

Université de Sherbrooke

**Impacts moléculaires d'un excès d'acides gras sur l'androgénèse des cellules
surréaliennes**

Par
Fanny Béland
Programmes de physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en physiologie-biophysique

Sherbrooke, Québec, Canada
Mai, 2016

Membres du jury d'évaluation
Dr Jean-Patrice Baillargeon, programme de physiologie-biophysique
Dr Patrice Perron, programme de physiologie-biophysique
Dr Xavier Roucou, programme de biochimie

© Fanny Béland, 2016

RÉSUMÉ

Impacts moléculaires d'un excès d'acides gras sur l'androgénèse des cellules surrénaliennes

Par

Fanny Béland

Programmes de physiologie-biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie (endocrinologie), Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) touche entre 5 à 10 % des femmes en âge de procréer et est associé à de nombreuses complications. Ce désordre endocrinien est caractérisé par des niveaux circulants élevés d'androgènes, dont la production est principalement modulée par la P450c17 et son cofacteur, soit la P450oxydoréductase (POR). Plusieurs études démontrent que l'hyperandrogénie présente chez les femmes SOPK pourrait être causée par la formation de phénomènes toxiques survenant à la suite de l'exposition des tissus non adipeux à un excès d'acides gras non estérifiés (AGNE), appelé lipotoxicité. Ainsi, l'objectif de cette étude est de déterminer les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'hyperandrogénie induite par la surexposition des cellules productrices d'androgènes aux AGNE. Pour y arriver, les cellules surrénaliennes bovines (CSB) ont été exposées en présence de forskoline (Fsk; 1X/2 jours; 10 μ M; activateur des adénylates cyclases) et d'oléate (acide gras monoinsaturé, 2X/jour; 200 μ M) durant 48 heures. Par la suite, le milieu de culture a été prélevé afin de doser le DHEA (principal androgène surrénalien) par ELISA. De plus, les protéines ont été récoltées afin de déterminer l'expression protéique de la P450c17 et de POR par Western blot. Finalement, pour déterminer les activités 17 α hydroxylase et 17,20-lyase de la P450c17, la concentration de plusieurs stéroïdes a été déterminé par LC-MS/MS et le ratio produit/substrat a été effectué. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM. Ainsi, sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate (vs absence d'oléate) augmente la production de DHEA de 114% par les CSB (n=17; 214 \pm 20% vs 100 \pm 0%; p<0,0001). De plus, l'ajout d'oléate n'affecte pas l'expression de la P450c17 (n=8; 98 \pm 6% vs 100 \pm 0%; p=0,74) et de POR (n=7; 119 \pm 13% vs 100 \pm 0%; p= 0,22). Finalement, la présence d'oléate augmente l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 de 124% (n=7; 224 \pm 19% vs 100 \pm 0%; p= 0,02) et tends à augmenter l'activité 17,20-lyase de la P450c17 de 81% (n=7; 181 \pm 28% vs 100 \pm 0%; p= 0,08). Ainsi, l'augmentation de la production des androgènes induite par les AGNE pourrait être due principalement à leurs effets sur l'augmentation des deux activités enzymatiques de la P450c17, sans effet significatifs sur l'expression de la P450c17 ni de son cofacteur POR. Les mécanismes sous-jacents à l'augmentation des activités de la P450c17 demeurent à élucider.

Mots clés : Syndrome des ovaires polykystiques, SOPK, acides gras non estérifiés, AGNE, lipotoxicité, androgènes, glande surrénale, P450c17

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	x
Liste des abréviations	xi
1. Introduction	1
1.1 Le syndrome des ovaires polykystiques	2
1.1.1 Critères diagnostiques du SOPK	2
1.2 Androgenèse	3
1.2.1 Anatomie et physiologie de la glande surrénale.....	4
1.2.1.1 Corticosurrénale	4
1.2.1.2 Médullosurrénale.....	5
1.2.2 Stéroïdogénèse et androgenèse surrénalienne.....	6
1.2.3 Régulation de la stéroïdogénèse et de l'androgénèse	10
1.2.3.1 Rôle et mécanisme d'action de l'ACTH	10
1.2.3.2 Effet de l'insuline sur l'androgenèse	13
1.2.4 Régulation de la P450c17	13
1.2.4.1 P450oxydoréductase.....	15
1.2.4.2 Cytochrome b5.....	16
1.2.4.3 Phosphorylation des résidus sérines et thréonines	16
1.3 Lipotoxicité	17
1.3.1 Cause du SOPK.....	17
1.3.2 Métabolisme des acides gras.....	17
1.3.3 Mécanismes lipotoxiques	19
1.3.4 Effet de la lipotoxicité sur l'androgenèse.....	22
1.3.4.1 Mécanismes cellulaires reliant la lipotoxicité à l'hyperandrogénie	23
1.3.5 Implication des différents acides gras au niveau de la lipotoxicité.....	24
1.4 Thiazolidinediones	25
1.5 Préambule	27
1.6 Hypothèse/problématique	28
1.6.1 Objectifs.....	28

