i>	111
Figure 16: Accumulation de lipide dans les hépatocytes des souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	113
Figure 17: Variation de l'expression des enzymes clés de la lipogenèse dans le foie des souris contrôles et des souris <i>P2rx7^{-/-}</i>	116

Figure 18 : conséquences physiologiques de la perte du récepteur P2X7 : bilan.....117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 La famille des transporteurs GLUT	12
Tableau 2 Condition de PCR pour géotyper les souris	83
Tableau 3. Amorces utilisées pour la PCR quantitative	88

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Desoxyribo Nucleique
ADNc	Acide Desoxyribo Nucleique complémentaire
AMP	Adénosine Mono Phosphate
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Tri Phosphate
ATP ⁴	ATP tétraanionique
BzATP	2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine-5'-triphosphate tri(triethylammonium)
C/EBP	CCAAT/enhancer binding proteins
Ca ²⁺	Calcium
CEI	Cellules Épithéliales Intestinales
CgA	Chromogranine A
Ctrl	Contrôle
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol
EMP-2	Protéine épithéliale Membranaire-2
ERK	protéine kinase régulée par signal extracellulaire
¹⁸ F-FDG	Fluorodésoxyglucose (¹⁸ F)
g	gramme
GIP	Peptide Insulinotrope dépendant du Glucose / Glucose-dependent Insulinotropic Peptide
GLP-1/2	Glucagon Like Peptide 1/2
GLUT	Transporteur de glucose / glucose transporter
GRK-3	Protéine G associée au récepteur kinase 3
h	heure
HEK 293	Cellules de rein embryonnaire humain 293 / Human Embryonic Kidney 293

IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
K ⁺	Potassium
kDa	kiloDalton
MCA	« Méthacarn » Methanol Chloroforme Acide acétique glacial
Mg	milligramme
min	minute
mm	millimètre
mM	milliMolaire
mmol/L	millimole par Litre
Na ⁺	Sodium
NAFLD	Maladie du foie gras non alcoolique / Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Stéatohépatite non alcoolique / NonAlcoholic SteatoHepatitis
°C	degré centigrade
OCT.	Optimum Cutting Temperature
PAGE	Gel polyacrylamide d'électrophorèse / polyacrylamide gel electrophoresis
pb	Paire de bases
PBS	Solution tampon phosphate / phosphate buffered saline
PCR	Réaction de polymérisation en chaine / polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
pH	potentiel hydrogène
PI4K	phosphatidyl inositol 4-kinase
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	protéine kinase C
PKD	protéine kinase D
PLC	Phospholipase C
RPTP β	Receptor-type protein tyrosine phosphatase bêta
SDS-PAGE	gel de polyacrylamide contenant du Sodium Dodécyl
SGLT	transporteur de glucose dépendant du sodium / Sodium Glucose Linked Transporter

SNP	Polymorphisme d'un seul nucléotide / Single Nucleotide Polymorphism
T	temps
TFF	facteurs en trèfle / trefoil factor
TLR	récepteurs de type Toll / Toll Like Receptor
UDP	Uracile Di Phosphate
UTP	Uracile Tri Phosphate
VLDL	lipoprotéines de très basse densité / Very Low Density Lipoprotein

INTRODUCTION

1.1 Introduction à la digestion des sucres

La digestion est un processus complexe qui permet l'assimilation de molécules simples par les cellules de l'organisme à partir des macronutriments de l'alimentation. Elle se divise en deux composantes majeures : la transformation mécanique (mastication, péristaltisme, brassage) et la transformation chimique (activités enzymatiques, pH) (Marieb, 1999).

Chez l'humain, la digestion des glucides commence dès l'entrée dans la bouche avec la mastication et l'action des amylases salivaires qui hydrolysent les polysaccharides tels que l'amidon en disaccharides comme le maltose. Cette digestion dite luminale se poursuit jusque dans la lumière intestinale grâce aux amylases pancréatiques. Le processus terminal de digestion des sucres se situe dans l'intestin grêle, à la bordure en brosse des villosités grâce à l'action des enzymes sucrase-isomaltase et lactase-phlorizine hydrolase (Gray, 1992). Ces enzymes sont responsables de la transformation des disaccharides en monosaccharides (glucose, fructose, galactose) qui peuvent être directement métabolisés par l'organisme. Une partie de ces sucres passe dans la circulation sanguine après le passage de l'épithélium intestinal grâce à des transporteurs spécifiques se trouvant à la surface des entérocytes. Une autre partie est directement utilisée par les entérocytes pour leurs besoins fonctionnels, enfin une dernière partie est utilisée dans la lumière intestinale par la flore bactérienne.

1.2 Structure de l'intestin grêle

1.2.1 Les trois segments de l'intestin grêle

L'intestin grêle est divisé en trois compartiments successifs, le duodénum, le jéjunum et l'iléon, qui ont chacun des caractères distinctifs et des fonctions particulières dans le processus de digestion (Figure 1).

Le premier compartiment se nomme le duodénum. Il prend naissance après le canal du pylore de l'estomac. Les glandes de Brünner dont il se compose neutralisent le chyme acide provenant de l'estomac en produisant et en sécrétant un mucus alcalin riche en

bicarbonate. Ce mucus protège le duodénum des attaques acides, favorise les conditions d'activation des enzymes intestinales et lubrifie la paroi intestinale. Le duodénum poursuit le processus de digestion en recueillant respectivement la bile de la vésicule biliaire par le canal cholédoque et les sucs pancréatiques par le canal pancréatique au niveau de l'ampoule hépatopancréatique, ou ampoule de Vater, qui s'ouvre par la papille duodénale majeure. Le flux y est contrôlé par le sphincter d'Oddi. Le jéjunum assure la majorité de la digestion terminale et de l'absorption des nutriments grâce à de longues projections de la muqueuse dans la lumière intestinale. Il se distingue du compartiment précédent par l'absence des glandes de Brünner. Enfin, l'iléon se différencie par la présence de plaques de Peyer qui jouent, avec les cellules M, un rôle immunitaire. L'iléon est responsable de l'absorption des sels biliaires, des électrolytes et des nutriments non absorbés par le jéjunum.

1.2.2 La paroi intestinale

Quel que soit le compartiment, la paroi intestinale des mammifères est composée de quatre couches de tissus distincts (Figure 1). De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve la muqueuse qui est constituée de l'épithélium intestinal de surface, le chorion et la musculaire muqueuse. La sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif et contient les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques qui alimentent la muqueuse. La musculuse possède deux couches de tissu musculaire lisse. La plus interne est une couche de tissu musculaire circulaire alors que la plus externe est longitudinale. La tunique la plus externe est une gaine de tissu conjonctif appelée séreuse.

L'étanchéité de la paroi intestinale est assurée par une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI) qui sont intimement liées grâce aux complexes de jonctions cellulaires. Chaque CEI est associée à sa voisine par des jonctions serrées, des jonctions adhérentes et des desmosomes. Cette étanchéité n'est cependant pas incompatible avec la seconde fonction de l'intestin grêle qui est l'absorption des nutriments issus de la digestion. En effet, l'intestin grêle s'est parfaitement adapté pour amplifier les échanges entre la lumière intestinale et le milieu intérieur. Par sa longueur, en moyenne six mètres chez l'homme, l'intestin offre une grande surface de contact avec le milieu extérieur. Cette surface est démultipliée par quatre degrés de plissement de la paroi intestinale (Figure 1). Les plis circulaires ou valvules conniventes représentent le premier niveau de plissement.

Ce sont des évaginations de la muqueuse et de la sous-muqueuse qui apparaissent en aval de l'estomac, après la portion supérieure du duodénum. Elles deviennent protubérantes à l'entrée du jéjunum et diminuent progressivement de taille jusqu'à leur disparition dans l'iléon distal. Les villosités sont des projections en forme de doigts de gant de la muqueuse dans la lumière intestinale et elles recouvrent toute la surface de l'intestin grêle. Avec les cryptes, ou glandes de Lieberkühn, qui s'invaginent dans la sous-muqueuse entre les villosités, elles représentent les deuxième et troisième degrés de plissement. Cet axe crypte villosité est ainsi l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle qui assure le renouvellement de l'épithélium intestinal et la protection des cellules souches contre le milieu extérieur. Finalement, des appendices au pôle apical des CEI forment le quatrième degré de plissement. Ces structures sont les microvillosités et donnent cet aspect de bordure en brosse qui fait face à la lumière intestinale (Gartner et Hiatt, 1992, Kierszenbaum, 2006).

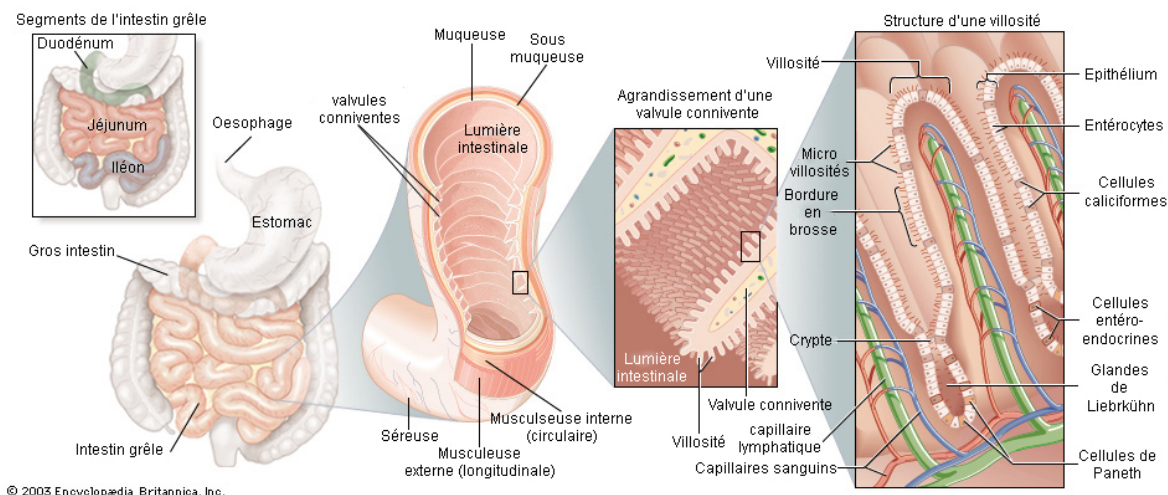


Figure 1 Structure de l'intestin grêle.

L'intestin grêle est divisé en trois compartiments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Chacun d'eux est constitué de quatre couches concentriques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculature et la séreuse. La musculature est constituée d'une couche de muscles longitudinaux et une couche de muscle circulaire. La muqueuse est formée d'un épithélium de surface constituée de cellules épithéliales intestinales, de la *lamina propria* et la *muscularis mucosae*. Pour favoriser l'absorption des nutriments, la surface de contact avec la lumière est multipliée par différents degrés de repliements : les valvules conniventes, les villosités et les glandes de Lieberkühn et enfin les microvillosités à la surface des entérocytes qui donne cet aspect de bordure en brosse à l'épithélium intestinal.

Avec l'aimable autorisation de l'Encyclopaedia Britannica, Inc., copyright 2003 ; utilisés avec permission.

« By courtesy of Encyclopaedia Britannica, Inc., copyright 2003; used with permission. »

1.2.3 Renouveau et différenciation des cellules de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est un tissu dit à renouvellement rapide et continu. Chez les mammifères, une cellule met de deux à sept jours pour migrer de son site de division cellulaire final dans la crypte et jusqu'à cinq jours chez l'humain. Le maintien de l'intégrité du tissu est assuré par la prolifération cellulaire dans la partie inférieure du compartiment cryptal. Les fonctions d'absorption et de sécrétion du tissu sont effectuées par les cellules différenciées majoritairement dans la villosité. Ces deux compartiments forment l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle : l'axe crypte villosité (Figure 2).

Pour assurer le renouvellement rapide et continu de l'épithélium intestinal, les cellules souches présentes dans la base des cryptes de Lieberkühn vont se diviser pour engendrer des cellules progénitrices hautement prolifératives qui vont occuper la majorité de l'espace cryptal (van der Flier et Clevers, 2009). Ces cellules vont demeurer environ deux jours dans la crypte pour se diviser quatre à cinq fois et ensuite entamer un processus de différenciation cellulaire pour donner les précurseurs des cellules différenciées pendant leur migration ascendante, excepté pour les précurseurs des cellules de Paneth qui migrent dans le fond des cryptes. À la jonction entre la crypte et la villosité, les précurseurs sont pleinement différenciés en deux grandes lignées cellulaires soient la lignée sécrétrice et la lignée des cellules absorbantes. La lignée sécrétrice regroupe les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth, alors que les entérocytes, qui représentent la lignée cellulaire majoritaire, forment la lignée des cellules absorbantes. Ces cellules différenciées vont continuer à migrer le long de la villosité jusqu'à l'apex, entrer spontanément en apoptose et vont être exfoliées dans la lumière intestinale.

Chacun des types cellulaires joue un rôle particulier. Les cellules caliciformes vont sécréter des mucines et des protéines de la famille des facteurs en trèfle (TFF) qui vont lubrifier l'épithélium intestinal pour le protéger des frictions du contenu de l'intestin, le prémunir des dommages chimiques et des stress du cisaillement et prévenir l'invasion de l'épithélium par les bactéries. Ces cellules sont reconnaissables par leur vaste cytoplasme apical et par l'accumulation de granules de sécrétion qui donnent une forme arrondie à la cellule (Deplancke et Gaskins, 2001, Kim et Ho, 2010). Les cellules entéroendocrines coordonnent les fonctions intestinales telles que le péristaltisme, la régulation de la satiété, la digestion terminale et l'absorption des nutriments grâce à la sécrétion de peptides

hormonaux spécifiques (Furness *et al.*, 2013). Les cellules de Paneth ont la particularité de migrer à la base des cryptes où elles jouent un rôle dans l'immunité innée. Ces cellules contiennent de larges granules de sécrétion au pôle apical constitués de protéines spécifiques telles que des lysozymes, des peptides antimicrobiens et des défensines. Elles vont ainsi avoir un effet direct sur la microflore intestinale (Garabedian *et al.*, 1997). Le dernier type cellulaire principal est l'entérocyte. Les entérocytes représentent 80 % des CEI. Ces cellules de la lignée absorbante sont fortement polarisées avec une bordure en brosse au pôle apical responsable de l'absorption et du transport des nutriments à travers l'épithélium intestinal (van der Flier et Clevers, 2009). En effet, la présence de nombreuses enzymes au niveau des microvillosités permet la fragmentation des dipeptides et des disaccharides dans la lumière intestinale. La sucrase-isomaltase hydrolyse le saccharose et l'isomaltose en une molécule de fructose et une molécule de glucose, respectivement deux molécules de glucose et les liaisons alpha 1-6 D-glucosidique. La lactase-phlorizine hydrolase dissocie le lactose en une molécule de galactose et une molécule de glucose. Son activité phlorizine hydrolase consiste à dégrader la phlorizine en phlorétine et en glucose. Ainsi, les entérocytes participent activement à la digestion des nutriments, mais assurent également leur transport transcellulaire de la lumière intestinale à leur déversement dans la circulation sanguine pour alimenter tous les organes (Yamada et Alpers, 2003).

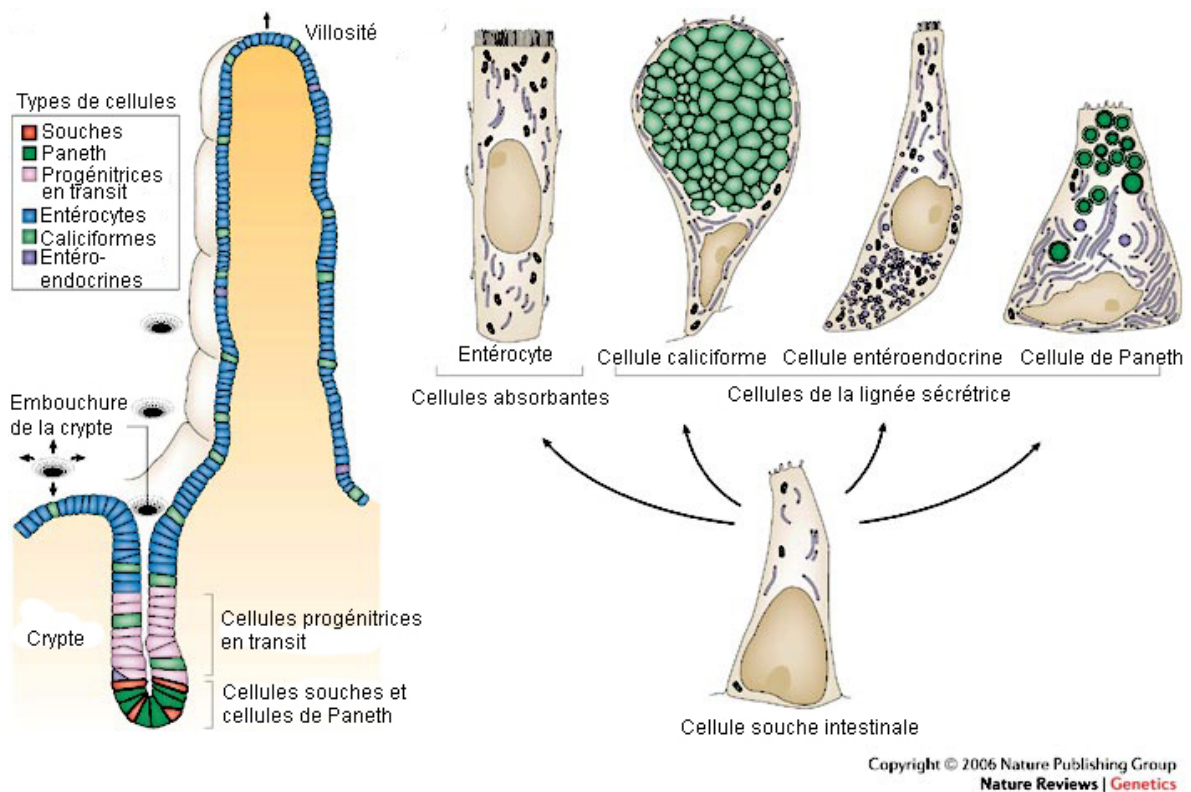


Figure 2 : Distribution des cellules principales de l'épithélium intestinal.

La crypte ou glande de Lieberkühn contribue au renouvellement de l'épithélium de la villosité. Les flèches indiquent le flux montant des cellules qui sortent de la crypte. Les cellules souches sont proches de la base de la glande, mais deux théories s'affrontent pour la localisation exacte de ces cellules. La première théorie propose que les cellules souches soient mélangées aux cellules de Paneth, la seconde suggère qu'elles se trouvent au-dessus de ces dernières. Au-dessus des cellules souches, on retrouve les cellules progénitrices en divisions et celles partiellement différenciées. Dans le cou de la crypte et sur la villosité se trouvent les cellules différenciées post-mitotiques. Les progéniteurs ascendants donnent les cellules absorbantes ou entérocytes qui présentent une bordure en brosse, les cellules caliciformes qui sécrètent le mucus et les cellules entéroendocrines plus petites avec beaucoup de sous types qui sécrètent les hormones. Les cellules de Paneth retournent dans la crypte après différenciation et sécrètent des protéines antibactériennes.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Genetics, (Crosnier *et al.*, 2006) copyright 2006

1.3 Les transporteurs des sucres à la membrane des entérocytes

Nous savons depuis quelques décennies qu'il existe deux processus distincts pour absorber le glucose et le fructose, les deux sucres simples majoritaires de l'alimentation, dans l'intestin. Le premier qui ne concerne que le glucose et le galactose implique également les ions sodium, le second processus qui s'applique au glucose, au galactose et au fructose est une diffusion facilitée à travers la membrane qui représenterait 75 % du glucose total absorbé (Madara et Pappenheimer, 1987) (Figure 3).

1.3.1 Le transporteur SGLT1

Le Dr Robert K. Crane est le premier à avoir émis l'hypothèse d'un cotransport Na^+ /glucose dans les années 1960 (Crane, 1962). Il a ensuite mis en évidence que le gradient sodique, maintenu par la pompe Na^+/K^+ -ATPase à la membrane basolatérale était le moteur du transport actif du glucose. Ce transporteur, dit actif secondaire, est le transporteur de glucose dépendant du sodium (Sodium Glucose Linked Transporter, SGLT1). SGLT1 est une protéine membranaire de 73 kDa qui a une forte affinité pour le glucose avec une constante de Michaelis $K_m \sim 0,1 \text{ mM}$. Cependant, il est saturable à environ 30 mM de glucose (Debnam et Levin, 1975). Le transporteur possède quatorze domaines transmembranaires en hélice α et ses deux extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. SGLT1 est principalement localisé à la bordure en brosse des entérocytes matures de l'intestin grêle. À la bordure en brosse, la liaison de deux ions Na^+ au transporteur SGLT1 entraîne un changement de conformation qui permet la liaison du sucre. Un deuxième changement de conformation permet l'entrée des substrats dans la cellule qui se dissocient du symport, car les sites de liaison du côté cytoplasmique ont moins d'affinité et la concentration du sodium intracellulaire est basse. C'est le potentiel électrochimique des deux ions Na^+ qui passent selon le gradient de concentration dans la cellule qui permet le passage de la molécule de glucose contre son gradient chimique (Wright *et al.*, 2003). Le gradient sodique est maintenu par la pompe Na^+/K^+ -ATPase qui par hydrolyse de l'ATP libère trois Na^+ dans le milieu extracellulaire et permet l'entrée de deux ions K^+ . De nombreux facteurs influencent la fonction du transporteur SGLT1 : une diète riche en sucres augmente l'expression en ARNm de *Sglt1* (Miyamoto *et al.*, 1993). Dans des oocytes de *Xenopus laevis* exprimant un *Sglt1* de lapin, la phosphorylation du transporteur par la protéine kinase A augmente le transport du glucose d'environ 30 %,

alors que l'activation d'une protéine kinase C (PKC) réduit le transport du glucose de 60 % (Wright *et al.*, 1997). Ce changement dans le taux maximum de transport du glucose s'accompagne d'une modulation du nombre de transporteurs à la surface des cellules. Plus récemment, dans la muqueuse intestinale de jéjunum humain, l'activation du récepteur à l'angiotensine II de type 1 inhibe le transporteur SGLT-1 alors que l'activation du récepteur à l'angiotensine II de type 2 augmente le transport du glucose par ce transporteur (Casselbrant *et al.*, 2015).

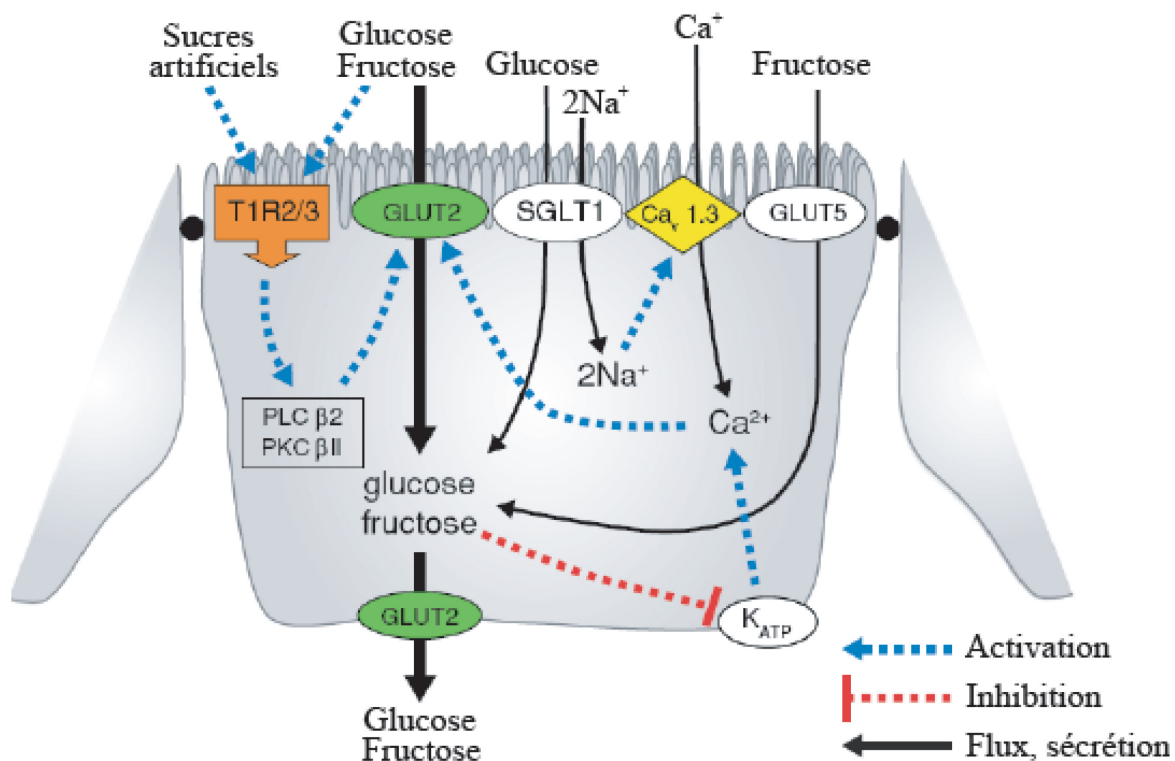


Figure 3 : Absorption du glucose et du fructose par les entérocytes

Les transporteurs SGLT1, GLUT5 et GLUT2 sont les trois composants majeurs de l'absorption du glucose et du fructose par l'intestin grêle. SGLT1 permet le transport actif du glucose du côté apical des entérocytes. L'entrée de Na^+ par SGLT1 entraîne une dépolarisation de la membrane et une entrée massive de Ca^{2+} par le canal neuroendocrinien non classique de type L $\text{Ca}_v1,3$ qui induit un réarrangement du cytosquelette permettant la circulation des protéines à partir du plateau terminal. Les récepteurs linguaux T1R2/3 permettent la reconnaissance du glucose, du fructose et des sucres artificiels et vont s'activer. En réponse à ce signal, PLC $\beta 2$ et PKC βII migrent à la membrane apicale où PLC $\beta 2$ génère le diacylglycérol nécessaire pour l'activation complète PKC βII . Le résultat de cette signalisation est l'insertion de GLUT2 à la membrane apicale. GLUT5 permet le transport facilité du fructose du côté apical des entérocytes. Le fructose ainsi entré dans la cellule pourrait avoir le même effet que le Na^+ et dépolariser la membrane pour augmenter la Ca^{2+} intracellulaire. GLUT2 est responsable du flux transcellulaire du glucose et du fructose puisqu'il permet leur transport facilité au travers la membrane apicale et basolatérale des entérocytes.

Modifié de (Kellett *et al.*, 2008)

1.3.2 La famille des transporteurs membranaires SLC2 ou GLUT

Les membres de la famille GLUT sont des protéines transmembranaires codées par les gènes *SLC2* (Mueckler et Thorens, 2013). Au nombre de quatorze chez l'humain, les protéines GLUT ont des spécificités de substrats divers et sont impliquées dans le transport des sucres, mais aussi d'autres molécules telles que l'urate, la glucosamine et la vitamine C (Mueckler et Thorens, 2013). Les quatorze membres de la famille GLUT sont constitués d'environ cinq cents acides aminés et possèdent douze domaines transmembranaires. Les extrémités N-terminales et C-terminales sont cytoplasmiques. Chaque membre possède une large boucle intracellulaire centrale. La famille GLUT est ubiquitaire (Tableau 1). L'expression d'un membre spécifique de la famille GLUT dans un type cellulaire précis dépend des propriétés cinétiques intrinsèques à ce GLUT, mais aussi aux mécanismes régulant son expression. Au niveau de l'intestin grêle, du jéjunum en particulier, nous retrouvons principalement les transporteurs GLUT2 et GLUT5 (Davidson *et al.*, 1992, Mueckler, 1994). Ces deux transporteurs vont permettre le transit de tous les sucres, mais tout particulièrement de transporter le fructose et le glucose issus de la digestion de la lumière intestinale au flux sanguin, il est donc intéressant d'étudier le rôle de chacun dans le métabolisme des sucres. Même si le glucose reste prédominant dans l'alimentation humaine, la consommation de fructose a fortement augmenté (Gross *et al.*, 2004). En ce sens, des études montrent une relation directe entre la quantité de fructose ingérée et l'augmentation de l'incidence de l'obésité, du diabète de type 2 et le développement du syndrome métabolique (Havel, 2005, Douard et Ferraris, 2008).

Tableau 1 La famille des transporteurs GLUT

Isoforme	Tissu principal	Sensibilité à l'insuline	Substrat (Affinité)	Présence dans le muscle	Présence dans le tissu adipeux blanc
GLUT1	Erythrocyte, cerveau, ubiquitaire	Non	Glucose	Oui	Oui
GLUT2	Foie, pancréas, intestin, rein	Oui	Glucose (faible) ; fructose	Non	Non
GLUT3	Cerveau	Non	Glucose (forte)	Non	Oui (ARNm)
GLUT4	Cœur, muscle, TA blanc et brun, cerveau	Oui	Glucose (forte)	Oui	Oui
GLUT5	Intestin, testicule, rein	Non	Fructose ; glucose (très faible)	Oui	Oui
GLUT6	Cerveau, rate, leucocytes	Non	Glucose	Non	Indéterminé
GLUT7	Indéterminé	Indéterminé	Indéterminé	Indéterminé	Indéterminé
GLUT8	Testicules, cerveau, autres tissus	Non (sauf les blastocystes)	Glucose	Oui (ARNm)	Oui (ARNm)
GLUT9	Foie, rein	Indéterminé	Indéterminé	Non	Indéterminé
GLUT10	Foie, pancréas	Non	Glucose	Oui (ARNm)	Indéterminé
GLUT11	Cœur, muscle	Non	Glucose (faible) ; fructose	Oui (ARNm)	Non
GLUT12	Cœur, prostate, muscle, intestin grêle, TA blanc	Oui	Indéterminé	Oui	Oui

TA : tissu adipeux, ARNm : Seul l'ARN messenger a été détecté.

Adapté de (Wood et Trayhurn, 2003)

1.3.2.1 Le transporteur GLUT5

Le transporteur à glucose de type 5 ou GLUT5 est codé par le gène *SLC2A5*. C'est le seul transporteur spécifique du fructose qui n'a pas la capacité de transporter d'autres molécules de sucres (Burant *et al.*, 1992). Il est insensible à la phlorétine et la cytochalasine B. Chez l'humain, c'est dans l'intestin grêle que le transporteur s'exprime le plus et il est localisé uniquement dans les entérocytes matures. Autrefois, on pensait que GLUT5 assurait le transport du fructose à la membrane apicale uniquement et que c'était un autre transporteur de la famille des GLUTs qui permettait la majeure partie de son transport dans le sang à la membrane basolatérale. Néanmoins, chez l'humain, le transporteur GLUT5 a été aussi mis en évidence à la membrane basolatérale suggérant qu'il participe aussi dans le transfert spécifique du fructose à travers la membrane basale des entérocytes, en complément de l'autre transporteur qui transporte préférentiellement le glucose (Blakemore *et al.*, 1995). L'expression en ARNm du transporteur est régulée positivement par une diète riche en D-fructose, mais n'est pas affectée par d'autres sucres chez le rat (Miyamoto *et al.*, 1993). Ce changement d'expression en ARNm du transporteur GLUT5 par la diète peut être déclenché très tôt au sevrage des jeunes rats (David *et al.*, 1995). En revanche, chez les jeunes rats de moins de quatorze jours, le fructose n'a aucun effet sur l'expression et l'activité de GLUT5. Néanmoins, en prétraitant les intestins avec un analogue de glucocorticoïde, le fructose est capable d'augmenter l'expression du gène *Slc2a5* et le transport de fructose par GLUT5 chez ces jeunes rats suggérant que les glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle majeur dans la régulation de GLUT5 dans l'intestin (Douard *et al.*, 2008, Douard et Ferraris, 2008). La karyophérine- $\alpha 2$ en combinaison avec le fructose pourrait aussi stimuler GLUT5 (Douard *et al.*, 2008). Enfin, le rythme diurne chez le rat adulte influence l'expression génique et protéique de GLUT5 (Shu *et al.*, 1998). Ce rythme diurne consiste en une augmentation génique et protéique de GLUT5 trois à quatre heures avant le repas pour anticiper le pic d'alimentation. L'expression génique et protéique de GLUT5 semble augmenter en fonction d'un signal paracrine et endocrine dans l'intestin. *In vitro*, un traitement à l'insuline de 24 h sur la lignée cellulaire de muscle squelettique L6 induit une augmentation de l'abondance et de l'activité de GLUT5 dans ces cellules, probablement grâce à l'activation de son promoteur (Hajduch *et al.*, 2003). Chez l'humain, le transporteur GLUT5 est surexprimé dans les muscles de personnes qui souffrent de

diabète de type 2 (Stuart *et al.*, 2007) et son expression est augmentée jusqu'à quatre fois dans le duodénum (Dyer *et al.*, 2002). En condition inflammatoire et infectieuse, certaines études montrent que l'expression et l'activité de GLUT5 diminuent (Douard et Ferraris, 2008).

1.3.2.2 Le transporteur GLUT2

Le transporteur à glucose de type 2 ou GLUT2 est codé par le gène *SLC2A2*. GLUT2 est un transporteur de glucose atypique dans la famille des GLUT en raison de son apparente faible affinité pour son substrat principal avec un K_m de l'ordre de 17 mM (Mueckler et Thorens, 2013). Il peut transporter le galactose et le fructose, mais il a une faible affinité pour ces derniers. GLUT2 est responsable du transport facilité du glucose dans le foie, le pancréas, le rein et le cerveau. Dans l'intestin, il permet le transport du glucose, du galactose et du fructose à la membrane apicale et basolatérale des entérocytes permettant ainsi le transport transcellulaire de ces sucres de la lumière intestinale vers le flux sanguin. À la membrane basolatérale, il transporte de façon bidirectionnelle de larges flux entrants et sortants de glucose dans la cellule. Contrairement à SGLT1, il n'est pas saturable dans les conditions physiologiques ni dans des conditions de diabète. Il n'est pas un facteur limitant dans les processus de métabolisme du glucose par les cellules. Chez l'humain, un polymorphisme dans le gène *SLC2A2* qui se traduit par la substitution de la thréonine 110 par une isoleucine conduit à une consommation de sucre journalière plus importante chez les porteurs de l'allèle contenant l'isoleucine (Eny *et al.*, 2008). Plus récemment, des études montrent que la détection du glucose extracellulaire par GLUT2 contribue au contrôle de la prise alimentaire exercé par l'hypothalamus (Stolarczyk *et al.*, 2010). De plus, il a été mis en évidence que la consistance du sucre ingéré, liquide ou solide, avait en fait plus d'importance que la nature du sucre. En effet, l'ingestion de saccharose sous forme liquide chez des souris induit une augmentation de l'expression de GLUT2 et GLUT5 dans l'iléon par rapport à des souris contrôles et des souris nourries au fructose sous forme solide. On peut observer également un changement de comportement à l'égard de la nourriture. Avec du saccharose sous forme liquide, les souris ne compensent plus l'apport élevé de calories par une baisse de la prise alimentaire (Ritze *et al.*, 2014). Enfin, l'absorption du glucose par le transporteur GLUT2 dans l'intestin induit la sécrétion de l'hormone neurotensine qui est connue pour réguler la satiété (Kuhre *et al.*, 2015).

Les niveaux d'expression du transporteur GLUT2 à la membrane des entérocytes sont contrôlés par plusieurs mécanismes. À court terme, l'élévation de la concentration en glucose dans la lumière intestinale conduit à une augmentation de l'expression membranaire de GLUT2 (voir section 1.4). Le calcium intracellulaire pourrait également jouer un rôle important dans l'insertion à la membrane apicale de GLUT2 en réarrangeant le cytosquelette des entérocytes. Les récepteurs de goût T1R (sweet taste receptors) stimulent l'insertion de GLUT2 à la membrane apicale et l'augmentation de l'absorption du glucose en quelques minutes dans les jéjunums de rat après perfusion des intestins avec différents sucres artificiels (Mace *et al.*, 2007).

Les régulations endocrines et paracrines de l'expression de GLUT2 sont aussi très importantes. En effet, l'insuline qui se lie à son récepteur à la membrane des entérocytes conduit à l'internalisation rapide de GLUT2 à la membrane apicale et basolatérale chez la souris (Tobin *et al.*, 2008). L'insuline peut aussi prévenir l'insertion de GLUT2 à la membrane apicale même en présence d'un taux élevé de glucose. Ces observations ont aussi été faites dans un modèle de cellule intestinale humaine (Tobin *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent que l'insuline atténue l'absorption transépithéliale de glucose en régulant le transporteur GLUT2. La sécrétion paracrine des incrétines Glucagon Like Peptide 1 (GLP-1) et du Glucose Dependent Insulinotropic Peptide (GIP) des hormones gastro-intestinales qui stimulent la libération d'insuline des cellules β pancréatiques de façon dépendante du glucose après un repas (Campbell et Drucker, 2013), favorise la sécrétion d'insuline conduisant ainsi à l'internalisation de GLUT2 comme indiqué précédemment. Le GLP-2 en revanche promeut l'insertion de Glut2 à la bordure en brosse des entérocytes chez le rat (Au *et al.*, 2002). Les niveaux de GLUT2 peuvent également être contrôlés par les mécanismes senseurs d'énergie de la cellule comme l'activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) qui entraîne l'activation de p38 (Walker *et al.*, 2005).

À long terme, la nature de la diète va influencer les niveaux d'expression de GLUT2. Une diète avec un indice glycémique faible entraîne une insertion minimale de GLUT2 à la membrane et réciproquement (Gouyon *et al.*, 2003).

1.4 Régulation du mécanisme d'absorption du glucose

Avant un repas, la concentration en glucose dans la lumière intestinale est faible et inférieure au 5 mmol/L du plasma (Kellett et Brot-Laroche, 2005). Toute molécule de glucose au pôle apical des cellules est rapidement prise en charge par le transporteur SGLT1 dont c'est le rôle puisque c'est un transporteur de haute affinité, mais de faible capacité et aussi le seul transporteur capable de transférer le glucose contre son gradient de concentration. Le transporteur de haute capacité, mais de faible capacité GLUT2 permet d'équilibrer le glucose entre le flux sanguin et les entérocytes à la membrane basolatérale. Ainsi, comme il y a peu de glucose dans la lumière intestinale avant un repas, le transporteur GLUT2 est très peu présent à la membrane apicale et le transporteur GLUT2 à la membrane basolatérale fonctionne en fournissant du glucose sanguin aux entérocytes pour maintenir le niveau d'énergie requis. La présence du transporteur GLUT2 à la bordure en brosse pourrait permettre la fuite de glucose du sang vers la lumière intestinale à travers les entérocytes en raison d'un gradient de concentration favorable. En réalité, cette présence à la membrane apicale ne cause aucun préjudice aux fonctions intestinales. La possible perte de glucose dans la lumière est minimisée pour plusieurs raisons chez la souris. Tout d'abord, comme mentionnée plus haut, l'expression membranaire de Glut2 est diminuée en présence de faible concentration luminale de glucose et est abolie après une nuit de jeûne (Gouyon et al., 2003). Ensuite, l'affinité de GLUT2 pour son substrat est faible, le glucose à ces faibles concentrations sera plus rapidement métabolisé par l'activité glycolytique des entérocytes. Enfin, toutes les molécules de glucose sécrétées dans la lumière seront rapidement retransportées par le transporteur SGLT1 dans les cellules contre le gradient de concentration (Kellett, 2001).

Après un repas, les disaccharides et les dextrans limités de la digestion atteignent les entérocytes et sont hydrolysés rapidement en monosaccharides, ce qui a pour conséquence une élévation très importante de la concentration en glucose à la surface des membranes apicales entre 50 et 300 mmol/L (Ferraris *et al.*, 1990). La concentration en glucoses libres augmentant, le transport initial à travers la membrane est effectué par le transporteur SGLT1 causant l'activation de la kinase PKC β II. Ces événements conduisent à l'activation rapide des transporteurs GLUT2 déjà présents à la membrane et à l'insertion à la membrane d'autres transporteurs GLUT2 situés dans des vésicules intracellulaires juste

sous la membrane. GLUT2 est alors le transporteur majoritaire responsable de l'absorption du glucose (Kellett et Brot-Laroche, 2005) (Figure 4).

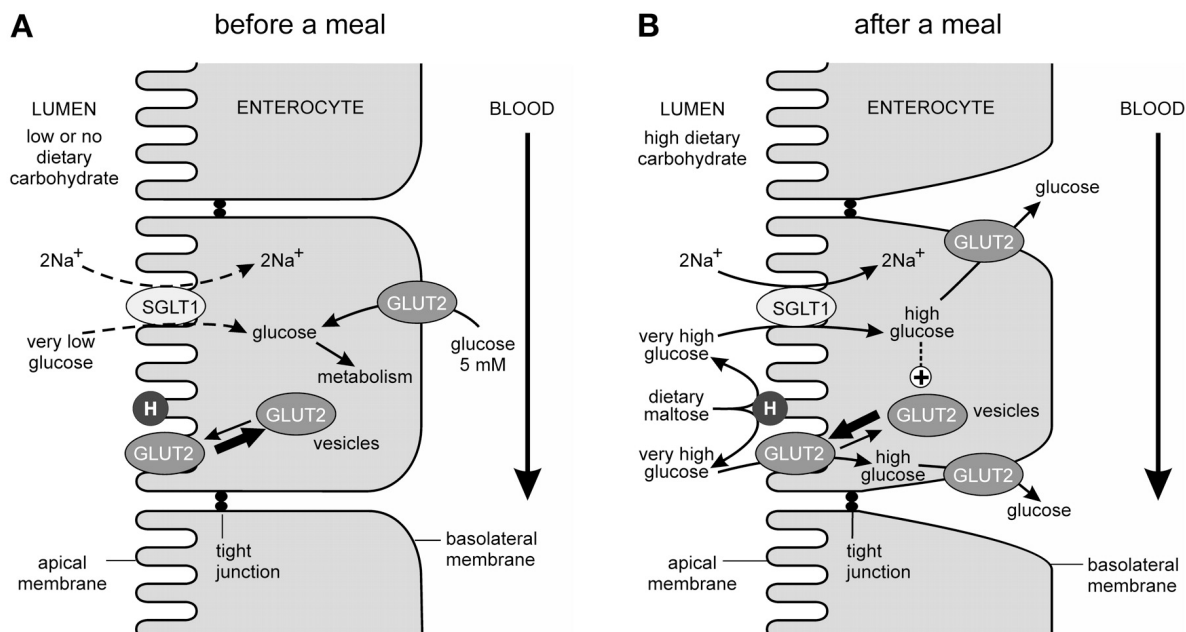


Figure 4 : Modèle de l'absorption du glucose par GLUT2 dans l'intestin avant et après un repas.

Avant un repas (A), la concentration en glucose dans la lumière est faible. SGLT1 transporte le glucose contre son gradient de concentration grâce au symport des deux Na^+ . Le transporteur GLUT2 se trouve dans des vésicules à la membrane apicale des entérocytes. À la membrane basolatérale, GLUT2 permet les échanges de glucose entre le flux sanguin et les entérocytes pour subvenir à leurs besoins.

Après un repas (B), la concentration de glucose dans la lumière est beaucoup plus importante. SGLT1 assure le transport initial du glucose, mais se trouve vite saturé. Un signal est alors déclenché pour permettre l'insertion rapide de GLUT2 présents dans les vésicules au pôle apical à la membrane plasmique. GLUT2 est alors le transporteur majoritaire du glucose et permet le passage transcellulaire des sucres vers le flux sanguin. H = hydrolase.

American Diabetes Association Apical GLUT2 : A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption, American Diabetes Association, 2005. Copyright and all rights reserved. Material from this publication has been used with the permission of American Diabetes Association. »

1.5 Les facteurs à risque métabolique

Une perturbation dans les mécanismes de régulation vus ci-dessus ainsi qu'un déséquilibre tel que la régulation par les incrétines peuvent avoir des conséquences désastreuses sur l'homéostasie du corps humain en empêchant la transmission du message de l'arrivée d'une grande concentration de glucose, en diminuant l'efficacité de son transport et en ne distribuant pas de façon adéquate ce glucose aux organes périphériques (Kellett et Brot-Laroche, 2005). Ces conséquences ne seront visibles qu'à moyen et long terme sans surveillance et donc plus difficiles à traiter. L'une des conséquences importantes de cette perte d'homéostasie est le développement du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique, ou syndrome X, désigne un ensemble de signes physiologiques qui sont des facteurs de risque de développer une maladie cardiaque ou un diabète de type 2 (Eckel *et al.*, 2005, Alberti *et al.*, 2009). Cette définition est incomplète, car en constante évolution, mais des critères de diagnostic clinique ont été établis et ceux-ci semblent faire consensus (Alberti *et al.*, 2009). Une personne est atteinte de ce syndrome si elle présente au moins deux des facteurs de risque suivant selon les critères de diagnostic du syndrome métabolique de l'Organisation mondiale de la Santé (Srikanthan *et al.*, 2016) :

- un embonpoint abdominal, soit, un indice de masse corporelle supérieur à 30kg/m² ou un ratio tour de taille sur tour de hanches supérieur à 0,9 pour les hommes et 0,85 pour les femmes.
- un taux élevé de triglycérides sanguins supérieur ou égal à 150 mg/dL
- une hypertension, soit une tension supérieure ou égale à 140/90 mm Hg
- un taux de lipoprotéine de haute densité inférieur à 35 mg/dL chez l'homme et inférieur à 39 mg/dL chez la femme
- une glycémie élevée à cause d'une résistance à l'insuline diagnostiquée.
- la détection d'albumine dans les urines à un taux supérieur à 20 µg/min ou à un ratio albumine sur créatinine supérieur à 30 mg/g.

Chez presque tous les individus atteints, on note un métabolisme corporel dérégulé qui se manifeste par un début de résistance à l'insuline. Ce mauvais métabolisme donne pourtant des signaux précurseurs avant l'apparition ou l'installation durable de la maladie dont voici quelques exemples.

1.5.1 L'intolérance au glucose et le prédiabète

Parmi ces signes, on retrouve l'intolérance au glucose et l'état prédiabétique. L'intolérance au glucose est diagnostiquée par la provocation d'une hyperglycémie par l'absorption d'une boisson sucrée contenant 75 g de glucose chez une personne à jeun depuis au moins 8 h. La glycémie est alors mesurée 2 h après l'ingestion de la boisson sucrée. Une personne normale aura une tolérance normale au glucose si sa glycémie est inférieure à 7,8 mmol/L après deux heures. Au-dessus de ce chiffre, la personne souffre d'intolérance au glucose même si sa glycémie à jeun est normale. Au-delà de 11,1 mmol/L, cette personne peut être atteinte de diabète (Zendjabil, 2015). La personne sera prédiabétique si sa glycémie à jeun est supérieure à la normale, soit entre 6,1 et 6,9 mmol/L et est intolérante au glucose (Zendjabil, 2015). Parfois, l'élévation de la glycémie à jeun ou après le test de tolérance au glucose est très subtile et ne sera pas reconnue comme étant cliniquement anormale parce que les valeurs restent inférieures aux normes officielles. Pourtant, ceci pourrait être la première étape d'un dysfonctionnement des cellules β du pancréas qui compense la résistance à l'insuline (Weir et Bonner-Weir, 2004).

1.5.2 La stéatose hépatique

La stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD pour non alcoholic fatty liver disease) est caractérisée par une accumulation de triglycéride dans le foie sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes. L'obésité et la résistance à l'insuline seraient responsables de ce phénomène en favorisant la libération des acides gras libres des adipocytes. L'augmentation de la masse des adipocytes et de l'activité de la lipase hormonosensible permettent l'hydrolyse des triglycérides qui contribue à l'élévation du niveau des acides gras libres dans le sang. Le taux d'absorption des acides gras par les hépatocytes n'est pas contrôlé et dépend donc directement de la concentration plasmatique des acides gras libres (Browning et Horton, 2004). Ces acides gras sont ensuite soit oxydés pour générer de l'ATP, soit estérifiés pour produire des triglycérides qui sont incorporés dans les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) pour l'exportation ou stockés dans les hépatocytes. Un défaut dans l'une ou l'autre de ces voies métaboliques peut conduire à la stéatose hépatique par accumulation de l'acide oléique, le produit final de la synthèse *de novo* des acides gras. La contribution significative de la synthèse d'acide gras endogène au développement du NAFLD ne provient que de données sur des souris. Chez l'humain, cet

effet serait plus modéré, car les acides gras synthétisés *de novo* dans le foie contribuent modestement au niveau de synthèse des triglycérides dans celui-ci, mais l'importance de cette voie de signalisation dans le développement de la stéatose reste à être déterminée.