1.6.1.1	Objectif principal.....	28
1.6.1.2	Objectifs secondaires	28
2.	Matériel et méthodes.....	30
2.1	Culture cellulaire	30
2.1.1	Culture primaire bovine.....	30
2.1.2	Lignée cellulaire NCI-H295R.....	31
2.1.3	Culture primaire humaine.....	32
2.2	Stimulation cellulaire	33
2.3	Récolte cellulaire	33
2.4	Dosage.....	34
2.4.1	Dosage stéroïdien.....	34
2.4.2	Dosage du 8-isoprостane.....	34
2.4.3	Dosage protéique.....	35
2.5	Immunobuvardage (Western blot).....	36
2.6	Immunoprécipitation	37
2.7	Activité enzymatique	38
2.7.1	Bloc stéroïdien.....	42
2.8	Présentation des résultats	42
2.8.1	Analyses statistiques.....	43
3.	Résultats	44
3.1	Cellules surrénaliennes bovines.....	44
3.1.1	Effet de différents activateurs de la stéroïdogénèse sur la production de DHEA .44	
3.1.1.1	Effet de l'ACTH sur la production de DHEA.....	44
3.1.1.2	Effet de la Fsk sur la production de DHEA.....	46
3.1.1.3	Effets du palmitate 100 µM et de l'oléate 200 µM sur la production de DHEA	48
3.1.2	Effet de l'oléate 200 µM sur la synthèse de plusieurs molécules	50
3.1.2.1	Effet de l'oléate 200 µM sur la production de DHEA.....	51
3.1.2.2	Effet de l'oléate 200 µM sur la production d'androstènedione	52
3.1.2.3	Effet de l'oléate 200 µM sur la production de cortisol.....	53
3.1.2.4	Effet de l'oléate 200 µM sur la production de 8-isoprостane.....	54
3.1.3	Effet de la rosiglitazone 10 µM sur la synthèse de DHEA.....	55
3.1.3.1	Effet d'une exposition de 48h à la rosiglitazone 10 µM sur la production de DHEA	55
3.1.3.2	Effet d'une exposition prolongée à la rosiglitazone 10 µM sur la production de	
DHEA	57	

3.1.4	Effet de la pioglitazone 10 μ M sur la synthèse de DHEA	59
3.1.4.1	Effet d'une exposition de 48h à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA .	59
3.1.4.2	Effet d'une exposition prolongée à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA	61
3.1.5	Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la synthèse des androgènes	63
3.1.5.1	Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de la P450c17	63
3.1.5.2	Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de POR	66
3.1.6	Immunoprécipitation	69
3.1.7	Effet de l'oléate 200 μ M sur les activités enzymatiques de la P450c17	70
3.1.7.1	Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17	70
3.1.7.2	Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17	72
3.1.8	Bloc stéroïdien.....	73
3.2	Cellules NCI-H295R	77
3.2.1	Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production de DHEA	77
3.2.2	Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA	79
3.2.3	Immunoprécipitation	80
3.3	Cellules surrénaliennes humaines.....	81
3.3.1	Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production d'androstènedione.....	81
3.3.2	Effet de l'oléate 200 μ M sur la synthèse d'androstènedione et de cortisol	82
3.3.2.1	Effet de l'oléate 200 μ M sur la production d'androstènedione	82
3.3.2.2	Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de cortisol.....	84
4.	Discussion.....	85
4.1	Effets de l'oléate sur la production de différents stéroïdes	86
4.2	Effets de l'oléate sur la production de 8-isoprostane.....	89
4.3	Effets des thiazolidinediones sur la production de DHEA.....	90
4.4	Effets de l'oléate sur l'expression de la P450c17 et de POR.....	91
4.5	Effets de l'oléate sur l'activité enzymatique de la P450c17	92
5.	Conclusion	95
6.	Perspectives.....	97
7.	Remerciements.....	98
	Liste des références	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Histologie de la glande surrénale	6
Figure 2. Schématisation représentant les principales sources de cholestérol ainsi que la stéroïdogénèse précoce (Miller et Auchus, 2011).	7
Figure 3. Représentation de la stéroïdogénèse surrénalienne	9
Figure 4. Schématisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	11
Figure 5. Représentation du transfert d'électrons entre la P450c17 et la P450oxydoréductase	15
Figure 6. Illustration des mécanismes intracellulaires responsables de la lipotoxicité.....	19
Figure 7. Inhibition de la 3 β HSD par l'épostane	40
Figure 8. Schématisation d'une plaque de silice suite à la séparation des stéroïdes	41
Figure 9. Effet de concentrations croissantes d'ACTH sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines	45
Figure 10. Effet de concentrations croissantes de Fsk sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines	47
Figure 11. Effets du palmitate 100 μ M et de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines sous stimulation à l'ACTH 10 nM et à la Fsk 10 μ M.....	49
Figure 12. Augmentation de la production de DHEA par l'oléate 200 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines	51
Figure 13. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines	52
Figure 14. Augmentation de la production de cortisol par l'oléate 200 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines	53
Figure 15. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de 8-isoprostane par les cellules fasciculées et réticulées bovines	54
Figure 16. Effet d'une exposition de 48h à la rosiglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines	56

Figure 17. Effet d'une exposition prolongée à la rosiglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines	.58
Figure 18. Effet d'une exposition de 48h à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines60
Figure 19. Effet d'une exposition prolongée à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines	.62
Figure 20. Augmentation de l'expression protéique de la P450c17 par la Fsk 10 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines64
Figure 21. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines65
Figure 22. Augmentation de l'expression protéique de POR par la Fsk 10 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines67
Figure 23. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de POR par les cellules fasciculées et réticulées bovines68
Figure 24. Immunoprécipitation de SHP-1 au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines69
Figure 25. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines71
Figure 26. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines72
Figure 27. Augmentation de l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 mesurée par la conversion de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone par l'oléate 200 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines74
Figure 28. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-prégnénolone en DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines75
Figure 29. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-progestérone en androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines76
Figure 30. Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R78

Figure 31. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R.....	79
Figure 32. Immunoprécipitation de la P450c17 au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R	80
Figure 33. Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées humaines	82
Figure 34. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées humaines	83
Figure 35. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de cortisol par les cellules fasciculées et réticulées humaines	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des différents dosages effectués	35
Tableau 2. Caractéristiques des anticorps utilisés pour les immunobuvardages	37

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β HSD	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase / 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase
ACTH	Hormone corticotrope / adrenocorticotropic hormone
ADN	Acide désoxyribonucléique / deoxyribonucleic acid
AGNE	Acide gras non estérifié / Non esterified fatty acid
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique / Cyclic adenosine monophosphate
ARN	Acide ribonucléique / Ribonucleic acid
ARNm	Acide ribonucléique messenger / Messenger ribonucleic acid
ATP	Adénosine triphosphate / Adenosine triphosphate
CRH	Corticolibérine / Corticotropin-releasing hormone
DAG	Diacylglycérol / Diacylglycerol
DHEA	Déhydroépiandrosterone / Dehydroepiandrosterone
DHEAS	Sulfate de déhydroépiandrosterone / Dehydroepiandrosterone sulfate
DHT	Dihydrotestostérone / Dihydrotestosterone
DO	Densité optique / Optical density
ELISA	Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée / Enzyme linked immunosorbent assay
FAD	Flavine adénine dinucléotide / Flavin adenine dinucleotide
FMN	Flavine mononucléotide / Flavin mononucleotide
Fsk	Forskoline / Forskolin
GLUT4	Transporteur de glucose de type 4 / Glucose transporter type 4
GnRH	Gonadolibérine / Gonadorelin
HDL	Lipoprotéine de haute densité / High density lipoprotein
HSL	Lipase hormonosensible / Hormon-sensitive lipase

IGF-1	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline / Insulin-like growth factor-1
JNK	Kinase c-Jun N-terminale / c-Jun N-terminal kinase
KDa	Kilodalton / Kilodalton
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse / Chromatography-tandem mass spectrometry
LDL	Lipoprotéine de basse densité / Low density lipoprotein
LH	Hormone lutéinisante / Luteinizing hormone
LPL	Lipoprotéine lipase / Lipoprotein lipase
MC2	Récepteur des mélanocortines / melanocortin receptor
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate / Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NFκB	Facteur nucléaire kappa B/ Nuclear factor kappa B
PPARγ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma / Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PKA	Protéine kinase A / Protein kinase A
PKC	Protéine kinase C / Protein kinase C
POMC	Pro-opiomélanocortine / Pro-opiomelanocortin
POR	P450oxydoréductase / P450oxydoreductase
RER	Réticulum endoplasmique rugueux / Rough endoplasmic reticulum
ROS	Espèce réactive de l'oxygène / Réactive oxygen species
RXR	Récepteur X de rétinoïdes / Retinoid X receptor
SHBG	Globuline se liant aux hormones sexuelles / Sex hormone binding globulin
SOPK/PCOS	Syndrome des ovaires polykystiques / Polycystic ovary syndrome
StAR	Protéine régulatrice de la stéroïdogénèse/ Steroidogenic acute regulatory protein
TLR	Récepteur de type Toll / Toll-like receptors
TNFα	Facteur de nécrose tumorale / Tumor necrosis factor-α