La stéatose hépatique est un prérequis pour des événements subséquents qui entraîneront des blessures au foie et qui feront évoluer la maladie vers une stéatohépatite non alcoolique (NASH). L'étiologie de la progression de la maladie est encore peu connue, mais elle impliquerait un stress oxydatif et des facteurs qui promeuvent l'expression de cytokine pro-inflammatoire (Browning et Horton, 2004). La NASH se distingue du NAFLD par le gonflement et la mort des hépatocytes, des dépôts de collagène qui traduisent une fibrose et l'invasion du tissu par les cellules immunitaires (Cohen *et al.*, 2011). La NASH peut progresser en cirrhose dans 10% à 29% des individus avec NASH en dix ans (Argo et Caldwell, 2009), la cirrhose évoluant éventuellement en cancer du foie.

1.6 Les nucléotides extracellulaires

Il est bien connu que plusieurs facteurs contribuent au maintien d'une glycémie normale. Entre autres, l'insuline qui stimule l'absorption du glucose par les tissus périphériques, tels les muscles et les adipocytes, en mobilisant GLUT4 à la membrane (Khan et Pessin, 2002). Le glucose est alors emmagasiné par les voies de la glycogénogenèse et de la lipogenèse tout en inhibant la glycogénolyse dans le foie (Saltiel et Kahn, 2001). Inversement, le glucagon stimule la gluconéogenèse, la glycogénolyse et la lipolyse et inhibe la glycogénogenèse et la lipogenèse (Jiang et Zhang, 2003). Enfin, les incrétines qui ont un effet insulino-trope, telles que le GIP et le GLP-1, participent indirectement à la régulation de la concentration de glucose sanguin. Ces deux hormones favorisent également la prolifération et la survie des cellules β du pancréas. Chacune possède néanmoins des rôles distincts. Le GIP favorise les effets de l'insuline sur le métabolisme des lipides. Le GLP-1 inhibe la vidange gastrique et favorise la satiété. Le GLP-1 inhibe aussi la sécrétion de glucagon et diminue la production de glucose endogène (Kim et Egan, 2008). À ces facteurs, dont le rôle est bien documenté, nous pouvons ajouter les nucléotides extracellulaires et plus particulièrement l'adénosine 5'-triphosphate (ATP).

Effectivement, l'ATP peut moduler la fonction des cellules β pancréatique en se liant aux récepteurs P2Y et P2X pour moduler la sécrétion d'insuline (Petit *et al.*, 2009). Plus précisément, des études montrent que le récepteur P2Y₁ joue un rôle dans la régulation

du glucose puisque des souris $P2Y_1^{-/-}$ ont une glycémie et une insulinémie plus élevées et que ces souris sont plus grosses malgré une consommation de nourriture normale. La sécrétion d'insuline est aussi augmentée dans les îlots de Langerhans isolés de ces souris (Leon *et al.*, 2005). Des analogues pharmacologiques de l'ATP ont été synthétisés et testés comme nouveaux sécrétagogues du pancréas qui agissent en se liant au récepteur P2Y pour libérer l'insuline. La liaison du composé entraîne une sécrétion d'insuline de 500% soit une activité cent fois supérieure à l'ATP, mais a pour effet secondaire une résistance vasculaire pancréatique (Fischer *et al.*, 2000). Enfin, des polymorphismes dans le gène codant l'un des récepteurs à l'ATP, le récepteur P2X7, et qui conduisent à des défauts de fonctionnement sont associés à une altération de l'homéostasie du glucose chez la souris et l'humain. Les souris possédant l'allèle avec le polymorphisme développent une intolérance au glucose très tôt et répondent moins bien à l'insuline (Todd *et al.*, 2015).

Depuis maintenant plus de 40 ans, des rôles essentiels sont attribués aux nucléotides extracellulaires comme médiateurs autocrines et paracrines dans la communication intercellulaire (Burnstock, 1972). Dans les faits, la première preuve d'un signal extracellulaire induit par une purine a été décrite par Drury et Szent-Györgyi (Drury et Szent-Gyorgyi, 1929) sur le flot sanguin.

Les sources de nucléotides extracellulaires sont multiples. La concentration cytosolique d'ATP est de l'ordre du millimolaire. Une première grande source de nucléotides extracellulaires est donc la cellule elle-même puisque la lyse ou l'éclatement de celle-ci va augmenter de manière considérable la concentration en nucléotide dans le voisinage immédiat de la cellule. Dans les neurones du système nerveux central et périphérique, l'ATP est localisée et sécrétée avec les neurotransmetteurs conventionnels par exocytose pour atteindre une concentration jusqu'à 100 mM. Les terminaisons nerveuses libèrent certes une quantité plus faible, mais leurs actions sont plus efficaces grâce à leur proximité avec leurs cellules cibles (White, 1988, Zhang *et al.*, 2000, Burnstock, 2006). Les nucléotides peuvent aussi être libérés dans le milieu extracellulaire grâce à des canaux membranaires spécifiques en réponse à des stimuli mécaniques, hypoxiques ou à la suite de la formation d'un pore membranaire après l'infection des cellules par des bactéries (Crane *et al.*, 2002). Des forces d'étirement, de cisaillement et des changements osmotiques induisent la libération de nucléotides chez beaucoup de cellules et de tissus. Le changement

de milieu dans un pétri contenant des astrocytomes humains stimule jusqu'à dix fois la libération d'UTP (Lazarowski *et al.*, 1997). L'hypoxie induit la libération d'ATP des cellules endothéliales et des fibroblastes de l'adventice de l'artère pulmonaire (Gerasimovskaya *et al.*, 2002).

Dans l'intestin, les sources de nucléotides extracellulaires sont la nourriture (Grimble, 1994, Ortega *et al.*, 1995) et la flore bactérienne qui colonise la lumière intestinale (Crane *et al.*, 2005). Les cellules de la muqueuse de l'iléon contribuent aussi à la sécrétion d'ATP (Patel *et al.*, 2011). En condition pro-inflammatoire, nous avons aussi rapporté que les cellules épithéliales intestinales sécrètent de l'UTP et de l'UDP (Grbic *et al.*, 2008). Au site d'inflammation, les nucléotides peuvent être libérés en grande quantité à cause des bris cellulaires, de l'activation des leucocytes et de la présence des cytokines et des chimiokines (Di Virgilio *et al.*, 2001). Dans le cas d'une blessure, les plaquettes sanguines qui sont recrutées et activées peuvent libérer une grande quantité de nucléotides par exocytose. Elles concentrent dans des granules de sécrétion jusqu'à 500 mM de nucléotides (Boeynaems *et al.*, 2005). Des conditions d'hypoxie et d'acidose locale peuvent aussi favoriser la libération des nucléotides dans l'intestin (Hart *et al.*, 2008, Colgan et Eltzhig, 2012). De façon intéressante, il a été montré que le glucose déclençait chez certaines bactéries colonisant l'intestin humain la sécrétion d'ATP (Hironaka *et al.*, 2013). Cependant, la concentration exacte de ces nucléotides extracellulaires dans l'intestin reste inconnue. Une fois libérés, les nucléotides peuvent exercer leur action autocrine ou paracrine en se liant à leurs récepteurs spécifiques.

1.7 Les récepteurs nucléotidiques

Les nucléotides tri- et diphosphates sont les ligands endogènes de la famille des récepteurs nucléotidiques P2. Les récepteurs P2 se divisent en deux sous-familles : les récepteurs P2Y sont des récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs P2X sont des récepteurs canaux sélectifs de certains cations activés par un ligand. Dans cette thèse, je m'intéresserai aux récepteurs de la famille des P2X et au récepteur P2X7 tout particulièrement.

1.7.1 Propriétés des récepteurs P2X

Les sept sous-types de récepteurs P2X présentement identifiés chez l'humain sont encodés par sept gènes différents (North, 2002). La séquence codante des gènes des récepteurs P2X peut contenir jusqu'à treize exons et comprend de nombreux variants d'épissage alternatif. Les sept récepteurs P2X qui ont été clonés chez le rat et l'humain font de 379 acides aminés (P2X6 de rat) à 595 acides aminés (P2X7 humain et de rat) de long et partagent de 35% à 54% d'identité. Structurellement, ces récepteurs sont composés de deux domaines hydrophobes transmembranaires et une large boucle extracellulaire dans laquelle va se lier le ligand ATP. Les extrémités N-terminales et C-terminales sont cytoplasmiques. Une caractéristique importante du domaine extracellulaire qui représente la plus grande partie de la protéine est la présence de dix résidus cystéine hautement conservés parmi tous les récepteurs des vertébrés et qui forment cinq ponts disulfures. Chez le rat, les sous-unités possèdent de trois à six séquences de N-glycosylation qui servent à l'adressage de la protéine à la membrane plasmique (North, 2002). L'extrémité N-terminale des récepteurs est similaire en longueur et contient un domaine consensus de phosphorylation par les protéines kinases C (PKC). L'extrémité C-terminale est en revanche beaucoup plus variable en longueur (Figure 5).

Les récepteurs P2X forment des homo- ou des hétérotrimères. L'organisation trimérique a été mise en évidence par réticulation et analyse en gel PAGE natif des récepteurs P2X1 et P2X3 surexprimés dans les oocytes de *Xenopus laevis* (Nicke *et al.*, 1998), puis confirmée par microscopie à force atomique (Barrera *et al.*, 2005), microscopie électronique (Mio *et al.*, 2005) et enfin par cristallisation du récepteur P2X4 du poisson-zèbre *Danio rerio* (Kawate *et al.*, 2009). Les possibilités d'assemblage ont été définies et les sous-unités les plus remarquables sont les sous-unités P2X₆ qui ne peuvent pas former d'homotrimères, les sous-unités P2X₅ qui s'assemblent avec toutes les autres sous-unités sauf la sous-unité P2X₇ qui ne forme que des homotrimères (Torres *et al.*, 1999, Barrera *et al.*, 2005). Chaque combinaison de sous-unités, avec les différents variants possibles, contribue à la diversité de signalisation par les récepteurs P2X.

Les récepteurs P2X ont comme ligand naturel principal l'ATP qui, lorsqu'il se lie sur chacune des sous-unités du récepteur, permet l'ouverture du canal et permet le passage des ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺. La désensibilisation de chacun des canaux dépend des propriétés

propres à chacune des sous-unités qui le composent. Certains récepteurs sont rapidement désensibilisés comme les récepteurs P2X1 et P2X3, d'autres sont plus lents comme P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7 (North, 2002). Les récepteurs P2X sont largement distribués dans les organes et sont associés à de nombreux effets liés aux nucléotides principalement dans les neurones et la transmission synaptique, la contraction des muscles lisses, l'activation des macrophages, leur prolifération et la mort cellulaire (Burnstock et Knight, 2004, Surprenant et North, 2009).

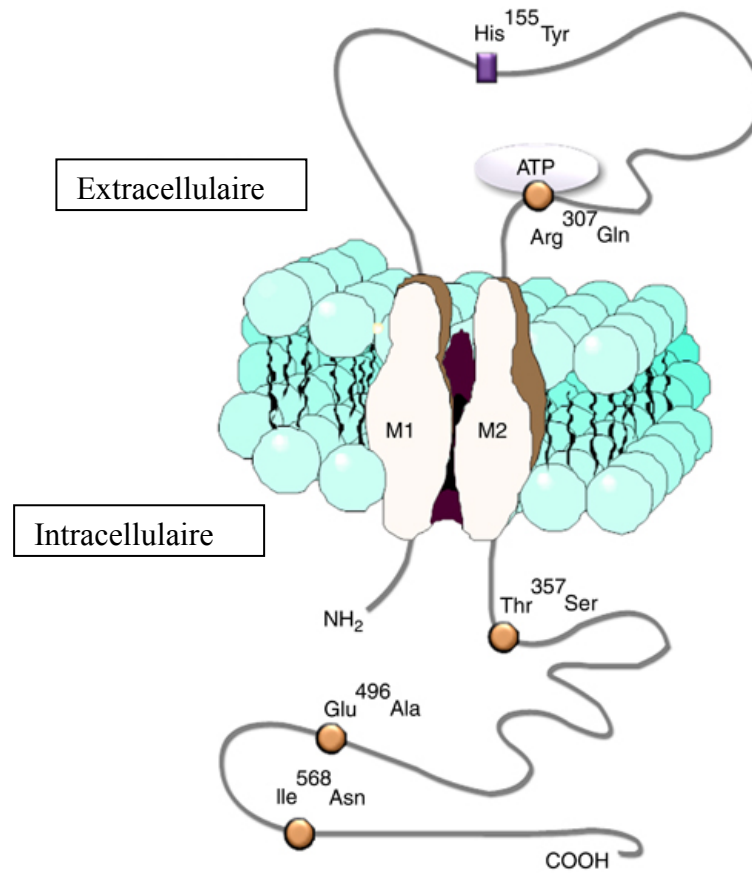


Figure 5 Structure d'une sous-unité des récepteurs P2X

Chaque sous-unité des récepteurs P2X est constituée de deux séquences riches en acides aminés hydrophobes qui correspondent aux deux domaines transmembranaires (M1 et M2). Les extrémités N-terminales et C-terminales sont cytoplasmiques. Le domaine extracellulaire représente la plus grande partie de la protéine. Il contient dix résidus cystéine très conservés dans l'évolution qui forment des ponts disulfures. Des résidus chargés positivement vont accueillir la molécule d'ATP sur chacune des sous-unités du récepteur. Le trimère ainsi activé permet l'entrée des ions Na⁺ et Ca²⁺ et la sortie de K⁺. L'extrémité C-terminale est la portion la plus variable des récepteurs P2X.

Modifié de (Gartland *et al.*, 2012)

1.7.2 Signalisation associée aux récepteurs P2X

Comme mentionné plus haut, les récepteurs P2X sont responsables d'une grande diversité de signaux dans beaucoup d'organes et de tissus.

Les récepteurs P2X2 et P2X3 sont essentiels dans la transduction du goût puisque ces deux récepteurs sont présents dans les fibres nerveuses des papilles gustatives de rat (Bo *et al.*, 1999). Suite à l'arrivée d'une substance goûteuse, de l'ATP est libéré par les cellules réceptrices et agit de façon paracrine comme neurotransmetteur sur les récepteurs P2X2, P2X3 et P2X2/3 situés sur les cellules présynaptiques et sur les neurones afférents (Finger *et al.*, 2005). Ces deux récepteurs sont aussi impliqués dans l'audition (Housley *et al.*, 2002). Dans le glomus carotidien, en réponse à l'hypoxie, de l'ATP est libérée et active les nerfs afférents primaires grâce probablement aux récepteurs P2X2/3 (Rong *et al.*, 2003). La distension de la vessie entraîne une libération d'ATP par les cellules urothéliales qui excite les nerfs afférents de la vessie par les récepteurs P2X3 ce qui permet la vidange (Ferguson *et al.*, 1997). L'ATP agit aussi par l'intermédiaire des récepteurs P2X pour conduire la sensation de douleur. Le récepteur P2X7 a été associé à la douleur neuropathique et à la douleur inflammatoire chronique (Chessell *et al.*, 2005).

D'autres mécanismes comme la sécrétion, l'apoptose et l'inflammation sont aussi déclenchés par l'ATP et impliquent principalement le récepteur P2X7 comme nous allons le voir par la suite.

1.8 Le récepteur P2X7

Le récepteur P2X7 est localisé sur les cellules d'origine hématopoïétiques, sur les cellules immunitaires et la plupart des épithéliums. On le retrouve également dans les os et dans de nombreuses cellules endothéliales (North, 2002). Dans l'intestin, on retrouve le récepteur P2X7 à la surface des lymphocytes T dans les plaques de Peyer (Proietti *et al.*, 2014), ainsi que dans les neurones entériques du côlon distal (da Silva *et al.*, 2015) et les ganglions lymphatiques mésentériques (de Campos *et al.*, 2012). Le récepteur s'exprime également dans la muqueuse intestinale (Neves *et al.*, 2014). Ce récepteur atypique de la famille des récepteurs P2X possède de nombreuses facettes pour assurer ses fonctions dans tous ces tissus dont certaines seront développées à la section 1.8.4.

1.8.1 Le gène *P2RX7*, ses variants et ses polymorphismes

Le gène codant le récepteur P2X7 se trouve chez l'humain sur le chromosome douze dans la région q24.31 (Volonte *et al.*, 2012). Il se trouve en tandem avec le gène P2X4 et le gène est constitué de treize exons (Buell *et al.*, 1998). Dix variants d'épissage ont été identifiés à ce jour, un onzième existe chez les rongeurs (Sluyter et Stokes, 2011). Quatre d'entre eux possèdent l'intron dix qui détient un codon-stop prématuré conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée pour sa queue carboxy-terminale. Deux variants possèdent un exon alternatif N3 avec un autre codon d'initiation conduisant à la traduction d'une protéine non fonctionnelle sans domaine transmembranaire 1. De plus, certains variants perdent un ou plusieurs des treize exons. Par exemple, le variant P2X7J tronqué en aval de l'exon 7 n'est pas fonctionnel en lui-même, mais peut se comporter comme dominant négatif lorsqu'il s'associe avec des sous-unités du récepteur P2X7 natif (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005, Kaczmarek-Hajek *et al.*, 2012). Il a été démontré que ce type de récepteur empêchait le déclenchement de l'apoptose normalement induit par l'isoforme P2X7A de ce récepteur permettant ainsi la croissance anarchique de cellules cancéreuses (Feng *et al.*, 2006). Au contraire, l'association de la forme P2X7B avec la forme P2X7A semble renforcer la réponse du récepteur et exercer des effets trophiques (Adinolfi *et al.*, 2010).

Outre l'épissage alternatif, de nombreux polymorphismes ont été répertoriés dans le gène *P2RX7* humain. Certains confèrent des phénotypes de perte ou gain de fonctions et plusieurs sont associés à une susceptibilité accrue de développer certaines maladies (Saunders *et al.*, 2003, Denlinger *et al.*, 2005). Par exemple, P2X7I résulte d'une mutation rare qui conduit à un allèle nul et qui pourrait être associée à une plus grande susceptibilité à la tuberculose (Sluyter et Stokes, 2011). Le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) rs3751143 est le mieux caractérisé et conduit à une perte de fonctions de P2X7.

1.8.1.1 Le SNP perte de fonction rs3751143

Le SNP rs3751143 est une variation d'une base adénine en cytosine à la position 1513 conduisant à la substitution du glutamate 496 en alanine. La fréquence de cet allèle est de 0.122 dans la population caucasienne (Gu *et al.*, 2001). Cette substitution ne semble ni altérer la translocation du récepteur à la surface des monocytes ni celle des leucocytes, mais

conduit à l'expression d'un récepteur non fonctionnel (Gu et al., 2001). Ainsi, même si une plus grande abondance du récepteur P2X7 restaure partiellement sa fonction dans les macrophages, la cytotoxicité induite par l'ATP dans les lymphocytes est fortement altérée. À la lumière de leurs résultats, les auteurs suggèrent que la substitution du glutamate par une alanine perturbe les interactions entre les sous-unités P2X7 pour former le canal (Gu et al., 2001).

Il existe d'autres SNP perte de fonctions, mais qui sont moins bien caractérisés. Inversement, il existe des SNP de gain de fonctions qui sont associés à une libération de IL-1 β , induite par l'ATP, plus importante (Stokes *et al.*, 2010). Les mécanismes par lesquels la substitution d'un acide aminé altère la fonction du récepteur restent encore inconnus. Si le SNP touche le domaine extracellulaire, c'est la liaison de l'ATP qui pourrait être affectée. Les SNP dans les domaines transmembranaires et la queue C-terminale pourraient affecter les mécanismes d'ouvertures et de fermetures du canal ou même la formation de celui-ci. Dans le domaine le plus distal de la protéine, un SNP prévient la mobilité du récepteur jusqu'à la membrane et conduit à une perte de fonction totale du récepteur (Sluyter et Stokes, 2011).

1.8.1.2 SNP de P2X7 et pathologies

Plusieurs de ces SNP sont associés au développement de maladies. Le SNP rs3751143 est le plus robuste en ce qui concerne l'association avec une augmentation de la susceptibilité à la tuberculose. En effet, l'allèle mutant a été trouvé avec une fréquence plus élevée dans six cohortes de patients sur dix qui ont développé cette maladie. De plus, une méta-analyse des polymorphismes de *P2RX7* et de la susceptibilité à la tuberculose soutient cette affirmation (Xiao *et al.*, 2010). L'incapacité d'induire la mort des mycobactéries dans les macrophages est le mécanisme le plus probable, mais un défaut de libération d'IL-1 β ou un défaut de la réponse immunitaire adaptative n'est pas à exclure. Ce SNP a également été étudié dans plusieurs cohortes de patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique. Les observations préliminaires des auteurs suggèrent qu'une augmentation de la fréquence de ce SNP peut être associée à une augmentation de la susceptibilité à la maladie, mais les individus hétérozygotes pour l'allèle 1513 ont une espérance de vie significativement plus longue que les individus possédant les deux copies normales de cet allèle quand ils développent la maladie. (Thunberg *et al.*, 2002, Wiley *et al.*, 2002, Sluyter et Stokes, 2011).

Il existe de nombreuses études d'association de SNP du gène *P2RX7* avec des troubles physiologiques, mais celles-ci doivent être complétées pour montrer une association significative entre la maladie étudiée et la présence du SNP. Néanmoins, pour montrer la diversité de fonctions que peut jouer le récepteur P2X7, voici une énumération de certains désordres associés à des SNP du gène *P2RX7*. Des SNP sont associés à des désordres osseux avec une augmentation du risque de fracture et des problèmes dans la géométrie de la hanche. Ils sont associés aussi à des désordres inflammatoires, cardiovasculaires et psychiatriques (Sluyter et Stokes, 2011).

1.8.2 Structure de la protéine P2X7

Le récepteur P2X7 est un membre atypique de la famille des récepteurs P2X. Contrairement aux autres récepteurs, la concentration ionique extracellulaire ainsi que certains métaux peuvent réguler de façon allostérique le récepteur (Virginio *et al.*, 1997), ce qui a pour conséquence une diminution du courant induit en présence d'une forte concentration ionique (Surprenant *et al.*, 1996, Rassendren *et al.*, 1997). Ceci est dû au fait que le récepteur P2X7 est préférentiellement activé par l'ATP tétraanionique (ATP⁴⁻).

Bien qu'il possède une structure tertiaire comparable aux autres récepteurs P2X, avec une courte queue N-terminale, les deux domaines transmembranaires et la boucle extracellulaire N-glycosylé, il possède une extrémité C-terminale plus longue de 120 à 200 acides aminés (Surprenant *et al.*, 1996, Rassendren *et al.*, 1997) qui lui confère une masse moléculaire pour la forme mature de 65 kDa (Volonte *et al.*, 2012). Contrairement aux autres récepteurs P2X, la queue C-terminale de P2X7 est impliquée dans le maintien et l'augmentation du courant à la suite de l'application soutenue de l'agoniste (Becker *et al.*, 2008). Ce prolongement dans le cytoplasme lui confère de nombreux domaines putatifs d'interaction à d'autres molécules qui peuvent ensuite être à l'origine de l'activation des voies de signalisation qui sont attribuées à l'activation du récepteur P2X7 (Denlinger *et al.*, 2001, North, 2002). Ces domaines sont similaires à plus de 40% à des motifs fonctionnels connus. On trouve un site d'attachement au cytosquelette, une séquence avec un motif PXXP riche en proline qui pourrait être un site de liaison pour les protéines qui possèdent un domaine d'homologie Src3 (SH3). Le récepteur possède aussi un site de multimérisation qui favorise l'assemblage des sous-unités du récepteur, un motif d'interaction aux lipides, un site qui permet le bon adressage du récepteur à la membrane et qui pourrait favoriser la

formation d'un pore. Ce motif entre les acides aminés 551 et 581 pourrait contenir un motif de rétention au réticulum endoplasmique, puisqu'une fois muté, l'expression de P2X7 à la surface est abolie (Smart *et al.*, 2003). Cette observation est confirmée par l'existence d'un polymorphisme dans ce domaine qui substitue une isoleucine à une asparagine et qui entraîne un déficit d'expression du récepteur P2X7 à la surface (Wiley *et al.*, 2003). Le récepteur possède aussi un motif de liaison au lipopolysaccharide contenant deux acides aminés basiques essentiels pour la localisation du récepteur à la surface probablement en stabilisant la protéine à la membrane plasmique des macrophages (Denlinger *et al.*, 2001). La palmitoylation du récepteur est aussi une modification post-traductionnelle essentielle pour le recrutement du récepteur dans les radeaux lipidiques et pour sa stabilité dans le temps dans les macrophages péritonéaux primaires (Gonnord *et al.*, 2009). Enfin, le récepteur contient des résidus similaires à une région du récepteur 1 du TNF qui recouvre son domaine de mort suggérant que le récepteur P2X7 peut activer les caspases et induire l'apoptose.

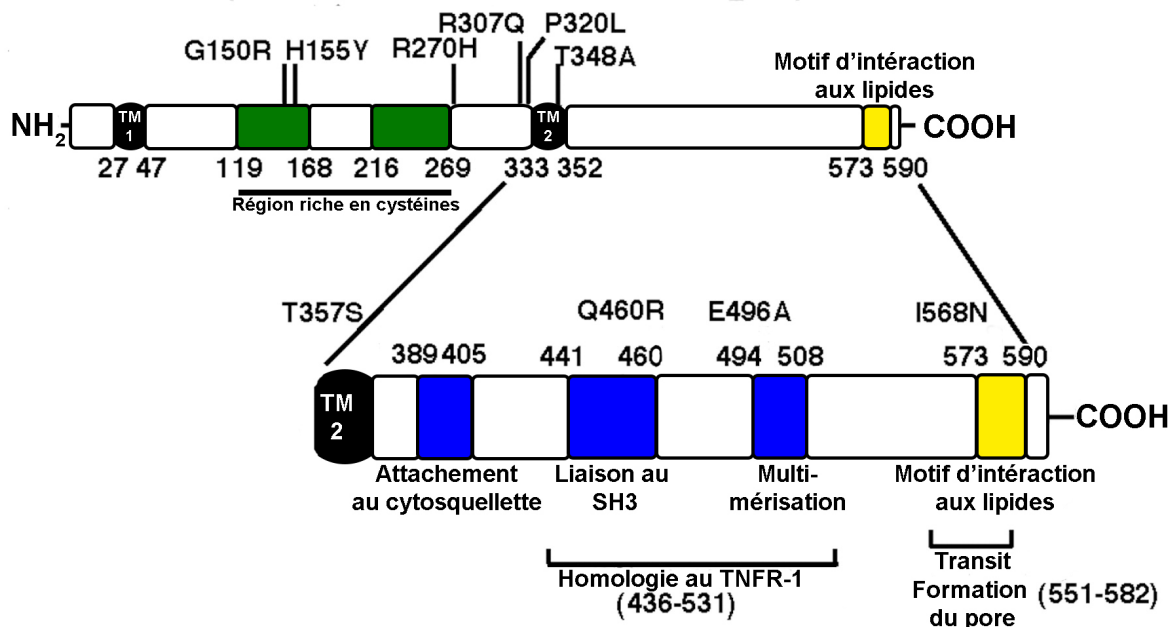


Figure 6 : Représentation schématique de l'extrémité C-terminale du récepteur P2X7 avec ses domaines putatifs et les mutations non synonymes.

Le récepteur P2X7 est constitué de 595 acides aminés avec deux domaines transmembranaires (portions noires), deux régions riches en cystéines (portions vertes) probablement impliquées dans le repliement de la protéine et un domaine qui recouvre un motif d'interaction au lipide (portion jaune). Les portions bleues représentent des domaines putatifs qui ont été identifiés par similarité de séquences avec des domaines connus dans d'autres protéines. L'extrémité C-terminale contient un domaine d'attachement au cytosquelette, un site de liaison aux domaines SH3, un site de multimérisation. La queue C-terminale présente aussi une séquence d'acides aminés qui a une forte homologie avec le domaine de mort du récepteur 1 du TNF et un site qui permet le transit du récepteur et qui donnerait la capacité au récepteur de former un pore.

Adapté de (Denlinger *et al.*, 2006)

1.8.3 Partenaires et régulation du récepteur P2X7

Les multiples fonctions du récepteur P2X7 sont particulièrement dépendantes de la queue C-terminale et des domaines d'interaction présents dans celle-ci. Kim et ses collaborateurs ont mis en évidence des complexes fonctionnels avec le récepteur P2X7 de rat (Kim *et al.*, 2001). Par immunoprécipitation du récepteur P2X7 surexprimé dans les HEK et purification par affinité et d'analyses par spectroscopie de masse, onze protéines ont été co-isolées. Parmi ces protéines, nous retrouvons trois protéines du cytosquelette : l' α -actinine 4, la β -actine et la supervilline. Par une approche double hybride, Wilson et collaborateurs ont mis en évidence que le récepteur P2X7 interagit avec la protéine épithéliale membranaire 2 (EMP-2) (Wilson *et al.*, 2002). Ensemble, ces protéines pourraient fonctionner en synergie et être responsables du changement de morphologie et du bourgeonnement cellulaire observé dans les cellules après l'activation du récepteur P2X7. Cette signalisation mène ensuite éventuellement à la mort cellulaire (Virginio *et al.*, 1999), une des fonctions principales attribuées à P2X7. Kim et ses collaborateurs ont également mis en évidence que la sous-unité $\beta 2$ des intégrines qui est un récepteur de surface cellulaire et la laminine $\alpha 3$ qui est un composant de la matrice extracellulaire co-immunoprécipitent avec le récepteur P2X7 (Kim *et al.*, 2001). Néanmoins, la laminine $\alpha 3$ pourrait interagir avec la sous-unité $\beta 2$ des intégrines. Elle serait donc isolée dans le complexe à cause de cette association et non pas à cause d'une interaction directe avec l'ectodomaine de P2X7. Des protéines chaperonnes et la protéine MAGuk forment aussi des complexes avec le récepteur. MAGuk est une protéine d'échafaudage possédant des domaines d'interaction PDZ, SH3 et guanylate kinase (Dimitratos *et al.*, 1999). Elle pourrait se lier au domaine riche en proline de P2X7 pour ancrer le récepteur au cytosquelette (Sheng et Pak, 2000). Deux protéines de signalisation ont aussi été isolées : la tyrosine phosphatase RPTP β et la phosphatidyl inositol 4-kinase (PI4K). Cette kinase est impliquée dans la biosynthèse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂), un intermédiaire essentiel dans la signalisation des lipides. Le PIP₂ pourrait fournir au récepteur P2X7 la possibilité d'activer des voies de signalisation grâce au diacylglycérol (DAG) et à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Kim et ses collaborateurs montrent que le récepteur P2X7 peut être phosphorylé sur tyrosine. La RPTP β pourrait finalement être responsable de la déphosphorylation du récepteur P2X7 sur sa tyrosine 343, dans le second

domaine transmembranaire. Cette déphosphorylation diminuerait l'amplitude du courant induit par l'agoniste du récepteur P2X7 et réduirait donc son activité. Feng et ses collaborateurs proposent un autre mécanisme de régulation de P2X7 (Feng *et al.*, 2005). À la suite d'une stimulation à l'ATP des cellules CaSki, la forme native de P2X7 est phosphorylée sur tyrosine et sérine. À forte concentration d'ATP, la phosphorylation sur thréonine a un effet négatif sur la phosphorylation des précédents résidus. L'ATP augmente aussi l'interaction de la kinase-3 associée au récepteur couplé à une protéine G (GRK-3), de la β -arrestine-2 et la dynamine au récepteur P2X7. Ces observations suggèrent qu'il existe un mécanisme de rétrocontrôle négatif du récepteur P2X7 qui induit son internalisation par la voie dépendante des clathrines et de la dynamine. Le récepteur P2X7 est ensuite envoyé au protéasome ou recyclé à la membrane (Feng *et al.*, 2005).

Dans notre laboratoire, nous avons montré dans les CEI que l'augmentation de glucose dans le milieu stimule l'expression du récepteur P2X7 grâce à une augmentation de l'expression et de l'activité du facteur de transcription CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) β (Bilodeau *et al.*, 2015). En plus d'une régulation transcriptionnelle et d'une régulation post-traductionnelle du récepteur P2X7, son activité est régulée négativement par la présence de cations divalents tels que le calcium, le magnésium, le zinc et le cuivre (Virginio *et al.*, 1997).

1.8.4 Fonctions et signalisations associées au récepteur P2X7

1.8.4.1 Rôle de P2X7 dans différents tissus et organes

La fonction principale associée au récepteur P2X7 est l'induction de la mort cellulaire (Surprenant *et al.*, 1996, Mackenzie *et al.*, 2005). L'activation du récepteur P2X7 par l'ATP extracellulaire induit l'apoptose et la nécrose des cellules mésengiales en culture (Schulze-Lohoff *et al.*, 1998). Il induit, entre autres, la mort des cellules myéloïdes par activation des caspases (Ferrari *et al.*, 1999), des cellules hématopoïétiques de souris (Yoon *et al.*, 2007) et des monocytes/macrophages lorsqu'ils sont infectés par des mycobactéries (Fairbairn *et al.*, 2001, Placido *et al.*, 2006). La plupart de ces mécanismes impliquent la formation d'un pore à la suite d'une stimulation prolongée à l'ATP qui permet le passage de molécule pouvant atteindre 900 Da.

La formation de ce pore P2X7 est très controversée (Kaczmarek-Hajek et al., 2012). En effet, la protéine pannexin-1, qui forme des canaux transmembranaires, a pu être purifiée avec le récepteur P2X7 dans les cellules HEK transfectées et une interaction fonctionnelle entre les deux protéines a été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires. Sur la base de ces observations, il a été conclu que la protéine pannexin-1 était responsable et le principal constituant du fameux pore P2X7 et que sa formation était nécessaire pour le clivage de la caspase 1 et la libération de l'interleukine IL-1 β pour déclencher les mécanismes apoptotiques (Pelegrin et Surprenant, 2006, Locovei *et al.*, 2007). D'autres études n'ont pas réussi à confirmer ces observations et suggèrent donc que le récepteur P2X7 est l'acteur principal dans la formation du pore qui déclenche les mécanismes d'apoptose ou que d'autres voies de signalisation sont nécessaires à la formation d'un pore unique ou des pores (Yan *et al.*, 2008, Yan *et al.*, 2010, Alberto *et al.*, 2013).

Le récepteur P2X7 participe aussi à la maturation de l'interleukine 1 (IL-1) et à sa sécrétion par les macrophages dans la réponse inflammatoire (Ferrari *et al.*, 2006). L'activation des récepteurs de type Toll (TLR) par les liposaccharides conduit à l'accumulation de pro-IL-1 dans le cytoplasme et l'agrégation des composants de l'inflammasome. Ces composants se retrouvent sous le feuillet interne de la membrane plasmique. L'activation de P2X7 déclenche une fuite de potassium qui permet le chargement de la pro-IL-1, la procaspase-1 et d'autres composants de l'inflammasome dans les lysosomes. La pro-caspase-1 est clivée et convertit la pro-IL-1 en IL-1 mature. La fuite de potassium déclenchée par P2X7 permet la sécrétion du contenu du lysosome.

Le récepteur P2X7 a aussi des rôles un peu moins traditionnels comme la formation des cellules géantes multinucléées (Lemaire *et al.*, 2006), l'internalisation de membrane plasmique (Kochukov et Ritchie, 2004). Il joue aussi un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire des cellules de la microglie (Bianco *et al.*, 2006, Monif *et al.*, 2009)

Dans le modèle de souris, généré par la compagnie Pfizer, dont le gène du récepteur P2X7 a été invalidé (*P2rx7*^{-/-}), les souris mâles ont une réduction de sécrétion salivaire et pancréatique, mais une augmentation des sécrétions des glandes lacrymales. Le récepteur P2X7 pourrait ainsi jouer un rôle dans la régulation de la sécrétion des glandes exocrines

(Kaczmarek-Hajek et al., 2012). Néanmoins, ce modèle de souris est controversé. En effet, deux isoformes de P2X7 avec une queue C-terminale tronquée et une version hybride avec une portion du vecteur ayant servi à invalider le gène échappent à l'invalidation et leur expression en ARN messenger est détectée dans le cerveau, les glandes salivaires et la rate. Pour l'hybride, son expression est aussi retrouvée dans le foie, les poumons et les reins. Les protéines une fois traduites se rendent difficilement à la membrane et leur activation ne produit qu'un très faible courant par rapport à la forme native de P2X7 (Masin *et al.*, 2012).

Dans les glandes salivaires, qui ont été un modèle de transduction de signal dans des cellules épithéliales depuis des années, le récepteur P2X7 garde les mêmes propriétés, qui ont été rapportées dans d'autres systèmes cellulaires tels que le flux des ions et la perméabilisation des cellules au bromure d'éthidium. Dans ces cellules, P2X7 peut moduler l'activation de la phospholipase C- β (PLC- β) par d'autres neurotransmetteurs, agissant ainsi comme neuromodulateur, et cela de façon indépendante du calcium extracellulaire. Le modèle de souris transgéniques P2X7^{-/-} a confirmé l'implication du récepteur dans cette modulation qui serait couplée à la voie de signalisation des lipides intracellulaires. P2X7 peut aussi stimuler la phospholipase A₂ (PLA₂) qui induit la libération d'acide arachidonique qui, avec ses dérivés, sont des médiateurs de l'inflammation. L'activation de PLA₂ par P2X7 pourrait donc ainsi participer à des processus inflammatoires dans les cellules épithéliales. Le récepteur augmente aussi l'activité de la phospholipase D (PLD) dans les acini de la glande submandibulaire. Cette activation est dépendante en partie de l'augmentation du calcium intracellulaire, des PKC, et de PLA₂. Pour chacune des phospholipases mentionnées ci-dessus, l'interaction de P2X7 avec la PI4K pourrait être la clé de la régulation de ces enzymes puisque le niveau de PIP₂ contrôlé par la PI4K est un régulateur de l'ancrage ou de l'activation de certaines isoformes de PLA, PLC et PLD (Sluyter et Stokes, 2011). P2X7, en régulant les phospholipases, génère une grande quantité de médiateurs lipidiques qui peuvent ensuite réguler de nombreux effecteurs tels que les PKC et les MAP kinases, mais les mécanismes sous-jacents restent encore inconnus.

L'activation du récepteur P2X7 est associée à l'activation de la signalisation par les kinases N-terminal c-Jun dans les macrophages (Humphreys *et al.*, 2000). Dans les acini de la parotide de rat, la stimulation et l'activation du récepteur P2X7 activent la protéine kinase D (PKD) et les protéines kinases régulées par signal extracellulaire 1 et 2 (ERK1 et

ERK2) (Bradford et Soltoff, 2002). Une forte concentration d'ATP augmente l'activité de PKD par transphosphorylation et son autophosphorylation. Cette signalisation est dépendante de PKC δ , mais indépendante de l'élévation de calcium intracellulaire. Certains mécanismes vus ci-dessus ne sont pas complètement compris, mais impliquent de multiples voies de signalisation comme l'activation des phospholipases A2 et D et le couplage aux PKC, à AKT, à Src et la kinase p38 (Jacques-Silva *et al.*, 2004, Papp *et al.*, 2007, Martel-Gallegos *et al.*, 2013).

1.8.4.2 Rôle de P2X7 dans l'intestin

Dans l'intestin, le récepteur P2X7 joue aussi différents rôles pour maintenir l'intégrité de la paroi intestinale et l'homéostasie entre les bactéries commensales et l'épithélium intestinal. Le récepteur P2X7 est exprimé dans les neurones du système nerveux entérique. En condition de colite ulcéreuse, une réduction du nombre de neurones a été notée et celle-ci serait due à l'activation du récepteur et de la pannexine 1 ce qui viendrait affecter la motilité intestinale (da Silva *et al.*, 2015). Il a été montré que l'utilisation d'antagonistes dirigés contre P2X7 en prophylaxie est efficace pour traiter la colite induite chez le rat, probablement par une action anti-inflammatoire systémique, en interférant avec une boucle d'amplification de stress inflammatoire soutenue par l'activation de P2X7 (Marques *et al.*, 2014). Dans des échantillons de colonoscopie de patient atteint de la maladie de Crohn, l'étude de l'expression du gène *P2RX7* montre une expression accrue du récepteur dans l'épithélium enflammé et dans la *lamina propria* des patients atteints de cette maladie. Ces tissus présentent aussi un taux plus élevé d'apoptose par rapport aux tissus contrôles. Ces observations appuient une implication possible du récepteur P2X7 dans l'inflammation et l'apoptose dans le côlon (Neves *et al.*, 2014). *In vitro*, dans les cellules épithéliales HCT8, l'ajout d'ATP dans le milieu change la morphologie des cellules qui présentent des caractéristiques d'autophagie, induit l'apoptose des cellules et active la production de dérivés réactifs de l'oxygène. La combinaison d'un traitement à l'interféron- γ et à l'ATP dans des explants épithéliaux intestinaux humains présentent un pourcentage de cellules en apoptose plus élevé dans l'épithélium et la *lamina propria* du côlon et une activité de la caspase-3 plus élevée aussi. L'exposition à l'interféron- γ des biopsies contribue à une augmentation de l'expression du récepteur non seulement dans l'épithélium, mais aussi dans *lamina propria* alors que dans des conditions

normales, P2X7 se limite à l'épithélium (Souza *et al.*, 2012). Dans les plaques de Peyer situé dans l'iléon, le récepteur P2X7 contribue à réguler le nombre de lymphocytes T auxiliaires. En effet, le récepteur est fortement exprimé dans ces cellules et il contribue à l'induction de leur mort cellulaire. Ce phénomène permet de maintenir une réponse immunitaire appropriée et de maintenir une protection de l'hôte contre les bactériémies. En absence du récepteur, la réponse immunitaire est plus importante et contribue à l'élimination des bactéries commensales, ce qui a pour conséquence une diminution de la translocation bactérienne, puis une diminution de la stimulation des lymphocytes B. Les souris n'exprimant pas le récepteur P2X7 sont plus susceptibles de faire des septicémies (Proietti *et al.*, 2014). Le récepteur P2X7 est aussi impliqué dans le dysfonctionnement des neurones sensoriels viscéral et l'hypersensibilité post-infection dans un modèle murin d'induction du syndrome du côlon irritable (Keating *et al.*, 2011). Dans ce cas, P2X7 est aussi une cible pour réduire la douleur viscérale. Finalement, l'activation de P2X7 est à l'origine d'une boucle d'amplification du processus inflammatoire dans les cellules épithéliales intestinales. Dans la muqueuse intestinale, les granulocytes sont attirés par chimiotaxie et libèrent de l'ATP dans l'espace extracellulaire. Cet ATP ou celui libéré par des CEI en nécrose active le récepteur P2X7 à la membrane des CEI. Cette stimulation conduit à l'activation de la caspase 1 et à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle IL-1 β qui induit la sécrétion d'autres cytokines comme C-X-C ligand 5 et C-X-C ligand 1 qui vont attirer les granulocytes à travers l'épithélium intestinal. De plus, IL-1 β peut activer différentes métalloprotéases qui peuvent dégrader la *lamina propria* et permettre un recrutement massif des granulocytes des vaisseaux sanguins (Cesaro *et al.*, 2010).

Hypothèse/problématique

En raison de l'augmentation de la prévalence de l'obésité, un facteur de risque de développer un syndrome métabolique et un précurseur du diabète de type 2, des maladies cardiovasculaires ou un accident vasculaire cérébral, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de réguler la glycémie. Plusieurs études mettent en avant le rôle des récepteurs P2 dans le contrôle de l'homéostasie du glucose dans des modèles animaux avec une délétion dans les gènes codant ces récepteurs. Ainsi, le récepteur P2Y₁ est impliqué dans le maintien de l'homéostasie du glucose par le pancréas en régulant la sécrétion d'insuline chez la souris (Leon et al., 2005). Concernant notre protéine d'intérêt, il a été démontré que P2X7 était régulé à la hausse dans les îlots de Langerhans d'individus obèses alors que le récepteur est pour ainsi dire indétectable dans ceux-ci chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Glas et al., 2009). Enfin, une étude d'association pangénomique a mis en évidence une association entre des variations de l'homéostasie du glucose et des polymorphismes de *P2RX7* (Todd et al., 2015). Les sources d'énergie proviennent de l'alimentation et le glucose doit impérativement traverser la barrière épithéliale intestinale avant de se retrouver dans la circulation sanguine où il sera métabolisé par les cellules ou s'accumulera sous forme de glycogène dans le foie et les muscles squelettiques ou sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Nous avons vu que le récepteur P2X7 est exprimé dans les villosités de l'intestin (Groschel-Stewart *et al.*, 1999), que son expression était augmentée en présence de glucose dans les CEI (Bilodeau et al., 2015).

L'hypothèse du projet de recherche est que le récepteur P2X7 activé par l'ATP est impliqué dans la régulation de la glycémie par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes, dont la régulation de la translocation du transporteur GLUT2.

Objectifs

Objectif 1 : Identifier la signalisation et les mécanismes cellulaires activés par P2X7 qui régulent la translocation membranaire de Glut2.

In vitro, dans un modèle de CEI, nous allons identifier les protéines qui sont activées à la suite de la stimulation du récepteur P2X7 et nous allons confirmer le rôle de ces protéines en suivant la localisation du transporteur GLUT2 après traitement des CEI avec des

inhibiteurs pharmacologiques de chacune des protéines identifiées. Le rôle de P2X7 dans l'activation de cette signalisation sera ensuite vérifié par une approche d'extinction du gène *P2rx7* par shARN.

Objectif 2 : Étudier les effets de la perte du gène *P2rx7* dans les souris sur l'axe crypte villosité de l'intestin

Après confirmation de la perte d'expression du récepteur P2X7 chez les souris invalidées pour le gène *P2rx7*, nous étudierons la localisation du transporteur GLUT2 le long de l'axe crypte villosité des jéjunums des souris qui ont subi un jeûne de 6 h pour confirmer si le récepteur influence la translocation de GLUT2 *in vivo*. Nous ferons aussi un décompte des cellules entéroendocrines à l'aide de l'anticorps anti-chromogranine A pour détecter un changement dans la fréquence d'apparition des cellules et savoir si P2X7 joue un rôle dans leur détermination.

Objectif 3 : Examiner des changements physiologiques chez la souris consécutifs à la perte du récepteur P2X7.

Nous étudierons la croissance des souris sur 20 semaines pour détecter un changement dans la prise de masse des souris depuis le sevrage. Nous allons également mesurer la glycémie des souris après 6 h de jeûne et tester leur tolérance à une hyperglycémie provoquée pendant 90 min. Une analyse des concentrations d'insuline dans le plasma sera aussi effectuée pour détecter un changement dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie du glucose chez ces souris, ainsi que les taux de triglycérides et de cholestérol. Nous observerons les changements anatomiques dans le foie, un organe régulateur de la glycémie et qui exprime le transporteur GLUT2, et nous étudierons le profil ARNm de certains acteurs impliqués dans la lipogenèse dans cet organe.

De façon exceptionnelle, cette thèse sera présentée dans un format hybride ou combiné. Dans un premier temps, les résultats de l'objectif 1 seront présentés sous la forme d'un article scientifique publié en 2013 (Chapitre I). Dans la seconde partie, le matériel et les méthodes ainsi que les résultats couvrant les objectifs 2 et 3 seront présentés dans un format de thèse classique (Chapitre II).

CHAPITRE I

ARTICLE

Glucose transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes

Auteurs de l'article: Jean-François Bourzac, Karine L'Ériger, Jean-François Larrivée, Guillaume Arguin, Maude S. Bilodeau, Jana Stankova, and Fernand-Pierre Gendron.