TP	Température pièce / Room temperature
TSPO	Protéine translocatrice/ Translocator protein
TZD	Thiazolidinedione / Thiazolidinedione
UI	Unité internationale / Instruction unit

1. INTRODUCTION

Ce mémoire portera sur les impacts moléculaires engendrés par un excès d'acides gras sur la production des androgènes au niveau des cellules surrénaliennes afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents au développement du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Cette endocrinopathie, qui est principalement caractérisée par une hyperandrogénie, constitue le dérèglement hormonal le plus fréquent chez les femmes en âge de procréer et est associée à de nombreuses complications.

Récemment, notre laboratoire a démontré que l'exposition des cellules surrénaliennes à des niveaux élevés d'acides gras entraîne une augmentation de la sécrétion des androgènes (Bellanger *et al.*, 2012). D'autre part, il a été montré que l'élévation expérimentale des niveaux plasmatiques d'acide gras non estérifié (AGNE) chez des femmes en santé entraînait une augmentation des niveaux circulants d'androgènes (Mai *et al.*, 2008). Ainsi, nous avons proposé l'hypothèse générale que la lipotoxicité pourrait expliquer, du moins en partie, la surproduction androgénique des femmes atteintes du SOPK.

Les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre le lien entre la lipotoxicité et le développement de l'hyperandrogénie des femmes atteintes du SOPK ainsi que les mécanismes cellulaires sous-jacents à ce phénomène. Ces nouvelles connaissances pourraient permettre de développer des traitements plus ciblés qui seraient plus efficaces pour traiter le SOPK et ses conséquences à long terme.

1.1 Le syndrome des ovaires polykystiques

Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) est un désordre endocrinien qui touche entre 5 à 10 % des femmes en âge de procréer et qui est associé à de nombreuses complications métaboliques, tel que l'hypertension artérielle, la dyslipidémie athérogène, le diabète de type 2 et le cancer de l'endomètre (Torre et Fernandez, 2007). De plus, le SOPK est impliqué dans 82 % des cas d'hyperandrogénisme (Azziz *et al.*, 2004) et dans 75 % des cas d'infertilité anovulatoire (Franks, 1995).

1.1.1 Critères diagnostiques du SOPK

Les critères diagnostiques du SOPK ont beaucoup évolué depuis la découverte de ce syndrome par Stein et Leventhal en 1935. Selon le rapport de l'Androgen Excess & PCOS Society publié en 2006 (Azziz *et al.*, 2006), les patientes sont considérées comme étant atteintes du SOPK lorsqu'elles présentent : 1) une dysfonction ovarienne caractérisée par une oligoménorrhée ou par des ovaires d'apparences polykystiques et 2) une hyperandrogénie (niveaux d'androgènes circulants élevés, soit des niveaux de testostérone libre >25 pmol/L ou de testostérone totale $>2,1$ nmol/L selon les critères du centre hospitalier universitaire de Sherbrooke suite à la révision de la technique de dosage par LC-MS/MS) et 3) des signes d'hyperandrogénisme (manifestations cliniques de l'hyperandrogénie, telles que l'hirsutisme, l'acné ou la calvitie). Cependant, pour être diagnostiquées avec ce syndrome, les femmes ne doivent pas être atteintes de pathologies pouvant causer les mêmes signes cliniques que le SOPK, telles que l'hyperplasie congénitale des glandes surrénales, l'acromégalie, le syndrome de Cushing, l'hyperprolactinémie ou l'hypothyroïdie.

La plupart des chercheurs s'entendent pour dire que l'hyperandrogénie constitue la principale particularité du SOPK. Cette caractéristique, qui est présente chez la majorité des femmes atteintes du SOPK, est à l'origine de plusieurs manifestations cliniques de ce syndrome, tel que l'hirsutisme, l'acné et la calvitie. Malgré le fait que les ovaires constituent la principale source de l'hyperandrogénie présente chez les femmes atteintes du SOPK, il est important de noter que 25 à 60 % de ces femmes présentent des taux d'androgènes surrénaux élevés

(niveau > 2 écart-type de la moyenne des valeurs normales, Wild *et al.*, 1983), démontrant ainsi une implication non négligeable des glandes surrénales au niveau du développement de l'hyperandrogénie des femmes atteintes du SOPK. Un des androgènes qui est fréquemment utilisé en clinique comme marqueur de la sécrétion androgénique de la glande surrénale est le DHEAS. Ce dernier est produit en majeure partie par la glande surrénale (origine surrénalienne se situant entre 97 et 99%), il est le stéroïde le plus abondant au niveau sanguin après le cortisol, il est relativement stable durant la journée ainsi que durant le cycle menstruel et il est facilement quantifiable (Kumar *et al.*, 2005). Plusieurs facteurs tels que l'âge et l'ethnicité peuvent affecter les niveaux circulants de DHEAS. En effet, il a été démontré que les niveaux de DHEAS circulants diminuaient chez les femmes à partir de l'âge de 25 ans, phénomène aussi observable chez les femmes atteintes du SOPK (Moran *et al.*, 1999). D'un autre côté, il a été démontré que les niveaux d'androgènes surrénaliens étaient plus élevés durant l'adrénarchie chez les femmes ayant la peau noire que les femmes ayant la peau blanche (Pratt *et al.*, 1990). Ainsi, il est donc important de considérer ces facteurs lorsqu'un diagnostic de SOPK est posé.

1.2 Androgenèse

Les androgènes sont des stéroïdes responsables du maintien des fonctions sexuelles masculines et ils sont produits au niveau de deux organes, soit au niveau des gonades et des glandes surrénales. En physiologie, les cellules thécales ovariennes vont essentiellement produire des androgènes en réponse à une stimulation à l'hormone lutéale (LH) alors que les cellules surrénaliennes vont produire des androgènes en réponse à une stimulation à l'adrénocorticotrophine (ACTH) (Sewer et Waterman, 2003). Il a été démontré que les glandes surrénales et les ovaires contribuent à parts égales à la production de testostérone chez les femmes en âge de procréer (Piltonen *et al.*, 2002). Cependant, une étude de Cedars *et al.*, publiée en 1992, a démontré que l'hyperandrogénie des femmes atteintes du SOPK originait à 60 % de la synthèse androgénique ovarienne alors que 40 % de l'hyperandrogénie de ces femmes originait de la synthèse androgénique surrénalienne.

1.2.1 Anatomie et physiologie de la glande surrénale

Ainsi, puisque les cellules surréaliennes bovines constituent le modèle cellulaire le plus utilisé dans la littérature pour étudier la fonction de la glande surrénale et qu'il s'agit d'un modèle facilement accessible et ce, en grande quantité, nous avons décidé d'effectuer nos expérimentations au niveau de ce modèle cellulaire.

L'être humain possède deux glandes surrénales, soit une située sur le dessus de chaque rein. Cette glande endocrine est composée de deux parties, soit la corticosurrénale (partie externe) et la médullosurrénale (partie interne).

1.2.1.1 Corticosurrénale

Le cortex surrénalien, étudié depuis plus d'un siècle, constitue la principale partie de la glande surrénale. En effet, Arnold décrit pour la première fois les trois parties distinctes du cortex surrénalien en 1866 qu'il décida de nommer zone glomérulée (zone externe), zone fasciculée (zone intermédiaire) et zone réticulée (zone interne) (Arnold, 1866). Chacune de ces zones a un rôle ainsi qu'une morphologie différente (fig. 1).

La zone la plus externe de la corticosurrénale est la zone glomérulée. Cette zone est contiguë à la capsule et va produire des minéralocorticoïdes. L'aldostérone, principal minéralocorticoïde produit par les cellules de la zone glomérulée, est essentiellement sécrétée en réponse à une stimulation par l'angiotensine 2. Cette hormone, grâce à son action sur l'absorption et la sécrétion du sodium et du potassium au niveau des tubules collecteurs rénaux, permet la régulation de la concentration plasmatique de potassium, du volume sanguin et de la tension artérielle.

La zone centrale de la corticosurrénale est la zone fasciculée et elle constitue la zone la plus épaisse du cortex surrénalien. Les cellules de la zone fasciculée vont synthétiser des glucocorticoïdes de façon majoritaire (rat : corticostérone et homme : cortisol) et des androgènes de façon minoritaire. Le cortisol, sécrété par les cellules de la zone fasciculée et

réticulée en réponse à une stimulation à l'ACTH, est important dans la régulation de l'homéostasie en induisant, par exemple, le catabolisme protéique (Gallo-Payet et Battista, 2014).