Statut de l'article: publié dans Journal of Cellular Physiology

Avant-propos: J'ai effectué la majorité du travail expérimental à l'exception de la figure 1 B et C, la figure 5, la figure 6, la figure supplémentaire 3, la figure supplémentaire 5. Mes versions des figures 1A, 2A n'ont pas été retenues pour la première version de la publication

Résumé : L'ATP est connue pour induire le relargage de l'insuline dans les cellules β du pancréas en activant les récepteurs P2X et P2Y. L'intestin qui est l'organe responsable de l'absorption du glucose est une cible pour réguler le flux de glucose dans le sang. Dans cette étude, nous avons montré que le récepteur P2X7 s'exprime non seulement à l'apex des villosités, mais également dans les deux tiers supérieurs à l'aide d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de la protéine qui reconnaît la plupart des isoformes de P2X7. Dans un modèle de cellule intestinale non cancéreuse IEC-6, nous avons montré que la stimulation des cellules par le BzATP, un agoniste synthétique de P2X7 conduit à une diminution de l'expression du transporteur GLUT2 à la membrane. Ce mécanisme est spécifique de P2X7 puisque l'utilisation de l'oATP, un antagoniste irréversible, du A740003, un antagoniste compétitif et l'utilisation de cellules IEC-6 exprimant un shARN dirigé contre P2X7 inhibent le phénomène. L'activation de P2X7 conduit aussi à la phosphorylation activatrice des protéines effectrices PI4K, PLC γ -1, PKC δ et PKD1 indépendamment d'une élévation du calcium intracellulaire. De plus dans les IEC-6,

l'activation de P2X7 par le BzATP induit une diminution de l'absorption de glucose radioactif non hydrolysable. Dans le modèle Caco-2 de cellules épithéliales intestinales qui entame un processus de différenciation à l'atteinte de la confluence, l'activation du récepteur P2X7 conduit à une diminution du transport transcellulaire du glucose radioactif non hydrolysable. L'ensemble de ces données suggère que le récepteur P2X7 est une cible potentielle pour réguler le transport du glucose dans l'intestin grêle.

P2X₇ receptor stimulation reduces glucose absorption by down-regulating glucose transporter 2 expression at the membrane of intestinal epithelial cells

Jean-François Bourzac¹, Karine L'Ériger¹, Jean-François Larrivée², Guillaume Arguin¹,
Maude S. Bilodeau¹, Jana Stankova², and Fernand-Pierre Gendron^{1*}

¹Department of Anatomy and Cell Biology, and ²Immunology Division, Department of
Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4

Running head: P2X₇ regulates Glut2 expression

Key Words: **extracellular ATP, glucose transport, intestinal epithelium, ion-gated channels, receptor, cell signaling**

* Corresponding author: Fernand-Pierre Gendron, Ph.D., Department of Anatomy and Cell Biology, FMSS, Université de Sherbrooke, 3001 12^e Avenue Nord, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4. Tel. 819-564-5272, Fax: 819-564-5320; E-mail: Fernand-P.Gendron@USherbrooke.ca

Total number of figures: 6; Tables: 0

Contract grant sponsor: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada

Contract grant number: 327128-06

Contract grant sponsor: Canadian Institutes of Health Research

Contract grant number: NMD-94729.

ABSTRACT

With the diabetes epidemic affecting the world population, there is an increasing demand for means to regulate glycaemia. Dietary glucose is first absorbed by the intestine before entering the blood stream. Thus, the regulation of glucose absorption by intestinal epithelial cells (IECs) could represent a way to regulate glycaemia. Among the molecules involved in glycaemia homeostasis, extracellular ATP, a paracrine signaling molecule, was reported to induce insulin secretion from pancreatic β cells by activating P2Y and P2X receptors. In rat's jejunum, P2X7 expression was previously immunolocalized to the apex of villi, where it has been suspected to play a role in apoptosis. However, using an antibody recognizing the receptor extracellular domain and thus most of the P2X7 isoforms, we showed that expression of the receptor is apparent in the top two-thirds of villi. These data suggest a different role for this receptor in IECs. Using the non-cancerous IEC-6 cells and differentiated Caco-2 cells, glucose transport was reduced by more than 30% following P2X7 stimulation. This effect on glucose transport was not due to P2X7-induced cell apoptosis, but rather was the consequence of glucose transporter 2 (Glut2)'s internalization. The signaling pathway leading to P2X7-dependent Glut2 internalization involved the calcium-independent activation of phospholipase C γ 1 (PLC γ 1), PKC δ and PKD1. Although the complete mechanism regulating Glut2 internalization following P2X7 activation is not fully understood, modulation of P2X7 receptor activation could represent an interesting approach to regulate intestinal glucose absorption.

INTRODUCTION

Intestinal epithelial cells (IECs) form a permeable barrier to luminal pathogens while performing their digestive function and absorption of nutrients, such as glucose. To accommodate luminal glucose fluctuations, IECs have the ability to rapidly adapt their absorption capacity (Kellett et Brot-Laroche, 2005). IECs absorb luminal glucose either in an active manner by the sodium-dependent glucose transporter (SGLT1) or through facilitated transport using glucose transport facilitators 2 (Glut2) (Kellett et Brot-Laroche, 2005). In the classical model of sugar absorption, Glut2 was thought to be located only at the basolateral membrane where it transports glucose into blood (Cheeseman, 1993). More recently, it was shown that Glut2 is transiently inserted in the apical membrane of IECs by trafficking from an internal pool in response to a number of stimuli, including food intake, sugar content and hormones (Kellett et al., 2008). In this context, the role of Glut2 in the small intestine is of particular interest since it can transport glucose from the apical membrane of enterocytes to the blood stream on the basal side (Kellett et Brot-Laroche, 2005). Therefore, it is not surprising that IECs absorption of luminal glucose is considered as the first check points in the control of glycaemia (Mithieux, 2005).

Extracellular ATP is an endogenous intracellular signaling molecule like hormones and growth factors (Corriden et Insel, 2010). ATP activates G-protein coupled P2Y₂ and 11 receptors and P2X₁ to 7 ligand-gated ion channels (Corriden et Insel, 2010). In IECs, other than the previously described role of P2Y receptors in jejunum electrolyte secretion (Ghanem *et al.*, 2005), the functions of the P2X receptors have not been defined. However, immunolocalization studies have suggested different roles for this family of receptors. In rat's duodenum, P2X₁ was localized to the capillary plexus in the intestinal villus,

suggesting a role in the uptake and transport of metabolites (Groschel-Stewart et al., 1999). P2X5 immunostained of the membranes of the narrow “stem” of villus goblet cells, possibly influencing synthesis and release of mucin (Groschel-Stewart et al., 1999). P2X7 was localized to the membrane of enterocytes and goblet cells at the tip of the villus where cells are undergoing anoikosis, consistent with its involvement in apoptotic events (Groschel-Stewart et al., 1999). More recently, P2X7 function in IECs was associated to an inflammatory amplification loop during neutrophils migration (Cesaro et al., 2010).

The P2X7 receptor is unique among the P2X receptors family. Its elongated carboxy terminal end present in the full-length P2X7A isoform contains several protein-protein and lipid-protein interaction motifs that are associated with multi-protein complexes composed of cytoskeletal proteins, heat shock proteins, phosphatidylinositol 4-kinase (PI4-K), integrin $\beta 2$, and receptor phosphotyrosine phosphatase- β (Kim et al., 2001). The repeated or prolonged stimulation of P2X7 is associated with the formation of membrane pores that allows bi-directional passage of molecules up to 900 Da in size, which could lead to plasma membrane depolarization and apoptosis (North, 2002). However, we and others have shown that transient activation of P2X7 is associated with its ionic channel properties and activation of PKC and PKD, SAPK, MAPK, and Akt phosphorylation (Humphreys et al., 2000, Bradford et Soltoff, 2002, Gendron *et al.*, 2003, Jacques-Silva et al., 2004). P2X7 stimulation is also associated with phospholipid signaling through the control of target enzymes involved in phospholipid metabolism, such as phospholipases C (PLC) and PLD to generate lipid messengers such as diacylglycerol (DAG) (Sun *et al.*, 1999, Bradford et Soltoff, 2002, Takenouchi *et al.*, 2005). Among the non-apoptotic functions of P2X7, there is his key role in the inflammasome where its activation leads to IL-1 β maturation

(Qu *et al.*, 2007). P2X7 activity is also associated to increase lymphoid cells proliferation (Baricordi *et al.*, 1999), the stimulation of human epidermal keratinocytes terminal differentiation (Greig *et al.*, 2003), and the modulation of plasma membrane trafficking in rat thyrocytes (Kochukov et Ritchie, 2004). P2X7A is thus not only involved in pro-apoptotic events but also in normal cell functions. It was suggested that the non-apoptotic effects of P2X7A could be mediated by the formation of heterotrimers composed of the C-terminal end truncated isoform P2X7B and at least one P2X7A subunit (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005, Adinolfi *et al.*, 2010), although P2X7A stimulation can also stimulate non-apoptotic events as stated above (Adinolfi *et al.*, 2010). Finally, there is some evidence for the formation of P2X7 and P2X4 heteromers (Casas-Pruneda *et al.*, 2009, Weinhold *et al.*, 2010) in which the upregulation of P2X4 expression and function could compensate P2X7 depletion (Weinhold *et al.*, 2010).

In this study, we propose a new role for P2X7 in IECs function. We showed that P2X7 is not only expressed at the tip of small intestine villi (Groschel-Stewart *et al.*, 1999), but that its expression extends to the top two-thirds of villus. We have shown that P2X7 activation reduces glucose absorption and transport by IECs by down-regulating Glut2 membrane expression. Hence, we proposed that PKD participates to protein endocytosis.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

DMEM, Hank's Balanced Salt Solution 1X (HBSS), penicillin-streptomycin, HEPES and fetal bovine serum (FBS) were purchased from Wisent (St. Bruno, QC). GlutaMax, fura-2/AM and Hoechst 33342 were from Invitrogen Life Technologies. ATP

was from Roche Applied Science. Periodate oxidized ATP (oATP), 2'-& 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP), N-(1--2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide (A740003), BAPTA-AM and phenylarsine oxide (PAO) were from Sigma-Aldrich. The PKC inhibitors (GF109203X, Gö6983, Gö6976) and the PLC inhibitor (U73122) were acquired from EMD Biosciences. The selective PKD inhibitor 2,3,4,5-tetrahydro-7-hydroxy-1*H*-benzofuro[2,3-*c*]azepin-1-one (CID755673) and *N*-[1-[[[(Cyanoamino)(5-quinolinylamino)methylene]amino]-2,2-dimethylpropyl]-3,4-dimethoxybenzeneacetamide (A740003) were purchased from Tocris bioscience (Ellisville, MO). Rabbit polyclonal anti-phospho-PKD1/PKC μ (Ser^{744/748}), rabbit polyclonal anti-phospho-PKD1/PKC μ (Ser⁹¹⁶), rabbit polyclonal anti-phospho-PKC δ (Thr⁵⁰⁵), rabbit polyclonal anti-phospho-PLC γ 1 (Tyr⁷⁸³), rabbit anti-PKD/PKC μ , rabbit anti-PKC δ , and rabbit anti-PLC γ 1 were purchased from Cell Signalling Technology. Mouse monoclonal anti-actin (clone C4), rabbit polyclonal anti-P2X7, and control peptide antigen were obtained from Chemicon International. Rabbit polyclonal anti-Glut2 and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated donkey anti-mouse immunoglobulin G (IgG) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG was from GE Healthcare BioSciences, and ECL reagent was from Millipore. Sulfo-NHS-SS-biotin and streptavidine-agarose resin were from Thermo Scientific.

Cell culture

The rat intestinal epithelial cell line IEC-6 , the human c \acute{o} lon carcinoma cell line Caco-2 and human embryonic kidney cell line HEK293T (from the American Type Culture Collection, Manassas, VA) were grown as previously described (Degagne *et al.*, 2009,

Langlois et Gendron, 2009, Grbic *et al.*, 2011). Cells were incubated in serum-free medium for 24 h at 37°C before each experiment.

Generation of P2X7 shRNA IEC-6 cell lines

The 29 mer shRNA constructs directed against rat P2X7 were purchased from Origene (Rockville, MD). Retroviruses were produced in HEK293T cells and used for IEC-6 cells infection according to manufacturer recommendations. shRNA efficiency was validated by measuring transcript expression using quantitative real-time PCR.

Dynamic Video Imaging of Cytosolic Ca²⁺

IEC-6 and Caco-2 cells (5×10^5) were growth on collagen 1 coated glass coverslip in complete DMEM for 48 h. Cells were washed twice with Hanks' balanced salt solution with calcium and magnesium (HBSS 1X; Wisent bioproducts, St-Bruno, QC, Canada). Cells were incubated with 1 μ M fura 2-AM in HBSS for 20 min at room temperature (RT) in the dark. Cells were washed and bathed in fresh HBSS for 20 min at RT to ensure complete hydrolysis of the fura-2/AM. The coverslips were clamped into a Teflon circular open-bottom chamber and was mounted onto the stage of a Olympus IX71 microscope fitted with a MetaFluor digital imaging and photometry system (Olympus, Markham, ON, Canada). Fluorescence from isolated fura 2-loaded cells was monitored by videomicroscopy using alternating excitation wavelengths of 334 and 380 nm and recording emitted fluorescence at 510 nm. All experiments were performed at room temperature. The data is expressed as the intracellular free Ca²⁺ concentration (nM) calculated from the 334/380 fluorescence ratio according to Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Extraction of membrane proteins

Treated cells were washed twice with ice-cold PBS and incubated for 90 min at 4°C in 1 ml of ice-cold PBS containing 2 mg/ml sulfo-NHS-SS-biotin. After biotinylation, cells were washed three times with ice-cold PBS and quenched with 10 mM glycine ice-cold PBS solution. Cells were lysed in Triton buffer (40 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2 mM sodium orthovanadate, 40 mM β -glycerophosphate, 0.1 mM PMSF and protease inhibitor mixture). An aliquot of 25 μ g of each cell lysate was kept as the total protein fraction. The remaining lysates were precipitated overnight at 4°C with streptavidin-agarose resin with constant agitation. Biotinylated protein-streptavidin-agarose complexes were washed three times with 1 ml of Triton buffer. Beads were then resuspended in 40 μ l Laemmli 2X buffer and processed for western blot analysis.

Immunoblot analysis

After treatment and stimulation, cells were harvested and used for Western blot analysis as previously described (Grbic et al., 2008). Immunodetection was performed using anti-phospho-PKD1/PKC μ (Ser^{744/748}; 1:500), anti-phospho-PKD1/PKC μ (Ser⁹¹⁶; 1:500), anti-phospho-PKC δ (Thr⁵⁰⁵; 1:500), anti-phospho-PLC γ 1 (Tyr⁷⁸³; 1:500), or anti-Glut2 antibodies (1:500). After extensive washing with PBS-T, the blots were incubated for 1 h at room temperature with a HRP-conjugated secondary antibody and immunostained bands revealed with the Millipore chemiluminescence system and HyperfilmTM ECL (GE Healthcare) according to the manufacturer's instruction. For signal normalization, membranes were stripped of antibody and re-probed with anti-PKD1/PKC μ (1:500), anti-PKC δ (1:500), anti-PLC γ 1 (1:500) or with anti-actin (1:1,000) antibodies.

Detection of Glut2 membrane expression by flow cytometry

IEC-6 cells were treated with or without inhibitors (oATP or CID755673), stimulated for 5 min with 100 μ M BzATP and media replaced by fresh serum-free media. Cells were harvested at different times using trypsin as indicated in figures. Cells were rapidly washed with ice-cold PBS and fixed using 3% paraformaldehyde (PFA) for 30 min. PFA was washed out of the fixed cells using PBS and non-specific antigen sites blocked using 5% BSA in PBS for 1h with gentle agitation. Cells were rinsed and 1 μ g of anti-Glut2 primary antibody was added to the cell suspension for 1h with agitation. After washing, 2 μ g of Alexa Fluor 488 F(ab'')₂ goat anti-rabbit IgG was added for 30 min. Glut2 surface expression was then evaluated using a FACSCalibur™ flow cytometer and CellQuest Pro software (BD Bioscience).

Indirect immunofluorescence

Rat's jejunum tissues were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight at 4°C, embedded in paraffin, cut into 5- μ m sections, and applied to Superfrost/Plus slides (Fisher Scientific). Deparaffinized and rehydrated slides were processed as previously described (Grbic et al., 2008). P2X7 immunolocalization was performed using rabbit anti-P2X7 antibody as the primary antibodies, incubated with the sections overnight at 4°C. Slides were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated for 2 h with Alexa Fluor 568 F(ab')₂ goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) as the secondary antibody. Similarly, IEC-6 cells grown on sterile glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS after treatment and then fixed with 1% PFA for 30 min at 4°C. Cells were washed with PBS, quenched with 100 mM glycine for 10 min, washed and

then blocked with PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA) for 20 min. Alternatively, cells were washed with PBS, quenched with 100 mM glycine for 10 min, and then permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature (RT) and processed as described above. Cells were subsequently immunostained for 1.5 h with the rabbit anti-Glut2 as the primary antibody and for 30 min with the Alexa Fluor 568 F(ab')₂ goat anti-rabbit IgG (H+L) as the secondary antibody. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Non-immune controls (normal IgG antibody) were included in all experiments. Slides were washed in PBS, mounted and images were captured on a Leica DM2500 microscope using a Hamamatsu ORCA-R² digital camera.

***In vitro* glucose absorption**

For the glucose absorption assays, IEC-6 cells were seeded in 100-mm² petri dishes. After reaching confluence, cells were stimulated for 5 min with 100 μM BzATP and media replaced for FBS-free DMEM supplemented with 200 nCi of 3-O-[methyl-¹⁴C]-D-glucose (PerkinElmer). After 3 h, cells were extensively washed using warm PBS and harvested using trypsin. Cells were directly lysed in 5 ml of BCS scintillation cocktail (GE Health Care). 3-O-[methyl-¹⁴C]-D-glucose incorporation was determined using a Wallac 1409 DSA liquid scintillation counter and Wallac LSC software (PerkinElmer).

***In vitro* glucose transport**

For the *in vitro* glucose transport assays, Caco-2 cells (200,000 cells/well) were seeded on polycarbonate membrane transwell supports coated with collagen I. Cells were grown 15 days post-confluence as previously described (Langlois et Gendron, 2009). The transepithelial electric resistance (TEER) of the filter-grown Caco-2 monolayer was

measured using an EVOM volt ohmmeter (EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) with a pair of STX-2 chopstick electrodes to ensure polarized monolayer integrity. Wells with a TEER value smaller than 1000 ohms were rejected. Caco-2 cells were treated with the P2X7 antagonist A740003 (100 μ M) for 30 min at 37°C prior to receptor stimulation with 100 μ M BzATP for 5 min. Following stimulation, the cell culture media of the lower compartment was replaced by fresh DMEM, whereas the upper part was changed for DMEM supplemented with 200 nCi of 3-O-[methyl- 14 C]-D-glucose. Aliquots (50 μ l) were collected at 0, 5, 10, 20, 40 and 90 min after the addition of the glucose analogues and placed in 5 ml of BCS scintillation cocktail (GE Health Care). Radioactivity was determined as described above.

RESULTS

P2X7 receptor is expressed by IECs

Indirect immunofluorescence analysis showed that P2X7 receptor expression was not only localized to the apex of rat jejunum villi, as previously reported (Groschel-Stewart et al., 1999), but that it extended to the top two-thirds of the villus (Fig. 1A). Presence of a functional P2X7 receptor in IEC-6 (Fig. 1B) and Caco-2 (Fig. 1C) cells was determined by measuring the variation of intracellular calcium concentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) in response to BzATP in the presence or not of the P2X7 selective antagonist A740003 or the general P2 receptor antagonist PPADS. Addition of 100 μ M BzATP to adherent cells loaded with fura-2 showed an increase in intracellular calcium concentration (Fig. 1B and C). Addition of 100 μ M A740003 prior to BzATP stimulation significantly reduced by 50% the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both IEC-6 cells (Fig. 1B) and Caco-2 cells (Fig. 1 C). Although PPADS (100 μ M) also significantly reduces the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ when compared to non-stimulated control cells, the inhibition was not statistically different than the inhibitory effect induced by the P2X7 selective antagonist A740003 (Fig. 1B and C). We next determined if P2X7 stimulation with 100 μ M BzATP increases the expression of the apoptosis marker annexin V at the

surface of IEC-6 cells and of cleaved caspase-3. Receptor activation did not increase the number of annexin V positive cells (Fig. S1A). On the other hand, staurosporine (STS)-treated IEC-6 cells led to a significant increase in the number of apoptotic cells as compared to non-stimulated control cells (Ctrl) (Fig. S1A). In agreement with the annexin V results, cleaved caspase-3 could only be detected in STS-treated cells and not in BzATP-stimulated IEC-6 cells (Fig. S1B). These results showed that a functional P2X7 receptor is present on IECs. It also appears that P2X7 is the main effectors involved in the response to BzATP stimulation. In IEC-6 cells, P2X7 stimulation using BzATP up to 30 min did not induce an apoptotic response, suggesting that the function of this receptor extend far beyond its role in apoptosis.

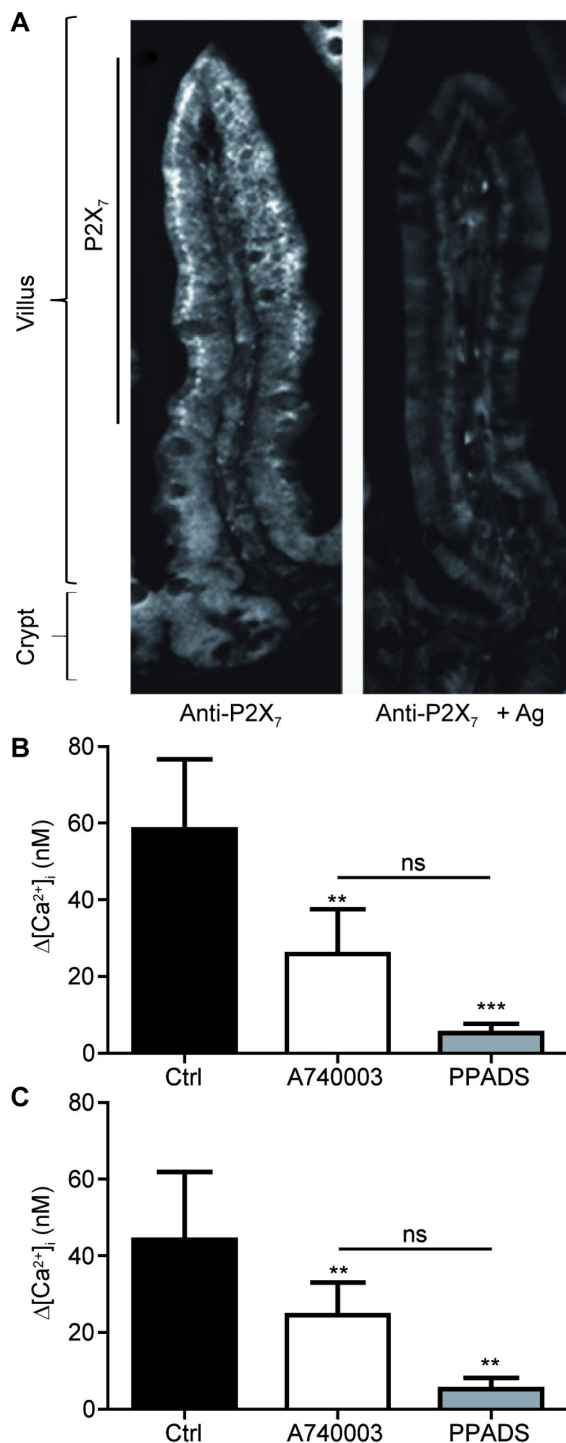


FIGURE 1. P2X7 receptor is expressed by IECs

(A) Localization of the P2X7 receptor to the top two-thirds of rat's jejunum villi (left panel) using immunofluorescence. Control with pre-absorbed anti-P2X7 antibody to the immunizing peptide is presented on the right panel. Original magnification is 20 \times . Presence of a functional P2X7 in (B) IEC-6 cells or (C) Caco-2 cells was determined by measuring the variation of intracellular calcium concentration ($\Delta[Ca^{2+}]_i$). IEC-6 and Caco-2 cells were stimulated with 100 μ M BzATP in the presence or not of 100 μ M of the

selective P2X7 receptor antagonist A740003 or 100 μ M PPADS, a general P2 receptors antagonist. Presented is a typical graph of ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) of three separate sets of experiments. Results are presented as the mean \pm SEM and statistical significance was one-way ANOVA with post-test where ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ as compared to non-stimulated control (Ctrl) cells and ns: non-significant vs A740003 treated cells as indicated on figure panels.

Stimulation of P2X7 receptor in normal rat IEC-6 cells down-regulates Glut2 cell surface expression

In resting IECs, Glut2 is expressed at the cell surface or in intracellular storage vesicles (Kellett et al., 2008). In accordance with the reported role of P2X7 on membrane internalization and protein endocytosis (Kochukov et Ritchie, 2004, Kochukov et Ritchie, 2005); we determined if P2X7 receptor stimulation could regulate Glut2 expression at the plasma membrane of IEC-6 cells (Fig. 2). Cell surface proteins were isolated from IEC-6 cells using biotin and streptavidin, and protein extracts were analyzed by Western blots to determine Glut2 expression at the cell surface. As previously reported (Kellett et Helliwell, 2000), we observed the expression of Glut2 at the cell surface of non-stimulated IEC-6 cells (Fig. 2A). However, a reduction of Glut2 cell surface expression was observed 5 min following a 5 min treatment of IEC-6 cells with 100 μ M BzATP, a potent P2X7 receptor agonist (Fig. 2A). Glut2 was further internalized 10, 15, and 30 min after the BzATP treatment (Fig. 2A). Contrary to a previous report (Hou *et al.*, 2009), the decrease in Glut2 cell surface expression was not associated to its degradation, as total Glut2 expression remained the same in total protein extracts (Fig. 2A). Taking advantage that the Glut2 antibody was directed against an extracellular epitope, we could observe Glut2 expression at the cell surface of unstimulated and non-permeabilized IEC-6 cells (Fig. 2B). Glut2 protein expression was characterized by a punctuated pattern of staining at the cell surface. A similar staining pattern was observed on cells treated with the P2X7 receptor antagonist

A740003 (Fig. 2C). Thirty minutes after the initial 5 min BzATP-stimulation the fluorescence staining on the non-permeabilized cells is strongly reduced and corresponds to a loss of Glut2 protein expression at the cell surface (Fig. 2D). The internalizing effect of BzATP was blocked by the addition of A740003 prior to cell stimulation (Fig. 2E) and of PPADS (supplemental Fig. S2). In fact, following P2X7 stimulation, Glut2 expression was mainly found in intracellular vesicles (supplemental Fig. S3). We validated these observations by FACS analysis and showed that Glut2 membrane expression was reduced after 15 and 30 min following the initial P2X7 receptor stimulation. (Fig. 2G). The loss of Glut2 expression at the cell surface was prevented by the addition of the P2X7 receptor antagonist α ATP prior to receptor stimulation (Fig. 2H). To circumvent potential α ATP non-specific effect, we developed an IEC-6 cell line with reduced P2X7 expression. Infected IEC-6 cells generally displayed a significant reduction in P2X7 gene expression as compared to wild type (wt) control cells and IEC-6 cells infected with genome-integrated control non-target (shNT) shRNA lentivirus (Fig. S4). Reduction of receptor expression also prevented the reduction in Glut2 cell surface expression (Fig.2I). These results are thus suggesting that P2X7 regulates Glut2 internalization.

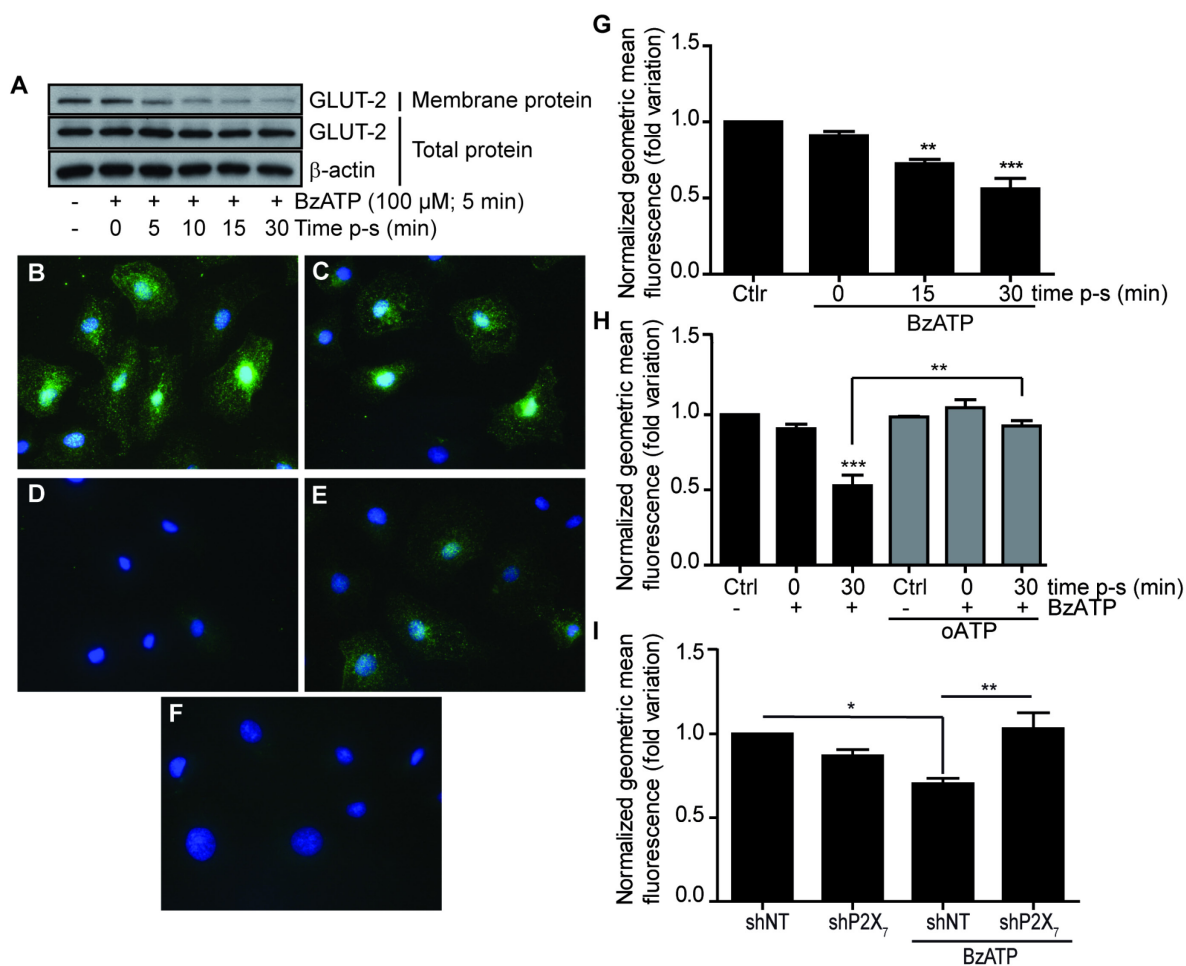


FIGURE 2. P2X7 receptor activation on normal IEC-6 rat cells with BzATP down-regulates Glut2 cell surface expression

(A) Cell surface proteins were biotinylated with membrane-impermeant NH-S-S-biotin and immunoprecipitated using streptavidin-agarose. Western blot analysis shows a reduction in Glut2 cell surface expression with time following P2X7 receptor activation (100 μM BzATP, 5 min at 37°C), whereas total Glut2 expression remained unchanged. β-actin antibody was used as a control for equal loading and to monitor protein integrity. Data are representative of three separate sets of experiments. (B) Glut2 expression was detected by immunofluorescence analysis at the cell surface in DMSO (vehicle) treated cells using non-permeabilized IEC-6 cells and in cells treated only with the selective P2X7 antagonist A740003 (C). (D) Glut2 cell surface expression was strongly reduced 15 min following the initial 5 min stimulation (15 min post-stimulation (p-s)) of IEC-6 cells with 100 μM BzATP at 37°C. (E) Addition of 100 μM A740003 prior to BzATP stimulation blocks the internalization of Glut2. (F) Non-immune staining for Glut2 immunolocalization using non-permeabilized IEC-6 cells. Nuclei were stained with Hoechts 33342. The immunofluorescence data (panels B-F) are representative of three to four separate sets of experiments and the original magnification was of 20x. (G) Flow cytometric analysis confirmed the western blot data. Results are the means ± SEM of three separate experiments done in duplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001 when compared to control un-stimulated cells (Ctrl).

(H) The addition of the P2X₇ receptor antagonist, oATP, at 100 μ M for 2 h prior to IEC-6 cells stimulation abolished the down-regulation of Glut2 membrane expression observed. Results are the means \pm SEM of three separate experiments done in duplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where ***p* \leq 0.01 and ****p* \leq 0.001. (I) Reduction in P2X₇ receptor expression using shRNA inhibited the down-regulation of Glut2 membrane expression as compared to non-targeting scramble shRNA (shNT). Results are the means \pm SEM of three separate experiments done in duplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where **p* \leq 0.05 and ***p* \leq 0.01.

Glucose absorption and transport are reduced in P2X7 stimulated IEC-6 and Caco-2 cells.

Because P2X₇ activation decreases Glut2 cell surface expression, we validated these observations by measuring glucose absorption and transepithelial transport using IEC-6 cells and polarized and differentiated Caco-2 cells, respectively (Fig. 3). In accordance with the observations on Glut2 expression, P2X₇ activation reduced the absorption of 3-O-[methyl-¹⁴C]-D-glucose by IEC-6 cells by more than 35% when compared to unstimulated cells (Fig. 3A). In enterocytes, Glut2 allowed the passage of glucose from the apical side and its release in the blood stream at the basal side. In this context, we performed glucose transport assays using polarized and differentiated Caco-2 cells which display an enterocyte-like phenotype (Beaulieu et Quaroni, 1991, Gendron *et al.*, 2006). As shown on Fig. 3B, the rate of glucose transport after 90 min is significantly reduced by about 30% as compared to control, whereas the overall rate of transport is reduced by more than 20% (Fig. 3C). As for the modulation of Glut2 expression at the plasma membrane, the addition of A740003 (100 μ M) prior to P2X₇ stimulation restores the rate of glucose transport back to control levels (Fig. 3B and C). The partial inhibition of glucose absorption could be explained by the presence of SGLT1 that remains unaffected following P2X₇ activation in IEC-6 cells (data not shown) and that P2X₇ stimulation does

not lead to complete Glut2 internalization. We then investigated the mechanism linking P2X7 receptor activation to Glut2 internalization.

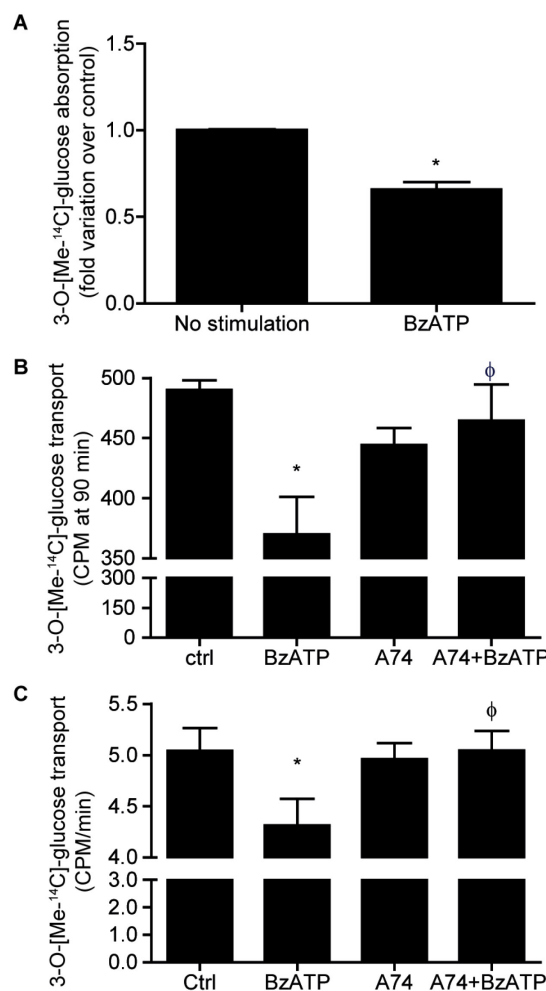


FIGURE 3. Glucose absorption and transport is reduced in P2X7 stimulated IECs

(A) Absorption of the metabolically stable D-glucose analogue, 3-O-[methyl-¹⁴C]-D-glucose, is reduced by 35% in cells stimulated with 100 μ M BzATP at 37°C. Results are presented as the mean \pm SEM of three separate experiments done in triplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where * $p \leq 0.05$ when compared to unstimulated cells. (B) The transepithelial transport of 3-O-[methyl-¹⁴C]-D-glucose is significantly reduced after 90 min following the initial 5 min stimulation of Caco-2 cells with 100 μ M BzATP. This effect was blocked by the addition of 100 μ M A740003 prior to cell stimulation with BzATP. (C) The overall rate of glucose transport is reduced by BzATP treatment and blocked by A740003 added prior to cell activation. Results are presented as the mean \pm SEM of three separate experiments done in triplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where * $p \leq 0.05$ when compared to unstimulated cells (ctrl) and where $\phi p < 0.05$ when compared to BzATP stimulated cells.

P2X7 stimulates PKD phosphorylation to regulate Glut2 internalization in normal rat intestinal epithelial IEC-6 cells

Phosphorylation of PKD in response to P2X7 stimulation has previously been described in rat's parotid acinar salivary cells (Bradford et Soltoff, 2002), but never in IECs. Activation of P2X7 using 100 μ M BzATP (Fig. 4A) or 1 mM ATP (supplemental Fig. S5) stimulated PKD catalytic domain activation loop phosphorylation on Ser^{744/748} and on autophosphorylation residue on Ser⁹¹⁶ in a time-dependent manner. The P2X7-mediated PKD phosphorylation was strongly reduced in the presence of the selective P2X7 receptor antagonist A740003 (Fig. 4B) or in the presence of shP2X₇ (Fig. 4C). PKD activity is generally associated with the regulation of vesicular transport between the trans-Golgi network (TGN) and cell membrane (Van Lint *et al.*, 2002). However, in this study the selective inhibition of PKD activity using CID755673 prevented P2X7-mediated internalization of Glut2 (Fig. 4D). These results suggest that PKD could regulate P2X7-induced Glut2 internalization in IECs.

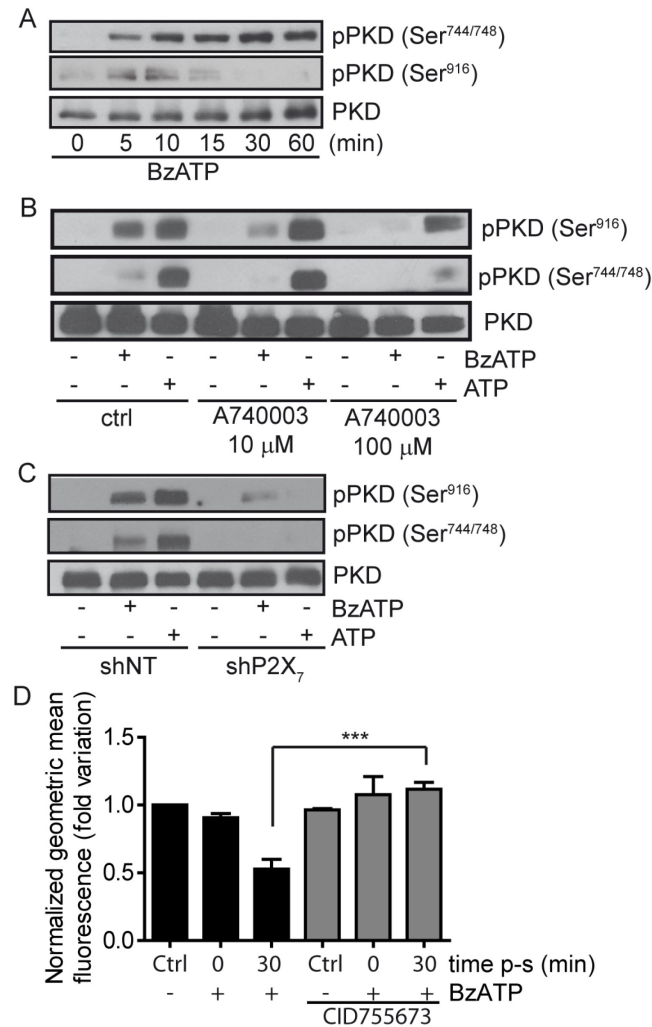


FIGURE 4. P2X7 receptor stimulates PKD1/PKC μ phosphorylation

(A) IEC-6 normal rat IECs incubated in serum-free DMEM were stimulated with 100 μ M BzATP in a time-dependent manner as indicated on figure. PKD1 phosphorylation on Ser^{744/748} and Ser⁹¹⁶ were determined by western blot analysis. (B) Addition of 10 or 100 μ M A740003 30 min prior to the stimulation of IEC-6 cells with 100 μ M BzATP for 5 min reduced PKD1 phosphorylation. Antibody recognizing the non-phosphorylated form of PKD1/PKC μ was used as a control for equal loading and to monitor protein integrity. (C) Reduction of P2X7 expression using shRNA abolished receptor induced PKD1 phosphorylation as compared to control shNT. Presented Western both results are representative of three separate sets of experiments. (D) Addition of the selective PKD inhibitor 2,3,4,5-tetrahydro-7-hydroxy-1H-benzofuro[2,3-c]azepin-1-one (CID755673; 546 nM, 20 min) prior to P2X7 receptor stimulation with BzATP (100 μ M, 5 min) inhibited P2X7-mediated Glut2 internalization as determined by flow cytometry analysis. Results are the means \pm SEM of three separate experiments done in duplicate. Statistical significance was determined by an unpaired *t* test where ****p* \leq 0.001.

The P2X7 receptor stimulates PKC δ activation in intestinal epithelial cells

As previously reported (Bradford et Soltoff, 2002, Gendron et al., 2003), we also observed phosphorylation of PKC δ on Thr⁵⁰⁵ following the addition of BzATP to IEC-6 cells (Fig. 5). PKC δ phosphorylation was detected after only 5 min of P2X7 stimulation and was maintained for up to 15 min, after which the phosphorylation is rapidly decreasing (Fig. 5A). Addition of oATP prior to P2X7 stimulation inhibited PKC δ phosphorylation (Fig. 5B). Given the nature of PKC δ , it was not surprising to find that inhibition of PLC using U73122 (Fig. 5C) reduced P2X7 stimulation of PKC δ phosphorylation. Numerous enzymes and different pathways can synthesize PIP₂; one route comes from the phosphorylation of phosphatidylinositol to phosphatidylinositol 4-phosphate (PI₄P) by PI4-K, and from the phosphorylation of PI₄P to PIP₂ by phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinases (PI4P-5K). We thus added a PI4-K inhibitor, PAO (20 μ M), prior to the stimulation of IEC-6 cells with 100 μ M BzATP or 1 mM ATP (Fig. 5D). Cells treated with PAO displayed a significant reduction in PKC δ phosphorylation. Finally, we identified PLC γ 1 as one of the potential lipases that could be involved in the hydrolysis of PIP₂ to generate DAG. P2X7 stimulation of IEC-6 cells led to a time-dependent increase of PLC γ 1 phosphorylation on Tyr⁷⁸³ residue (Fig. 5E).

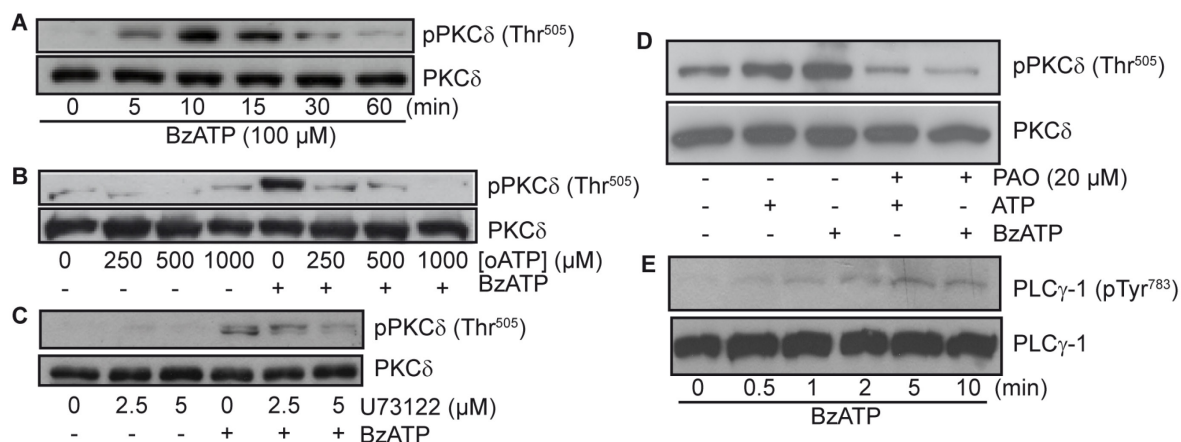


FIGURE 5. P2X7 receptor-mediated PKCδ phosphorylation on Thr⁵⁰⁵

(A) IEC-6 cells were stimulated with 100 μM BzATP in a time-dependent manner and phosphorylation status of PKCδ-Thr⁵⁰⁵ was analyzed by western blots. (B) Addition of oATP (0-1 mM) 2 h prior to P2X7 receptor stimulation with 100 μM BzATP for 5 min at 37°C led to a reduction in PKCδ phosphorylation. (C) IEC-6 cells were treated by the addition of U73122 (0-10 μM) 30 min prior to P2X7 stimulation with 100 μM BzATP for 5 min. (D) Addition of phenylarsine-oxide (PAO, 20 μM) to inhibits PI4-K activity reduced the phosphorylation of PKCδ on Thr⁵⁰⁵ mediated by P2X7 activation (100 μM BzATP or 1 mM ATP, 5 min at 37°C) in IEC-6 cells. (E) Stimulation of IEC-6 cells by 100 μM in a time-dependent manner (0-10 min) led to PLCγ1 phosphorylation on Tyr783 residue. Antibodies recognizing the non-phosphorylated form of PKCδ or PLCγ1 were used as a control for equal loading. Results are representative of three to four separate sets of experiments.

The phosphorylation of PKD is downstream of PKCδ

It is well known that PKD activation can be regulated by different PKC isoforms. Having established that PKD and PKCδ were both activated by P2X7, we next determined if PKCδ was located upstream of PKD. First, we showed that PKD phosphorylation on Ser^{747/748} was independent of the influx of calcium triggers by P2X7 activation and channel opening using calcium-free HBSS (Fig. 6A) as well as by chelating intracellular calcium using BAPTA loaded cells (Fig. 6B). These results were an indication that PKD activation involves a calcium-independent PKC, such as PKCδ. Previous reports have shown that GF109203x and Gö6983 could inhibit P2X7-mediated PKCδ phosphorylation (Bradford et

Soltoff, 2002, Gendron et al., 2003). Based on these observations, the addition of both GF109203x (Fig. 6C) and Gö6983 (Fig. 6D), prior to P2X7 stimulation by BzATP, lead to a strong inhibition of PKD phosphorylation on serine residues 744 and 748. On the other hand, the presence of Gö6976, a PKC inhibitor that does not inhibit PKC δ (Martiny-Baron *et al.*, 1993), did not reduce PKD phosphorylation (Fig. 6E). These results suggest that PKC δ activity is required to phosphorylate and activate PKD in IECs.