La zone la plus interne de la corticosurrénale est la zone réticulée et celle-ci est adjacente à la médullosurrénale. Cette zone va synthétiser des androgènes de façon majoritaire (chez l'humain : DHEAS et DHEA) et des glucocorticoïdes de façon minoritaire. Les androgènes sont sécrétés par les cellules de la zone fasciculée et réticulée en réponse à une stimulation à l'ACTH. Ces hormones vont jouer plusieurs rôles métaboliques, tel qu'en participant au développement musculaire (Laue et Cutler, 1997).

1.2.1.2 Médullosurrénale

La médullosurrénale constitue la partie centrale de la glande surrénale et appartient au système endocrinien ainsi qu'au système nerveux autonome. Les cellules chromaffines de cette zone vont synthétiser et sécréter des catécholamines (l'adrénaline ainsi que la noradrénaline) lorsqu'elles sont stimulées à l'acétylcholine (Carmichael, 1998).

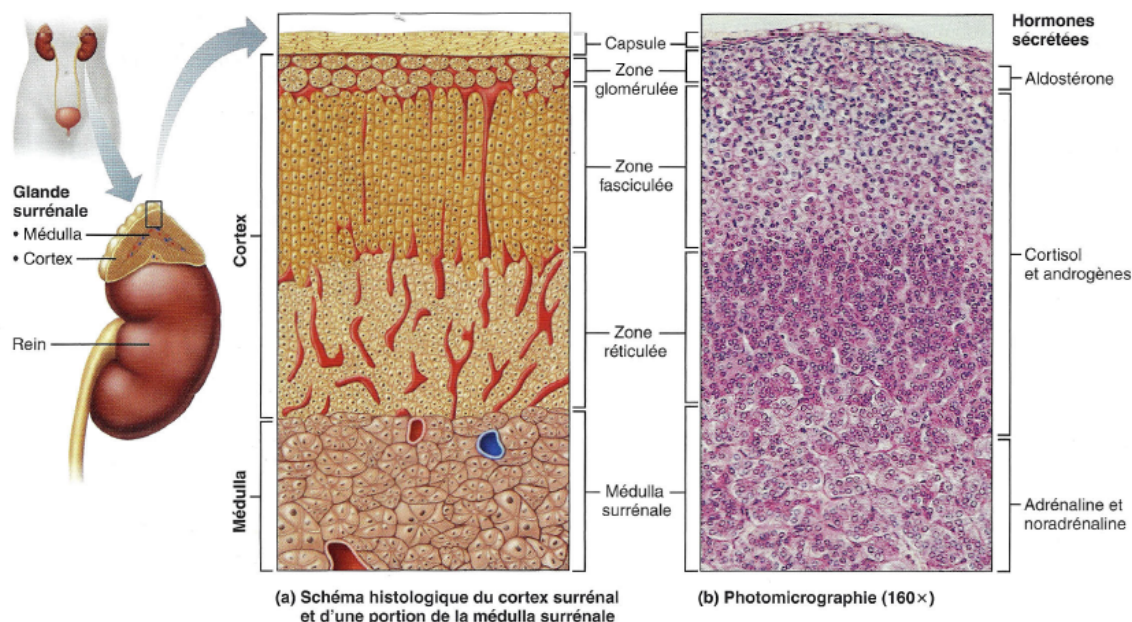


Figure 1. Histologie de la glande surrénale

A) Positionnement corporel de la glande surrénale. B) Diagramme représentant la corticosurrénale ainsi que la médullosurrénale. C) Photomicrographie de la corticosurrénale et de la médullosurrénale ainsi que les hormones produites et sécrétées par les différentes parties de la glande surrénale (160X). (Marieb *et al.*, 2010)