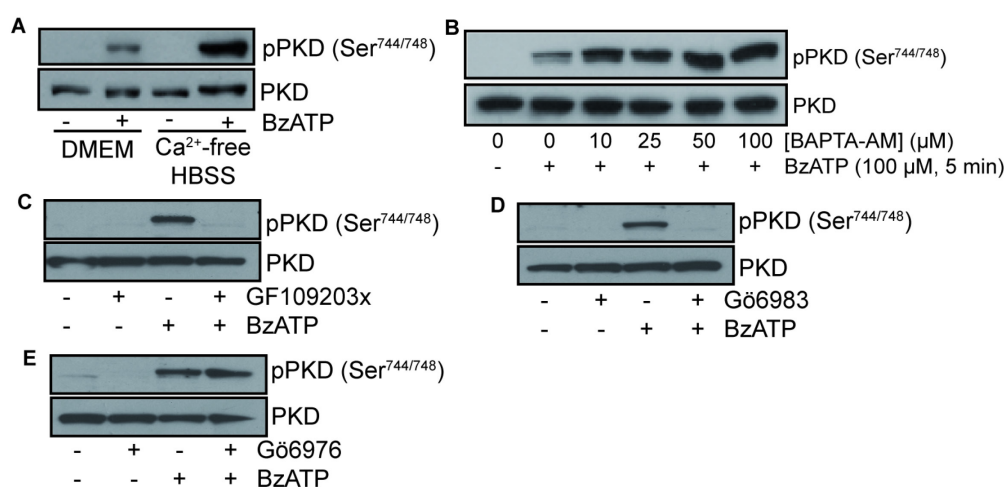


FIGURE 6. The phosphorylation of PKD/PKC μ on Ser^{744/748} by P2X7 is downstream of PKC δ activation

IEC-6 cells were grown in serum-free DMEM for 24 h or in calcium-free HBSS for 1 h before the stimulation of P2X7 with 100 μ M BzATP for 5 min at 37°C. (A) The absence of calcium or (B) the chelation of intracellular calcium using BAPTA-AM did not inhibit PKD1/PKC μ phosphorylation. Addition of different PKC inhibitors prior to P2X7 activation by BzATP (100 μ M, 5 min at 37°C) led to a reduction of PKD phosphorylation on Ser^{744/748} in the presence of (C) GF109203X (2.5 μ M) or (D) Gö6983 (5 μ M), but not of (E) Gö6976 (5 μ M). Antibody recognizing the non-phosphorylated form of PKD/PKC μ was used as a control for equal loading. Results are representative of three separate sets of experiments.

DISCUSSION

P2X7 nucleotide receptors have multiple functions ranging from the control of electrolyte transport to the modulation of cell proliferation, apoptosis and cytokine release

(Baricordi et al., 1999, North, 2002, Wildman et King, 2008, Adinolfi et al., 2010). In the small intestine, this receptor was first localized at the apex of villi (Groschel-Stewart et al., 1999). This particular localization led the authors to speculate about a role in IECs apoptosis (Groschel-Stewart et al., 1999). However, a closer look at the micrographs presented by Groschel-Stewart, a weak staining along villi and not only at the villi tips and goblet cells can be observed (Groschel-Stewart et al., 1999). This particular staining suggests that P2X7 could also be involved in functions other than apoptosis and mucin release (Groschel-Stewart et al., 1999). In fact, recent findings showed that P2X7 is associated to an inflammatory amplification loop during neutrophil migration (Cesaro et al., 2010). In this study, using an antibody recognizing the extracellular loop of P2X7, we showed that receptor expression extends to the top two-thirds of rat jejunum villi (Fig. 1A), suggesting that P2X7 may have broader biological functions in IECs. In fact, the use of this antibody could have led to the recognition, not only of the full-length P2X7A receptor, but also of other naturally occurring truncated isoforms, such as the P2X7B variant. This P2X7B variant is associated with the positive effects mediated by this receptor in various tissues (Adinolfi et al., 2010). Our results suggest that P2X7A and/or P2X7B isoforms are present along jejunum villi. Although the P2X7B isoform is denuded of a C-terminal domain, the presence of P2X7 heterotrimers formed of at least one P2X7A sub-unit could provide the necessary C-terminal domain that couples this receptor to a spectrum of downstream effectors important for P2X7 intracellular signaling pathways independent of Ca^{2+} influx. This calcium independent signaling pathway identified in this study is thus ruling out the possible involvement of other BzATP-sensitive P2X receptors, which are mediating their effect by acting as calcium gated-channels. Hence, as shown on Fig. 4C, inhibition of P2X7 expression using interfering RNA (shRNA) abrogate the PKD

stimulating effect of BzATP and ATP, thus showing that P2X7 is most probably the principal P2X receptors involved in the phosphorylation of PKD and the internalization of Glut2.

Extracellular ATP acting on both P2X and P2Y receptors can stimulate insulin release by pancreatic β cells, thus reducing the level of blood glucose (Petit et al., 2009). In addition to the pancreas, the regulation of glucose homeostasis also involves the intestine which is characterized by its high uptake capacity and glycolytic activity (Mithieux, 2005). To accommodate the large quantities of glucose found in the lumen in a postprandial situation, the low affinity and high capacity transporter Glut2 is required (Kellett et Helliwell, 2000). The regulation of Glut2 function or its expression at the level of the IECs could provide an avenue for the regulation of glucose absorption. It has been proposed that insulin provides such a protective mechanism by stimulating the internalization and vesicular storage of Glut2 in enterocytes of healthy but not of insulin-resistant mice, thus reducing glucose uptake (Tobin et al., 2008). However, beside insulin and glucose, only a few other molecules, such as flavonoids or glucocorticoids, have been reported to regulate Glut2 function or expression as means of regulating glucose absorption (Shepherd *et al.*, 2004, Kwon *et al.*, 2007). In this study, we showed that P2X7 receptor could modulate the absorption of glucose by IECs and its transepithelial transport from the apical to the basal cell compartment by controlling the expression of Glut2 at the cell surface. However, unlike the effect of insulin, ATP-dependent internalization of Glut2 leads to the formation of Glut2 storage vesicles and not to its rapid degradation by lysosomes, as observed in β cells (Hou et al., 2009). The different fates of internalized Glut2 in IECs versus β cells

could be explained by the different roles of Glut2 in these cells. In the pancreas, Glut2 is part of the glucose sensing mechanism (Leturque *et al.*, 2009), whereas in IECs, Glut2 functions are to facilitate glucose entry in response to variations in glucose levels (Kellett et Helliwell, 2000, Leturque et al., 2009). Thus, storage of Glut2 in intracellular vesicles would allow its rapid mobilization. It thus appears that the internalization and processing of Glut2 could be dependent of the cell type and the physiological conditions.

Although PKA-dependent phosphorylation of the Glut2 intracellular domains have been proposed as a mechanism to regulate its function (Thorens *et al.*, 1996), the mechanism leading to Glut2 internalization is not understood. In this study, we propose that P2X7-dependent internalization of Glut2 involves a PKC δ -PKD signaling pathway independent of calcium influx. It is well accepted that P2X7 activation by ATP leads to a massive influx of extracellular calcium, which is associated with an array of physiological effects (North, 2002). There are also several studies showing that this receptor can stimulate numerous signaling pathways independent of calcium (Amstrup et Novak, 2003, Garcia-Marcos *et al.*, 2006). Among these different effectors, we found enzymes involved in phospholipid signaling, such as PI4-K (Kim et al., 2001, Garcia-Marcos et al., 2006). Once activated, PI4-K generates the lipid precursor (PI₄P) necessary for the formation of DAG and subsequent activation of novel PKC molecules, such as PKC δ . DAG synthesis is generally associated with the catalytic activity of PLC β ; however in this study, we propose PLC γ 1 as an alternative for the production of DAG in IECs as a result of P2X7 stimulation. PLC γ 1 activation generally occurs via receptor tyrosine kinase (RTK), but non-RTK receptors can also activate this enzyme. Although the stimulation of PKC δ and PKD1 by

P2X7 has been described previously for other cell types (Carrasquero *et al.*, Bradford et Soltoff, 2002, Gendron et al., 2003), we are the first to report a link between this P2X7-dependent signaling pathway and the regulation of Glut2 membrane expression.

PKD is a particular serine/threonine kinase activated by the transient phosphorylation of Ser744 and Ser748 found in the activation loop. This activating phosphorylation is followed by the sustain autophosphorylation of Ser916. This autophosphorylation reaction creates docking sites for PKD binding partners and influence PKD localization within the cell (Nishikawa *et al.*, 1998, Hausser *et al.*, 1999). Although, PKD is generally associated with TGN vesicle trafficking (Liljedahl *et al.*, 2001), a large fraction of PKD1 resides in the cytosol where it could be recruited to the plasma membrane following PLC activation (Van Lint et al., 2002). Numerous substrates not associated with TGN trafficking were identified as E-cadherin (Jaggi *et al.*, 2005), β -catenin (Du *et al.*, 2009), vanilloid receptor type 1 (Wang *et al.*, 2004), plasma membrane Na^+/H^+ exchanger (Haworth *et al.*, 1999), and cardiac troponin I (cTnI) (Haworth *et al.*, 2004). PKD1-dependent phosphorylation of the vanilloid receptor type 1 at its N-terminus enhances receptor function (Wang et al., 2004), whereas PKD-dependent phosphorylation of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger reduces activity (Haworth et al., 1999). Thus, depending on the context, localization, and cell type, PKD-dependent phosphorylation could either act as a positive or negative regulator of protein functions (Mikhalap *et al.*, 2008). Of particular interest is the phosphorylation of cTnI by PKD1, occurring at PKA sites (Haworth et al., 2004). It could be that PKD1-dependent internalization of Glut2 uses a similar strategy to phosphorylate

Glut2 at the PKA sites and stimulates its internalization. However, additional experiments will be needed to confirm this possibility.

Considering the obesity and diabetes epidemic, regulation of blood sugar levels represents an increasing challenge. The data presented in this study represent an interesting avenue to regulate glycaemia. Contrary to most type II diabetes therapies, we proposed modulating glucose entry into cells by regulating the expression of Glut2 at the surface of enterocytes. We provided evidences that Glut2 membrane expression could be down-regulated from IECs plasma membrane following P2X7 activation. As illustrated in this work, Glut2 internalization was not due to the apoptotic properties of the P2X7 receptor. We also demonstrated that the internalization of Glut2 was dependent of the activity of PKC δ and PKD in a calcium independent manner. Although more experiments are required to fully elucidate the contribution of PKD1 to regulation of Glut2 expression, the data provided are supportive of a new role for P2X7 in the intestine and suggest a novel function for PKD1 in IECs.

Acknowledgements

This research was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada discovery grant (# 327128-06) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, NMD-94729) to F.P.G. F.P.G. is member of the FRSQ-funded Centre de Recherche Clinique Étienne-Le Bel. D.M.G. is a recipient of an Alexander Graham Bell scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

Disclosure: The authors have no conflict of interest to disclose.

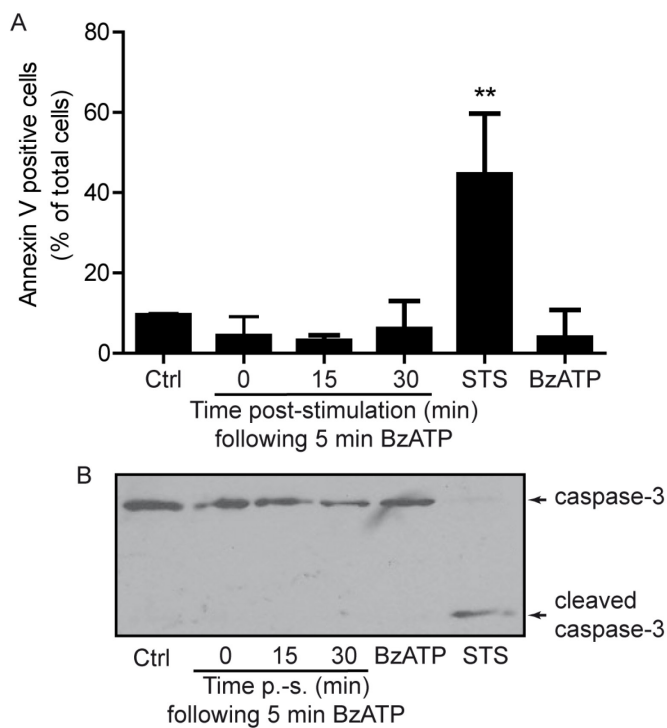


FIGURE S1. The activation of P2X7 does not induce IEC-6 cell apoptosis.

(A) Flow cytometric analysis of Annexin-V FITC incorporation was determined at 0, 15, and 30 min following the initial 5 min stimulation of IEC-6 cells with 100 μ M BzATP at 37°C. Alternatively, IEC-6 cells were treated for 30 min with 100 μ M BzATP or with 1 μ M staurosporine (STS), used as a positive control. Results are presented as the mean \pm SEM of three separate experiments done in duplicate. Statistical significance was determined by an unpaired t test where ** $p \leq 0.01$ when compared to control unstimulated cells (Ctrl). (B) Total and cleaved caspase-3 was analyzed by western blots using an antibody recognizing both forms. Presented immunoblot is representative of three distinct experiments.

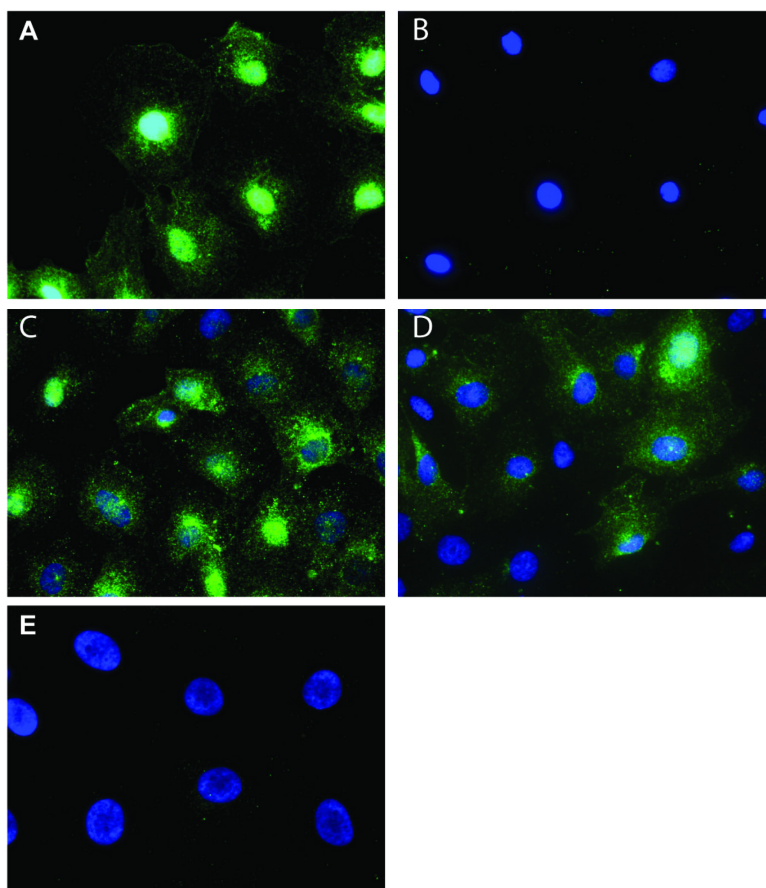


FIGURE S2. P2X7 mediated Glut2 internalization is blocked by PPADS.

(A) Non-stimulated and non-permeabilized IEC-6 cells show Glut2 expression at the plasma membrane. (B) Glut 2 expression is strongly reduced 15 min following the initial 5 min stimulation of IEC-6 cells with 100 μ M BzATP at 37°C. (C) PPADS (100 μ M, 30 min) did not affect Glut2 expression. (D) Addition of 100 μ M PPADS prior to BzATP stimulation blocks the internalization of Glut2. (E) Non-immune staining for Glut2 immunolocalization using non-permeabilized IEC-6 cells. Nuclei were stained with Hoechts 33342. Presented immunoblots are representative of three distinct experiments and the original magnification was of 20 \times .

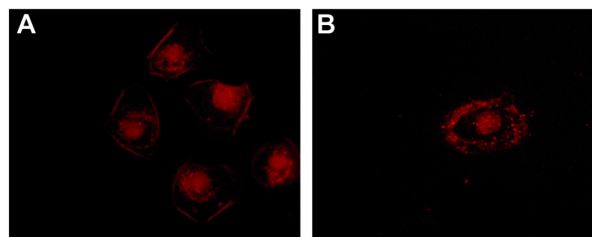


FIGURE S3. Glut2 is internalized in intracellular vesicles following P2X7 stimulation.

(A) Non-stimulated but permeabilized IEC-6 cells show Glut2 expression immunolocalized at the plasma membrane and in intracellular vesicles. (B) Following a 5-min stimulation of the P2X7 receptor with 100 μ M BzATP, Glut2 protein was expressed mainly in intracellular vesicles located at the peri-nuclear level. Presented immunoblot is representative of three distinct experiments.

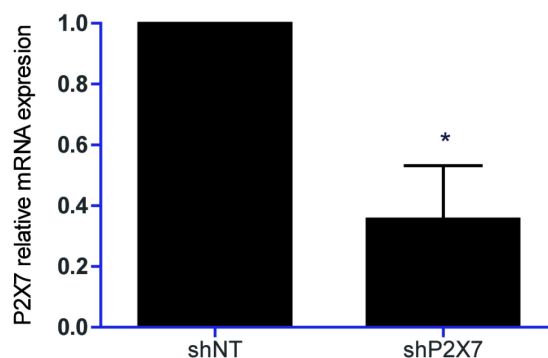


Figure S4. Validation of shRNA targeting P2X₇ in IEC-6 cells. Confluent IEC-6 cells were infected with retrovirus containing specific shRNA targeting P2X₇ and scrambled non-target shRNA (shNT). P2X₇ expression was determined by quantitative real-time PCR. Results are presented as the means \pm SEM of three experiments realized in duplicate. Statistical significance was determined by unpaired *t* test, where * $p < 0.05$.

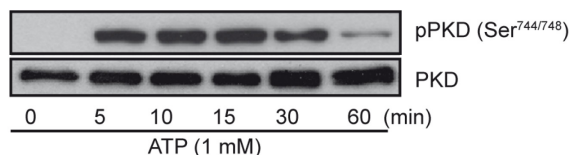


Figure S5. ATP stimulation of IEC-6 cells induces PKD1 phosphorylation.

ATP (1 mM) was added to confluent IEC-6 in a time-dependent manner. PKD1 phosphorylation was determined by Western blots using an antibody directed against phospho-Ser^{744/748}. Presented is a typical Western blot of three distinct sets of experiment.

REFERENCE

- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P, Callegari MG, Sandona D, Markwardt F, Schmalzing G, Di Virgilio F. 2010. Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor. *FASEB J* 24(9):3393-3404.
- Amstrup J, Novak I. 2003. P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx. *Biochem J* 374(Pt 1):51-61.
- Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, Di Virgilio F. 1999. Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem* 274(47):33206-33208.
- Beaulieu JF, Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* 280 (Pt 3):599-608.
- Bradford MD, Soltoff SP. 2002. P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C. *Biochem J* 366(Pt 3):745-755.

- Carrasquero LM, Delicado EG, Sanchez-Ruiloba L, Iglesias T, Miras-Portugal MT. Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes. *Glia* 58(8):984-995.
- Casas-Pruneda G, Reyes JP, Perez-Flores G, Perez-Cornejo P, Arreola J. 2009. Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia. *J Physiol* 587(Pt 12):2887-2901.
- Cesaro A, Brest P, Hofman V, Hebuterne X, Wildman S, Ferrua B, Marchetti S, Doglio A, Vouret-Craviari V, Galland F, Naquet P, Mograbi B, Unwin R, Hofman P. 2010. Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(1):G32-42.
- Cheeseman CI. 1993. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 105(4):1050-1056.
- Cheewatrakoolpong B, Gilchrest H, Anthes JC, Greenfeder S. 2005. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. *Biochem Biophys Res Commun* 332(1):17-27.
- Corriden R, Insel PA. 2010. Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Science signaling* 3(104):re1.
- Degagne E, Grbic DM, Dupuis AA, Lavoie EG, Langlois C, Jain N, Weisman GA, Sevigny J, Gendron FP. 2009. P2Y2 receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells. *J Immunol* 183(7):4521-4529.
- Du C, Jaggi M, Zhang C, Balaji KC. 2009. Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin. *Cancer Res* 69(3):1117-1124.

- Garcia-Marcos M, Pochet S, Marino A, Dehaye JP. 2006. P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link" in epithelial cells. *Cell Signal* 18(12):2098-2104.
- Gendron FP, Mongrain S, Laprise P, McMahon S, Dubois CM, Blais M, Asselin C, Rivard N. 2006. The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(2):G310-G318.
- Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. 2003. Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(2):C571-581.
- Ghanem E, Robaye B, Leal T, Leipziger J, Van Driessche W, Beauwens R, Boeynaems JM. 2005. The role of epithelial P2Y(2) and P2Y(4) receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *Br J Pharmacol* 146(3):364-369.
- Grbic DM, Degagn E, Larrive JF, Bilodeau MS, Vinette V, Arguin G, Stankova J, Gendron FP. 2011. P2Y(6) receptor contributes to neutrophil recruitment to inflamed intestinal mucosa by increasing CXC chemokine ligand 8 expression in an AP-1-dependent manner in epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*.
- Grbic DM, Degagne E, Langlois C, Dupuis AA, Gendron FP. 2008. Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. *J Immunol* 180(4):2659-2668.
- Greig AV, Linge C, Terenghi G, McGrouther DA, Burnstock G. 2003. Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120(6):1007-1015.

- Groschel-Stewart U, Bardini M, Robson T, Burnstock G. 1999. P2X receptors in the rat duodenal villus. *Cell Tissue Res* 297(1):111-117.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6):3440-3450.
- Hausser A, Storz P, Link G, Stoll H, Liu YC, Altman A, Pfizenmaier K, Johannes FJ. 1999. Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins. *J Biol Chem* 274(14):9258-9264.
- Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, Avkiran M. 2004. Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function. *Circ Res* 95(11):1091-1099.
- Haworth RS, Sinnott-Smith J, Rozengurt E, Avkiran M. 1999. Protein kinase D inhibits plasma membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger activity. *Am J Physiol* 277(6 Pt 1):C1202-1209.
- Hou JC, Williams D, Vicogne J, Pessin JE. 2009. The glucose transporter 2 undergoes plasma membrane endocytosis and lysosomal degradation in a secretagogue-dependent manner. *Endocrinology* 150(9):4056-4064.
- Humphreys BD, Rice J, Kertesz SB, Dubyak GR. 2000. Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor. *J Biol Chem* 275(35):26792-26798.
- Jacques-Silva MC, Rodnight R, Lenz G, Liao Z, Kong Q, Tran M, Kang Y, Gonzalez FA, Weisman GA, Neary JT. 2004. P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes. *Br J Pharmacol* 141(7):1106-1117.
- Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, Balaji KC. 2005. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase Cabstract is

- associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer. *Cancer Res* 65(2):483-492.
- Kellett GL, Brot-Laroche E. 2005. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. *Diabetes* 54(10):3056-3062.
- Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ, Leturque A. 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu Rev Nutr* 28:35-54.
- Kellett GL, Helliwell PA. 2000. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350 Pt 1:155-162.
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A. 2001. Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *Embo J* 20(22):6347-6358.
- Kochukov MY, Ritchie AK. 2004. A P2X7 receptor stimulates plasma membrane trafficking in the FRTL rat thyrocyte cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 287(4):C992-C1002.
- Kochukov MY, Ritchie AK. 2005. P2X7 receptor stimulation of membrane internalization in a thyrocyte cell line. *J Membr Biol* 204(1):11-21.
- Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. 2007. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *Faseb J* 21(2):366-377.
- Langlois C, Gendron FP. 2009. Promoting MPhi transepithelial migration by stimulating the epithelial cell P2Y(2) receptor. *Eur J Immunol* 39(10):2895-2905.
- Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(5):E985-992.

- Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V. 2001. Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104(3):409-420.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schachtele C. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 268(13):9194-9197.
- Mikhalap SV, Kovalevs'ka LM, Sydorenko SP. 2008. [The role of PKD family protein kinases in the regulation of protein post-translational modification]. *Ukr Biokhim Zh* 80(4):16-24.
- Mithieux G. 2005. The new functions of the gut in the control of glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(4):445-449.
- Nishikawa K, Toker A, Wong K, Marignani PA, Johannes FJ, Cantley LC. 1998. Association of protein kinase C α with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. *J Biol Chem* 273(36):23126-23133.
- North RA. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82(4):1013-1067.
- Petit P, Lajoix AD, Gross R. 2009. P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology. *Eur J Pharm Sci* 37(2):67-75.
- Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. 2007. Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *Journal of immunology* 179(3):1913-1925.

- Shepherd EJ, Helliwell PA, Mace OJ, Morgan EL, Patel N, Kellett GL. 2004. Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine. *J Physiol* 560(Pt 1):281-290.
- Sun SH, Lin LB, Hung AC, Kuo JS. 1999. ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors. *J Neurochem* 73(1):334-343.
- Takenouchi T, Ogihara K, Sato M, Kitani H. 2005. Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line. *Biochim Biophys Acta* 1726(2):177-186.
- Thorens B, Deriaz N, Bosco D, DeVos A, Pipeleers D, Schuit F, Meda P, Porret A. 1996. Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 271(14):8075-8081.
- Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, Stolarczyk E, Blazquez AG, Klein C, Prigent M, Serradas P, Cuif MH, Magnan C, Leturque A, Brot-Laroche E. 2008. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes* 57(3):555-562.
- Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenhede JR, Seufferlein T. 2002. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 12(4):193-200.
- Wang Y, Kedei N, Wang M, Wang QJ, Huppler AR, Toth A, Tran R, Blumberg PM. 2004. Interaction between protein kinase C α and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem* 279(51):53674-53682.

Weinhold K, Krause-Buchholz U, Rodel G, Kasper M, Barth K. 2010. Interaction and interrelation of P2X7 and P2X4 receptor complexes in mouse lung epithelial cells. *Cell Mol Life Sci* 67(15):2631-2642.

Wildman SS, King BF. 2008. P2X receptors: epithelial ion channels and regulators of salt and water transport. *Nephron Physiol* 108(3):p60-67.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

4.1 Modèle murin

Des souris de la lignée B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}/J possédant un fond génétique mixte C57BL/6J et C57BL/6N et leur contrôle C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) ont été maintenues dans un environnement contrôlé (20°C et un cycle lumière/noirceur de 12 h) avec un accès *ad libitum* à la moulée (Purina Chow) et à l'eau. Dans la lignée de souris B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}/J, le gène *P2rx7* a été invalidé par l'insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans la région du gène codant la partie C-terminale de la protéine (acide aminé 506 à 532) (Mouse Mutant Resource Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME (<https://www.jax.org/strain/005576>)). Les souris expérimentales utilisées dans ce projet ont été issues d'un croisement hybride F1 entre un mâle B6.129P2-P2rx7^{tm1Gab}/J et une femelle C57BL/6J suivi de 10 rétrocroisements avec une femelle C57BL/6J, puis d'un croisement consanguin entre deux souris hétérozygotes de la génération F10 et des générations suivantes. Les procédures du protocole 217-13B ont été approuvées par le Comité de santé animale de l'Université de Sherbrooke et suivent les recommandations du conseil canadien de protections des animaux en science.

4.1.1 Génotypage des souris

Les souris ont été génotypées par la méthode de génotypage par saponification des orteils des souris qui ont servi à leur identification. Les tissus ont été digérés toute la nuit à 70°C dans un tampon à pH basique, puis l'ensemble a été neutralisé et centrifugé 3 min à 4000 g. Trois amorces ont été nécessaires pour identifier les trois génotypes possibles : amorce sens pour le type sauvage (5'-TCA CCA CCT CCA AGC TCT TC-3'), amorce sens pour les souris *P2rx7*^{-/-} (5'-GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG-3') et une amorce commune anti-sens (5'-TAT ACT GCC CCT CGG TCT TG-3'). Les souris de type sauvage présentent une bande unique à 246 paires, alors que les souris *P2rx7*^{-/-} ont une

bande unique à 200 paires de base. Finalement, la présence de bandes à 246 paires de base et une bande à 200 paires de base correspond au génotype hétérozygote.

Tableau 2 Conditions de PCR pour génotyper les souris

Conditions de PCR pour une Taq polymérase GenScript			
étapes	Température en °C	Temps	Remarques
1	94	3 min	
2	94	30 s	
3	65	30 s	Diminuer de 0,5 °C par cycle
4	68	10 s	
5			Répéter les étapes 2 à 4 pour 10 cycles
6	94	30 s	
7	60	30 s	
8	72	30 s	
9			Répéter les étapes 6 à 8 pour 30 cycles
10	72	5 min	
11	4		Maintenir

4.2 Validation du modèle de souris *P2rx7^{-/-}* par immunobuvardage de type Western sur un enrichissement de CEI.

Le jéjunum de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* a été prélevé. Après vidange de leur contenu et trois rinçages au PBS froid, les jéjunums ont été retournés pour exposer les villosités vers l'extérieur. Les jéjunums ont été à nouveau rincés dans le PBS froid puis ont été incubés dans du MatriSpurse (BD Biosciences, Mississauga, ON) pendant vingt minutes sous agitation. Les gros fragments ont été éliminés avant centrifugation pour récolter les cellules épithéliales désolidarisées (Degagne *et al.*, 2012). Elles ont ensuite été lysées dans un tampon de lyse Laemmli 1x de glycérol sans β -mercapthoéthanol (Laemmli, 1970). Les protéines (20 μ g) des échantillons ont été séparées par SDS-PAGE sur un gel de 7%

d'acrylamide et transférées sur membrane de PVDF (Grbic et al., 2008). L'expression de P2X7 a été déterminée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-P2X7-APR-004 (Alomone Labs, Jérusalem, Israël) qui est dirigé contre la queue C-terminale de la protéine. L'anticorps a été utilisé dans un ratio 1:1000 dilué dans du tampon PBS BSA 5% et incubé toute la nuit à 4°C. Les procédures de lavage et d'hybridation de l'anticorps secondaire ont également été décrites précédemment (Grbic et al., 2008)

4.3 Test de tolérance au glucose oral

Des souris mâles ont été placées dans une cage propre et elles ont été privées de nourriture pour une période de 6 h durant le jour comme le suggère le Dr Andrikopoulos dans son évaluation du test de tolérance au glucose chez la souris (Andrikopoulos *et al.*, 2008) et pour ainsi éviter un stress métabolique d'un jeûne nocturne rapporté par le Dr Han (Han *et al.*, 2008). La glycémie après cette période (temps 0, t = 0) a été mesurée à partir d'un prélèvement de sang de la veine caudale de la souris à l'aide du glucomètre et des bandelettes de dosage de la glycémie FreeStyle Lite de Abbott qui ne nécessitent qu'un très petit volume de sang (Alva, 2008, Klaff *et al.*, 2015). Une solution à 50 mg de glucose a ensuite été administrée *per os* à l'aide d'une sonde de gavage 24x1'' W/1,25 mm (Cadence Inc., Staunton, VA). La glycémie a ensuite été mesurée par prélèvement de sang de la veine caudale après 10 min, 15 min, 30 min, 60 min et 90 min suivant le gavage. Ces tests ont été effectués sur des souris âgées de 3 semaines et 12 semaines. À l'aide du logiciel GraphPad Prism, nous avons ensuite déterminé par la méthode des trapèzes l'aire sous la courbe des glycémies de chaque souris (indice glycémique).

4.4 Analyse des sérums des souris

Des ponctions cardiaques ont été effectuées à l'aide de seringue de 5 ml équipée d'une aiguille hypodermique 25G 1½ (BD Biosciences, Mississauga, ON) chez 9 souris *P2rx7^{-/-}* et 8 souris sauvages âgées de 12 semaines privées de nourriture pendant 6 h. Le sang récupéré a été mis à coaguler pendant 30 min à température ambiante avant centrifugation à 3000 g pendant 10 min. Le dosage de l'insuline a été effectué grâce à la trousse commerciale ELISA en plaque 96 puits pour rat et souris EZRMI-13K (Milipore, St. Charles, MO. USA).

La concentration des triglycérides, du cholestérol et du glucose dans le plasma a été déterminée à l'aide de trousse commerciales (Siemens., Dearfield, Illinois, USA) utilisées dans un analyseur biochimique clinique automatique (Dimension XPand Plus, Dade Behring Inc.) tel que décrit précédemment (Plourde *et al.*, 2009, Courchesne-Loyer *et al.*, 2015).

Le test de HOMA2-IR (Homeostasis Model Assessment 2-Insulin Resistance) et le HOMA2-%B qui estime la fonction des cellules β du pancréas ont été calculés en utilisant les concentrations de glucose et d'insuline déterminées dans les sérums en utilisant le calculateur HOMA2-IR (<http://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/index.php>).

4.5 Tomographie par émission de positrons (TEP) et biodistribution du fluorodésoxyglucose (^{18}F) (^{18}F -FDG)

Pour l'imagerie TEP et la biodistribution du ^{18}F -FDG, nous avons utilisé un groupe de trois souris mâles contrôles âgées de 3 mois et un groupe de trois souris mâles $P2rx7^{-/-}$. Les souris contrôles et les souris $P2rx7^{-/-}$ ont été mises à jeun pour une période de 6 h comme expliquée à la section 4.4. Une solution de 50 mg de glucose contenant de 3 à 5 mégabecquerels du traceur radioactif ^{18}F -FDG a ensuite été administrée *per os* à l'aide d'une sonde de gavage 24x1'' W/1,25 mm (Cadence Inc.). Un volume de 150 μl à 200 μl a été administré en moins de quinze secondes. Les souris furent anesthésiées à l'aide d'isoflurane et rapidement placées dans le scanner et la biodistribution du ^{18}F -FDG en temps réel suivie pendant une période de 90 minutes. Après 90 minutes, les souris, toujours sous isoflurane, ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les organes suivants : estomac, duodénum, jéjunum, pancréas, foie, muscle squelettique de la cuisse et du sang ont été prélevés puis placés, en entier, dans des tubes FisherBrand 12 X 75 mm (Fisher Scientific, Ottawa, ON) pour déterminer le nombre de désintégrations des noyaux de fluor radioactifs par seconde dans un compteur Packard Cobra II E5003. La biodistribution du ^{18}F -FDG a été évaluée en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g) après correction de la dose nette injectée et en tenant compte du facteur de décroissance du radiotraceur.

4.6 Prélèvements, fixations et colorations des tissus

À l'âge de 3 et 12 semaines, les souris privées de nourriture depuis 6 h ont été euthanasiées par dislocation cervicale après une anesthésie à l'isoflurane. Le foie a été prélevé et fixé à l'aide d'une solution de 3% de paraformaldéhyde (PFA-3%) durant 18 h à 4°C. Pour la coloration Oil Red O, les foies de 9 souris contrôles et 6 souris *P2rx7^{-/-}* de 3 semaines et de 9 souris contrôles et 8 souris *P2rx7^{-/-}* de 12 semaines ont subi 3 bains successifs de 24 h dans une solution cryoprotectrice de saccharose à 30% pour préserver l'intégrité structurelle des échantillons comme le décrit le Dr Drover (Drover *et al.*, 2005). Le jéjunum a été retiré pour être fixé au PFA-3% comme précédemment décrit ou au MCA (70% méthanol, 20% chloroforme, 10% acide acétique glacial) pendant 1 heure à température de la pièce, puis plongé dans l'éthanol 70% à 4°C pendant 18 h. Après cette période, les tissus ont été lavés deux fois 24 h dans l'éthanol 70% à 4°C puis envoyés à la plateforme d'histologie et de microscopie électronique (<http://www.usherbrooke.ca/dep-anatomie-biologie-cellulaire/recherche/plateformes-facilities/plateforme-dhistologie-et-de-microscopie-electronique/>) pour être inclus dans la paraffine excepté les foies dans la solution de 30% de saccharose qui ont été inclus dans l'OCT. Les tissus ont ensuite été coupés et colorés au besoin à l'hématoxyline et l'éosine, à l'alcian bleu pour les coupes de jéjunum et à l'Oil Red O pour les coupes de foie inclus dans l'OCT.

4.6.1 Quantification de la coloration Oil Red O

La coloration à l'Oil Red O permet de visualiser les lipides présents sur les coupes histologiques. Afin de quantifier la coloration sur les coupes de foie, trois champs aléatoires à un grossissement de 20x ont été analysés à l'aide du logiciel Adobe Photoshop. Une plage de couleurs de différents rouges a été définie comme couleurs de référence pour la coloration à l'Oil Red O. Cette plage des différentes teintes de rouge est basée sur la sélection « rouge » du logiciel supplémenté de teinte magenta. Pour chaque champ de tissu, il a été demandé au logiciel de sélectionner tous les pixels correspondant à la plage de couleur préalablement définie et de nous donner le nombre de pixels qui ont été sélectionnés. La moyenne des 3 champs d'au minimum quatre souris différentes par groupe a ensuite été calculée et utilisée pour les tests statistiques.

4.7 Immunofluorescences indirectes sur les coupes de jéjunums de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*.

Les tissus fixés ont été déparaffinés et réhydratés dans des bains successifs de xylène et de solution d'éthanol 100 % à 70 %. Les lames ont ensuite été plongées dans une solution de blocage PBS 10% FBS et 0,2% de Triton X-100. L'incubation de l'anticorps primaire et de l'anticorps secondaire a été faite dans une solution PBS 10 % FBS. Les noyaux ont été colorés à l'aide du Hoechst 33342 (Invitrogen Life Technologies). La fluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM 2500 équipé d'une caméra Hamamatsu Digital C10600.

4.7.1 Expression de P2X7 dans le jéjunum de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*

L'expression de P2X7 dans le jéjunum de souris a été visualisée à l'aide des anticorps primaires anti-P2X7 de lapin APR-008-F directement couplé au FITC qui reconnaît la boucle extracellulaire de P2X7 ou avec l'anticorps primaire anti-P2X7 de lapin APR-004 qui reconnaît un motif dans la queue C-terminale (Alomone Labs. Jerusalem, Israel) dilués au ratio 1:50, puis d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 F(ab ») anti-lapin IgG (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) dilué au ratio de 1:400.

4.7.2 Expression et localisation de GLUT2 dans le jéjunum de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*

L'expression de GLUT2 dans le jéjunum de souris a été visualisée à l'aide des anticorps primaires anti-GLUT2 de lapin (H-67) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) dilués au ratio 1:100, puis d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 F(ab ») anti-lapin IgG (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) dilué au ratio de 1:400.

4.7.3 Décompte du nombre de cellules entéroendocrines chromogranine A positives de l'épithélium intestinal dans les souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*

À l'aide d'un anticorps de lapin dirigé contre la chromogranine A, (ImmunoStar, Hudson, WI, United states) dilué à un ratio de 1 :1000, puis d'un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 F(ab ») anti-lapin IgG (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON) dilué au ratio de 1 :400, nous avons fait le décompte des cellules positives par immunofluorescence à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DM 2500 équipé d'une caméra Hamamatsu Digital C10600.

4.8 Analyse de l'expression en ARN de gènes d'intérêts dans le foie des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-}

Pour ces analyses, le foie de 4 souris contrôles et *P2rx7*^{-/-} âgées de 3 semaines et le foie de 9 souris contrôles et de 10 souris *P2rx7*^{-/-} âgées de 12 semaines ont été prélevés. L'ARN de ces tissus a été extrait et l'ADNc synthétisé par RT-PCR. Les gènes d'intérêts décrits dans le tableau 3 ont été analysés en PCR quantitative en temps réel comme déjà décrit dans notre laboratoire (Grbic et al., 2008, Grbic *et al.*, 2012).

Tableau 3. Amorces utilisées pour la PCR quantitative

	Amorce sens (5' vers 3')	Amorce Antisens (5' vers 3')
<i>Acaca</i>	GATGAACCATCTCCGTTGCG	GAGCCAATTATGAATCGGGACTG
<i>Fasn</i>	GATGAAGAGGGACCATAAAGAATAA	GCACTTGATGTGAGGGGAGAT

4.9 Analyses statistiques

Les données sont présentées comme étant les moyennes \pm SEM. Les différences entre les souris contrôles et les souris *P2rx7*^{-/-} sont évaluées avec le test *t* quand les données suivent une loi normale. Pour les variables avec une distribution non normale, la comparaison est effectuée à l'aide du test non paramétrique Mann-Whitney.

RESULTATS

Nous avons montré au chapitre I que l'activation du récepteur P2X7 par son agoniste synthétique BzATP entraînait une diminution de l'expression membranaire de GLUT2 à la surface des cellules épithéliales. Il en résultait une diminution du transport transcellulaire du glucose en réponse à la stimulation du récepteur P2X7. L'approche par interférence à l'ARN pour diminuer l'expression du gène *P2rx7* ou des traitements à l'aide d'antagonistes du récepteur P2X7 dans les cellules IEC-6 neutralisent les effets du BzATP sur la signalisation activée par le récepteur P2X7 et inhibent la translocation de GLUT-2 dans le cytoplasme. Dans les cellules Caco-2, le prétraitement avec l'antagoniste compétitif du récepteur P2X7, le A740003, neutralise les effets du BzATP sur la vitesse du transport transcellulaire d'un analogue non hydrolysable radiomarqué de glucose (Bourzac *et al.*, 2013). Nous avons donc entrepris d'étudier *in vivo* quel serait l'impact d'une délétion du récepteur P2X7, en utilisant le modèle de souris *P2rx7^{-/-}* (Solle *et al.*, 2001), sur les mécanismes d'absorptions du glucose et les changements physiologiques que peut causer la perte du récepteur.

5.1 Effets de la perte du gène *P2rx7* sur l'axe crypte villosité du jéjunum de souris

5.1.1 Validation de notre modèle de souris *P2rx7^{-/-}*

Afin de valider l'absence de synthèse de la protéine P2X7, nous avons réalisé un immunobuvardage de type Western sur un enrichissement de CEI de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* (Fig. 7A). À l'aide d'un anticorps dirigé contre la queue C-terminale de la protéine P2X7, nous montrons l'absence de bande dans l'échantillon *P2X7^{-/-}* par rapport à l'échantillon contrôle. Le témoin vinculine démontre bien la présence de protéine dans les deux pistes. Nous avons réalisé une immunofluorescence sur des coupes de jéjunum de souris âgées de 3 mois à l'aide d'un anticorps dirigé contre la boucle extracellulaire (Fig. 7B et 7C). Les analyses de microscopie de fluorescence indirecte montrent que le récepteur P2X7 s'exprime à la surface des CEI le long des villosités des souris contrôles mais pas dans les souris *P2rx7^{-/-}*. Ces résultats suggèrent que l'insertion de la cassette néomycine dans le gène *P2rx7* par recombinaison homologe empêche la synthèse de la protéine et

que nos souris mutantes n'expriment aucune isoforme du récepteur P2X7 au niveau de l'épithélium intestinal.

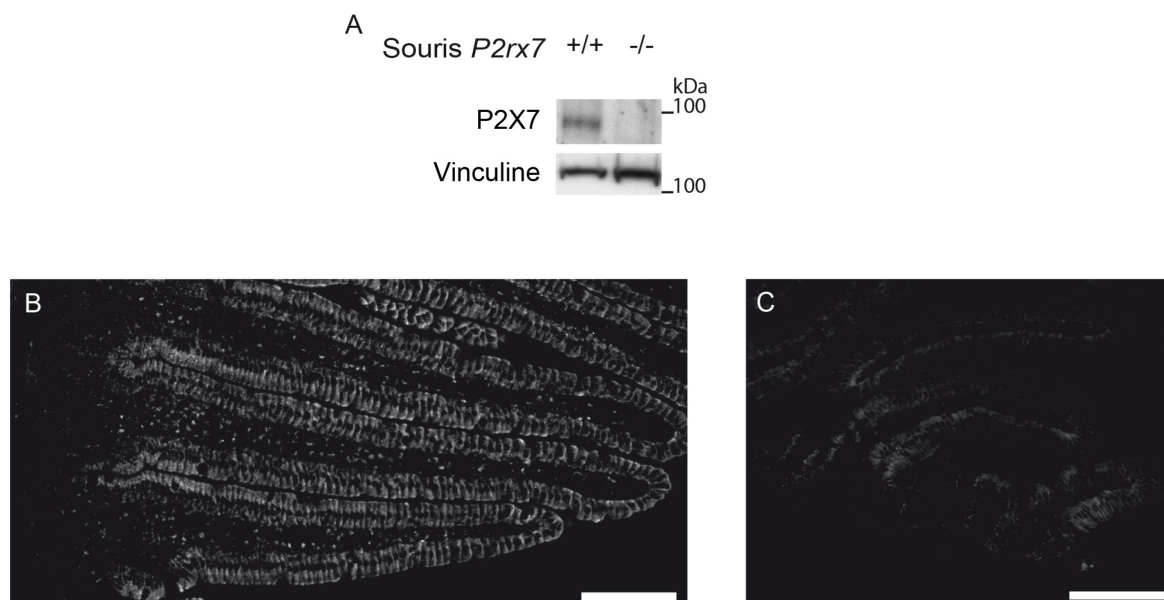


Figure 7 : Expression du récepteur P2X7 dans le jéjunum des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-}.

Immunobuvardage de type Western sur un enrichissement de CEI de souris contrôles (*P2X7*^{+/+}) et souris *P2rx7*^{-/-} (A). L'anticorps anti-P2X7 dirigé contre la queue C-terminale détecte la protéine P2X7 uniquement dans la piste de la souris contrôlé. Localisation du récepteur P2X7 dans les villosités du jéjunum de souris contrôles (B) et *P2rx7*^{-/-} (C) à l'aide d'un anticorps dirigé contre la boucle extracellulaire de la protéine. Barres d'étalonnages = 100 μ m.

5.1.2 Localisation du transporteur GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*

Comme le Dr Tobin et ses collaborateurs l'ont montré dans les souris résistantes à l'insuline, le transporteur facilité du glucose GLUT2 peut être maintenu à la membrane apicale des entérocytes (Tobin et al., 2008). Au chapitre précédent, nous avons démontré que l'abolition ou la réduction d'expression de *P2rx7* par shARN dans les cellules IEC-6 permettait de maintenir l'expression de GLUT2 à la membrane plasmique des cellules, et ce malgré une stimulation au BzATP (Bourzac et al., 2013). Nous avons donc validé, *in vivo*, si l'absence d'expression du récepteur P2X7 avait aussi un effet sur la localisation de ce transporteur dans les CEI de jéjunum des souris après un jeûne de 6 h (Fig. 8). Par des essais d'immunofluorescence indirecte, nous avons montré que la localisation du transporteur GLUT2 est diffuse et situé près du réseau de capillaires des villosités (flèches blanches Fig. 8A et annexe 8.1.1). À plus fort grossissement (63x), la fluorescence verte associée à GLUT2 se trouve sous les noyaux, colorés au Hoechts 33342, soit dans la portion basolatérale des CEI (Fig. 8B et annexe 8.1.2). Dans les souris *P2rx7^{-/-}* (Fig. 8C-D), la fluorescence est également localisée près du réseau de capillaires des villosités (flèches blanches Fig. 8C et annexe 8.1.3), c'est-à-dire du côté basolatéral des CEI, mais elle est aussi en contact avec la lumière intestinale en formant un liseré vert (têtes de flèches blanches, Fig. 8C et annexe 8.1.3). Au grossissement de 63x (Fig. 8D et annexe 8.1.4), la fluorescence se trouve sous les noyaux, dans la portion basolatérale et nous observons un fin marquage à l'apex des entérocytes. L'ensemble de ces observations instille l'idée qu'après 6 h de jeûne, le transporteur GLUT2 est principalement à la membrane basolatérale des CEI chez les souris contrôles. En revanche, chez les souris *P2rx7^{-/-}* le transporteur GLUT2 est présent à la fois à la membrane basolatérale et à la membrane apicale des CEI. Ces résultats suggèrent qu'en absence du récepteur P2X7, la translocation du transporteur GLUT2 est mal régulée et que le transporteur est relocalisé à l'apex des entérocytes. En fait, cette relocalisation pourrait affecter le flux de glucose entre la lumière intestinale et la circulation sanguine. De plus, la différence de localisation de GLUT2 entre les souris de type sauvage et les souris *P2rx7^{-/-}* est similaire à celle observée chez des souris ayant une résistance à l'insuline (Tobin et al., 2008), chez des patients obèses morbides et dans les modèles de souris *ob/ob* ou nourris avec une diète riche en gras (Ait-Omar et al., 2011).