1.2.2 Stéroïdogénèse et androgénèse surrénalienne

La synthèse de tous les stéroïdes débute avec le cholestérol en guise de précurseur (fig. 2). Celui-ci provient principalement des lipoprotéines de basse densité (LDL) chez l'humain, le rongeur et le bovin (Yaguchi, 1998). Cependant, lorsque le cholestérol provenant des LDL n'est pas suffisant, les cellules surrénaliennes peuvent synthétiser du cholestérol de façon endogène en utilisant l'acétate comme précurseur (Laue et Cutler, 1997). Les cellules fasciculées et réticulées emmagasinent le cholestérol sous forme d'esther dans des vacuoles jusqu'à ce qu'elles reçoivent un stimulus de l'ACTH, qui va entraîner la formation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). L'AMPC est un second messager qui va mener à l'activation de la protéine kinase A (PKA), une enzyme qui va permettre la libération des esters de cholestérol au niveau du cytoplasme. Ces lipides estérifiés vont par la suite entrer en contact avec la lipase hormonosensible (HSL), une enzyme qui catalyse la

conversion des esters de cholestérol en cholestérol libre pour ainsi permettre l'entrée du cholestérol au niveau de la mitochondrie grâce à une protéine nommée *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR). StAR va interagir avec la protéine translocatrice (TSPO) pour permettre le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie et cette réaction est l'étape limitante de la synthèse des stéroïdes (Walsh *et al.*, 2000). Par la suite, le cholestérol va être converti en prégnénolone par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (P450scc) et cette molécule va par la suite sortir de la mitochondrie pour ainsi se diriger au niveau du réticulum endoplasmique, où elle va rencontrer plusieurs enzymes, tel que la P450c17 et la 3 β HSD.

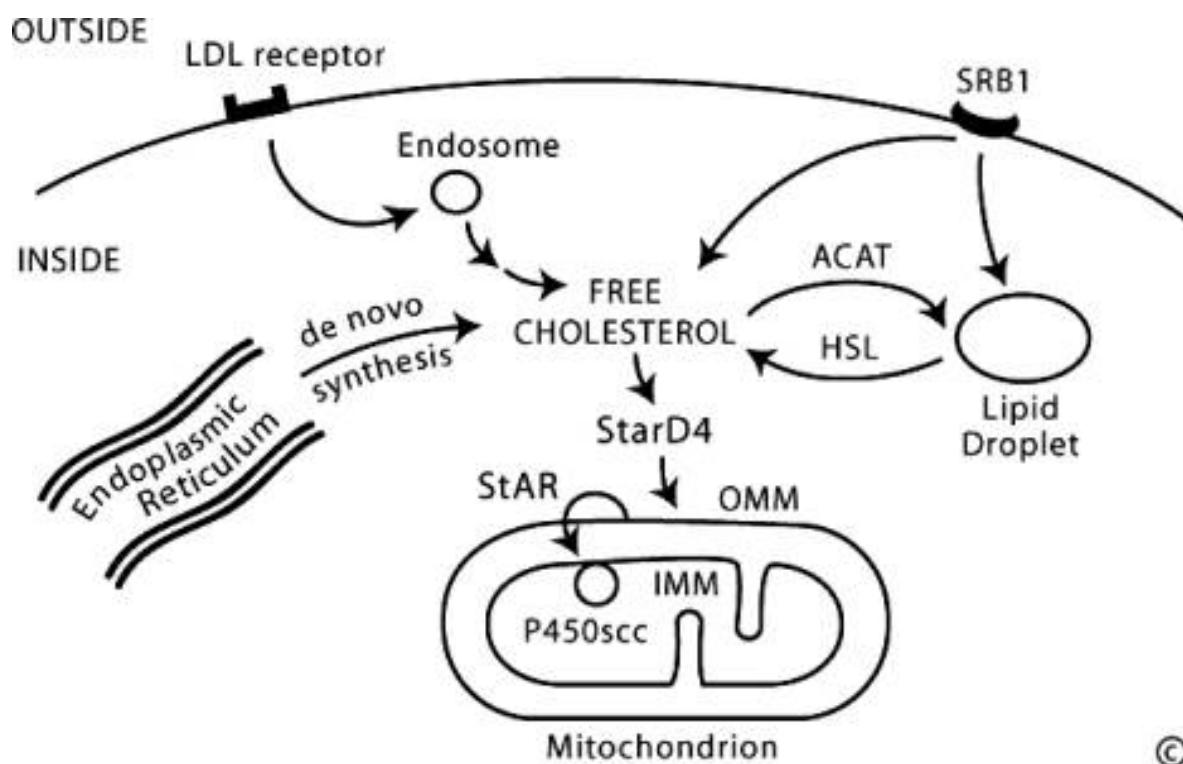


Figure 2. Schématisation représentant les principales sources de cholestérol ainsi que la stéroïdogenèse précoce (Miller et Auchus, 2011).