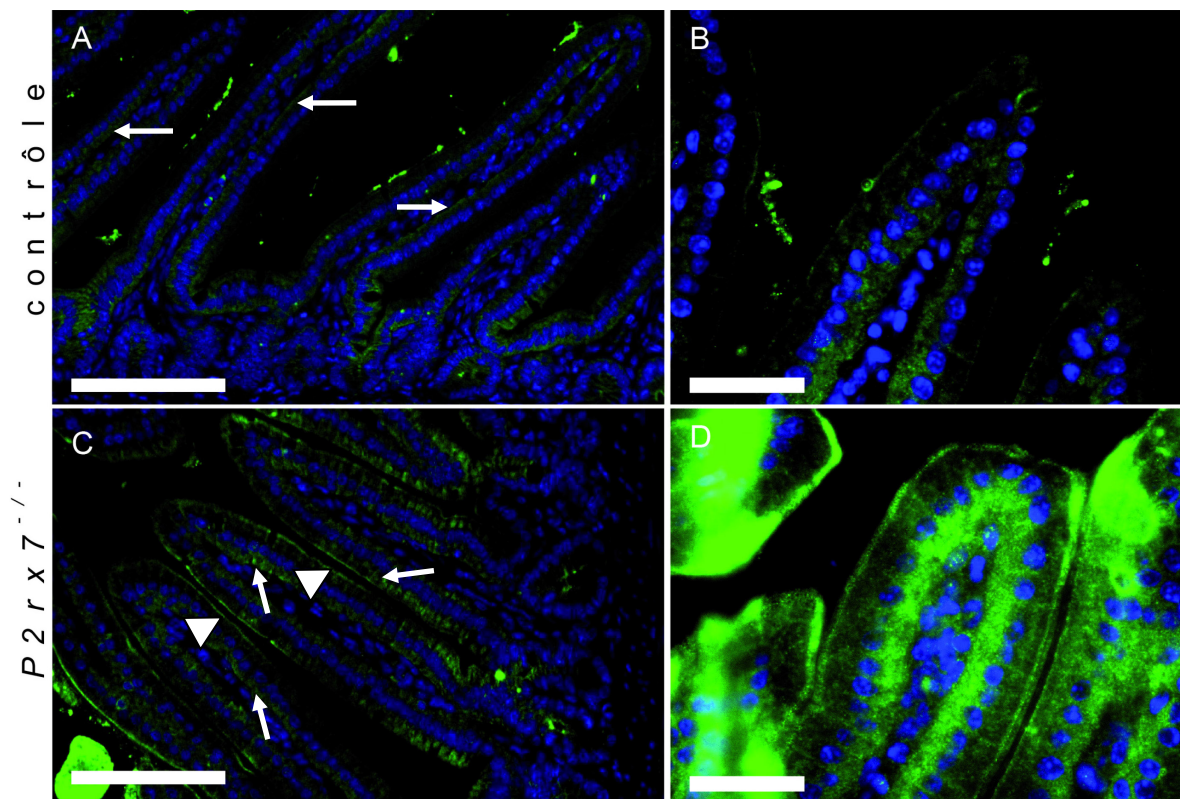


Figure 8 Localisation du transporteur facilité du glucose GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-}

Immunolocalisation par microscopie en épifluorescence indirecte et coloration des noyaux au Hoechts 33342 pour localiser le transporteur GLUT2 (fluorescence verte) sur des coupes de jéjunum de souris contrôles (A et B) et *P2rx7*^{-/-} (C et D), au grossissement 10x (A et C) et 63x (B et D). Les flèches blanches pointent la membrane basolatérale des CEI. Les têtes de flèche pointent l'apex des CEI. Les images sont représentatives de résultats obtenus dans quatre souris contrôles et quatre souris *P2rx7*^{-/-}. Pour les images A et C, la barre d'échelle = 100 μ m. Pour les images B et D, la barre d'échelle = 50 μ m.

5.1.3 Conséquences de la perte du gène *P2rx7* sur le nombre de cellules entéroendocrines dans les villosités des souris

L'intestin grêle n'est pas seulement une barrière qui contrôle le passage des nutriments dans la circulation sanguine, c'est aussi le plus gros organe endocrinien de l'organisme. Les cellules entéroendocrines sont les cellules de l'intestin qui sont responsables de la synthèse et la sécrétion de facteurs qui vont jouer un rôle clé dans la régulation du métabolisme, incluant l'homéostasie du glucose, et qui vont agir non seulement sur ses propres cellules mais aussi sur les organes périphériques dont le pancréas (Drucker, 2007). La présence et la localisation des cellules entéroendocrine peuvent se faire à l'aide d'un anticorps dirigé contre la chromogranine A (CgA). Cette prohormone est considérée comme un marqueur général des cellules entéroendocrines (Rindi *et al.*, 2004, Nagatake *et al.*, 2014). En plus de se retrouver dans des vésicules à cœur dense de la majorité des sous-types cellulaires formant l'intestin endocrine, la CgA peut être clivée en plusieurs fragments bioactifs qui vont influencer de nombreux systèmes de régulation, notamment celui responsable du maintien de la glycémie (Helle *et al.*, 2007, Angelone *et al.*, 2012). Puisque nos souris invalidées pour le gène *P2rx7* semblent avoir une anomalie au niveau de la localisation du transporteur GLUT2 dans les CEI et un défaut de régulation de la glycémie (Cf. section 5.2.2), nous avons émis l'hypothèse que l'absence de ce récepteur particulier pourrait aussi agir sur les fonctions endocriniennes de l'intestin, ou à tout le moins, sur le nombre des cellules entéroendocrines le long de l'axe crypte villosité de nos souris. Par immunofluorescence indirecte, un décompte général du nombre de cellules entéroendocrines présentes dans le jéjunum de nos animaux âgés de 12 semaines a été effectué (Fig. 9). Dans les souris contrôles (Fig. 9A), il y a très peu de fluorescence verte représentant les cellules CgA positive. La plupart des villosités en coupe des souris contrôles n'ont qu'en moyenne 1 à 2 cellules CgA positives par villosité. Dans les souris *P2rx7^{-/-}* (Fig. 9B), il n'est pas rare de voir des villosités en coupe possédant plus que 2 ou 3 cellules CgA positives. La figure 9C présente la moyenne du nombre de cellules entéroendocrines CgA positives par villosité sur un total de trente-cinq villosités sélectionnées au hasard chez 4 souris contrôles et 4 souris *P2rx7^{-/-}*. La figure montre que le nombre de cellules entéroendocrines CgA positives dans les souris *P2rx7^{-/-}* est significativement plus élevé que celui dénombré pour les souris contrôles. Ce résultat

semble indiquer qu'en absence du récepteur P2X7, les sous-types cellulaires avec des vésicules contenant de la CgA apparaissent plus fréquemment dans les villosités.

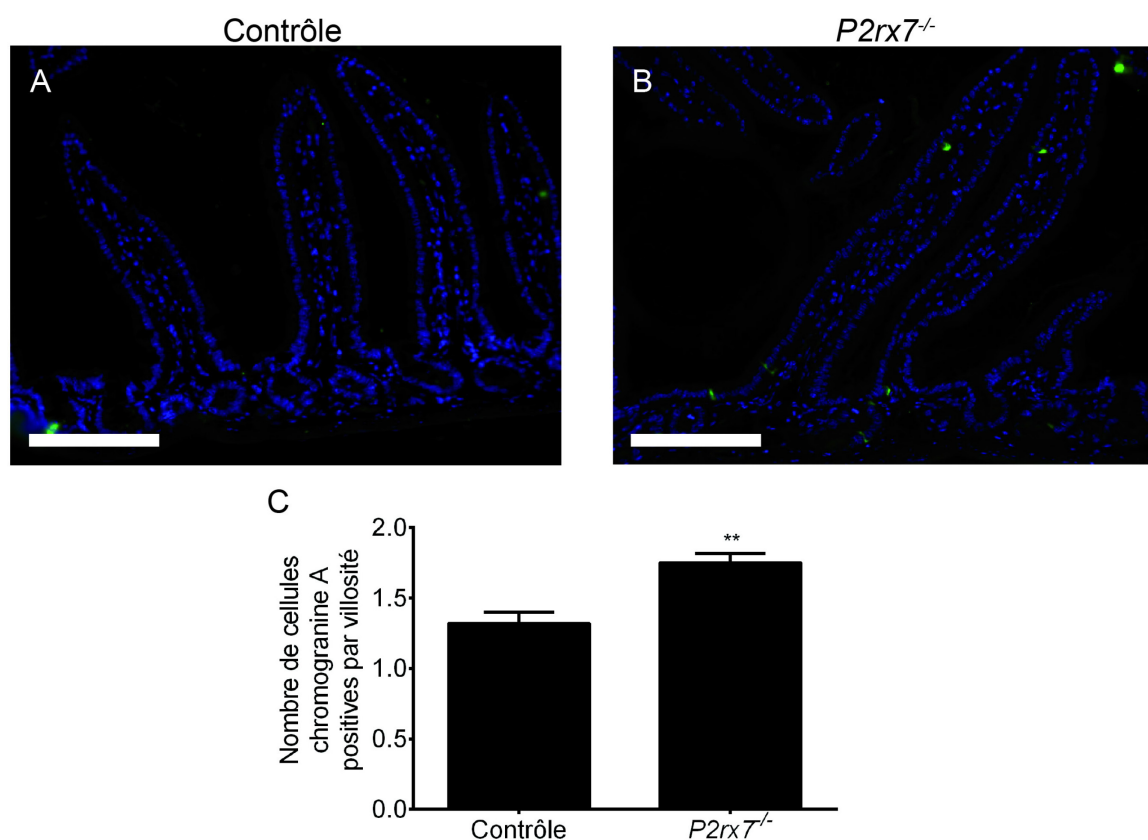


Figure 9 : Décompte du nombre de cellules chromogranine A positives dans le jéjunum de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* âgées de douze semaines

Les cellules positives pour la CgA ont été détectées par microscopie en fluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps dirigé contre la CgA. Les noyaux ont été colorés au Hoechts 33342. Les cellules CgA positives ont été localisées le long de l'axe crypte villosité sur des coupes de jéjunums de souris contrôles (A) et *P2rx7^{-/-}* (B). Décompte du nombre de cellules CgA positives dans le jéjunum des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* (C). Les résultats représentent la moyenne des cellules entéroendocrines CgA positives par villosité sur un total de trente-cinq villosités sélectionnées aléatoirement dans 4 souris contrôles et 4 souris *P2rx7^{-/-}*. Pour les panneaux A et B, la barre d'échelle = 100 μ m Le test statistique pour comparer le nombre moyen de cellules entéroendocrines CgA positives par villosité est le test *t* non apparié où ** : $p < 0.01$.

5.2 Conséquences de la perte du gène *P2rx7* sur la physiologie des souris

5.2.1 Effet de la perte du récepteur P2X7 sur la masse et la glycémie des souris.

Nous retrouvons dans la littérature un nombre croissant de liens associant le récepteur P2X7 et certains de ces variants polymorphiques à des troubles de l'homéostasie du glucose en raison du rôle du récepteur P2X7 dans la régulation des fonctions et de la survie des cellules β du pancréas (Glas et al., 2009, Todd et al., 2015, Vieira *et al.*, 2016), ou encore à des problèmes métaboliques liés à l'accumulation et la distribution anormales de tissu adipeux dans les souris *P2rx7^{-/-}* et à la sécrétion de cytokines par les adipocytes induite par l'activation du récepteur P2X7 qui pourraient favoriser la résistance à l'insuline (Madec *et al.*, 2011, Beaucage *et al.*, 2014). Les travaux présentés au chapitre I et à la figure 8 de la présente thèse ont mis en évidence un nouveau rôle potentiel du récepteur P2X7 dans le métabolisme du glucose en modulant la translocation du transporteur de glucose GLUT2 au domaine apical de la membrane plasmique suivant son activation. À la lumière de ces résultats, nous avons donc jugé pertinent d'étudier si les souris *P2rx7^{-/-}* seraient plus susceptibles de développer des désordres métaboliques liés à une possible hyperglycémie. Pour valider cette hypothèse, nous avons dans un premier temps suivi la croissance de 6 souris mâles contrôles et 8 souris mâles *P2rx7^{-/-}* pendant une période de 20 semaines durant laquelle nous avons mesuré la masse corporelle totale de chacune des souris une fois par semaine à la même heure (Fig. 10A). Nous observons une différence significative des masses entre nos mâles *P2rx7^{-/-}* et nos souris mâles contrôles dès la 3^e semaine de vie avec en moyenne une différence de 1,8 g (11,9 g pour les mutants contre 10,1 g pour les contrôles). Cette différence est plus grande avec le temps puisqu'à 20 semaines, il y a 7,2 g de différence entre nos deux cohortes de souris (39,3 g en moyenne pour les souris mâles *P2rx7^{-/-}* contre 32,1 g en moyenne pour les souris mâles contrôles). Ces résultats suggèrent que la perte du récepteur P2X7 chez les souris mâles conduit à une prise de poids plus importante que les souris mâles contrôles.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la glycémie de souris mâles à 3, 8, 12, 26, 36, et 52 semaines après 6 h de jeûne (Fig. 10B). À l'âge de 3 et à 8 semaines, la glycémie, après un jeûne de 6 h, n'est pas différente : 7,1 mmol/L et 7,2 mmol/L en moyenne pour les souris mâles contrôles, âgées respectivement de 3 et 8 semaines, contre 6,8 mmol/L et 7,0 mmol/L en moyenne pour les souris mâles *P2rx7^{-/-}*. Cependant, à 12

semaines d'âge, nous observons une différence significative de la glycémie entre les souris mâles contrôles (5,9 mmol/L) alors que chez les souris *P2rx7^{-/-}* la glycémie est en moyenne de 7,2 mmol/L. Cette différence dans la glycémie à jeun entre les souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* est maintenu jusqu'à 52 semaines d'âge (Fig. 10B). Après 52 semaines, les glycémies moyennes des souris mâles contrôles est de 6,4 mmol/L et 8,1 mmol/L pour les souris *P2rx7^{-/-}*. Nous n'avons pas poussé notre investigation passées 52 semaines puisque de nombreuses souris montraient des signes de détresse tels qu'une perte de mobilité et une obésité importante (observations personnelles).

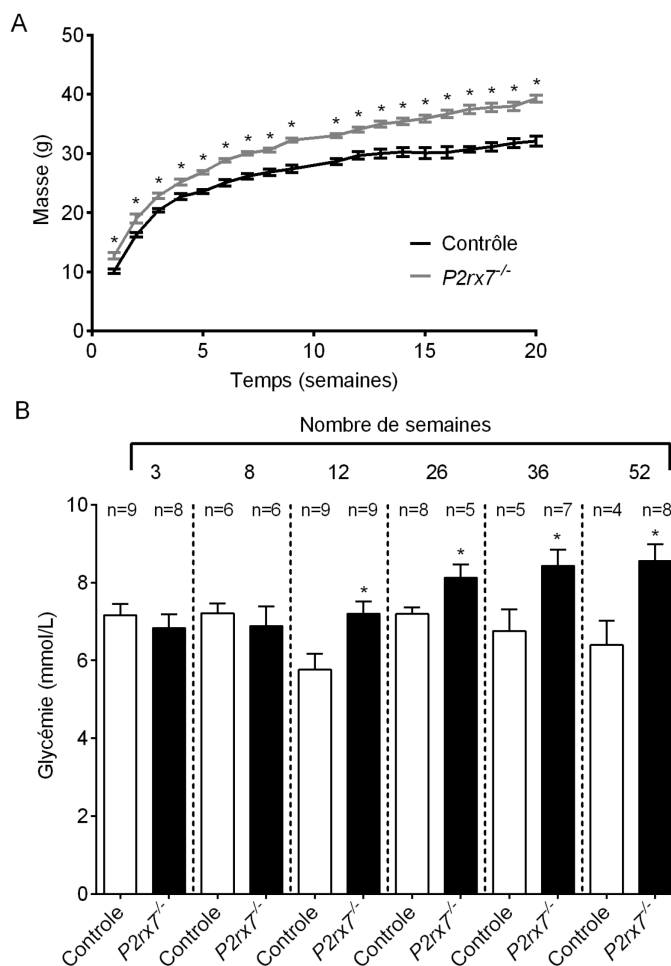


Figure 10 : Courbe de croissance de souris contrôles et de souris *P2rx7^{-/-}* et évolution de la glycémie après 6 h de jeûne dans les souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* dans le temps.

Courbes de croissance (A) réalisées en mesurant la masse de 6 souris mâles contrôles et 8 souris mâles *P2rx7^{-/-}* une fois par semaine à la même heure, de la 3^e à la 23^e semaine post-embryonnaire. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne des masses \pm SEM. Les glycémies ont été mesurées chez des souris contrôles et des souris *P2rx7^{-/-}* après 6 h de jeûne à la 3^e, 8^e, 12^e, 26^e, 36^e, et 52^e semaine post-embryonnaire. Les résultats de glycémie sont présentés comme étant la moyenne \pm SEM du nombre de souris indiqué sur le graphique pour les souris mâles contrôles et les souris mâles *P2rx7^{-/-}*. Le test statistique pour comparer les masses de souris est le test non paramétrique Mann Whitney où * : $p < 0.05$, lorsque comparé aux souris contrôles. Le test statistique pour comparer les glycémies est le test *t* non apparié où * : $p < 0.05$.

5.2.2 Évaluation de la tolérance au glucose dans les souris *P2rx7^{-/-}*

Des tests de tolérance au glucose oral ont été effectués chez des souris mâles contrôles et des souris mâles *P2rx7^{-/-}* pour déterminer leur capacité à normaliser leur glycémie. La voie orale est la plus physiologique parce qu'elle implique tous les mécanismes régulateurs et c'est une méthode utilisée depuis des décennies pour diagnostiquer le diabète chez l'humain (American Diabetes, 2014). Ainsi, par gavage, nous avons administré 50 mg de glucose à des souris après un jeûne de 6 h. Des prélèvements sanguins dans la veine caudale à 0 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min et à 90 min ont été effectués pour mesurer la glycémie à l'aide d'un glucomètre.

Chez les souris âgées de 3 semaines, la glycémie avant le gavage des deux groupes de souris était en moyenne de 7,1 mmol/L. Les résultats montrent que le pic de glycémie est retardé dans les souris *P2rx7^{-/-}* passant de 10 min pour les souris contrôles à 15 min pour les souris *P2rx7^{-/-}* (Fig. 11A). La glycémie maximale est aussi significativement différente chez ces souris passant de 16,5 mmol/L en moyenne pour les souris contrôles à 20,5 mmol/L en moyenne pour les souris *P2rx7^{-/-}* (Fig. 11A). La glycémie est significativement différente à 15 min et 30 min, s'élevant à 13,8 mmol/L et 9,8 mmol/L pour les souris contrôles et 20,5 mmol/L et 14,8 mmol/L pour les souris *P2rx7^{-/-}*. Cependant, les courbes de glycémie des deux groupes se croisent après 60 min et ne sont plus significativement différentes.

La glycémie maximale plus élevée chez les souris *P2rx7^{-/-}* après administration du glucose par voie orale, puis le retard pour revenir à l'équilibre suggèrent un défaut dans la réponse précoce de gestion d'une grande quantité de glucose chez les souris *P2rx7^{-/-}*, mais que ces souris rétablissent leur glycémie avec le temps comme observé chez les souris contrôles. En fait, l'aire sous la courbe (Fig. 11B), montre que la concentration sanguine de glucose dans les souris *P2rx7^{-/-}* est significativement plus élevée dans l'intervalle de 90 min que celle des souris contrôles suggérant une réponse biologique différente entre les deux groupes de souris face à l'hyperglycémie provoquée.

Contrairement aux souris âgées de 3 semaines, à 12 semaines d'âge, la glycémie après 6 h de jeûne des souris contrôles est en moyenne de 6,2 mmol/L alors que celle des souris *P2rx7^{-/-}* reste en moyenne à 7,2. La glycémie maximale n'est pas décalée dans le temps et atteint 13,6 mmol/L en moyenne pour les souris contrôles et 15,8 mmol/L en

moyenne pour les souris $P2rx7^{-/-}$ (Fig. 11C). En revanche, la courbe des souris $P2rx7^{-/-}$ ne recoupe pas la courbe des souris contrôles. La glycémie est significativement plus élevée chez les souris $P2rx7^{-/-}$ à 15, 30 et 60 min post-gavage (Fig. 11C). L'aire sous la courbe (Fig. 11D) montre que la concentration sanguine de glucose dans les souris $P2rx7^{-/-}$ est significativement plus élevée dans l'intervalle de 90 min que celle des souris contrôles, suggérant à nouveau une réponse biologique différente à l'hyperglycémie provoquée.

Les glycémies significativement différentes dans les souris mutantes à 12 semaines à 60 min et 90 min suggèrent une aggravation du défaut de la réponse biologique vu à 3 semaines qui pourrait s'apparenter à une mauvaise tolérance au glucose.

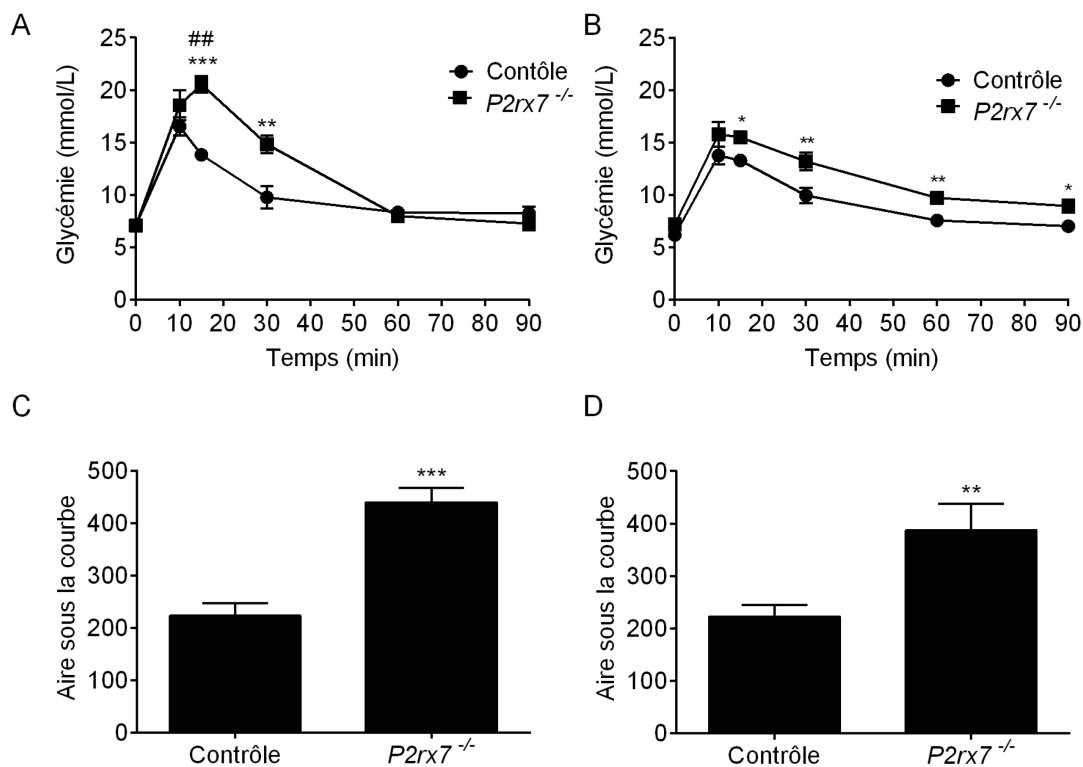


Figure 11 : Évaluation de la tolérance orale au glucose des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-}.

Après un jeûne de 6 h, une solution de 50 mg de glucose a été administrée *per os* à des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-} de 3 semaines (A) et 12 semaines (B). La glycémie est ensuite mesurée par prélèvement sanguin dans la veine caudale avant le gavage (temps 0 min), puis à 10 min, 15 min, 30 min, 60 min et 90 min après gavage. L'aire sous la courbe de la glycémie des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-} de 3 semaines (C) et 12 semaines (D) a été calculée par la méthode des trapèzes. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne \pm SEM de 7-8 souris mâles par groupe. Le test statistique pour comparer les glycémies est le test non paramétrique Mann Whitney où * : $p < 0.05$, ** < 0.01 , *** < 0.001 lorsque comparé aux souris contrôles, aux mêmes temps; où ## : $p < 0.01$ lorsque les pics maximums de glycémie des 2 groupes sont comparés. Le test statistique pour comparer les aires sous la courbe est le test *t* non apparié où ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$.

5.2.3 Analyses sanguines des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*

L'homéostasie du glucose reflète une balance entre la production de glucose par le foie, l'apport des sucres de l'alimentation par l'intestin grêle et l'absorption, la mise en réserve et l'utilisation de ces sucres par les organes périphériques. Parmi les régulateurs hormonaux de la glycémie, l'insuline est l'un des plus importants pour maintenir cet équilibre métabolique. Un défaut dans la signalisation de l'insuline est souvent observé dans le développement du diabète de type 2 et du syndrome métabolique (Roberts *et al.*, 2013). La résistance à l'insuline se manifeste lorsque cette hormone a moins d'effet sur ses récepteurs ce qui a pour conséquence une diminution de l'efficacité d'absorption du glucose par les organes périphériques et de fait, une élévation de la glycémie. La résistance à l'insuline provoque également une élévation des triglycérides, une diminution du taux de HDL (Lebovitz, 2001). Les tests de tolérance au glucose oral et la mesure de la glycémie après 6 h de jeûne chez les souris ont montré un défaut dans le maintien de l'équilibre du glucose sanguin pour les souris *P2rx7^{-/-}*. La perte du récepteur P2X7 chez les souris pourrait déséquilibrer la balance glycémique en favorisant la résistance à l'insuline. Des mesures de la concentration d'insuline circulante ont été effectuées pour vérifier cette hypothèse (Fig. 12A). Parallèlement, le glucose sanguin a été mesuré (Fig. 12B) pour calculer les indices HOMA de résistance à l'insuline (HOMA2-IR) et de la fonction des cellules β du pancréas pour chacun des groupes de souris (Fig. 12C et D). Les concentrations de cholestérol total (Fig. 13A) et des triglycérides (Fig. 13B) ont également été mesurées grâce à un analyseur automatique puisqu'ils sont des indices mesurables de la résistance à l'insuline.

La concentration d'insuline a été mesurée en duplicata dans le sérum de 8 souris mâles contrôles et de 9 souris mâles *P2rx7^{-/-}* âgées de 12 semaines obtenu par ponction cardiaque après un jeûne de 6 h. Les résultats de la figure 12A montrent une différence significative dans la concentration d'insuline dans le sérum entre les souris contrôles et les souris *P2rx7^{-/-}*. A partir d'un autre aliquote des mêmes sérums, la concentration en glucose a été mesurée et les résultats de la figure 12B montrent que la concentration en glucose est significativement différente entre les souris contrôles et les souris *P2rx7^{-/-}*. Les données d'insuline et de glucose obtenues chez les souris contrôles et les souris *P2rx7^{-/-}* nous permettent de calculer les indices HOMA2-IR (Fig. 12C) et HOMA2-%B à l'aide du

HOMA calculator pour chacune des souris. Ces indices permettent de quantifier la résistance à l'insuline et estiment la fonction des cellules β (Fig. 12 D) respectivement. Les résultats du calcul HOMA2-IR montrent une différence significative de l'indice entre les souris contrôles à 1,5 en moyenne et les souris $P2rx7^{-/-}$ à 2,8 en moyenne. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les souris contrôles à 17,3% en moyenne et les souris $P2rx7^{-/-}$ à 20,2% en moyenne concernant l'indice de la fonction des cellules β du pancréas. Ces résultats suggèrent que l'élévation de la concentration d'insuline dans les souris $P2rx7^{-/-}$ serait une réponse à une résistance à l'insuline plus importante que dans les souris contrôles mais que la fonction des cellules β du pancréas ne semble pas affectée.

Le dosage de la concentration de cholestérol total (Fig. 13A) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris contrôles et les souris $P2rx7^{-/-}$. Le dosage de la concentration des triglycérides (Fig. 13B) montre qu'il y a une différence significative entre les deux groupes de souris. En absence du récepteur P2X7, la concentration de triglycérides circulant dans le sang serait plus élevée que dans les souris contrôles. L'ensemble de ces résultats suggère que les souris $P2rx7^{-/-}$ pourraient être résistantes à l'insuline et que les taux plus élevés d'insuline dans le sang pourraient avoir pour conséquence une augmentation des triglycérides circulants.

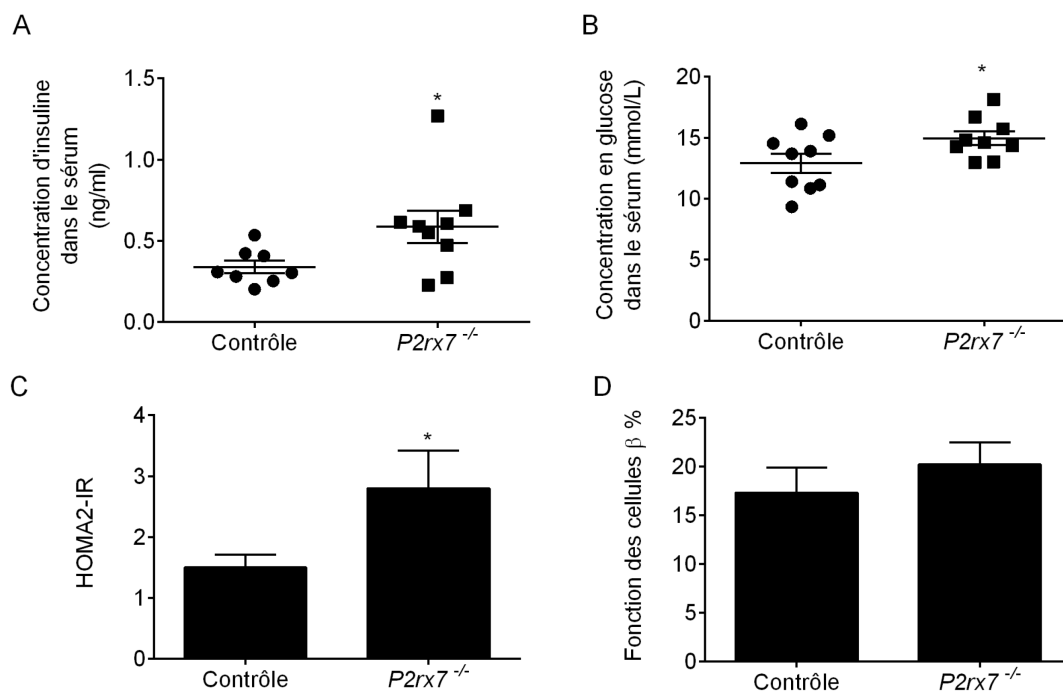


Figure 12 Concentration d'insuline et de glucose dans le sérum des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* et mesure de l'indice de résistance à l'insuline et de la fonction des cellules β .

Les concentrations d'insuline (A) et de glucose (B) dans le sérum obtenu par ponction cardiaque, de 8 souris mâles contrôles et 9 souris mâles *P2rx7^{-/-}* âgées de 12 semaines après un jeûne de 6 h, ont été mesurées dans un analyseur automatique. Les indices HOMA2-IR (C) et celui de la fonction des cellules β (D) ont été calculés avec le logiciel HOMA calculator à l'aide des données de concentration d'insuline et de glucose des figures A et B. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne \pm SEM. Le test statistique pour comparer la concentration d'insuline, l'indice HOMA2-IR et la fonction des cellules β est le test non paramétrique Mann Whitney où * : $p < 0.05$ lorsque comparé aux souris contrôles. Le test statistique pour comparer la concentration de glucose est le test t non apparié où * : $p < 0.05$.

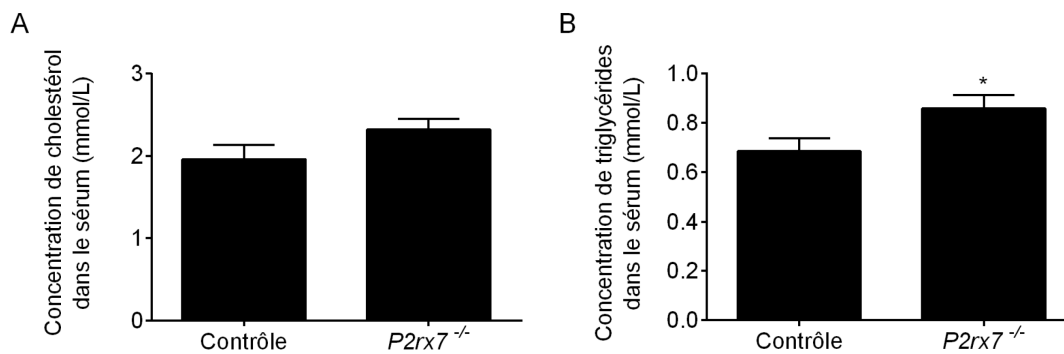


Figure 13 : Dosage de la concentration de cholestérol total et des triglycérides dans le sérum des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}*.

La concentration de cholestérol total (A) et des triglycérides (B) dans le sérum obtenu par ponction cardiaque de 9 souris mâles contrôles et 9 souris mâles *P2rx7^{-/-}* âgées de 12 semaines après un jeûne de 6 h, ont été mesurées dans un analyseur automatique. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne \pm SEM. Le test statistique pour comparer la concentration de cholestérol total et la concentration de triglycérides est le test *t* non apparié où * : $p < 0.05$.

5.2.4 Tomographie par émission de positrons (TEP) et biodistribution du fluorodésoxyglucose (^{18}F) (^{18}F -FDG) dans les souris contrôles et $P2rx7^{-/-}$

Comme nous venons de le voir, la perte d'expression du gène $P2rx7$ dans les souris cause une augmentation apparente du transporteur GLUT2 à la surface des entérocytes et une augmentation du taux d'insuline circulante qui pourrait s'expliquer par une résistance à l'insuline de certains organes. La présence accrue du transporteur GLUT2 à la membrane des CEI pourrait permettre le passage d'un flux de glucose plus important dans le sang et expliquer l'élévation de la glycémie mesurée dans les souris $P2rx7^{-/-}$ lors des tests de tolérance au glucose oral. Cette élévation pourrait s'expliquer aussi par un défaut de réabsorption du glucose par les organes périphériques normalement responsables de la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène (Moore *et al.*, 2012), ce qui pourrait expliquer l'apparente résistance à l'insuline évoquée par les résultats du test HOMA2-IR. Pour répondre à cette question, nous avons suivi le transit et l'accumulation du glucose radioactif ^{18}F -FDG dans les organes des souris par imagerie TEP. Après un jeûne de 6 h, une solution contenant 50 mg de glucose et le traceur radioactif ^{18}F -FDG (Fig. 14) a été administrée *per os* dans les souris contrôles et les souris $P2rx7^{-/-}$. Elles ont ensuite été anesthésiées et maintenues sous sédation, et placées rapidement dans le scanner en position ventrale. L'acquisition a été lancée trois minutes après l'administration du glucose supplémenté de ^{18}F -FDG. Après un temps d'acquisition de 90 min, les souris ont été euthanasiées et nous avons prélevé l'estomac, le foie, le duodénum, le jéjunum, le pancréas, une portion du quadriceps et du sang pour y évaluer la quantité de radioactivité présente et déterminer le profil de biodistribution du ^{18}F -FDG dans les tissus. Le profil de biodistribution est alors exprimé en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (Fig. 15).

Le glucose est en excès par rapport aux traces de ^{18}F -FDG contenu dans la solution administrée, le ^{18}F -FDG a donc un ratio de métabolisation dans les entérocytes moindre. La figure 14 montre différents stades des scans représentatifs effectués sur une souris contrôles et $P2rx7^{-/-}$. Après 1 min d'acquisition, c'est-à-dire 4 min après le gavage (Fig. 14), l'estomac (E) est fortement marqué. Le ^{18}F -FDG transit dans l'intestin grêle des 2 souris, où l'on peut distinguer le duodénum (D) qui se caractérise par la forme d'anse à proximité

de l'estomac. 6 minutes après le gavage, le ^{18}F -FDG semble avoir transité dans une plus grande partie de l'intestin grêle (I) des souris $P2rx7^{-/-}$ et après 13 minutes suivant le gavage, le scanner détecte une faible quantité de ^{18}F -FDG uniquement dans la vessie (V) des souris $P2rx7^{-/-}$. Pour les souris contrôles, la scintillation au niveau de la vessie n'est visible qu'à 29 minutes après le gavage, tandis que celui-ci s'accumule dans la vessie des souris $P2rx7^{-/-}$. Ce décalage dans le temps d'apparition du ^{18}F -FDG dans la vessie suggère que le flux du traceur et donc probablement du glucose à travers les CEI vers le compartiment sanguin est plus important dans les souris $P2rx7^{-/-}$ puisque le ^{18}F -FDG est plus rapidement concentré pour être éliminé. À 51 min après administration du ^{18}F -FDG, la vessie des souris contrôles et des souris $P2rx7^{-/-}$ continue d'accumuler une grande quantité de traceur, l'intestin grêle semble perdre le marquage progressivement. Après 1 h et 4 min, le scanner détecte une faible quantité de ^{18}F -FDG (tête de flèche) dans le cœur (C) des souris contrôles. Nous y reviendrons dans la discussion. Après 1 heure 24 minutes et à la fin de l'acquisition, 1 heure 34 minutes après le gavage, seul le cœur des souris contrôles semble accumuler le ^{18}F -FDG. Il ne reste que des traces du traceur dans l'intestin grêle des souris.

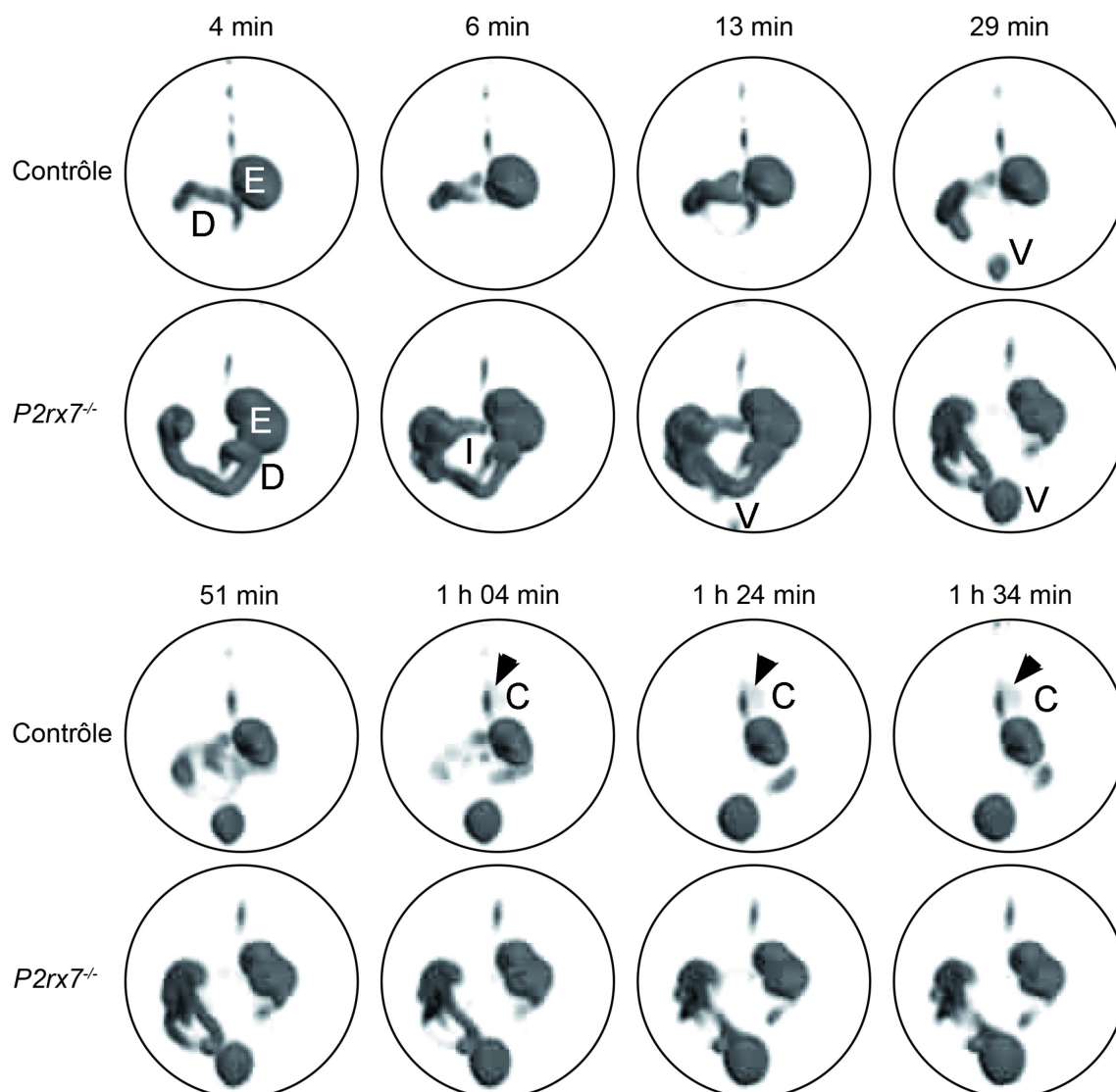


Figure 14 : Suivit de l'absorption du glucose par l'intestin par tomographie par émission de positrons à l'aide de la sonde ^{18}F -FDG.

Après un jeûne de 6 h, une solution contenant 50 mg de glucose et 3 à 5 MBq du traceur radioactif ^{18}F -FDG a été administrée *per os* à 3 souris mâles contrôles et 3 souris mâles $P2rx7^{-/-}$. Les souris ont été ensuite anesthésiées à l'isoflurane et placées en position ventrale dans le scanner. L'acquisition a débuté 3 minutes après le gavage. Les images permettent de visualiser la répartition et l'accumulation du ^{18}F -FDG dans différents organes : estomac (E), duodénum (D), intestin grêle (I), vessie (V), cœur (C). Les têtes de flèche montrent l'accumulation progressive de ^{18}F -FDG dans le cœur des souris contrôles

À la fin de l'expérience, les organes d'intérêts ont été prélevés pour des analyses de biodistribution du ^{18}F -FDG (Fig. 15). Les mesures de dose du traceur ^{18}F -FDG indiquent que pour l'estomac, le pourcentage moyen de dose injecté par gramme de tissu (%DI/g) est de 16,3% dans les souris contrôles et de 9,9% dans les souris mutantes. Il y a une tendance à la baisse du %DI/g dans le duodénum avec un %ID/g moyen de 13,3% pour les souris contrôles et 5,0% chez les mutants. Dans le système porte, une partie du ^{18}F -FDG est absorbée par le pancréas et le foie. Une dose plus importante est détectée dans le pancréas des souris $P2rx7^{-/-}$ avec un %ID/g moyen de 0,7% pour les souris contrôle contre 1,2% chez les souris $P2rx7^{-/-}$. De même dans le sang, le %ID/g moyen est de 1,2% dans les souris contrôles contre 2,9% dans les souris $P2rx7^{-/-}$. Le tissu musculaire des membres inférieurs est ici utilisé comme contrôle ou référence d'absorption basale du ^{18}F -FDG. Sous anesthésie, le muscle n'est pas à l'effort et n'a pas besoin d'un apport important de glucose. C'est aussi le tissu qui absorbe le moins de ^{18}F -FDG (Fueger *et al.*, 2006). Malgré un nombre restreint d'animaux (n=3) pour chaque groupe, les résultats montrent une augmentation significative de la présence de ^{18}F -FDG pour le compartiment sanguin et le pancréas et une tendance à la hausse dans le foie. À l'opposé, une baisse significative pour l'estomac et une tendance à la baisse pour le duodénum est observée dans les souris $P2rx7^{-/-}$ en comparaison des souris contrôles. Ces résultats semblent montrer que le glucose est plus rapidement absorbé au niveau intestinal pour être libéré dans le sang. Le sang alimente ensuite le pancréas et le foie qui semblent utiliser ou mettre en réserve une plus grande quantité de glucose. Une cohorte plus grande sera donc nécessaire pour valider ces conclusions.

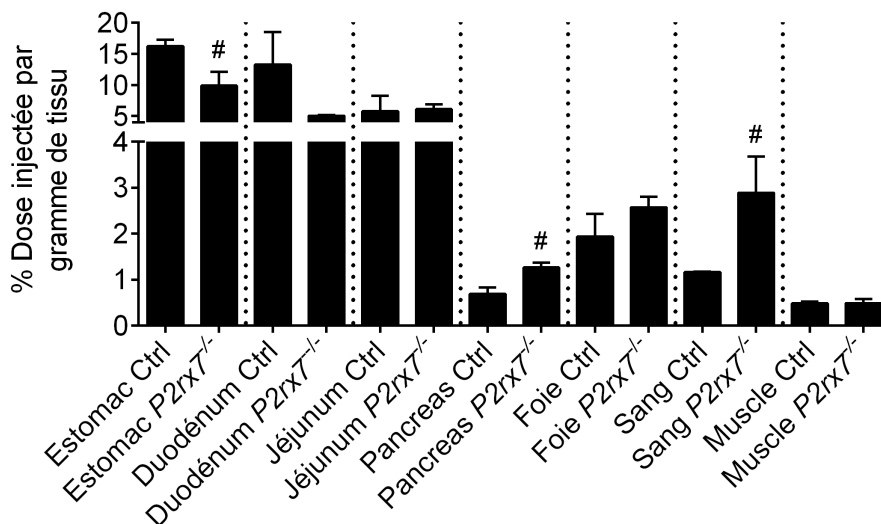


Figure 15 : Biodistribution du marqueur radioactif ^{18}F -FDG dans les organes des souris contrôles et $P2rx7^{-/-}$.

Après un jeûne de 6 h, une solution de glucose contenant 3 à 5 mégabecquerels du traceur radioactif ^{18}F -FDG a été administrée *per os* à des souris contrôles et des souris $P2rx7^{-/-}$. Après 90 minutes, les organes mentionnés sur le graphique ont été prélevés et la dose radioactive dans chacun d'eux a été mesurée et rapportée comme le pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%DI/g). Le %DI/g moyen de chaque organe des souris $P2rx7^{-/-}$ est comparé à celui des souris contrôles (Ctrl). Les résultats sont présentés comme la moyenne des %DI/g \pm SEM de 3 souris contrôles et 3 souris $P2rx7^{-/-}$. Le test statistique pour comparer le %DI/g est le test non paramétrique Mann Whitney où # : $p < 0.1$

5.2.5 La perte du récepteur P2X7 mène-t-elle à une stéatose du foie?

5.2.5.1 Accumulation de lipides dans le foie des souris *P2rx7^{-/-}*.

Une étude de la perte de fonction du récepteur P2X7 dans les souris a mis en évidence une distribution anormale du gras et l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans certains organes des souris mâles âgées de 12 mois (Beaucage et al., 2014). Le foie ne faisait pas partie des organes concernés. Pourtant, la quantité plus importante d'insuline et des triglycérides dans le sang, la résistance à l'insuline et la glycémie plus élevée sont autant de facteurs de risque de développer une stéatose hépatique (Browning et Horton, 2004, Cohen et al., 2011). Ces facteurs étant réunis dans nos souris *P2rx7^{-/-}*, une analyse histologique des foies des souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* âgées de 12 semaines a donc été effectuée (Fig. 16). Macroscopiquement, nous avons remarqué que les foies des souris *P2rx7^{-/-}* semblaient avoir un aspect alvéolé jaunâtre et étaient souvent plus gros que les foies des souris contrôles. Des coupes de foie de souris contrôles (Fig. 16A) et *P2rx7^{-/-}* (Fig. 16B) âgées de 12 semaines ont été colorées à l'hématoxyline et éosine. Les analyses suggèrent une vacuolisation principalement microvacuolaire (cercles blancs Fig. 16B) et de distributions variables dans les hépatocytes des souris *P2rx7^{-/-}* compatible avec une surcharge de glycogène et/ou de lipides. Pour vérifier cette hypothèse, une coloration à l'Oil Red O a été effectuée sur des lames de foie de souris de 3 semaines (Fig. 16C et D) et de 12 semaines (Fig. 16E et F) pour visualiser les triglycérides et les lipides. Nous observons dans les souris *P2rx7^{-/-}* une plus grande quantité de microvacuoles colorée en rouge dans le cytoplasme des hépatocytes (Fig. 16D et F) par rapport aux souris contrôles du même âge (Fig. 16C et E). Nous avons ensuite quantifié la coloration pour l'illustrer dans un graphique (Fig. 16G). La quantification de la coloration Oil Red O montre une différence significative de la moyenne des pixels rouges par champs dans les hépatocytes des souris *P2rx7^{-/-}* par rapport aux souris contrôles du même âge. À 3 semaines, la moyenne du nombre de pixels est de 17205 pour les souris *P2rx7^{-/-}* contre 4423 pour les souris contrôles. À 12 semaines, la moyenne est de 19245 pour les souris *P2rx7^{-/-}* contre 162 pour les souris contrôles. Ces résultats montrent que les hépatocytes des souris *P2rx7^{-/-}* mettent en réserve davantage de lipides suggérant que ces souris développent une stéatose du foie.

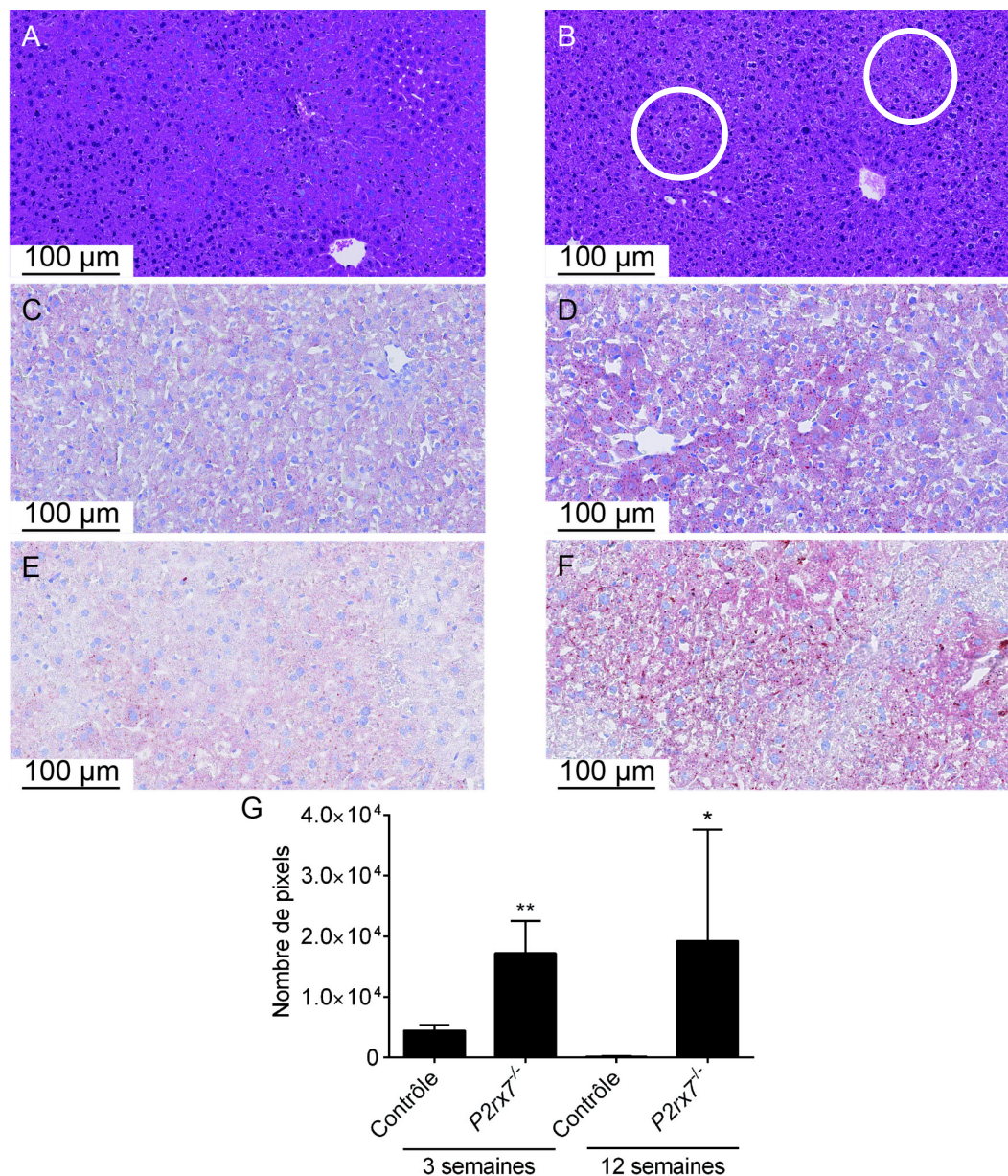


Figure 16: Accumulation de lipide dans les hépatocytes des souris *P2rx7*^{-/-}

Des coupes de foie de souris de 12 semaines contrôles (A) et *P2rx7*^{-/-} (B) ont été colorées à l'hématoxyline et éosine pour détecter des défauts histologiques au sein des hépatocytes. Les cercles blancs montrent des hépatocytes avec des microvacuoles. Une coloration Oil Red O a été effectuée sur des lames de foie de souris contrôles et *P2rx7*^{-/-} de 3 semaines (C et D) et de 12 semaines (E et F) pour déterminer la nature de ces vacuoles. La coloration Oil Red O dans les images a été quantifiée à l'aide du logiciel Adobe Photoshoph. Le graphique (G) représente la moyenne des pixels rouges comptabilisés dans les images de microscopie. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne de trois champs ± SEM de 4 souris contrôles et 4 souris *P2rx7*^{-/-} âgées de 3 semaines et de 8 souris contrôles et 8 souris *P2rx7*^{-/-} âgées de 12 semaines. Le test statistique pour comparer les moyennes de pixels est le test non paramétrique Mann Whitney où * : $p < 0.05$, ** < 0.01.

5.2.5.2 Etude de la transcription de deux enzymes de la lipogenèse dans les foies des souris *P2rx7^{-/-}*.

Le foie n'est normalement pas le lieu de stockage des lipides. En effet, dans des conditions physiologiques normales, la concentration des triglycérides hépatiques à l'équilibre est basse. Néanmoins, de nombreux échanges de triglycérides et d'acides gras entrant et sortant du foie ont lieu en réponse à l'absorption de nutriments ou d'un jeûne. Les acides gras de l'alimentation sont à 70% mis en réserve dans le tissu adipeux sous la forme de triglycérides, le reste est pris en charge par le foie. Dans le cas d'un apport excessif de sucre, les acides gras sont synthétisés *de novo* dans le foie, convertis en une autre famille de lipides comme les glycérides, les phosphoglycérides et les stérols pour ensuite former des lipoprotéines de très basse densité sécrétées dans le plasma ou être oxydés dans les mitochondries (Kawano et Cohen, 2013). L'accumulation de lipides dans le cytoplasme des hépatocytes des souris *P2rx7^{-/-}* pourrait être la conséquence d'un déséquilibre entre la mise en réserve des lipides par la synthèse *de novo* et l'absorption des acides gras d'un côté et l'élimination de ces lipides par l'oxydation des acides gras dans la mitochondrie et l'export sous forme de lipoprotéine. En raison de l'élévation de la concentration en glucose et de l'insuline dans les souris *P2rx7^{-/-}*, 2 facteurs qui promeuvent la lipogenèse en activant les facteurs de transcription responsables de la transcription des gènes lipogéniques (Kawano et Cohen, 2013), nous nous sommes intéressés à la lipogenèse *de novo* des triglycérides. Nous avons étudié le profil d'expression en ARNm de deux enzymes clés de la lipogenèse. L'Acétyl CoA Carboxylase alpha (ACC1) qui est l'enzyme limitant dans la synthèse des acides gras puisqu'elle permet le transfert du bicarbonate pour activer l'acétyl-CoA cytoplasmique en malonyl-CoA, un intermédiaire métabolique de la synthèse des acides gras. Quand les réserves d'énergie sont élevées, le citrate du cycle de Krebs s'accumule, sort de la mitochondrie et vient stimuler l'enzyme ACC1. L'acide gras synthase (FASN) est un complexe multienzymatique responsable de l'élongation des acides gras grâce à la fixation du malonyl-CoA (Wakil *et al.*, 1983, Wakil, 1986). L'ARNm des foies de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* âgées de 3 et 12 semaines ont été extraits et utilisés pour des analyses en qRT-PCR. À 3 semaines, la transcription du gène codant l'enzyme ACC1 est significativement augmentée de 1,7 fois dans les souris *P2rx7^{-/-}*. Ce résultat appuie une synthèse *de novo* des triglycérides dans le foie des souris *P2rx7^{-/-}*. À 12 semaines, la

transcription du gène de l'enzyme ACC1 dans les souris *P2rx7^{-/-}* est significativement plus basse et ne représente plus que 0,3 fois l'expression obtenue dans les souris contrôles. Pour l'enzyme FASN, on observe le même type de profil. La transcription du gène codant l'enzyme à 3 semaines tend à être plus importante dans les souris mutantes avec une augmentation de 1,3 fois. De même que pour ACC1 à 12 semaines, la tendance est à la baisse pour l'expression de l'enzyme FASN dans les souris mutantes.

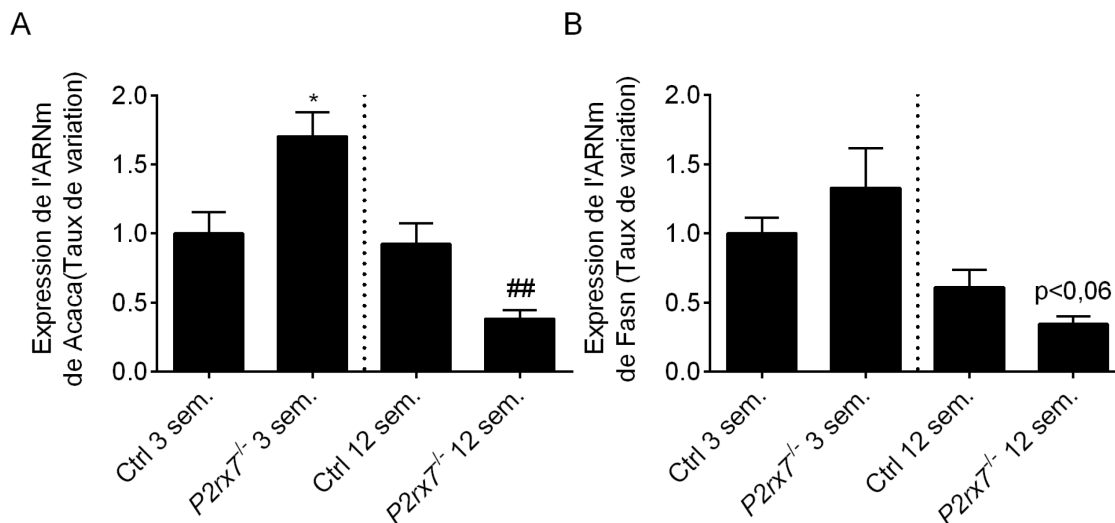


Figure 17: Variation de l'expression des enzymes clés de la lipogenèse dans le foie des souris contrôles et des souris *P2rx7^{-/-}*.

L'ARN des foies de souris contrôles et *P2rx7^{-/-}* a été extrait pour étudier les variations d'expression de l'enzyme ACC1 (A) et FASN (B) en qRT-PCR. Les résultats sont présentés comme la moyenne d'expression de l'ARNm de chaque enzyme \pm SEM de 4 souris contrôles et 4 souris *P2rx7^{-/-}* âgées de 3 semaines et de 9 souris contrôles et de 10 souris *P2rx7^{-/-}* âgées de 12 semaines. Le test statistique pour comparer les variations d'expression de l'enzyme ACC1 est le test *t* non apparié où * : $p < 0.05$ par rapport au contrôle (Ctrl) 3 semaines et ## : $p < 0.01$ par rapport au contrôle 12 semaines.

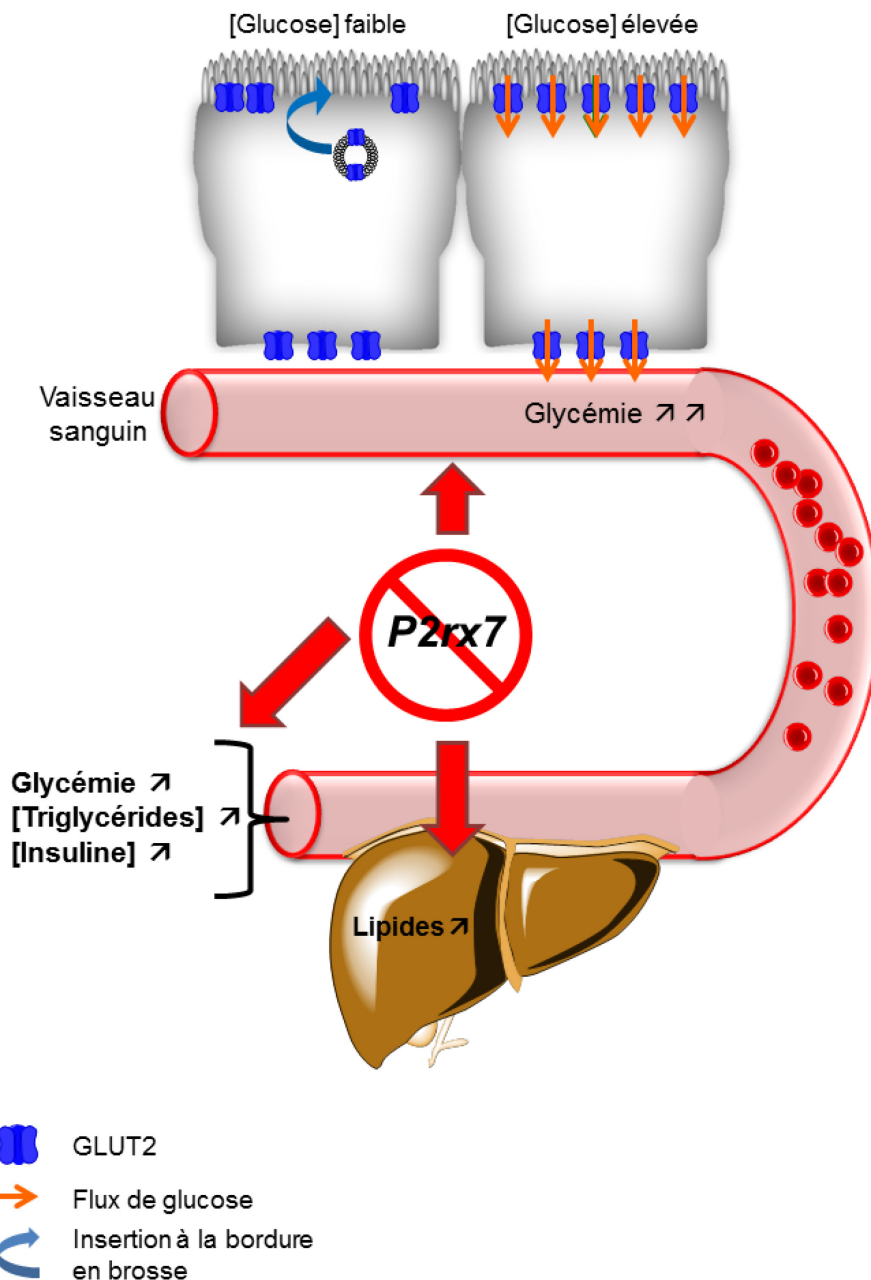


Figure 18 : conséquences physiologiques de la perte du récepteur P2X7 : bilan

En absence de récepteur P2X7 dans les souris $P2rx7^{-/-}$, le transporteur GLUT2 s'insère à la bordure en brosse des entérocytes même en condition préprandiale lorsque la concentration ([...]) en glucose est faible. Cette relocalisation pourrait perturber le flux de glucose entre la lumière intestinale et le flux sanguin puisqu'après ingestion d'une grande quantité de glucose, la glycémie des souris $P2rx7^{-/-}$ est plus élevée que celle des souris contrôle. Après 6 h de jeûne, les analyses sanguines montrent une glycémie plus élevée, mais aussi des concentrations en triglycérides et en insuline plus élevée que celles des souris contrôles. Dans le foie, nous avons observé une accumulation de lipide dans les hépatocytes.

DISCUSSION

L'ATP n'est définitivement plus limitée à sa fonction ancestrale de source principale d'énergie dans la cellule ou comme source de déoxyribonucléotide (dATP) (Alberts, 2015). La molécule d'ATP a acquis de nouvelles fonctions avec l'évolution des espèces qui a progressivement modelé des protéines intracellulaires avec des sites de liaisons complémentaires et de nombreux récepteurs extracellulaires du nucléotide à la surface des cellules. L'ensemble de ces modifications a profité autant à la création de la signalisation à court terme comme la sécrétion (Burnstock, 2014) ou la neurotransmission (Burnstock, 2006) que la signalisation à long terme pour la prolifération (Neary *et al.*, 2006), la différenciation (Rodrigues-Ribeiro *et al.*, 2015), l'inflammation, le dommage aux tissus et la mort cellulaire (Cauwels *et al.*, 2014). Parmi les récepteurs de l'ATP, un membre unique de la famille des récepteurs purinergiques ionotropiques P2X s'exprime à la surface des entérocytes : le récepteur P2X7.

6.1 Signalisation et mécanismes cellulaires activés par P2X7 dans les CEI

6.1.1 Les deux isoformes majeures de P2X7

Contrairement à Groschel-Stewart et ses collaborateurs (Groschel-Stewart *et al.*, 1999), nous avons mis en évidence avec un anticorps dirigé contre la boucle extracellulaire du récepteur P2X7 que la protéine s'exprimait sur les deux tiers supérieurs des villosités intestinales de rat. Le récepteur pourrait donc jouer un autre rôle que celui de « grande faucheuse » auquel il est souvent associé (Ferrari *et al.*, 1999). L'utilisation de cet anticorps au lieu de celui reconnaissant la queue C-terminale a peut-être mis en lumière la forme tronquée pour l'extrémité C-terminale P2X7B du récepteur qui s'exprime dans de nombreux tissus (Cheewatrakoolpong *et al.*, 2005). La combinaison de ces deux sous-unités pourrait conférer de nouvelles fonctions ou renforcer les effets de la sous-unité P2X7A. Le récepteur P2X7 semble formé de 3 sous-unités (Becker *et al.*, 2008), mais certains suggèrent que les sous-unités peuvent s'agréger en hexamère (Kim *et al.*, 2001) offrant plusieurs possibilités de moduler l'action du récepteur par combinaison des différentes formes de sous-unités. Un récepteur P2X7 formé de 3 sous-unités P2X7B ne peut pas

former le pore qui permet l'entrée du bromure d'éthidium et qui est associé aux mécanismes menant à l'apoptose (Adinolfi et al., 2010). En absence de la queue C-terminale, il n'y a pas de lien qui témoigne de l'état d'ouverture du canal avec les domaines de l'extrémité C-terminale qui pourrait réguler le recrutement des protéines cytoplasmiques. Inversement, il n'y a pas de connexion entre l'environnement intracellulaire et le canal P2X7 puisqu'il n'y a pas de lien physique entre l'extrémité C-terminale et les autres sous-unités du récepteur P2X7 (Becker et al., 2008). Néanmoins, le récepteur P2X7B permet de reproduire toutes les autres fonctions d'un récepteur formé de sous-unités P2X7A telles l'entrée de calcium par le canal P2X7 et la mobilisation du calcium intracellulaire pour favoriser la croissance par l'activation du facteur de transcription NFATc1 (Giuliani *et al.*, 2014), l'augmentation de la concentration intracellulaire d'ATP (mais pas sa sécrétion qui semble nécessiter la formation du pore). Une combinaison des formes P2X7A et P2X7B potentialise tous ces effets, mais la stœchiométrie variable 2:1 ou 1:2 ne facilite pas la compréhension des rôles de chacun.

Dans les CEI, l'expression de la forme P2X7B du récepteur serait donc plus favorable à la prolifération des cellules dans les cryptes. Dans la lumière intestinale, une majorité de formes P2X7B empêcherait l'entrée en apoptose des cellules dans un environnement qui peut être riche en ATP localement (Di Virgilio et al., 2001, Crane et al., 2005, Hironaka et al., 2013). En revanche, à l'apex, P2X7A serait majoritaire et son activation pourrait déclencher la libération d'ATP accumulé au cours de la migration vers le haut de la villosité et provoquer l'apoptose des cellules dans la lumière intestinale. Dans les 2 tiers supérieurs de la villosité, la présence de 2 sous-unités P2X7B modulerait la signalisation engendrée par la queue C-terminale de la sous-unité P2X7A permettant la réponse à l'ATP tout en empêchant l'activation de l'apoptose grâce aux propriétés intrinsèques au canal formé et la mobilité des différents domaines de la protéine. Nous avons démontré que cette signalisation déclenchée par l'activation du récepteur P2X7 a eu des effets originaux dans les CEI.

6.1.2 Signalisation activée par le récepteur P2X7 dans les CEI

Nous avons mis en évidence que l'activation du récepteur P2X7 dans les CEI induit une cascade de phosphorylation activatrice, indépendante du calcium, de différents effecteurs de P2X7 déjà connus dans d'autres modèles cellulaires. En effet, il a été montré

que P2X7 pouvait activer PKC δ et PKD dans les acini des parotides pour stimuler la sécrétion de salive (Bradford et Soltoff, 2002) et PKC δ chez les astrocytes dans la réponse inflammatoire (Gendron et al., 2003). Cependant, la conséquence de cette activation dans notre modèle est tout autre. Nous avons démontré que l'activation de PKC δ à la suite de la stimulation de P2X7 dans les CEI induit une diminution de la translocation du transporteur GLUT2 à la surface des CEI (annexe 8.2.1). Ceci a comme conséquence de réduire l'absorption du glucose par les CEI et de son transport transcellulaire (Bourzac et al., 2013). Cette signalisation conforte le rôle de PKC δ dans la régulation de la translocation de certains transporteurs GLUT, mais contrairement à GLUT2 dans l'intestin, elle favorise l'insertion de GLUT4 à la membrane des myotubes (Alpert *et al.*, 2007). Cette différence pourrait être due à la spécificité du tissu ou à la nature du transporteur.

Nous avons montré que PKD joue un rôle essentiel dans l'internalisation de GLUT2 puisque l'inhibition de PKD par le CID755673, un inhibiteur pharmacologique spécifique de cette kinase, bloque l'internalisation du transporteur de glucose induite par l'activation de P2X7. De même que pour PKC δ , PKD augmente l'absorption de glucose dans les cardiomyocytes probablement en favorisant l'insertion de GLUT4 à la membrane (Luiken *et al.*, 2008). De plus, si PKD est connu pour réguler le transport vésiculaire dans l'appareil de Golgi (Prigozhina et Waterman-Storer, 2004, Hausser *et al.*, 2005), c'est la première fois que nous démontrons son implication possible dans le transport rétrograde de protéines membranaires comme GLUT2. En effet, une grande fraction de PKD se trouve dans le cytoplasme où la kinase peut être recrutée à la membrane plasmique grâce à son domaine en doigt de zinc riche en cystéine 2 suite à l'activation de PLC et être activée par les PKC (Van Lint et al., 2002). De plus, PKD a de nombreux substrats qui ne sont pas liés au transport vésiculaire du réseau trans-Golgien et qui lui confèrent de nombreux rôles dans la régulation de la physiologie de la cellule notamment dans la survie après un stress oxydatif par l'activation du complexe IKK α -IKK β -NEMO, dans la motilité cellulaire, la transcription de gènes par phosphorylation des histones désacétylases 4, 5, 7 et 9 et l'immunité innée (Fu et Rubin, 2011). Si le rôle des kinases PKC δ et PKD semble contradictoire entre le muscle et l'intestin, le bilan au niveau du contrôle de la glycémie est le même puisqu'il tend à diminuer la quantité de glucose dans le sang. L'hypothèse selon laquelle PKD serait impliquée dans l'internalisation de GLUT2 pourrait être confirmée par

une approche de surexpression d'une forme inactive du domaine kinase de PKD. Idéalement, des cellules intestinales non cancéreuses transfectées avec le vecteur d'expression de PKD inactif pourraient être stimulées au BzATP, un agoniste de P2X7, et la localisation du transporteur GLUT2 à la membrane vérifiée par immunofluorescence.

Dans cette première partie, nous avons montré *in vitro* que la stimulation du récepteur P2X7 avait pour conséquence l'activation d'une voie de signalisation qui semble mener à l'internalisation du transporteur GLUT2 ce qui a pour effet une diminution de l'absorption du glucose dans les cellules et une diminution du transport transcellulaire de celui-ci à travers une monocouche de CEI (Bourzac et al., 2013) suggérant que le récepteur P2X7 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la glycémie au niveau intestinal.

6.2 Conséquences de la perte du gène *P2rx7* sur la villosité intestinale

En raison des résultats obtenus par l'approche shARN contre P2X7 qui montraient un maintien du transporteur GLUT2 à la membrane des CEI malgré la stimulation au BzATP, nous avons opté pour un modèle de souris transgénique dont le gène *P2rx7* est modifié par l'insertion d'une cassette de sélection néomycine qui remplace les acides aminés 506 à 532 de la protéine. Ce modèle permet d'étudier des changements physiologiques qui sont spécifiques de la perte du récepteur P2X7 alors que l'injection des agonistes de P2X7 aurait des effets systémiques importants puisque le récepteur s'exprime dans de nombreux tissus et les agonistes ne sont sélectifs de P2X7 (North, 2002, Baraldi *et al.*, 2004). En revanche, la délétion du gène n'est pas tissu spécifique (Solle et al., 2001) et certaines observations pourraient être le résultat de mécanismes impliquant plusieurs tissus et organes. Il n'en demeure pas moins que le modèle de délétion général utilisé est quand même représentatif de ce que nous pouvons observer chez des patients portant une mutation pour ce récepteur.

En absence du récepteur P2X7, nous avons montré que le transporteur GLUT2 serait relocalisé à la membrane apicale des entérocytes. La différence de localisation de GLUT2 entre les souris contrôles et les souris *P2X7^{-/-}* est similaire à celle observée dans les souris résistantes à l'insuline obtenues par une diète prolongée en fructose ou en corps gras (Tobin et al., 2008), ainsi qu'aux observations effectuées dans le modèle de souris *ob/ob* et chez des patients atteints d'obésité morbide (Ait-Omar et al., 2011). La présence constitutive de GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes pourrait être le signe d'un

état pathologique ou une adaptation à un défaut dans la régulation du métabolisme. À la membrane apicale en condition postprandiale, le transporteur GLUT2 permet l'entrée du glucose dans les entérocytes et des entérocytes vers la circulation sanguine (Kellett et Brot-Laroche, 2005). En condition de jeûne, le flux pourrait être inversé pour réduire la glycémie. SGLT-1 contrecarrerait ce flux sortant en réabsorbant contre le gradient de concentration le glucose dans la lumière (Kellett, 2001, Ait-Omar et al., 2011).

Au niveau de l'épithélium intestinal, les cellules entéroendocrines synthétisent et sécrètent des facteurs qui vont avoir un rôle majeur dans la régulation du métabolisme, incluant l'homéostasie du glucose. Or, nous avons montré que le nombre des cellules positives pour la CgA était plus élevé dans les villosités des souris *P2rx7^{-/-}*. La CgA peut être clivée en plusieurs fragments bioactifs qui vont influencer de nombreux systèmes de régulation, notamment celui responsable du maintien de la glycémie (Helle et al., 2007, Angelone et al., 2012). En effet, la CgA peut être clivée en pancréastatine. Ce peptide inhibe la première phase de sécrétion de l'insuline induite par le glucose dans le pancréas. Il agirait également au niveau des hépatocytes pour inhiber la glycogénèse et les adipocytes en inhibant la signalisation du récepteur à l'insuline et par conséquent la translocation de GLUT4 à la membrane et l'absorption du glucose. La pancréastatine pourrait ainsi jouer un rôle dans l'augmentation de la glycémie (Helle et al., 2007).

Les incrétines sont aussi des hormones synthétisées par les cellules entéroendocrines de l'intestin et participent au maintien de la glycémie en favorisant la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Les deux incrétines les plus étudiées sont le GIP et le GLP-1 (Campbell et Drucker, 2013). Le GLP-1 est synthétisé et sécrété par les cellules entéroendocrines de type L le long de l'intestin grêle et du côlon tandis que le GIP est synthétisé et sécrété par les cellules entéroendocrines de type K présentes principalement dans le duodénum et le jéjunum proximal (Habib *et al.*, 2012). Le GLP-1 agit au niveau du pancréas par l'intermédiaire de son récepteur GLP-1R pour augmenter la sécrétion de l'insuline et diminuer la sécrétion du glucagon (Drucker, 2006), augmente la synthèse de l'insuline, stimule la prolifération des cellules β et inhibe leur apoptose (Campbell et Drucker, 2013). L'action du GIP par l'intermédiaire de son récepteur GIPR augmente aussi la sécrétion d'insuline au niveau des cellules, β mais stimule aussi la sécrétion de glucagon par les cellules α (Meier *et al.*, 2003). Une étude approfondie des

cellules entéroendocrines dans l'épithélium intestinal des souris *P2rx7^{-/-}* et des hormones qu'elles synthétisent et qu'elles sécrètent nous permettrait d'avoir une vision plus globale des acteurs qui pourraient modifier la glycémie.

Dans l'épithélium intestinal, nous avons vu que la perte de P2X7 chez les souris avait pour conséquences la relocalisation du transporteur GLUT2 à la membrane apicale et une augmentation des cellules endocrines qui synthétisent la CgA. Ces modifications vont dans le sens d'une perturbation de la glycémie et appuient le rôle de l'intestin grêle dans la régulation de l'homéostasie du glucose (Mithieux, 2005).

6.3 Changements physiologiques dans les souris *P2rx7^{-/-}*

6.3.1 Masse et glycémie

En absence du récepteur P2X7, les souris subissent de nombreux changements physiologiques comparativement aux souris contrôles. Nous avons observé un gain de poids significatif précoce. Dans la littérature, ce changement de masse n'est pas observé dans ce modèle (Glas et al., 2009) ou bien il est plus tardif puisque la différence de masse n'est significative qu'à l'âge de 9 mois (Beaucage et al., 2014). Outre l'environnement, le fond génétique des souris peut influencer de nombreux paramètres physiologiques (Haluzik et al., 2004, Syberg et al., 2012, Suto et Satou, 2013). Pour les études du Dr Glas le fond génétique des souris *P2rx7^{-/-}* est C57BL/6 alors que celui des souris du Dr Beaucage est 129/Ola × C57BL/6 × DBA/2 et nous avons maintenu la colonie de souris *P2rx7^{-/-}* sur un fond génétique C57BL/6J par croisement consanguin de souris hétérozygotes *P2rx7^{+/-}*.

Nous avons également mis en évidence, une différence dans la glycémie des souris à partir de 12 semaines post-embryonnaires. À 12 semaines, cette différence de glycémie semble être liée à une diminution dans les souris contrôles plutôt qu'à une augmentation de celle-ci dans les souris *P2rx7^{-/-}* comme on peut le voir à 26, 36 et 52 semaines puisque la glycémie des souris contrôles à 26 semaines revient au niveau des souris contrôles de 8 semaines et que la glycémie des souris *P2rx7^{-/-}* de 12 semaines est au même niveau que celle des souris *P2rx7^{-/-}* de 8 semaines. Ces résultats ont été obtenus après un jeûne de 6 h et non pas un jeûne prolongé de 18 ou 24 h ce qui explique les valeurs glycémiques autour de 7 mmol/L au lieu de 6 mmol/L et 5 mmol/L respectivement pour un jeûne prolongé dans les souris C57BL/6 (Andrikopoulos et al., 2008). Nous avons choisi un jeûne de 6 h pour

éviter les effets cataboliques associés à un jeûne prolongé durant la nuit (Andrikopoulos et al., 2008). À 12 semaines, si nous sommes les premiers à souligner cette diminution, c'est d'abord parce que nous avons mesuré la glycémie chez des souris plus jeunes de 3 et 6 semaines. Néanmoins, cette diminution de glycémie dans les souris contrôles est aussi visible dans d'autres études sans que les auteurs attirent l'attention sur le phénomène (Lloyd *et al.*, 2008, Ostler *et al.*, 2014). Un défaut dans la méthodologie n'est pas à exclure pour expliquer la diminution de la glycémie des souris contrôles à 12 semaines, mais les données récoltées proviennent d'au moins 3 expériences indépendantes. Une autre explication à ce phénomène pourrait être le dérèglement hormonal lié à la puberté bien qu'il favorise normalement l'hyperglycémie (Amrani *et al.*, 1998). Enfin, si nous pouvons contrôler la durée minimum du jeûne, nous ne connaissons pas le moment exact de la dernière prise alimentaire des souris avant le retrait de la nourriture et celui-ci pourrait être différent entre les deux groupes de souris.

6.3.2 P2X7 et homéostasie du glucose

Dans la littérature, il existe des évidences d'un lien entre le récepteur P2X7 et l'homéostasie du glucose. En outre, chez les individus obèses, il a été mesuré que l'expression de P2X7 est augmentée dans les îlots de Langerhans alors que l'expression de celui-ci est fortement réduite chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Glas et al., 2009). Une étude d'association pangénomique a mis en évidence une association entre des variations de l'homéostasie du glucose et des polymorphismes de *P2RX7* (Todd et al., 2015). En absence de récepteur P2X7, la glycémie des souris *P2rx7^{-/-}* est plus élevée ce qui suggère des troubles de la glycémie après un jeûne de 6 h. Pour comprendre ce phénomène, nous avons dans un premier temps réalisé de tests de tolérance au glucose par voie orale. Ces tests permettent de mesurer la capacité des souris *P2rx7^{-/-}* à rétablir la glycémie après un apport de glucose élevé. À 3 semaines, même si la glycémie maximale est plus élevée, les souris *P2rx7^{-/-}* ont la capacité de réduire leur glycémie au niveau de la glycémie des souris contrôles après 90 min. À 12 semaines, la glycémie des souris *P2rx7^{-/-}* est plus élevée que la glycémie des souris contrôles pendant la phase de réabsorption du sucre dans le sang. Les glycémies des souris *P2rx7^{-/-}* restent néanmoins bien inférieures aux glycémies des modèles de souris *ob/ob* (Xu *et al.*, 2011), résistantes à l'insuline (Ait-Omar et al., 2011) ou *db/db* (Arakawa *et al.*, 2001). Pour ces tests de tolérance au glucose par voie orale

à 3 et 12 semaines, l'aire sous la courbe est significativement différente entre les deux groupes. Ces aires donnent une idée de la vitesse d'absorption des sucres au niveau de l'intestin (Jenkins *et al.*, 1982, Jenkins *et al.*, 2002). Pour une même quantité du même sucre, le glucose dans notre cas, la capacité à réguler la glycémie est différente entre les souris contrôles et les souris *P2rx7^{-/-}*. Ces résultats suggèrent dans un premier temps une absorption plus importante du glucose dans les souris *P2rx7^{-/-}* à 3 semaines, puis une mauvaise tolérance au glucose, ou à tout le moins une réduction de la capacité des souris *P2rx7^{-/-}* à réguler leur glycémie chez les souris âgées de 12 semaines. L'imagerie TEP et les analyses de biodistribution du ¹⁸F-FDG appuient cette théorie d'absorption plus importante puisque le ¹⁸F-FDG est détecté dans la vessie des souris *P2rx7^{-/-}* de façon précoce comparativement à la vessie des souris contrôles et le %DI/g de tissus est plus faible dans l'estomac et le duodénum des souris *P2rx7^{-/-}*. L'apparition d'une faible quantité de ¹⁸F-FDG dans le cœur des souris *P2rx7^{-/-}* de façon plus tardive que dans le cœur des souris contrôles semble contredire cette théorie, mais une hyperglycémie sévère diminue l'absorption du ¹⁸F-FDG dans le cœur (Kubota *et al.*, 1996). La glycémie plus élevée dans les souris *P2rx7^{-/-}* après un jeûne de 6 h puis l'administration de 50 mg de glucose, le tout combiné à des défauts de l'homéostasie du glucose pourraient expliquer le faible taux d'absorption du ¹⁸F-FDG dans le myocarde vu par imagerie TEP.

La disparition du ¹⁸F-FDG dans l'intestin devait nous permettre de calculer la vitesse d'absorption du glucose par les CEI dans les souris contrôles et les souris *P2rx7^{-/-}*. En raison de la longueur de l'intestin et de ses courbures dans la cavité abdominale, il est difficile de garder la zone d'absorption dans un même plan. De plus, les mouvements péristaltiques de l'intestin accroissent la difficulté à analyser et à interpréter les résultats. La grande quantité de ¹⁸F-FDG dans l'estomac perturbe également le signal spécifique dans le duodénum en se chevauchant partiellement avec lui. Néanmoins, cette approche novatrice pourra être améliorée dans un futur proche grâce à des capteurs plus performants qui augmenteront la résolution des images obtenues.

Puisque les analyses TEP et de biodistribution suggéraient une dérégulation des processus régulant l'absorption et la distribution du glucose, nous avons déterminé si cette dérégulation pouvait avoir des conséquences sur différents paramètres sanguins. Nous avons porté une attention particulière aux concentrations de triglycérides, de cholestérol,

d'insuline circulante et du glucose, tous des facteurs associés au risque de syndrome métabolique chez l'homme (Srikanthan et al., 2016). Les concentrations d'insuline, de glucose et de triglycérides sont significativement augmentées dans les souris *P2rx7^{-/-}* comparativement aux souris contrôles. Nous avons pu également calculer l'indice HOMA2 pour quantifier la résistance à l'insuline et la fonction des cellules β du pancréas. Les résultats indiquent que les souris *P2rx7^{-/-}* semblent plus résistantes à l'insuline que les souris contrôles mais la fonction des cellules β du pancréas n'est pas significativement différente. Le modèle HOMA est basé sur des données d'études physiologiques humaines et une valeur limite à l'indice HOMA1-IR et HOMA2-IR a été indexée pour identifier la résistance à l'insuline et le syndrome métabolique (Geloneze *et al.*, 2009). En comparant avec les indices HOMA-IR de modèle de souris, l'indice des souris *P2rx7^{-/-}* est comparable à celui du modèle de résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras (3,9) (Ait-Omar et al., 2011). Les souris du modèle de résistance à l'insuline induite par une diète riche en gras ont une mauvaise tolérance au glucose qui semble plus importante que chez les souris *P2rx7^{-/-}*. De plus, on observe dans les 2 cas une glycémie à jeun qui augmente progressivement avec l'âge (temps de jeûne différent). Les souris présentent également un défaut dans la localisation du transporteur GLUT2 bien que celui-ci semble s'accumuler dans les endosomes et non pas à la membrane apicale.

L'indice HOMA-IR intègre des facteurs normalisés qui sont spécifiques à son utilisation chez des patients humains et qui ont été validés chez des humains. La force de cette mesure de substitution pour la résistance à l'insuline repose sur la force de la relation sous-jacente entre la réponse hépatique à l'insuline en condition de jeûne, soit l'arrêt de la production de glucose, et la réponse du corps entier à l'insuline mesuré lors d'un clamp euglycémique hyperinsulinique. Il y a certaines subtilités à prendre en compte lorsque ces indices sont appliqués aux modèles animaux, mais l'indice HOMA-IR est utile en tant que mesure indirecte de la résistance à l'insuline (Mather, 2009). En effet, la corrélation linéaire entre le taux d'infusion de glucose et l'indice HOMA-IR dérivé du clamp glucidique chez la souris est d'environ $r = 0,4$ (Lee *et al.*, 2008) soit un degré de corrélation plus faible que pour les hommes. De plus, les indices HOMA-IR varient entre différentes espèces de rats (Cacho *et al.*, 2008), il faut donc apporter une attention particulière à l'indice HOMA-IR qui sert de référence.

En absence de récepteur P2X7, les jeunes souris semblent répondre plus tardivement à l'ingestion d'une grande quantité de glucose en raison d'un flux transcellulaire au niveau des CEI probablement plus important ou prolongé. En effet, comme il a été montré, une augmentation de la concentration de glucose induit une expression accrue du récepteur P2X7 dans les CEI (Bilodeau et al., 2015). Dans ce travail, nous avons montré que P2X7 pourrait agir comme un régulateur négatif du transport du glucose. Donc, en absence d'expression de P2X7, nous perdons ce mécanisme de contrôle, résultant ainsi à un passage accru et prolongé du glucose de l'alimentation vers la circulation.

Cet excès de glucose pourrait induire une réponse plus forte des cellules β du pancréas à sécréter l'insuline. En condition normale, sous l'effet de l'insuline, le foie ne produit plus de glucose ni par la voie de la gluconéogenèse, ni par la voie de la glycolyse. Au contraire, l'insuline favorise la synthèse de glycogène et la glycolyse dans les muscles et le tissu adipeux, augmente le taux d'absorption des sucres dans ces tissus grâce à la stimulation de la translocation à la membrane du transporteur de glucose sensible à l'insuline GLUT4 (Karnieli *et al.*, 1981, Dimitriadis *et al.*, 2011). L'insuline affecte aussi le métabolisme des lipides en réduisant la lipolyse dans le tissu adipeux et favorise la synthèse des triglycérides et des acides gras. Sous son action, le tissu adipeux et les muscles absorbent également les triglycérides du flux sanguin (Dimitriadis et al., 2011). L'insuline favorise l'adipogenèse et la différenciation du tissu adipeux (Klemm *et al.*, 2001) et inhibe finement l'enzyme FASN (Najjar *et al.*, 2005). En revanche, l'augmentation de l'insuline circulante pourrait favoriser l'activité de FASN (Najjar et al., 2005) et augmenter la concentration d'acides gras libres dans le sang. Avec le vieillissement, les souris *P2rx7^{-/-}* sont plus grosses en raison d'une accumulation de gras (Beaucage et al., 2014) qui pourrait s'expliquer par la combinaison d'une concentration élevée de glucose et la sécrétion plus importante d'insuline. En temps normal, le contrôle de l'activité lipogénique à court terme dépend de cette hormone. L'activation du récepteur à l'insuline dans les adipocytes déclenche une augmentation de l'exocytose de vésicules contenant le transporteur GLUT4 et une diminution de l'internalisation du transporteur. Il en résulte une nette augmentation du transporteur GLUT4 à la membrane plasmique augmentant ainsi le taux d'absorption de glucose (Kanzaki et Pessin, 2001). Le glucose est

phosphorylé en glucose-6-phosphate pour entrer dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. La glycolyse aboutit à la formation de pyruvate qui est transformé en acétyl CoA. La voie des pentoses phosphates est une source importante de NADPH+H⁺. Un deuxième point de contrôle à court terme de l'activité lipogénique se fait par un ajustement de l'activité des enzymes de la voie. En effet, les changements nutritionnels responsables des modulations de l'activité lipogénique s'accompagnent de modifications importantes des concentrations des hormones pancréatiques et des hormones β-adrénergiques qui vont entraîner un changement de l'état de phosphorylation d'un certain nombre d'enzymes lipogéniques et ainsi modifier leur activité telles ACC1 et la pyruvate déshydrogénase. Cette dernière est activée par l'insuline qui favorise sa déphosphorylation sur la sous-unité E1. Le contrôle transcriptionnel, qui implique des mécanismes à plus long terme, permet de moduler la quantité d'enzymes lipogéniques. L'insuline et le glucose agissent en synergie pour stimuler l'expression de ces enzymes (Bastard *et al.*, 2013).

Pour la synthèse des triglycérides, le tissu adipeux synthétise principalement le glycérol-3-phosphate à partir de la réduction du dihydroxyacétone phosphate (la glycérol kinase a une faible activité dans le tissu adipeux). L'excès d'acétyl CoA de la mitochondrie est exporté dans le cytosol où il est pris en charge par ACC1 pour former le malonyl-CoA puis polymérisé en acide gras à longue chaîne grâce au complexe FASN. Ces acides gras nouvellement synthétisés peuvent être estérifiés en présence du glycérol-3-phosphate grâce à l'action de la glycérol-3-phosphate acyltransférase pour former l'acide lysophosphatidique, puis l'acide phosphatidique suite à l'ajout d'un second acyl-CoA par la 1-acylglycérol-3-phosphate O-acyltransférase. L'acide phosphatidique est déphosphorylé pour former un diacylglycérol grâce à l'activité de la lipine 1. Un troisième acyl-CoA est ensuite ajouté par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase pour donner un triglycéride. Les souris *P2rx7^{-/-}* accumuleraient davantage de gouttelettes riches en triglycérides dans le tissu adipeux et deviendraient ensuite résistantes à l'insuline en raison d'une grande concentration des acides gras libres. Un cercle vicieux d'amplification de la résistance à l'insuline est créé, inhibant ainsi les effets de l'insuline sur l'inhibition de la lipogenèse, sur la néoglucogenèse et la glycogénolyse. Les acides gras libres seraient ainsi la cause et la conséquence de la résistance à l'insuline (Saltiel et Kahn, 2001). Un tissu adipeux plus important pourrait libérer davantage d'acides gras libres, mais également des molécules

impliquées dans des processus inflammatoires qui peuvent perturber la signalisation du récepteur à l'insuline. La concentration de ces acides gras chez la plupart des personnes obèses est souvent élevée (Boden, 2008). Dans les souris *P2rx7^{-/-}*, l'accumulation de gras viscéral pourrait favoriser la libération d'acides gras libres dans la circulation ou au moins perturber le métabolisme de ces molécules. Une élévation chronique des acides gras semble favoriser la résistance à l'insuline dans le foie et le muscle squelettique et perturber la sécrétion d'insuline (Bays *et al.*, 2004). Dans notre modèle murin, les souris *P2rx7^{-/-}* semblent développer une résistance à l'insuline, mais nous n'avons pas observé de défaut dans la sécrétion d'insuline. Le lien entre l'augmentation des acides gras libres et la résistance à l'insuline pourrait impliquer l'accumulation de triglycérides et des métabolites dérivés des acides gras dans certains organes tels les muscles et le foie (Saltiel et Kahn, 2001).

6.3.3 Les souris *P2rx7^{-/-}* développent une stéatose du foie

La résistance à l'insuline et les facteurs de risques du syndrome métabolique sont souvent mis en relation avec la stéatose hépatique non alcoolique (Saltiel et Kahn, 2001, Adams et Angulo, 2005). Concrètement, la stéatose du foie serait la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Adams *et al.*, 2009). Nous avons mis en évidence une accumulation de gouttelettes lipidiques plus importante dans le foie des souris *P2rx7^{-/-}* en comparaison des foies des souris contrôles. L'explication conventionnelle de l'accumulation des triglycérides dans les hépatocytes est l'augmentation de la libération d'acides gras libres par les adipocytes (Browning et Horton, 2004). Les souris *P2rx7^{-/-}* présentent une masse plus importante du tissu adipeux due à une hyperplasie des adipocytes (Beaucage *et al.*, 2014) contribuant ainsi à l'augmentation de la concentration des acides gras libres dans le plasma (Browning et Horton, 2004). Le taux d'absorption des acides gras par le foie est proportionnel à la concentration des acides gras libres dans le plasma et la capacité d'absorption des hépatocytes. Le processus d'absorption de ces molécules hydrophobes à travers la membrane plasmique nécessite des transporteurs de la famille des FATPs (Fatty acid transport protéins) et CD36 dont le nombre et l'activité vont influencer la capacité cellulaire à accumuler les acides gras (Kawano et Cohen, 2013). Ces acides gras sont ensuite convertis en acyl-CoA et soit métabolisés pour générer de l'ATP, soit estérifiés pour former les triglycérides qui seront accumulés dans les hépatocytes ou exportés. En

phase postprandiale, les acides gras libérés par la lipolyse dans le tissu adipeux sont dégradés dans le foie en acétyl-CoA. L'excès d'acétyl-CoA peut entrer dans la voie de la cétogenèse pour synthétiser les corps cétoniques. Un défaut dans ce métabolisme peut mener à une stéatose du foie.

Sans exclure cette dernière possibilité, dans les modèles murins, la synthèse *de novo* des acides gras dans le foie contribue significativement à la stéatose hépatique. Nous avons montré que la lipogenèse semblait activée dans les souris *P2rx7^{-/-}* âgées de 3 semaines puisque la transcription de gènes codant 2 enzymes clés de la synthèse des acides gras était significativement augmentée pour l'enzyme ACC1 et semblait à la hausse pour FASN. L'insuline promeut la lipogenèse en activant le facteur de transcription SREBP-1c impliqué dans l'activation de la transcription de tous les gènes requis pour la lipogenèse (Horton *et al.*, 2002) même dans le cas de résistance à l'insuline. L'excès de glucose active le facteur de transcription ChREBP qui permet la transcription de la pyruvate kinase du foie. Cette enzyme de la glycolyse favorise la formation du pyruvate, un intermédiaire qui entre dans le cycle de Krebs pour générer le citrate, la source principale d'acétyl-CoA utilisée par l'enzyme ACC1 pour former le malonyl-CoA, la première étape de la lipogenèse. Le malonyl-CoA inhibe également la β oxydation des acides gras contribuant indirectement à leur accumulation. À 12 semaines, la transcription du gène codant pour l'enzyme ACC1 est significativement diminuée et celui de FASN tend aussi à diminuer. Ce rétrocontrôle semble lié à l'activité de l'AMPK qui peut inhiber l'enzyme ACC1 et le facteur de transcription SREBP-1 (Li *et al.*, 2011).

6.4 Forces et limites des travaux

6.4.1 Modèles cellulaires

Le modèle de cellule IEC-6 est un modèle de cellules intestinales issues de la crypte de rat (Quaroni *et al.*, 1979). En raison de cette origine, ces cellules présentent des caractéristiques de cellules épithéliales cryptales et ne sont pas polarisées. Néanmoins, ce sont des cellules « normales », non cancéreuses compatibles avec des études de voies de signalisation. L'absorption du glucose est aussi plus physiologique dans ces cellules puisque dans les cellules cancéreuses le métabolisme du glucose est fortement perturbé.

Les cellules Caco-2 sont des cellules épithéliales issues d'un adénocarcinome colorectal. Bien qu'elles dérivent d'un carcinome du côlon, les cellules se différencient à l'atteinte de la confluence et se polarisent leur conférant ainsi un phénotype de cellules entérocytaires de l'intestin grêle avec l'expression de jonctions serrées et des microvillosités. Ces propriétés en font un modèle intéressant pour étudier le transport transcellulaire du glucose

6.4.2 Modèle murin

Ce modèle permet d'étudier des changements physiologiques qui sont spécifiques de la perte du récepteur P2X7 alors que l'injection des agonistes de P2X7 aurait des effets systémiques importants puisque le récepteur s'exprime dans de nombreux tissus et les agonistes ne sont pas sélectifs de P2X7 (North, 2002, Baraldi et al., 2004). En revanche, la délétion du gène n'est pas tissu spécifique (Solle et al., 2001) et certaines observations pourraient être le résultat de mécanismes impliquant plusieurs tissus et organes. Il n'en demeure pas moins que l'utilisation d'un modèle de délétion général est quand même représentatif de ce que nous pouvons observer chez des patients portant une mutation pour ce récepteur.

La détermination des indices HOMA2 à partir d'un prélèvement sanguin nécessiterait d'être vérifiée par un clamp euglycémique. Les tests oraux de tolérance au glucose donnent des indices de mauvaise tolérance au glucose qui pourraient être aussi évalués également par un clamp euglycémique. Néanmoins, les tests oraux sont plus physiologiques et permettent de mettre en jeu les mécanismes de régulation du métabolisme du glucose de l'épithélium intestinal. C'est aussi le meilleur test pour déterminer une différence dans l'absorption du glucose au niveau de l'épithélium intestinal qui pourrait se refléter sur la glycémie.

La localisation du transporteur GLUT2 à la membrane n'a été analysée que de façon qualitative. Une quantification des transporteurs pourrait être possible par imagerie confocale ou par une analyse de l'intensité et de la surface des pixels occupées par le marquage fluorescent.

Le décompte du nombre de cellules entéroendocrines n'est pas suffisant pour conclure à un dérèglement hormonal lié à une synthèse plus importante de ces hormones au niveau de l'épithélium intestinal. Le dosage de la CgA et d'autres hormones impliquées

dans la régulation de la glycémie est nécessaire pour évaluer plus globalement les mécanismes qui sont modifiés dans les souris *P2rx7^{-/-}*.

L'imagerie TEP ne nous a pas permis de calculer la vitesse d'absorption du glucose en raison des courbures de l'intestin grêle et de la contamination par les organes alentour. La nouvelle génération de capteurs donnera des images de meilleure résolution. Bien qu'incomplets, les résultats obtenus donnent des indices intéressants sur la vitesse et la différence de répartition du glucose dans les organes périphériques.

Si des éléments suggèrent une accumulation des lipides dans les hépatocytes, la différence de l'expression en ARN des enzymes clés de la lipogenèse n'est pas suffisante pour conclure à une lipogenèse *de novo* dans les hépatocytes. Il faudrait mesurer l'activité des enzymes de la lipogenèse, mais également vérifier s'il n'y a pas une diminution de la voie de la β -oxydation des acides gras ou des corps cétoniques.

6.5 Conclusions et perspectives

L'une des fonctions les plus connues du récepteur P2X7 est l'induction de la mort cellulaire (Surprenant et al., 1996, Mackenzie et al., 2005). Ce n'est pas sa seule fonction puisqu'il est aussi impliqué dans la réaction inflammatoire, la formation des cellules géantes multinuclées, l'internalisation de membrane, la prolifération cellulaire et la sécrétion (Kochukov et Ritchie, 2004, Bianco et al., 2006, Ferrari et al., 2006, Lemaire et al., 2006, Monif et al., 2009, Kaczmarek-Hajek et al., 2012). Dans l'intestin, le récepteur P2X7 est davantage associé à l'inflammation et à la mort cellulaire (Cesaro et al., 2010, Neves et al., 2014, Proietti et al., 2014). Cependant, il a été démontré que P2X7 était régulé à la hausse dans les îlots de Langerhans d'individus obèses alors que le récepteur est pour ainsi dire indétectable dans ceux-ci chez les personnes atteintes de diabète de type 2 (Glas et al., 2009), il a été établi que des variations de l'homéostasie du glucose étaient associées à des polymorphismes de *P2RX7* (Todd et al., 2015). De plus, la présence du récepteur à la membrane des entérocytes (Groschel-Stewart et al., 1999) et son expression augmentée en présence de glucose dans les CEI (Bilodeau et al., 2015) font du récepteur P2X7 un candidat à la régulation de l'homéostasie du glucose.

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse semble montrer que l'activation du récepteur P2X7, présent non seulement à l'apex, mais aussi tout le long des villosités intestinales, peut réguler le flux transcellulaire de glucose dans les CEI en activant une voie

de signalisation qui mène à la translocation du transporteur GLUT2 dans le cytoplasme des cellules. Cette signalisation impliquerait la phosphorylation de PLC γ -1 et des kinases PKC δ et PKD. Cependant, il reste à déterminer les partenaires potentiels en aval de PKD et les modifications sur le transporteur GLUT2 qui mènent à son internalisation. GLUT2 présente dans sa queue C-terminale et dans sa 3^e boucle intracellulaire des sites putatifs de phosphorylation sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine. Le clonage de la séquence codante du gène *SLC2A2* entier ou seulement la partie codant la queue C-terminale ou la 3^e boucle intracellulaire en phase avec une étiquette GFP pourrait permettre d'identifier les protéines impliquées dans l'internalisation du transporteur et les modifications post-traductionnelles sur GLUT2 par spectroscopie de masse suite à l'activation de P2X7. La validation des partenaires pourra se faire par co-immunoprécipitation de GLUT2 et immunobuvardage de type western. L'importance du ou des sites de phosphorylation sur le transporteur GLUT2 pour la translocation pourrait être vérifiée par mutagenèse dirigée. Le transporteur GLUT4 est internalisé de façon clathrine dépendante (Stralfors, 2012), il serait intéressant d'étudier cette voie comme moyen d'endocytose pour GLUT2.

En absence du récepteur P2X7, le transporteur GLUT2 est présent à la membrane apicale des entérocytes des souris en période de jeûne. Ce profil d'expression dans l'intestin grêle en condition post prandiale est similaire à celui des personnes souffrant d'obésité morbide et est comparable au profil d'expression de GLUT2 des modèles de souris ob/ob et de souris résistantes à l'insuline (Tobin et al., 2008, Ait-Omar et al., 2011) ce qui suggère un état pathologique ou une adaptation à un déséquilibre de l'homéostasie. Nous avons montré également qu'en absence du récepteur P2X7, le nombre de cellules entéroendocrines pourrait être augmenté suggérant une modification de l'équilibre hormonal. Il faudrait faire un décompte des cellules entéroendocrines avec des marqueurs spécifiques des hormones sécrétées par les cellules intestinales pour déterminer si cette augmentation implique l'ensemble des sous-types de cellules entéroendocrines ou seulement un type particulier. Cette analyse pourrait être complétée en analysant toutes les cellules de la lignée sécrétrice et de la lignée absorbante. P2X7 pourrait participer au contrôle de la glycémie au niveau intestinal non seulement en contrôlant la translocation cytoplasmique du transporteur GLUT2 à la surface des entérocytes, mais aussi en jouant un rôle dans la détermination des cellules entéroendocrines qui sécrètent de nombreux facteurs

impliqués dans la régulation du métabolisme, dont la régulation de la glycémie (Drucker, 2007). Il serait donc intéressant de non seulement doser les hormones incrétines telles le GIP et le GLP-1 qui favorisent la libération d'insuline (Kim et Egan, 2008) et l'hormone hyperglycémiant glucagon, mais aussi d'identifier le rôle de P2X7 dans la détermination et la différenciation des cellules intestinales. Dans la littérature, le récepteur P2X7 participe à la détermination et la différenciation des cellules souches neurales. Les niveaux d'expression et/ou d'activité du récepteur offrent également une opportunité aux cellules de se différencier en neurones ou en cellules gliales (Glaser *et al.*, 2013). L'ouverture du canal P2X7 et la mobilisation du calcium activent le facteur de transcription NFAT (Ferrari *et al.*, 1999). Il faudrait donc vérifier l'activité des facteurs de transcription NFAT dans les CEI en cours de différenciation avec des essais luciférase suite à l'activation du récepteur P2X7. Par une approche d'ARN interférant, il faudrait vérifier les effets de la perte du facteur de transcription sur les différents facteurs déjà connus pour réguler la destinée des CEI (van der Flier et Clevers, 2009).

Finalement, nous avons montré que les souris *P2rx7^{-/-}* présentent de nombreux facteurs associés au développement du syndrome métabolique tels qu'une glycémie accrue, une augmentation de la concentration d'insuline et des triglycérides dans le sang. Les tests de tolérance au glucose montrant un défaut dans la capacité de gérer une grande quantité de glucose puis de rétablir la glycémie, il faudrait vérifier s'il s'agit d'un problème de réabsorption du glucose au niveau des organes périphériques en faisant un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale. Des résultats préliminaires du laboratoire semblent confirmer cette hypothèse. Avec l'âge, les souris *P2rx7^{-/-}* semblent développer une stéatose du foie qui serait la manifestation hépatique du syndrome métabolique (Adams *et al.*, 2009). De plus, les souris *P2rx7^{-/-}* semblent résistantes à l'insuline. Un test de tolérance à l'insuline intrapéritonéal nous permettra de vérifier la diminution de la sensibilité à l'insuline détectée avec le calcul HOMA2-IR. Notre modèle est un modèle de souris dans lequel le récepteur P2X7 n'est traduit dans aucun tissu. Or, le récepteur P2X7 est normalement présent non seulement dans l'intestin, mais aussi dans tous les organes qui participent au contrôle de la glycémie tels le foie, le pancréas, le tissu adipeux, le muscle squelettique, les reins (North, 2002). Il est peu probable que l'ensemble des perturbations physiologiques énumérées précédemment ne soit que la conséquence de la perte de

récepteur P2X7 dans l'intestin. D'ailleurs, le transporteur GLUT2 est aussi présent dans le foie, le pancréas et le rein et pourrait être également sous le contrôle du récepteur P2X7 pour sa translocation à la membrane des cellules de ces organes. La création d'un modèle de souris *P2rx7^{-/-}* tissus spécifiques permettrait de clarifier le rôle de chacun des protagonistes dans chaque organe participant à la régulation de l'homéostasie du glucose. Comme nous l'avons fait pour les cellules intestinales, il serait possible d'utiliser des cellules de foie et de pancréas, et de vérifier *in vitro* l'expression du récepteur P2X7 et du transporteur GLUT2 et d'analyser la signalisation et le comportement du transporteur GLUT2 suite à la stimulation du récepteur P2X7. Le récepteur P2X7 pourrait déclencher une signalisation synergique dans ces organes pour favoriser la diminution de la glycémie.

Malgré le fait que certaines questions demeurent en suspens en ce qui a trait à ce projet, mes travaux ont mis en lumière une nouvelle fonction pour le récepteur P2X7 dans les CEI. Avec la progression quasi endémique du syndrome métabolique, de la stéatose hépatique et du diabète de type 2, l'identification d'un nouvel intervenant permettant de contrôler, en partie, la glycémie, pourrait s'avérer une découverte importante dans le développement de nouvelles thérapies visant ces fléaux. De plus, avec le développement récent d'antagonistes ciblant P2X7 en vue de réduire l'inflammation chez l'humain (Keystone et al., 2012 ; Stock et al., 2012), l'identification de l'implication du récepteur P2X7 dans l'homéostasie du glucose et de son effet potentiel sur les fonctions hépatiques amène une certaine mise en garde face à l'utilisation systémique de ces antagonistes. Une attention particulière à ces désordres potentiels devra être incluse dans le design expérimental des futurs essais ciblant l'inhibition de ce récepteur.

LISTE DES REFERENCES

Adams, L. A. and P. Angulo (2005). "Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease." *Diabet Med* **22**(9): 1129-1133.

Adams, L. A., O. R. Waters, M. W. Knuiiman, R. R. Elliott and J. K. Olynyk (2009). "NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study." *Am J Gastroenterol* **104**(4): 861-867.

Adinolfi, E., M. Cirillo, R. Woltersdorf, S. Falzoni, P. Chiozzi, P. Pellegatti, M. G. Callegari, D. Sandona, F. Markwardt, G. Schmalzing and F. Di Virgilio (2010). "Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X7 receptor." *FASEB J* **24**(9): 3393-3404.

Ait-Omar, A., M. Monteiro-Sepulveda, C. Poitou, M. Le Gall, A. Cotillard, J. Gilet, K. Garbin, A. Houllier, D. Chateau, A. Lacombe, N. Veyrie, D. Hugol, J. Tordjman, C. Magnan, P. Serradas, K. Clement, A. Leturque and E. Brot-Laroche (2011). "GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice." *Diabetes* **60**(10): 2598-2607.

Alberti, K. G., R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, S. C. Smith, Jr., E. International Diabetes Federation Task Force on, Prevention, L. Hational Heart, I. Blood, A. American Heart, F. World Heart, S. International Atherosclerosis and O. International Association for the Study of (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." *Circulation* **120**(16): 1640-1645.

Alberto, A. V., R. X. Faria, C. G. Couto, L. G. Ferreira, C. A. Souza, P. C. Teixeira, M. M. Froes and L. A. Alves (2013). "Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor?" *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**(9): 775-787.

Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell*. New York, NY, Garland Science, Taylor and Francis Group.

Alpert, E., A. Gruzman, T. Tennenbaum and S. Sasson (2007). "Selective cyclooxygenase-2 inhibitors stimulate glucose transport in L6 myotubes in a protein kinase Cdelta-dependent manner." *Biochem Pharmacol* **73**(3): 368-377.

Alva, S. (2008). "FreeStyle Lite--a blood glucose meter that requires no coding." *J Diabetes Sci Technol* **2**(4): 546-551.

American Diabetes, A. (2014). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes Care* **37 Suppl 1**: S81-90.

Amrani, A., S. Durant, M. Throsby, J. Coulaud, M. Dardenne and F. Homo-Delarche (1998). "Glucose homeostasis in the nonobese diabetic mouse at the prediabetic stage." *Endocrinology* **139**(3): 1115-1124.

Amstrup, J. and I. Novak (2003). "P2X7 receptor activates extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 independently of Ca²⁺ influx." *Biochem J* **374**(Pt 1): 51-61.

Andrikopoulos, S., A. R. Blair, N. Deluca, B. C. Fam and J. Proietto (2008). "Evaluating the glucose tolerance test in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(6): E1323-1332.

Angelone, T., R. Mazza and M. C. Cerra (2012). "Chromogranin-A: a multifaceted cardiovascular role in health and disease." *Curr Med Chem* **19**(24): 4042-4050.

Arakawa, K., T. Ishihara, A. Oku, M. Nawano, K. Ueta, K. Kitamura, M. Matsumoto and A. Saito (2001). "Improved diabetic syndrome in C57BL/KsJ-db/db mice by oral administration of the Na(+)-glucose cotransporter inhibitor T-1095." *Br J Pharmacol* **132**(2): 578-586.

Argo, C. K. and S. H. Caldwell (2009). "Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis." *Clin Liver Dis* **13**(4): 511-531.

Au, A., A. Gupta, P. Schembri and C. I. Cheeseman (2002). "Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2." *Biochem J* **367**(Pt 1): 247-254.

Baraldi, P. G., F. Di Virgilio and R. Romagnoli (2004). "Agonists and antagonists acting at P2X7 receptor." *Curr Top Med Chem* **4**(16): 1707-1717.

Baricordi, O. R., L. Melchiorri, E. Adinolfi, S. Falzoni, P. Chiozzi, G. Buell and F. Di Virgilio (1999). "Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor." *J Biol Chem* **274**(47): 33206-33208.

Barrera, N. P., S. J. Ormond, R. M. Henderson, R. D. Murrell-Lagnado and J. M. Edwardson (2005). "Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize." *J Biol Chem* **280**(11): 10759-10765.

Bastard, J.-P., B. Fève and Association française d'études et de recherches sur l'obésité. (2013). *Physiologie et physiopathologie du tissu adipeux*. Paris, Springer.

Bays, H., L. Mandarino and R. A. DeFronzo (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(2): 463-478.

Beaucage, K. L., A. Xiao, S. I. Pollmann, M. W. Grol, R. J. Beach, D. W. Holdsworth, S. M. Sims, M. R. Darling and S. J. Dixon (2014). "Loss of P2X7 nucleotide receptor function leads to abnormal fat distribution in mice." *Purinergic Signal* **10**(2): 291-304.

- Beaulieu, J. F. and A. Quaroni (1991). "Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells." *Biochem J* **280** (Pt 3): 599-608.
- Becker, D., R. Woltersdorf, W. Boldt, S. Schmitz, U. Braam, G. Schmalzing and F. Markwardt (2008). "The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity." *J Biol Chem* **283**(37): 25725-25734.
- Bianco, F., S. Ceruti, A. Colombo, M. Fumagalli, D. Ferrari, C. Pizzirani, M. Matteoli, F. Di Virgilio, M. P. Abbracchio and C. Verderio (2006). "A role for P2X7 in microglial proliferation." *J Neurochem* **99**(3): 745-758.
- Bilodeau, M. S., G. Arguin and F. P. Gendron (2015). "C/EBPbeta regulates P2X7 receptor expression in response to glucose challenge in intestinal epithelial cells." *Biochem Cell Biol* **93**(1): 38-46.
- Blakemore, S. J., J. C. Aledo, J. James, F. C. Campbell, J. M. Lucocq and H. S. Hundal (1995). "The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum." *Biochem J* **309** (Pt 1): 7-12.
- Bo, X., A. Alavi, Z. Xiang, I. Oglesby, A. Ford and G. Burnstock (1999). "Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds." *Neuroreport* **10**(5): 1107-1111.
- Boden, G. (2008). "Obesity and free fatty acids." *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**(3): 635-646, viii-ix.
- Boeynaems, J. M., D. Communi, N. S. Gonzalez and B. Robaye (2005). "Overview of the P2 receptors." *Semin Thromb Hemost* **31**(2): 139-149.
- Bourzac, J. F., K. L'Eriger, J. F. Larrivee, G. Arguin, M. S. Bilodeau, J. Stankova and F. P. Gendron (2013). "Glucose transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes." *J Cell Physiol* **228**(1): 120-129.
- Bradford, M. D. and S. P. Soltoff (2002). "P2X7 receptors activate protein kinase D and p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK) downstream of protein kinase C." *Biochem J* **366**(Pt 3): 745-755.
- Browning, J. D. and J. D. Horton (2004). "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury." *J Clin Invest* **114**(2): 147-152.
- Buell, G. N., F. Talabot, A. Gos, J. Lorenz, E. Lai, M. A. Morris and S. E. Antonarakis (1998). "Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor." *Receptors Channels* **5**(6): 347-354.
- Burant, C. F., J. Takeda, E. Brot-Laroche, G. I. Bell and N. O. Davidson (1992). "Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5." *J Biol Chem* **267**(21): 14523-14526.

- Burnstock, G. (1972). "Purinergic nerves." *Pharmacol Rev* **24**(3): 509-581.
- Burnstock, G. (2006). "Historical review: ATP as a neurotransmitter." *Trends Pharmacol Sci* **27**(3): 166-176.
- Burnstock, G. (2014). "Purinergic signalling in endocrine organs." *Purinergic Signal* **10**(1): 189-231.
- Burnstock, G. and G. E. Knight (2004). "Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems." *Int Rev Cytol* **240**: 31-304.
- Cacho, J., J. Sevillano, J. de Castro, E. Herrera and M. P. Ramos (2008). "Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(5): E1269-1276.
- Campbell, J. E. and D. J. Drucker (2013). "Pharmacology, physiology, and mechanisms of incretin hormone action." *Cell Metab* **17**(6): 819-837.
- Carrasquero, L. M., E. G. Delicado, L. Sanchez-Ruiloba, T. Iglesias and M. T. Miras-Portugal "Mechanisms of protein kinase D activation in response to P2Y(2) and P2X7 receptors in primary astrocytes." *Glia* **58**(8): 984-995.
- Casas-Pruneda, G., J. P. Reyes, G. Perez-Flores, P. Perez-Cornejo and J. Arreola (2009). "Functional interactions between P2X4 and P2X7 receptors from mouse salivary epithelia." *J Physiol* **587**(Pt 12): 2887-2901.
- Casselbrant, A., M. Malinauskas, H. U. Marschall, V. Wallenius and L. Fandriks (2015). "Angiotensin II exerts dual actions on sodium-glucose transporter 1-mediated transport in the human jejunal mucosa." *Scand J Gastroenterol*: 1-8.
- Cauwels, A., E. Rogge, B. Vandendriessche, S. Shiva and P. Brouckaert (2014). "Extracellular ATP drives systemic inflammation, tissue damage and mortality." *Cell Death Dis* **5**: e1102.
- Cesaro, A., P. Brest, V. Hofman, X. Hebuterne, S. Wildman, B. Ferrua, S. Marchetti, A. Doglio, V. Vouret-Craviari, F. Galland, P. Naquet, B. Mograbi, R. Unwin and P. Hofman (2010). "Amplification loop of the inflammatory process is induced by P2X7R activation in intestinal epithelial cells in response to neutrophil transepithelial migration." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**(1): G32-42.
- Cheeseman, C. I. (1993). "GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane." *Gastroenterology* **105**(4): 1050-1056.
- Cheewatrakoolpong, B., H. Gilchrest, J. C. Anthes and S. Greenfeder (2005). "Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(1): 17-27.

Chessell, I. P., J. P. Hatcher, C. Bountra, A. D. Michel, J. P. Hughes, P. Green, J. Egerton, M. Murfin, J. Richardson, W. L. Peck, C. B. Grahames, M. A. Casula, Y. Yiangou, R. Birch, P. Anand and G. N. Buell (2005). "Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain." *Pain* **114**(3): 386-396.

Cohen, J. C., J. D. Horton and H. H. Hobbs (2011). "Human fatty liver disease: old questions and new insights." *Science* **332**(6037): 1519-1523.

Colgan, S. P. and H. K. Eltzschig (2012). "Adenosine and hypoxia-inducible factor signaling in intestinal injury and recovery." *Annu Rev Physiol* **74**: 153-175.

Corriden, R. and P. A. Insel (2010). "Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation." *Science signaling* **3**(104): re1.

Courchesne-Loyer, A., V. St-Pierre, M. Hennebelle, C. A. Castellano, M. Fortier, D. Tessier and S. C. Cunnane (2015). "Ketogenic response to cotreatment with bezafibrate and medium chain triacylglycerols in healthy humans." *Nutrition* **31**(10): 1255-1259.

Crane, J. K., T. M. Naeher, S. S. Choudhari and E. M. Giroux (2005). "Two pathways for ATP release from host cells in enteropathogenic *Escherichia coli* infection." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**(3): G407-417.

Crane, J. K., R. A. Olson, H. M. Jones and M. E. Duffey (2002). "Release of ATP during host cell killing by enteropathogenic *E. coli* and its role as a secretory mediator." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**(1): G74-86.

Crane, R. K. (1962). "Hypothesis for mechanism of intestinal active transport of sugars." *Fed Proc* **21**: 891-895.

Crosnier, C., D. Stamataki and J. Lewis (2006). "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." *Nat Rev Genet* **7**(5): 349-359.

da Silva, M. V., A. R. Marosti, C. E. Mendes, K. Palombit and P. Castelucci (2015). "Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression in enteric neurons." *Histochem Cell Biol* **143**(2): 171-184.

David, E. S., D. S. Cingari and R. P. Ferraris (1995). "Dietary induction of intestinal fructose absorption in weaning rats." *Pediatr Res* **37**(6): 777-782.

Davidson, N. O., A. M. Hausman, C. A. Ifkovits, J. B. Buse, G. W. Gould, C. F. Burant and G. I. Bell (1992). "Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5." *Am J Physiol* **262**(3 Pt 1): C795-800.

de Campos, N. E., C. Marques-da-Silva, G. Correa, M. T. Castelo-Branco, H. S. de Souza and R. Coutinho-Silva (2012). "Characterizing the presence and sensitivity of the P2X7 receptor in different compartments of the gut." *J Innate Immun* **4**(5-6): 529-541.

Debnam, E. S. and R. J. Levin (1975). "An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured in vivo." *J Physiol* **246**(1): 181-196.

Degagne, E., D. M. Grbic, A. A. Dupuis, E. G. Lavoie, C. Langlois, N. Jain, G. A. Weisman, J. Sevigny and F. P. Gendron (2009). "P2Y2 receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells." *J Immunol* **183**(7): 4521-4529.

Degagne, E., N. Turgeon, J. Moore-Gagne, C. Asselin and F. P. Gendron (2012). "P2Y(2) receptor expression is regulated by C/EBPbeta during inflammation in intestinal epithelial cells." *FEBS J* **279**(16): 2957-2965.

Denlinger, L. C., G. Angelini, K. Schell, D. N. Green, A. G. Guadarrama, U. Prabhu, D. B. Coursin, P. J. Bertics and K. Hogan (2005). "Detection of human P2X7 nucleotide receptor polymorphisms by a novel monocyte pore assay predictive of alterations in lipopolysaccharide-induced cytokine production." *J Immunol* **174**(7): 4424-4431.

Denlinger, L. C., D. B. Coursin, K. Schell, G. Angelini, D. N. Green, A. G. Guadarrama, J. Halsey, U. Prabhu, K. J. Hogan and P. J. Bertics (2006). "Human P2X7 pore function predicts allele linkage disequilibrium." *Clin Chem* **52**(6): 995-1004.

Denlinger, L. C., P. L. Fiset, J. A. Sommer, J. J. Watters, U. Prabhu, G. R. Dubyak, R. A. Proctor and P. J. Bertics (2001). "Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide." *J Immunol* **167**(4): 1871-1876.

Deplancke, B. and H. R. Gaskins (2001). "Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer." *Am J Clin Nutr* **73**(6): 1131S-1141S.

Di Virgilio, F., P. Chiozzi, D. Ferrari, S. Falzoni, J. M. Sanz, A. Morelli, M. Torboli, G. Bolognesi and O. R. Baricordi (2001). "Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells." *Blood* **97**(3): 587-600.

Dimitratos, S. D., D. F. Woods, D. G. Stathakis and P. J. Bryant (1999). "Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family." *Bioessays* **21**(11): 912-921.

Dimitriadis, G., P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou and S. A. Raptis (2011). "Insulin effects in muscle and adipose tissue." *Diabetes Res Clin Pract* **93 Suppl 1**: S52-59.

Douard, V., X. L. Cui, P. Soteropoulos and R. P. Ferraris (2008). "Dexamethasone sensitizes the neonatal intestine to fructose induction of intestinal fructose transporter (Slc2A5) function." *Endocrinology* **149**(1): 409-423.

Douard, V. and R. P. Ferraris (2008). "Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(2): E227-237.

- Drover, V. A., M. Ajmal, F. Nassir, N. O. Davidson, A. M. Nauli, D. Sahoo, P. Tso and N. A. Abumrad (2005). "CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood." *J Clin Invest* **115**(5): 1290-1297.
- Drucker, D. J. (2006). "The biology of incretin hormones." *Cell Metab* **3**(3): 153-165.
- Drucker, D. J. (2007). "The role of gut hormones in glucose homeostasis." *J Clin Invest* **117**(1): 24-32.
- Drury, A. N. and A. Szent-Gyorgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." *J Physiol* **68**(3): 213-237.
- Du, C., M. Jaggi, C. Zhang and K. C. Balaji (2009). "Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin." *Cancer Res* **69**(3): 1117-1124.
- Dyer, J., I. S. Wood, A. Palejwala, A. Ellis and S. P. Shirazi-Beechey (2002). "Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(2): G241-248.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy and P. Z. Zimmet (2005). "The metabolic syndrome." *Lancet* **365**(9468): 1415-1428.
- Eny, K. M., T. M. Wolever, B. Fontaine-Bisson and A. El-Sohemy (2008). "Genetic variant in the glucose transporter type 2 is associated with higher intakes of sugars in two distinct populations." *Physiol Genomics* **33**(3): 355-360.
- Fairbairn, I. P., C. B. Stober, D. S. Kumararatne and D. A. Lammas (2001). "ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion." *J Immunol* **167**(6): 3300-3307.
- Feng, Y. H., X. Li, L. Wang, L. Zhou and G. I. Gorodeski (2006). "A truncated P2X7 receptor variant (P2X7-j) endogenously expressed in cervical cancer cells antagonizes the full-length P2X7 receptor through hetero-oligomerization." *J Biol Chem* **281**(25): 17228-17237.
- Feng, Y. H., L. Wang, Q. Wang, X. Li, R. Zeng and G. I. Gorodeski (2005). "ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor." *Am J Physiol Cell Physiol* **288**(6): C1342-1356.
- Ferguson, D. R., I. Kennedy and T. J. Burton (1997). "ATP is released from rabbit urinary bladder epithelial cells by hydrostatic pressure changes--a possible sensory mechanism?" *J Physiol* **505** (Pt 2): 503-511.
- Ferrari, D., M. Los, M. K. Bauer, P. Vandenabeele, S. Wesselborg and K. Schulze-Osthoff (1999). "P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death." *FEBS Lett* **447**(1): 71-75.

Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, R. M. Lemoli, A. Curti, M. Idzko, E. Panther and F. Di Virgilio (2006). "The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release." *J Immunol* **176**(7): 3877-3883.

Ferrari, D., C. Stroh and K. Schulze-Osthoff (1999). "P2X7/P2Z purinoreceptor-mediated activation of transcription factor NFAT in microglial cells." *J Biol Chem* **274**(19): 13205-13210.

Ferraris, R. P., S. Yasharpour, K. C. Lloyd, R. Mirzayan and J. M. Diamond (1990). "Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions." *Am J Physiol* **259**(5 Pt 1): G822-837.

Finger, T. E., V. Danilova, J. Barrows, D. L. Bartel, A. J. Vigers, L. Stone, G. Hellekant and S. C. Kinnamon (2005). "ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves." *Science* **310**(5753): 1495-1499.

Fischer, B., L. Shahar, A. Chulkin, J. L. Boyer, K. T. Harden, F. P. Gendron, A. R. Beaudoin, J. Chapal, D. Hillaire-Buys and P. Petit (2000). "2-Thioether-5'-O-(1-thiotriphosphate)-adenosine derivatives: new insulin secretagogues acting through P2Y-receptors." *Isr Med Assoc J* **2** **Suppl**: 92-98.

Fu, Y. and C. S. Rubin (2011). "Protein kinase D: coupling extracellular stimuli to the regulation of cell physiology." *EMBO Rep* **12**(8): 785-796.

Fueger, B. J., J. Czernin, I. Hildebrandt, C. Tran, B. S. Halpern, D. Stout, M. E. Phelps and W. A. Weber (2006). "Impact of animal handling on the results of 18F-FDG PET studies in mice." *J Nucl Med* **47**(6): 999-1006.

Furness, J. B., L. R. Rivera, H. J. Cho, D. M. Bravo and B. Callaghan (2013). "The gut as a sensory organ." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**(12): 729-740.

Garabedian, E. M., L. J. Roberts, M. S. McNevin and J. I. Gordon (1997). "Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice." *J Biol Chem* **272**(38): 23729-23740.

Garcia-Marcos, M., S. Pochet, A. Marino and J. P. Dehaye (2006). "P2X7 and phospholipid signalling: the search of the "missing link" in epithelial cells." *Cell Signal* **18**(12): 2098-2104.

Gartland, A., K. K. Skarratt, L. J. Hocking, C. Parsons, L. Stokes, N. R. Jorgensen, W. D. Fraser, D. M. Reid, J. A. Gallagher and J. S. Wiley (2012). "Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women." *Eur J Hum Genet* **20**(5): 559-564.

Gartner, L. P. and J. L. Hiatt (1992). *Atlas d'histologie en couleurs*. Bruxelles, De Boeck-Wesmael.

Geloneze, B., A. C. Vasques, C. F. Stabe, J. C. Pareja, L. E. Rosado, E. C. Queiroz, M. A. Tambascia and B. Investigators (2009). "HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS)." *Arq Bras Endocrinol Metabol* **53**(2): 281-287.

Gendron, F. P., S. Mongrain, P. Laprise, S. McMahon, C. M. Dubois, M. Blais, C. Asselin and N. Rivard (2006). "The CDX2 transcription factor regulates furin expression during intestinal epithelial cell differentiation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(2): G310-G318.

Gendron, F. P., J. T. Neary, P. M. Theiss, G. Y. Sun, F. A. Gonzalez and G. A. Weisman (2003). "Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(2): C571-581.

Gerasimovskaya, E. V., S. Ahmad, C. W. White, P. L. Jones, T. C. Carpenter and K. R. Stenmark (2002). "Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor." *J Biol Chem* **277**(47): 44638-44650.

Ghanem, E., B. Robaye, T. Leal, J. Leipziger, W. Van Driessche, R. Beauwens and J. M. Boeynaems (2005). "The role of epithelial P2Y(2) and P2Y(4) receptors in the regulation of intestinal chloride secretion." *Br J Pharmacol* **146**(3): 364-369.

Giuliani, A. L., D. Colognesi, T. Ricco, C. Roncato, M. Capece, F. Amoroso, Q. G. Wang, E. De Marchi, A. Gartland, F. Di Virgilio and E. Adinolfi (2014). "Trophic activity of human P2X7 receptor isoforms A and B in osteosarcoma." *PLoS One* **9**(9): e107224.

Glas, R., N. S. Sauter, F. T. Schulthess, L. Shu, J. Oberholzer and K. Maedler (2009). "Purinergic P2X7 receptors regulate secretion of interleukin-1 receptor antagonist and beta cell function and survival." *Diabetologia* **52**(8): 1579-1588.

Glaser, T., R. R. Resende and H. Ulrich (2013). "Implications of purinergic receptor-mediated intracellular calcium transients in neural differentiation." *Cell Commun Signal* **11**(1): 12.

Gonnord, P., C. Delarasse, R. Auger, K. Benihoud, M. Prigent, M. H. Cuif, C. Lamaze and J. M. Kanellopoulos (2009). "Palmitoylation of the P2X7 receptor, an ATP-gated channel, controls its expression and association with lipid rafts." *FASEB J* **23**(3): 795-805.

Gouyon, F., L. Caillaud, V. Carriere, C. Klein, V. Dalet, D. Citadelle, G. L. Kellett, B. Thorens, A. Leturque and E. Brot-Laroche (2003). "Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice." *J Physiol* **552**(Pt 3): 823-832.

Gray, G. M. (1992). "Starch digestion and absorption in nonruminants." *J Nutr* **122**(1): 172-177.

Grbic, D. M., E. Degagn, J. F. Larrive, M. S. Bilodeau, V. Vinette, G. Arguin, J. Stankova and F. P. Gendron (2011). "P2Y(6) receptor contributes to neutrophil recruitment to inflamed intestinal mucosa by increasing CXC chemokine ligand 8 expression in an AP-1-dependent manner in epithelial cells." *Inflamm Bowel Dis*.

Grbic, D. M., E. Degagne, C. Langlois, A. A. Dupuis and F. P. Gendron (2008). "Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP." *J Immunol* **180**(4): 2659-2668.

Grbic, D. M., E. Degagne, J. F. Larrivee, M. S. Bilodeau, V. Vinette, G. Arguin, J. Stankova and F. P. Gendron (2012). "P2Y6 receptor contributes to neutrophil recruitment to inflamed intestinal mucosa by increasing CXC chemokine ligand 8 expression in an AP-1-dependent manner in epithelial cells." *Inflamm Bowel Dis* **18**(8): 1456-1469.

Greig, A. V., C. Linge, G. Terenghi, D. A. McGrouther and G. Burnstock (2003). "Purinergetic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes." *J Invest Dermatol* **120**(6): 1007-1015.

Grimble, G. K. (1994). "Dietary nucleotides and gut mucosal defence." *Gut* **35**(1 Suppl): S46-51.

Groschel-Stewart, U., M. Bardini, T. Robson and G. Burnstock (1999). "P2X receptors in the rat duodenal villus." *Cell Tissue Res* **297**(1): 111-117.

Gross, L. S., L. Li, E. S. Ford and S. Liu (2004). "Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment." *Am J Clin Nutr* **79**(5): 774-779.

Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-3450.

Gu, B. J., W. Zhang, R. A. Worthington, R. Sluyter, P. Dao-Ung, S. Petrou, J. A. Barden and J. S. Wiley (2001). "A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor." *J Biol Chem* **276**(14): 11135-11142.

Habib, A. M., P. Richards, L. S. Cairns, G. J. Rogers, C. A. Bannon, H. E. Parker, T. C. Morley, G. S. Yeo, F. Reimann and F. M. Gribble (2012). "Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry." *Endocrinology* **153**(7): 3054-3065.

Hajduch, E., G. J. Litherland, S. Turban, E. Brot-Laroche and H. S. Hundal (2003). "Insulin regulates the expression of the GLUT5 transporter in L6 skeletal muscle cells." *FEBS Lett* **549**(1-3): 77-82.

Haluzik, M., C. Colombo, O. Gavrilova, S. Chua, N. Wolf, M. Chen, B. Stannard, K. R. Dietz, D. Le Roith and M. L. Reitman (2004). "Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in ob/ob mice." *Endocrinology* **145**(7): 3258-3264.

Han, B. G., C. M. Hao, E. E. Tchekneva, Y. Y. Wang, C. A. Lee, B. Ebrahim, R. C. Harris, T. S. Kern, D. H. Wasserman, M. D. Breyer and Z. Qi (2008). "Markers of glycemic control in the mouse: comparisons of 6-h- and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**(4): E981-986.

Hart, M. L., M. Henn, D. Kohler, D. Kloor, M. Mittelbronn, I. C. Gorzolla, G. L. Stahl and H. K. Eltzschig (2008). "Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury." *FASEB J* **22**(8): 2784-2797.

Hausser, A., P. Storz, G. Link, H. Stoll, Y. C. Liu, A. Altman, K. Pfizenmaier and F. J. Johannes (1999). "Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins." *J Biol Chem* **274**(14): 9258-9264.

Hausser, A., P. Storz, S. Martens, G. Link, A. Toker and K. Pfizenmaier (2005). "Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex." *Nat Cell Biol* **7**(9): 880-886.

Havel, P. J. (2005). "Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism." *Nutr Rev* **63**(5): 133-157.

Haworth, R. S., F. Cuello, T. J. Herron, G. Franzen, J. C. Kentish, M. Gautel and M. Avkiran (2004). "Protein kinase D is a novel mediator of cardiac troponin I phosphorylation and regulates myofilament function." *Circ Res* **95**(11): 1091-1099.

Haworth, R. S., J. Sinnott-Smith, E. Rozengurt and M. Avkiran (1999). "Protein kinase D inhibits plasma membrane Na(+)/H(+) exchanger activity." *Am J Physiol* **277**(6 Pt 1): C1202-1209.

Helle, K. B., A. Corti, M. H. Metz-Boutigue and B. Tota (2007). "The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties." *Cell Mol Life Sci* **64**(22): 2863-2886.

Hironaka, I., T. Iwase, S. Sugimoto, K. Okuda, A. Tajima, K. Yanaga and Y. Mizunoe (2013). "Glucose triggers ATP secretion from bacteria in a growth-phase-dependent manner." *Appl Environ Microbiol* **79**(7): 2328-2335.

Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." *J Clin Invest* **109**(9): 1125-1131.

Hou, J. C., D. Williams, J. Vicogne and J. E. Pessin (2009). "The glucose transporter 2 undergoes plasma membrane endocytosis and lysosomal degradation in a secretagogue-dependent manner." *Endocrinology* **150**(9): 4056-4064.

Housley, G. D., D. J. Jagger, D. Greenwood, N. P. Raybould, S. G. Salih, L. E. Jarlebark, S. M. Vlajkovic, R. Kanjhan, P. Nikolic, D. J. Munoz and P. R. Thorne (2002). "Purinergic regulation of sound transduction and auditory neurotransmission." *Audiol Neurootol* **7**(1): 55-61.

Humphreys, B. D., J. Rice, S. B. Kertesz and G. R. Dubyak (2000). "Stress-activated protein kinase/JNK activation and apoptotic induction by the macrophage P2X7 nucleotide receptor." *J Biol Chem* **275**(35): 26792-26798.

Jacques-Silva, M. C., R. Rodnight, G. Lenz, Z. Liao, Q. Kong, M. Tran, Y. Kang, F. A. Gonzalez, G. A. Weisman and J. T. Neary (2004). "P2X7 receptors stimulate AKT phosphorylation in astrocytes." *Br J Pharmacol* **141**(7): 1106-1117.

Jaggi, M., P. S. Rao, D. J. Smith, M. J. Wheelock, K. R. Johnson, G. P. Hemstreet and K. C. Balaji (2005). "E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C $\{\mu\}$ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer." *Cancer Res* **65**(2): 483-492.

Jenkins, D. J., H. Ghafari, T. M. Wolever, R. H. Taylor, A. L. Jenkins, H. M. Barker, H. Fielden and A. C. Bowling (1982). "Relationship between rate of digestion of foods and post-prandial glycaemia." *Diabetologia* **22**(6): 450-455.

Jenkins, D. J., C. W. Kendall, L. S. Augustin, S. Franceschi, M. Hamidi, A. Marchie, A. L. Jenkins and M. Axelsen (2002). "Glycemic index: overview of implications in health and disease." *Am J Clin Nutr* **76**(1): 266S-273S.

Jiang, G. and B. B. Zhang (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(4): E671-678.

Kaczmarek-Hajek, K., E. Lorinczi, R. Hausmann and A. Nicke (2012). "Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges." *Purinergic Signal* **8**(3): 375-417.

Kanzaki, M. and J. E. Pessin (2001). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling." *J Biol Chem* **276**(45): 42436-42444.

Karnieli, E., M. J. Zarnowski, P. J. Hissin, I. A. Simpson, L. B. Salans and S. W. Cushman (1981). "Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity." *J Biol Chem* **256**(10): 4772-4777.

Kawano, Y. and D. E. Cohen (2013). "Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease." *J Gastroenterol* **48**(4): 434-441.

Kawate, T., J. C. Michel, W. T. Birdsong and E. Gouaux (2009). "Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state." *Nature* **460**(7255): 592-598.

Keating, C., P. Pelegrin, C. M. Martinez and D. Grundy (2011). "P2X7 receptor-dependent intestinal afferent hypersensitivity in a mouse model of postinfectious irritable bowel syndrome." *J Immunol* **187**(3): 1467-1474.

- Kellett, G. L. (2001). "The facilitated component of intestinal glucose absorption." *J Physiol* **531**(Pt 3): 585-595.
- Kellett, G. L. and E. Brot-Laroche (2005). "Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption." *Diabetes* **54**(10): 3056-3062.
- Kellett, G. L., E. Brot-Laroche, O. J. Mace and A. Leturque (2008). "Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2." *Annu Rev Nutr* **28**: 35-54.
- Kellett, G. L. and P. A. Helliwell (2000). "The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane." *Biochem J* **350 Pt 1**: 155-162.
- Khan, A. H. and J. E. Pessin (2002). "Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways." *Diabetologia* **45**(11): 1475-1483.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histologie et biologie cellulaire : une introduction à l'anatomie pathologique*. Bruxelles, De Boeck.
- Kim, M., L. H. Jiang, H. L. Wilson, R. A. North and A. Surprenant (2001). "Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex." *EMBO J* **20**(22): 6347-6358.
- Kim, M., V. Spelta, J. Sim, R. A. North and A. Surprenant (2001). "Differential assembly of rat purinergic P2X7 receptor in immune cells of the brain and periphery." *J Biol Chem* **276**(26): 23262-23267.
- Kim, W. and J. M. Egan (2008). "The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment." *Pharmacol Rev* **60**(4): 470-512.
- Kim, Y. S. and S. B. Ho (2010). "Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress." *Curr Gastroenterol Rep* **12**(5): 319-330.
- Klaff, L. J., R. Brazg, K. Hughes, A. M. Tideman, H. C. Schachner, P. Stenger, S. Pardo, N. Dunne and J. L. Parkes (2015). "Accuracy evaluation of contour next compared with five blood glucose monitoring systems across a wide range of blood glucose concentrations occurring in a clinical research setting." *Diabetes Technol Ther* **17**(1): 8-15.
- Klemm, D. J., J. W. Leitner, P. Watson, A. Nesterova, J. E. Reusch, M. L. Goalstone and B. Draznin (2001). "Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation." *J Biol Chem* **276**(30): 28430-28435.
- Kochukov, M. Y. and A. K. Ritchie (2004). "A P2X7 receptor stimulates plasma membrane trafficking in the FRTL rat thyrocyte cell line." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(4): C992-C1002.
- Kochukov, M. Y. and A. K. Ritchie (2005). "P2X7 receptor stimulation of membrane internalization in a thyrocyte cell line." *J Membr Biol* **204**(1): 11-21.

Kubota, K., R. Kubota, S. Yamada, M. Tada, T. Takahashi and R. Iwata (1996). "Re-evaluation of myocardial FDG uptake in hyperglycemia." *J Nucl Med* **37**(10): 1713-1717.

Kuhre, R. E., L. E. Bechmann, N. J. Wewer Albrechtsen, B. Hartmann and J. J. Holst (2015). "Glucose stimulates neurotensin secretion from the rat small intestine by mechanisms involving SGLT1 and GLUT2 leading to cell depolarization and calcium influx." *Am J Physiol Endocrinol Metab*: ajpendo 00012 02015.

Kwon, O., P. Eck, S. Chen, C. P. Corpe, J. H. Lee, M. Kruhlak and M. Levine (2007). "Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids." *FASEB J* **21**(2): 366-377.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Langlois, C. and F. P. Gendron (2009). "Promoting MPhi transepithelial migration by stimulating the epithelial cell P2Y(2) receptor." *Eur J Immunol* **39**(10): 2895-2905.

Lazarowski, E. R., L. Homolya, R. C. Boucher and T. K. Harden (1997). "Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation." *J Biol Chem* **272**(39): 24348-24354.

Lebovitz, H. E. (2001). "Insulin resistance: definition and consequences." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109 Suppl 2**: S135-148.

Lee, S., R. Muniyappa, X. Yan, H. Chen, L. Q. Yue, E. G. Hong, J. K. Kim and M. J. Quon (2008). "Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(2): E261-270.

Lemaire, I., S. Falzoni, N. Leduc, B. Zhang, P. Pellegatti, E. Adinolfi, P. Chiozzi and F. Di Virgilio (2006). "Involvement of the purinergic P2X7 receptor in the formation of multinucleated giant cells." *J Immunol* **177**(10): 7257-7265.

Leon, C., M. Freund, O. Latchoumanin, A. Farret, P. Petit, J. P. Cazenave and C. Gachet (2005). "The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice." *Purinergic Signal* **1**(2): 145-151.

Leturque, A., E. Brot-Laroche and M. Le Gall (2009). "GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(5): E985-992.

Li, Y., S. Xu, M. M. Mihaylova, B. Zheng, X. Hou, B. Jiang, O. Park, Z. Luo, E. Lefai, J. Y. Shyy, B. Gao, M. Wierzbicki, T. J. Verbeuren, R. J. Shaw, R. A. Cohen and M. Zang (2011). "AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice." *Cell Metab* **13**(4): 376-388.

Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J. Van Lint and V. Malhotra (2001). "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network." *Cell* **104**(3): 409-420.

Lloyd, D. J., J. McCormick, J. Helmering, K. W. Kim, M. Wang, P. Fordstrom, S. A. Kaufman, R. A. Lindberg and M. M. Veniant (2008). "Generation and characterization of two novel mouse models exhibiting the phenotypes of the metabolic syndrome: Apob48-/- Lepob/ob mice devoid of ApoE or Ldlr." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**(3): E496-505.

Locovei, S., E. Scemes, F. Qiu, D. C. Spray and G. Dahl (2007). "Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex." *FEBS Lett* **581**(3): 483-488.

Luiken, J. J., D. Vertommen, S. L. Coort, D. D. Habets, M. El Hasnaoui, M. M. Pelsers, B. Viollet, A. Bonen, L. Hue, M. H. Rider and J. F. Glatz (2008). "Identification of protein kinase D as a novel contraction-activated kinase linked to GLUT4-mediated glucose uptake, independent of AMPK." *Cell Signal* **20**(3): 543-556.

Mace, O. J., J. Affleck, N. Patel and G. L. Kellett (2007). "Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2." *J Physiol* **582**(Pt 1): 379-392.

Mackenzie, A. B., M. T. Young, E. Adinolfi and A. Surprenant (2005). "Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors." *J Biol Chem* **280**(40): 33968-33976.

Madara, J. L. and J. R. Pappenheimer (1987). "Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia." *J Membr Biol* **100**(2): 149-164.

Madec, S., C. Rossi, M. Chiarugi, E. Santini, A. Salvati, E. Ferrannini and A. Solini (2011). "Adipocyte P2X7 receptors expression: a role in modulating inflammatory response in subjects with metabolic syndrome?" *Atherosclerosis* **219**(2): 552-558.

Marieb, E. N. (1999). *Anatomie et physiologie humaines*. Saint-Laurent, Québec, Éditions du Renouveau pédagogique.

Marques, C. C., M. T. Castelo-Branco, R. G. Pacheco, F. Buongusto, A. do Rosario, Jr., A. Schanaider, R. Coutinho-Silva and H. S. de Souza (2014). "Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis." *Biochim Biophys Acta* **1842**(1): 65-78.

Martel-Gallegos, G., G. Casas-Pruneda, F. Ortega-Ortega, S. Sanchez-Armass, J. A. Olivares-Reyes, B. Diebold, P. Perez-Cornejo and J. Arreola (2013). "Oxidative stress induced by P2X7 receptor stimulation in murine macrophages is mediated by c-Src/Pyk2 and ERK1/2." *Biochim Biophys Acta* **1830**(10): 4650-4659.

Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme and C. Schachtele (1993). "Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976." *J Biol Chem* **268**(13): 9194-9197.

Masin, M., C. Young, K. Lim, S. J. Barnes, X. J. Xu, V. Marschall, W. Brutkowski, E. R. Mooney, D. C. Gorecki and R. Murrell-Lagnado (2012). "Expression, assembly and function of novel C-terminal truncated variants of the mouse P2X7 receptor: re-evaluation of P2X7 knockouts." *Br J Pharmacol* **165**(4): 978-993.

Mather, K. (2009). "Surrogate measures of insulin resistance: of rats, mice, and men." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(2): E398-399.

Meier, J. J., B. Gallwitz, N. Siepmann, J. J. Holst, C. F. Deacon, W. E. Schmidt and M. A. Nauck (2003). "Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia." *Diabetologia* **46**(6): 798-801.

Mikhalap, S. V., L. M. Kovalevs'ka and S. P. Sydorenko (2008). "[The role of PKD family protein kinases in the regulation of protein post-translational modification]." *Ukr Biokhim Zh* **80**(4): 16-24.

Mio, K., Y. Kubo, T. Ogura, T. Yamamoto and C. Sato (2005). "Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain." *Biochem Biophys Res Commun* **337**(3): 998-1005.

Mithieux, G. (2005). "The new functions of the gut in the control of glucose homeostasis." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**(4): 445-449.

Miyamoto, K., K. Hase, T. Takagi, T. Fujii, Y. Taketani, H. Minami, T. Oka and Y. Nakabou (1993). "Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars." *Biochem J* **295** (Pt 1): 211-215.

Monif, M., C. A. Reid, K. L. Powell, M. L. Smart and D. A. Williams (2009). "The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore." *J Neurosci* **29**(12): 3781-3791.

Moore, M. C., K. C. Coate, J. J. Winnick, Z. An and A. D. Cherrington (2012). "Regulation of hepatic glucose uptake and storage in vivo." *Adv Nutr* **3**(3): 286-294.

Mueckler, M. (1994). "Facilitative glucose transporters." *Eur J Biochem* **219**(3): 713-725.

Mueckler, M. and B. Thorens (2013). "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." *Mol Aspects Med* **34**(2-3): 121-138.

Nagatake, T., H. Fujita, N. Minato and Y. Hamazaki (2014). "Enteroendocrine cells are specifically marked by cell surface expression of claudin-4 in mouse small intestine." *PLoS One* **9**(6): e90638.

Najjar, S. M., Y. Yang, M. A. Fernstrom, S. J. Lee, A. M. Deangelis, G. A. Rjaily, Q. Y. Al-Share, T. Dai, T. A. Miller, S. Ratnam, R. J. Ruch, S. Smith, S. H. Lin, N. Beauchemin and A. M. Oyarce (2005). "Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity." *Cell Metab* **2**(1): 43-53.

Neary, J. T., Y. Kang, Y. F. Shi, M. D. Tran and I. B. Wanner (2006). "P2 receptor signalling, proliferation of astrocytes, and expression of molecules involved in cell-cell interactions." *Novartis Found Symp* **276**: 131-143; discussion 143-137, 233-137, 275-181.

Neves, A. R., M. T. Castelo-Branco, V. R. Figliuolo, C. Bernardazzi, F. Buongusto, A. Yoshimoto, H. F. Nanini, C. M. Coutinho, A. J. Carneiro, R. Coutinho-Silva and H. S. de Souza (2014). "Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **20**(3): 444-457.

Nicke, A., H. G. Baumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler and G. Schmalzing (1998). "P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels." *EMBO J* **17**(11): 3016-3028.

Nishikawa, K., A. Toker, K. Wong, P. A. Marignani, F. J. Johannes and L. C. Cantley (1998). "Association of protein kinase C μ with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase." *J Biol Chem* **273**(36): 23126-23133.

North, R. A. (2002). "Molecular physiology of P2X receptors." *Physiol Rev* **82**(4): 1013-1067.

Ortega, M. A., M. C. Nunez, A. Gil and A. Sanchez-Pozo (1995). "Dietary nucleotides accelerate intestinal recovery after food deprivation in old rats." *J Nutr* **125**(6): 1413-1418.

Ostler, J. E., S. K. Maurya, J. Dials, S. R. Roof, S. T. Devor, M. T. Ziolo and M. Periasamy (2014). "Effects of insulin resistance on skeletal muscle growth and exercise capacity in type 2 diabetic mouse models." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**(6): E592-605.

Papp, L., E. S. Vizi and B. Sperlagh (2007). "P2X7 receptor mediated phosphorylation of p38MAP kinase in the hippocampus." *Biochem Biophys Res Commun* **355**(2): 568-574.

Patel, B. A., M. Rogers, T. Wieder, D. O'Hare and M. G. Boutelle (2011). "ATP microelectrode biosensor for stable long-term in vitro monitoring from gastrointestinal tissue." *Biosens Bioelectron* **26**(6): 2890-2896.

Pelegri, P. and A. Surprenant (2006). "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor." *EMBO J* **25**(21): 5071-5082.

Petit, P., A. D. Lajoix and R. Gross (2009). "P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology." *Eur J Pharm Sci* **37**(2): 67-75.

Placido, R., G. Auricchio, S. Falzoni, L. Battistini, V. Colizzi, E. Brunetti, F. Di Virgilio and G. Mancino (2006). "P2X(7) purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* reducing the intracellular bacterial viability." *Cell Immunol* **244**(1): 10-18.

Plourde, M., J. Tremblay-Mercier, M. Fortier, F. Pifferi and S. C. Cunnane (2009). "Eicosapentaenoic acid decreases postprandial beta-hydroxybutyrate and free fatty acid responses in healthy young and elderly." *Nutrition* **25**(3): 289-294.

Prigozhina, N. L. and C. M. Waterman-Storer (2004). "Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility." *Curr Biol* **14**(2): 88-98.

Proietti, M., V. Cornacchione, T. Rezzonico Jost, A. Romagnani, C. E. Faliti, L. Perruzza, R. Rigoni, E. Radaelli, F. Caprioli, S. Preziuso, B. Brannetti, M. Thelen, K. D. McCoy, E. Slack, E. Traggiai and F. Grassi (2014). "ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism." *Immunity* **41**(5): 789-801.

Qu, Y., L. Franchi, G. Nunez and G. R. Dubyak (2007). "Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages." *Journal of immunology* **179**(3): 1913-1925.

Quaroni, A., J. Wands, R. L. Trelstad and K. J. Isselbacher (1979). "Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria." *J Cell Biol* **80**(2): 248-265.

Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, G. Collo, R. A. North and A. Surprenant (1997). "The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA." *J Biol Chem* **272**(9): 5482-5486.

Rindi, G., A. B. Leiter, A. S. Kopin, C. Bordini and E. Solcia (2004). "The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences." *Ann N Y Acad Sci* **1014**: 1-12.

Ritze, Y., G. Bardos, J. G. D'Haese, B. Ernst, M. Thurnheer, B. Schultes and S. C. Bischoff (2014). "Effect of high sugar intake on glucose transporter and weight regulating hormones in mice and humans." *PLoS One* **9**(7): e101702.

Roberts, C. K., A. L. Hevener and R. J. Barnard (2013). "Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training." *Compr Physiol* **3**(1): 1-58.

Rodrigues-Ribeiro, R., E. C. Alvarenga, M. L. Calio, E. J. Paredes-Gamero and A. T. Ferreira (2015). "Dual role of P2 receptors during osteoblast differentiation." *Cell Biochem Biophys* **71**(2): 1225-1233.

Rong, W., A. V. Gourine, D. A. Cockayne, Z. Xiang, A. P. Ford, K. M. Spyer and G. Burnstock (2003). "Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia." *J Neurosci* **23**(36): 11315-11321.

Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.

Saunders, B. M., S. L. Fernando, R. Sluyter, W. J. Britton and J. S. Wiley (2003). "A loss-of-function polymorphism in the human P2X7 receptor abolishes ATP-mediated killing of mycobacteria." *J Immunol* **171**(10): 5442-5446.

Schulze-Lohoff, E., C. Hugo, S. Rost, S. Arnold, A. Gruber, B. Brune and R. B. Sterzel (1998). "Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors." *Am J Physiol* **275**(6 Pt 2): F962-971.

Sheng, M. and D. T. Pak (2000). "Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins." *Annu Rev Physiol* **62**: 755-778.

Shepherd, E. J., P. A. Helliwell, O. J. Mace, E. L. Morgan, N. Patel and G. L. Kellett (2004). "Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in rat small intestine." *J Physiol* **560**(Pt 1): 281-290.

Shu, R., E. S. David and R. P. Ferraris (1998). "Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats." *Am J Physiol* **274**(2 Pt 1): G232-239.

Sluyter, R. and L. Stokes (2011). "Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease." *Recent Pat DNA Gene Seq* **5**(1): 41-54.

Smart, M. L., B. Gu, R. G. Panchal, J. Wiley, B. Cromer, D. A. Williams and S. Petrou (2003). "P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region." *J Biol Chem* **278**(10): 8853-8860.

Solle, M., J. Labasi, D. G. Perregaux, E. Stam, N. Petrushova, B. H. Koller, R. J. Griffiths and C. A. Gabel (2001). "Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors." *J Biol Chem* **276**(1): 125-132.

Souza, C. O., G. F. Santoro, V. R. Figliuolo, H. F. Nanini, H. S. de Souza, M. T. Castelo-Branco, A. A. Abalo, M. M. Paiva, C. M. Coutinho and R. Coutinho-Silva (2012). "Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells." *Biochim Biophys Acta* **1820**(12): 1867-1878.

Srikanthan, K., A. Feyh, H. Visweshwar, J. I. Shapiro and K. Sodhi (2016). "Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population." *Int J Med Sci* **13**(1): 25-38.

Stokes, L., S. J. Fuller, R. Sluyter, K. K. Skarratt, B. J. Gu and J. S. Wiley (2010). "Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1beta secretion." *FASEB J* **24**(8): 2916-2927.

Stolarczyk, E., C. Guissard, A. Michau, P. C. Even, A. Grosfeld, P. Serradas, A. Lorsignol, L. Penicaud, E. Brot-Laroche, A. Leturque and M. Le Gall (2010). "Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**(5): E1078-1087.

Stralfors, P. (2012). "Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes." *Adv Exp Med Biol* **729**: 111-126.

Stuart, C. A., M. E. Howell and D. Yin (2007). "Overexpression of GLUT5 in diabetic muscle is reversed by pioglitazone." *Diabetes Care* **30**(4): 925-931.

Sun, S. H., L. B. Lin, A. C. Hung and J. S. Kuo (1999). "ATP-stimulated Ca²⁺ influx and phospholipase D activities of a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, are mediated through P2X7 receptors." *J Neurochem* **73**(1): 334-343.

Surprenant, A. and R. A. North (2009). "Signaling at purinergic P2X receptors." *Annu Rev Physiol* **71**: 333-359.

Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North and G. Buell (1996). "The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7)." *Science* **272**(5262): 735-738.

Suto, J. and K. Satou (2013). "Genetic background (DDD/Sgn versus C57BL/6J) strongly influences postnatal growth of male mice carrying the A(y) allele at the agouti locus: identification of quantitative trait loci associated with diabetes and body weight loss." *BMC Genet* **14**: 35.

Syberg, S., S. Petersen, J. E. Beck Jensen, A. Gartland, J. Teilmann, I. Chessell, T. H. Steinberg, P. Schwarz and N. R. Jorgensen (2012). "Genetic Background Strongly Influences the Bone Phenotype of P2X7 Receptor Knockout Mice." *J Osteoporos* **2012**: 391097.

Takenouchi, T., K. Ogihara, M. Sato and H. Kitani (2005). "Inhibitory effects of U73122 and U73343 on Ca²⁺ influx and pore formation induced by the activation of P2X7 nucleotide receptors in mouse microglial cell line." *Biochim Biophys Acta* **1726**(2): 177-186.

Thorens, B., N. Deriaz, D. Bosco, A. DeVos, D. Pipeleers, F. Schuit, P. Meda and A. Porret (1996). "Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic beta cells." *J Biol Chem* **271**(14): 8075-8081.

Thunberg, U., G. Tobin, A. Johnson, O. Soderberg, L. Padyukov, M. Hulthdin, L. Klareskog, G. Enblad, C. Sundstrom, G. Roos and R. Rosenquist (2002). "Polymorphism in the P2X7 receptor gene and survival in chronic lymphocytic leukaemia." *Lancet* **360**(9349): 1935-1939.

Tobin, V., M. Le Gall, X. Fioramonti, E. Stolarczyk, A. G. Blazquez, C. Klein, M. Prigent, P. Serradas, M. H. Cuif, C. Magnan, A. Leturque and E. Brot-Laroche (2008). "Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice." *Diabetes* **57**(3): 555-562.

Todd, J. N., W. Poon, V. Lyssenko, L. Groop, B. Nichols, M. Wilmot, S. Robson, K. Enjyoji, M. A. Herman, C. Hu, R. Zhang, W. Jia, R. Ma, J. C. Florez and D. J. Friedman (2015). "Variation in Glucose Homeostasis Traits Associated With P2RX7 Polymorphisms in Mice and Humans." *J Clin Endocrinol Metab*: jc20144160.

- Torres, G. E., T. M. Egan and M. M. Voigt (1999). "Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners." *J Biol Chem* **274**(10): 6653-6659.
- van der Flier, L. G. and H. Clevers (2009). "Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium." *Annu Rev Physiol* **71**: 241-260.
- Van Lint, J., A. Rykx, Y. Maeda, T. Vantus, S. Sturany, V. Malhotra, J. R. Vandenhede and T. Seufferlein (2002). "Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move." *Trends Cell Biol* **12**(4): 193-200.
- Vieira, F. S., H. F. Nanini, C. M. Takiya and R. Coutinho-Silva (2016). "P2X7 receptor knockout prevents streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice." *Mol Cell Endocrinol* **419**: 148-157.
- Virginio, C., D. Church, R. A. North and A. Surprenant (1997). "Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor." *Neuropharmacology* **36**(9): 1285-1294.
- Virginio, C., A. MacKenzie, F. A. Rassendren, R. A. North and A. Surprenant (1999). "Pore dilation of neuronal P2X receptor channels." *Nat Neurosci* **2**(4): 315-321.
- Volonte, C., S. Apolloni, S. D. Skaper and G. Burnstock (2012). "P2X7 receptors: channels, pores and more." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **11**(6): 705-721.
- Wakil, S. J. (1986). "The relationship between structure and function for and the regulation of the enzymes of fatty acid synthesis." *Ann N Y Acad Sci* **478**: 203-219.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi (1983). "Fatty acid synthesis and its regulation." *Annu Rev Biochem* **52**: 537-579.
- Walker, J., H. B. Jijon, H. Diaz, P. Salehi, T. Churchill and K. L. Madsen (2005). "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK." *Biochem J* **385**(Pt 2): 485-491.
- Wang, Y., N. Kedei, M. Wang, Q. J. Wang, A. R. Huppler, A. Toth, R. Tran and P. M. Blumberg (2004). "Interaction between protein kinase C μ and the vanilloid receptor type 1." *J Biol Chem* **279**(51): 53674-53682.
- Weinhold, K., U. Krause-Buchholz, G. Rodel, M. Kasper and K. Barth (2010). "Interaction and interrelation of P2X7 and P2X4 receptor complexes in mouse lung epithelial cells." *Cell Mol Life Sci* **67**(15): 2631-2642.
- Weir, G. C. and S. Bonner-Weir (2004). "Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes." *Diabetes* **53 Suppl 3**: S16-21.
- White, T. D. (1988). "Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission." *Pharmacol Ther* **38**(2): 129-168.

Wildman, S. S. and B. F. King (2008). "P2X receptors: epithelial ion channels and regulators of salt and water transport." *Nephron Physiol* **108**(3): p60-67.

Wiley, J. S., L. P. Dao-Ung, B. J. Gu, R. Sluyter, A. N. Shemon, C. Li, J. Taper, J. Gallo and A. Manoharan (2002). "A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study." *Lancet* **359**(9312): 1114-1119.

Wiley, J. S., L. P. Dao-Ung, C. Li, A. N. Shemon, B. J. Gu, M. L. Smart, S. J. Fuller, J. A. Barden, S. Petrou and R. Sluyter (2003). "An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X7 receptor." *J Biol Chem* **278**(19): 17108-17113.

Wilson, H. L., S. A. Wilson, A. Surprenant and R. A. North (2002). "Epithelial membrane proteins induce membrane blebbing and interact with the P2X7 receptor C terminus." *J Biol Chem* **277**(37): 34017-34023.

Wood, I. S. and P. Trayhurn (2003). "Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins." *Br J Nutr* **89**(1): 3-9.

Wright, E. M., J. R. Hirsch, D. D. Loo and G. A. Zampighi (1997). "Regulation of Na⁺/glucose cotransporters." *J Exp Biol* **200**(Pt 2): 287-293.

Wright, E. M., M. G. Martin and E. Turk (2003). "Intestinal absorption in health and disease--sugars." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**(6): 943-956.

Xiao, J., L. Sun, H. Yan, W. Jiao, Q. Miao, W. Feng, X. Wu, Y. Gu, A. Jiao, Y. Guo, X. Peng and A. Shen (2010). "Metaanalysis of P2X7 gene polymorphisms and tuberculosis susceptibility." *FEMS Immunol Med Microbiol* **60**(2): 165-170.

Xu, J., Y. Wang, D. S. Xu, K. F. Ruan, Y. Feng and S. Wang (2011). "Hypoglycemic effects of MDG-1, a polysaccharide derived from *Ophiopogon japonicas*, in the ob/ob mouse model of type 2 diabetes mellitus." *Int J Biol Macromol* **49**(4): 657-662.

Yamada, T. and D. H. Alpers (2003). *Textbook of gastroenterology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Yan, Z., A. Khadra, S. Li, M. Tomic, A. Sherman and S. S. Stojilkovic (2010). "Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating." *J Neurosci* **30**(42): 14213-14224.

Yan, Z., S. Li, Z. Liang, M. Tomic and S. S. Stojilkovic (2008). "The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions." *J Gen Physiol* **132**(5): 563-573.

Yoon, M. J., H. J. Lee, Y. S. Lee, J. H. Kim, J. K. Park, W. K. Chang, H. C. Shin and D. K. Kim (2007). "Extracellular ATP is involved in the induction of apoptosis in murine hematopoietic cells." *Biol Pharm Bull* **30**(4): 671-676.

Zendjabil, M. (2015). "Biological diagnosis of diabetes mellitus." *Pathol Biol (Paris)*.

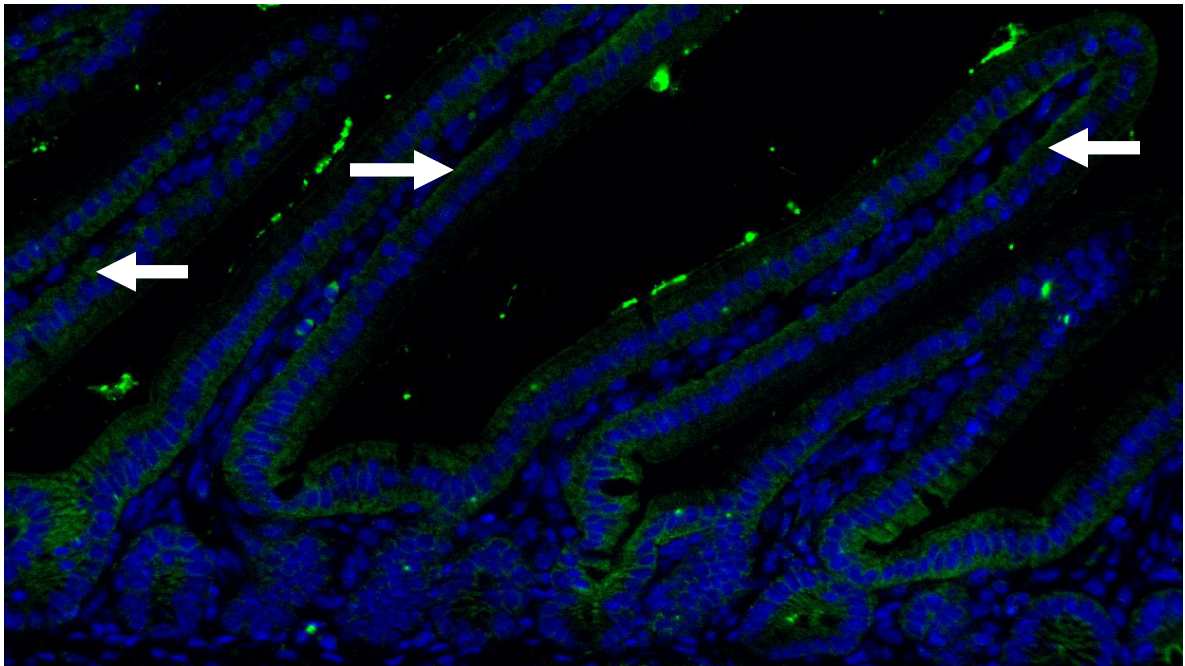
Zhang, M., H. Zhong, C. Vollmer and C. A. Nurse (2000). "Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors." *J Physiol* **525 Pt 1**: 143-158.

ANNEXES

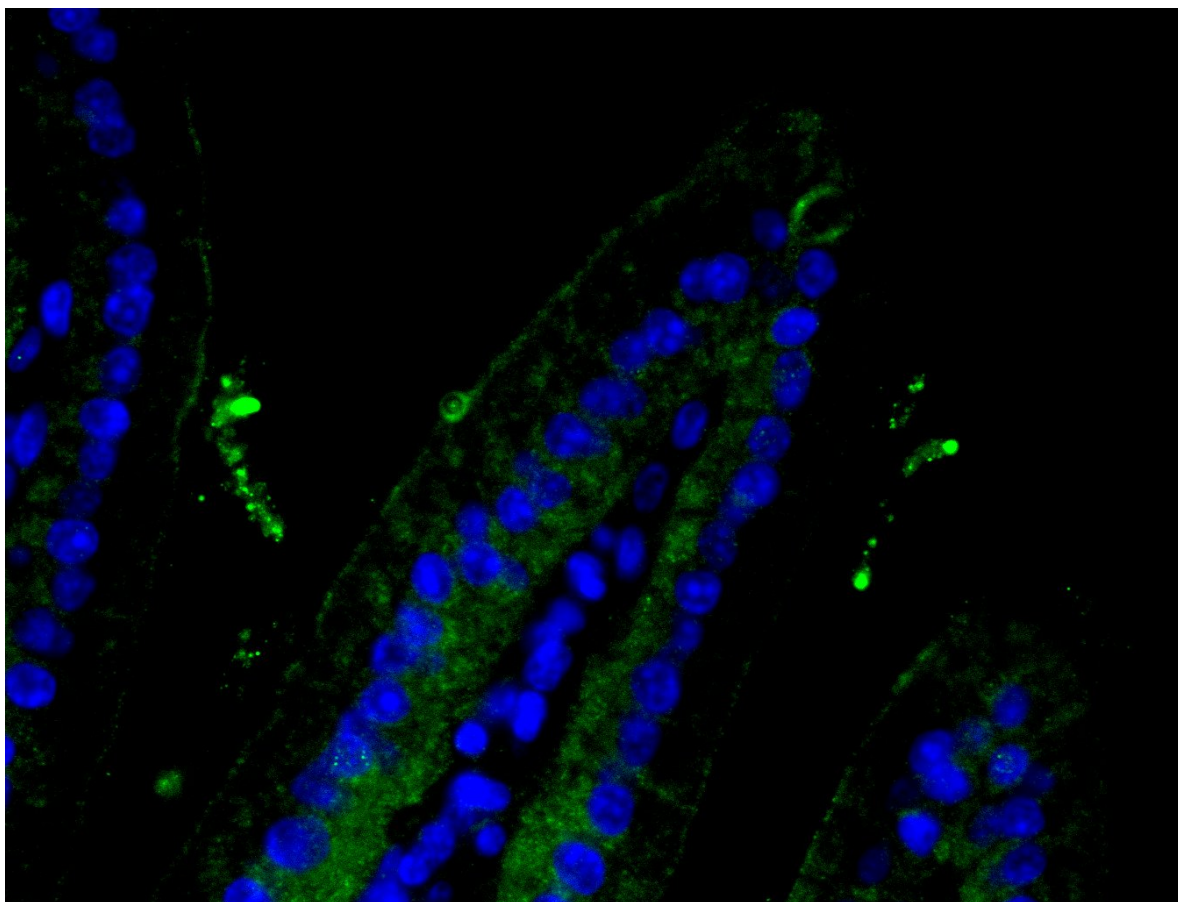
8.1 Localisation du transporteur GLUT2 dans les CEI des souris contrôles et *P2rx7*^{-/-}

Immunofluorescence indirecte et coloration des noyaux au Hoechts 33342 pour localiser le transporteur GLUT2 (fluorescence verte) sur des coupes de jéjunum de souris. Les flèches blanches pointent vers la membrane basolatérale des CEI tandis que les têtes de flèche pointent vers l'apex des CEI.

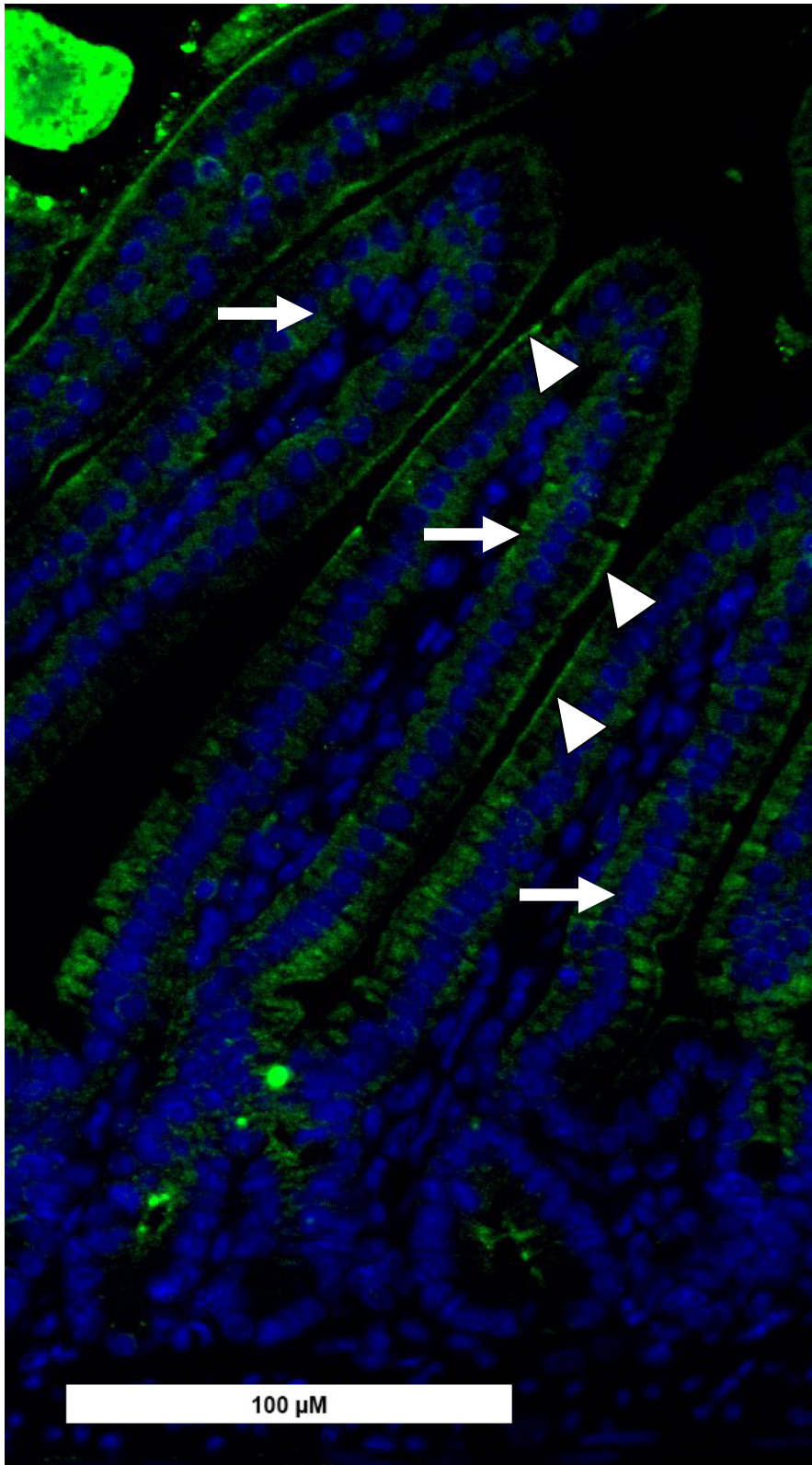
8.1.1 Souris contrôle au grossissement 20x



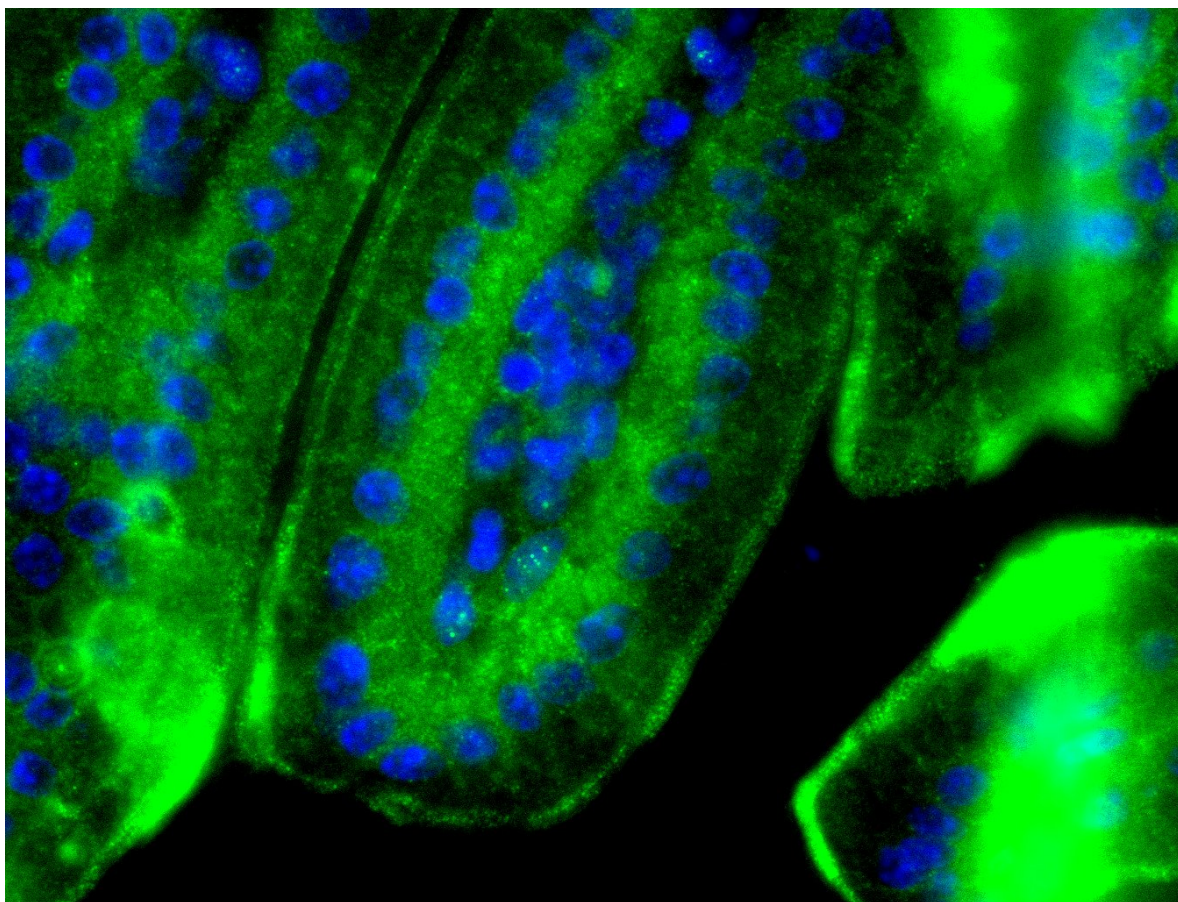
8.1.2 Souris contrôles au grossissement 63x



8.1.3 Souris *P2rx7*^{-/-} au grossissement 20x

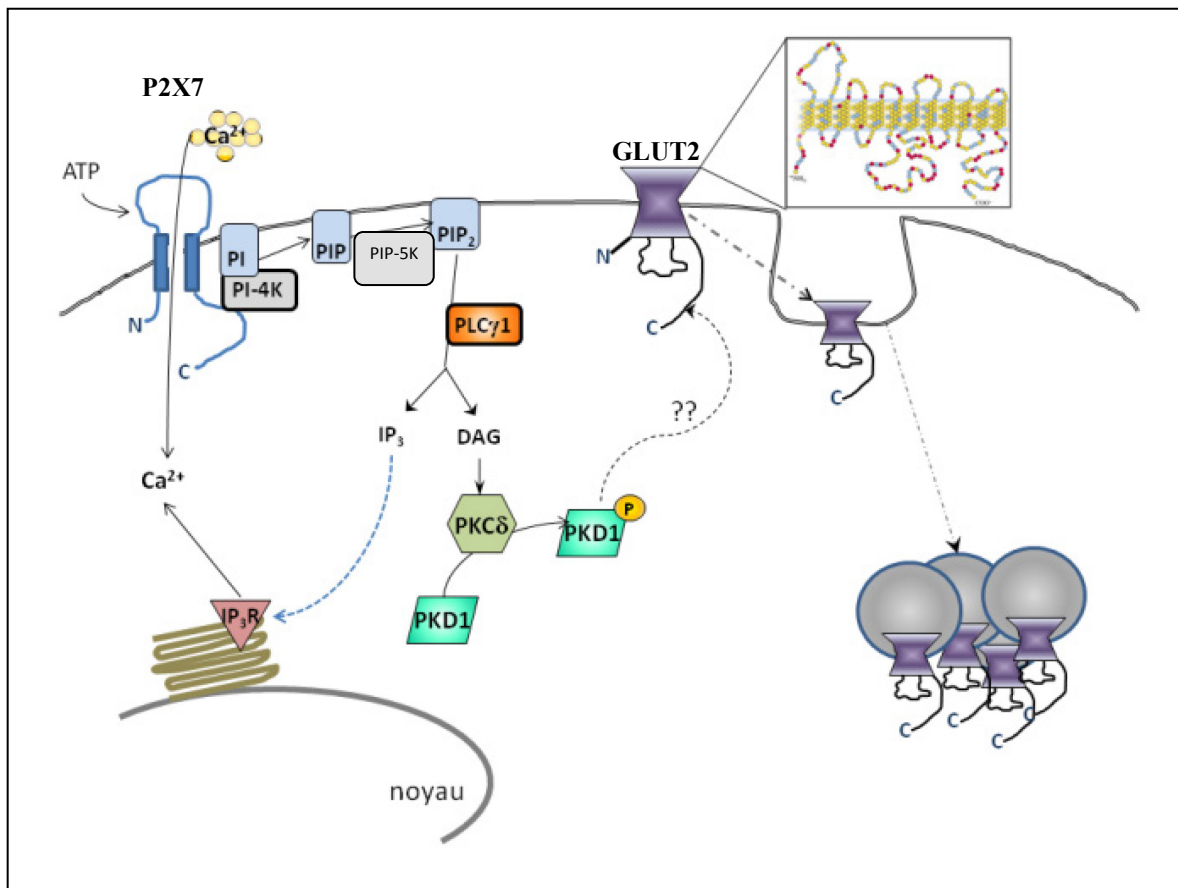


8.1.4 Souris $P2X7^{-/-}$ au grossissement 63x



8.2 Schéma bilan

8.2.1 La voie *PI4K-PLC γ -PKC* activée par *P2X7*



8.3 Autorisation de reproduire les figures

8.3.1 Pour la figure 1 :

Dear Mr. Bourzac,

Thank you for your permission request.

Encyclopaedia Britannica is happy to grant you permission to use our illustration "small intestine" only in your dissertation. We will waive the usual fee but ask that you use the following credit in your paper: "By courtesy of Encyclopaedia Britannica, Inc., copyright 2003; used with permission. »

Best regards,

Sylvia Wallace

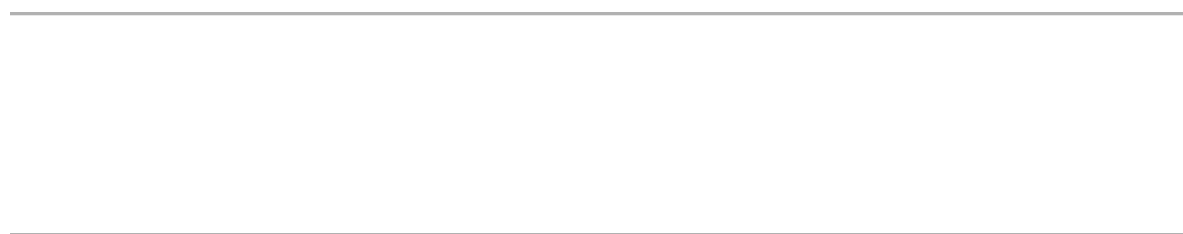
Permissions

EB, Inc.

8.3.2 Pour la figure 2 :

**NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 19, 2015



This is a License Agreement between Jean-François Bourzac ("You") and Nature

Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number

3620240532408

License date

May 01, 2015

Licensed content publisher

Nature Publishing Group

Licensed content publication

Nature Reviews Genetics

Licensed content title

Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control

Licensed content author

Cécile Crosnier, Despina Stamatakis and Julian Lewis

Licensed content date

May 1, 2006

Volume number

7

Issue number

5

Type of Use

reuse in a dissertation / thesis

Requestor type

academic/educational

Format

print and electronic

Portion

figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations

1

High-res required

no

Figures

FIGURE 1 | The distribution of epithelial cell types in the mammalian small intestine.

Author of this NPG article

no

Your reference number

None

Title of your thesis / dissertation

Le récepteur P2X7 est un acteur fin de la régulation de l'absorption du glucose intestinale mais très important pour l'homéostasie

Expected completion date

Jun 2015

Estimated size (number of pages)

100

Total

0.00 CAD

Terms and Conditions

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
- 2.
- 3.
- 4.
5. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
- 6.
- 7.
- 8.
9. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).

- 10.
- 11.
- 12.
13. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
- 14.
- 15.
- 16.

17. The credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd:
[JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)
For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd:
[JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

18.

19.

20.

21. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

22.

23.

24.

25. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

26.

27.

28.

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

8.3.3 Pour la figure 3 :



RightsLink®

Account
Info

Help



Title:

Apical GLUT2:A
Major Pathway of
Intestinal Sugar
Absorption

Author:

George L. Kellett,
Edith Brot-Laroche

Logged in as:

Jean-François
Bourzac

Account #:

3000903252

Publication: Diabetes
Publisher: American Diabetes Association
Date: Oct 1, 2005
 Copyright © 2005, American Diabetes Association

LOGOUT

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between ("You") and American Diabetes Association ("American Diabetes Association") consists of your order details and the terms and conditions provided by American Diabetes Association and Copyright Clearance Center.

License number	Reference confirmation email for license number
License date	May 01, 2015
Licensed content publisher	American Diabetes Association
Licensed content publication	Diabetes
Licensed content title	Apical GLUT2:A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption
Licensed copyright line	Copyright © 2005, American Diabetes Association
Licensed content author	George L. Kellett, Edith Brot-Laroche
Licensed content date	Oct 1, 2005
Volume number	54
Issue number	10
Type of use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic institution
Format	Print, Electronic
Portion	chart/graph/table/figure
Number of charts/graphs/tables/figures	1
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Canada

In the following language(s)	Original language plus one translation
Specific languages	in french if possible
With incidental promotional use	no
Lifetime unit quantity of new product	0 to 499
Specified additional information	fig 2: The apical GLUT2 model of intestinal glucose absorption before (A) and after (B) a meal from Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption George L. Kellett1 and Edith Brot-Laroche2 etes.54.10.3056 Diabetes October 2005 vol. 54 no. 10 3056-3062
The requesting person/organization	Bourzac Jean-François / Student of Université de Sherbrooke
Order reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Le récepteur P2X7 est un acteur fin de la régulation de l'absorption du glucose intestinale mais très important pour l'homéostasie
Expected completion date	Jun 2015
Expected size (number of pages)	100
Billing Type	Invoice
Billing address	Jean-François Bourzac
	Sherbrooke Canada Attn: Jean-François Bourzac
Total	0.00 CAD

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Pour la figure 4 :

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION LICENSE TERMS AND CONDITIONS

May 19, 2015

This is a License Agreement between Jean-François Bourzac ("You") and American Diabetes Association ("American Diabetes Association") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by American Diabetes Association, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3623081029234
License date	May 06, 2015
Licensed content publisher	American Diabetes Association
Licensed content publication	Diabetes
Licensed content title	Apical GLUT2:A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption
Licensed copyright line	Copyright © 2005, American Diabetes Association
Licensed content author	George L. Kellett, Edith Brot-Laroche
Licensed content date	Oct 1, 2005
Volume number	54
Issue number	10

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Academic institution
Format	Print, Electronic
Portion	chart/graph/table/figure
Number of charts/graphs/tables/figures	1
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Canada
In the following language(s)	Original language plus one translation
Specific languages	in french if possible
With incidental promotional use	no
The lifetime unit quantity of new product	0 to 499
Specified additional information	fig 2: The apical GLUT2 model of intestinal glucose absorption before (A) and after (B) a meal from Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption George L. Kellett1 and Edith Brot-Laroche2 etes.54.10.3056 Diabetes October 2005 vol. 54 no. 10 3056-3062
The requesting person/organization is:	Bourzac Jean-François / Student of Université de Sherbrooke
Order reference number	None
Title of your thesis /	Le récepteur P2X7 est un acteur fin

dissertation	de la régulation de l'absorption du glucose intestinale mais très important pour l'homéostasie
Expected completion date	Jun 2015
Expected size (number of pages)	100
Total	0.00 CAD

Terms and Conditions

STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL

Introduction

The publisher for this copyrighted content is American Diabetes Association. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your CCC account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Limited License

Publisher hereby grants to you a non-exclusive license to use this material. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process; any form of granted republication must be completed within one (1) year from the date hereof (although copies prepared before then may be distributed thereafter); and any electronic posting is limited to a period of one (1) year. This permission shall automatically terminate if fail to comply with the terms of this license.

Geographic Rights: Scope

Licenses may be exercised anywhere in the world.

Altering/Modifying Material: Not Permitted

You may not alter or modify the material in any manner (except that you may use, within the scope of the license granted, one or more excerpts from the copyrighted material, provided that the process of excerpting does not alter the meaning of the material or in any way reflect negatively on the publisher or any writer of the material), nor may you translate

the material into another language.

Reservation of Rights

Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

License Contingent on Payment

While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action

to protect its copyright in the materials.

Copyright Notice: Disclaimer

You _____ must include the following copyright and permission notice in connection with any reproduction of the licensed material: "American Diabetes Association [Insert Title of Publication, American Diabetes Association, [Insert Year of Publication]]. Copyright and all rights reserved. Material from this publication has been used with the permission of American Diabetes Association. »

Warranties: None

Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material and adopts on its own behalf the limitations and disclaimers established by CCC on its behalf in its Billing and Payment terms and conditions for this licensing transaction.

Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

No Transfer of License

This license is only granted you and your company (if noted in the license) and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in a writing and signed by both parties (or, in the

case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

Objection to Contrary Terms

Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

Jurisdiction:

This license transaction shall be governed by and construed in accordance with the laws of the Commonwealth of Virginia. You hereby agree to submit to the jurisdiction of the federal and state courts located in the Commonwealth of Virginia for purposes of resolving any disputes that may arise in connection with this licensing transaction.

Other Terms and Conditions:

None

v1.0

8.3.4 Pour la figure 5 :

RightsLink®

[Home](#)[Account Info](#)[Help](#)[Live](#)**Title:**

Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal

Logged in as:

Jean-François
Bourzac

Account #:

[LOGOUT](#)

women

Author: Alison Gartland,
Kristen K Skarratt,
Lynne J Hocking,
Claire Parsons,
Leanne Stokes et
al.

Publication: European Journal
of Human
Genetics

Publisher: Nature Publishing
Group

Date: Jan 11, 2012

Copyright © 2012, Rights Managed
by Nature Publishing Group

Creative Commons

The request you have made is considered to be non-commercial/educational. As the article you have requested has been distributed under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial 2.5), you may reuse this material for non-commercial/educational purposes without obtaining additional permission from Nature Publishing Group, providing that the author and the original source of publication are fully acknowledged.

For full terms and conditions of the Creative Commons license, please see the attached link <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2015 [Copyright Clearance Center, Inc.](#) All Rights Reserved. [Privacy statement](#). [Terms and Conditions](#).

Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com