La P450c17 est une enzyme grandement impliquée dans la synthèse des androgènes. Cette enzyme est seulement exprimée au niveau du réticulum endoplasmique des cellules de la zone fasciculée et de la zone réticulée des mammifères et possède 2 activités enzymatiques, soit l'activité 17 α hydroxylase et l'activité 17,20-lyase. L'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 va catalyser l'hydroxylation de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone ainsi que l'hydroxylation de la progestérone en 17OH-progestérone et cette réaction s'effectue principalement au niveau de la zone fasciculée du cortex surrénalien afin de former des glucocorticoïdes. L'activité 17,20-lyase de la P450c17 va catalyser la conversion de la 17OH-prégnénolone en DHEA ainsi que la conversion de la 17OH-progestérone en androstènedione et cette réaction s'effectue essentiellement au niveau de la zone réticulée du cortex surrénalien afin de former des androgènes (fig. 3). Chez la femme, le DHEAS est l'androgène le plus abondant retrouvé au niveau de la circulation sanguine, suivi par le DHEA, l'androstènedione, la testostérone et la 5 α -hydrotestostérone (DHT) (Meunier, 2005 ; Gardner et Shoback, 2007). Le DHEAS est formé à partir du DHEA sous l'action de plusieurs sulfotransférases (Rizner, 2016).

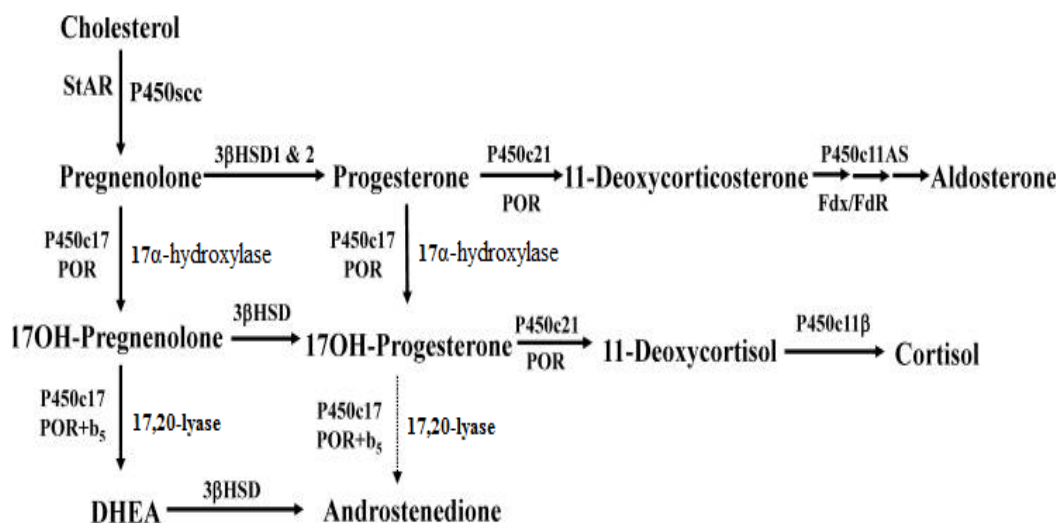


Figure 3. Représentation de la stéroïdogénèse surrénalienne

Le cholestérol est le précurseur de tous les stéroïdes et celui-ci est converti en prégnénolone à l'intérieur de la mitochondrie. Au niveau de la zone glomérulée, la prégnénolone est convertie en minéralocorticoïdes (majoritairement en aldostérone). Au niveau de la zone fasciculée, la prégnénolone est principalement convertie en glucocorticoïdes (majoritairement en cortisol). Finalement, au niveau de la zone réticulée, la prégnénolone est principalement convertie en androgènes (majoritairement en DHEA) (Miller et Auchus, 2011).

1.2.3 Régulation de la stéroïdogénèse et de l'androgénèse

1.2.3.1 Rôle et mécanisme d'action de l'ACTH

L'ACTH est une hormone de 39 acides aminés produite et sécrétée par les cellules corticotrophes de l'adénohypophyse. Ainsi, lorsqu'un stress physique ou psychologique survient, les cellules neurosécrétrices du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus vont libérer la corticolibérine (CRH; *corticotropin-releasing hormone*) au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire. Ce peptide de 41 acides aminés va stimuler la formation de l'ACTH à partir de son précurseur, la pro-opimélanocortine (POMC) ainsi que son relargage au niveau de la circulation systémique (Montero-Melendez, 2015). Par la suite, l'ACTH va se lier au récepteur MC2 (*melanocortin receptor 2*), exprimé au niveau de la zone glomérulée et fasciculée de la glande surrénale. Il a été démontré que l'ACTH entraîne une augmentation de l'expression du récepteur MC2 ainsi qu'une désensibilisation cellulaire lors d'une exposition prolongée (Liakos *et al.*, 2000, Kramer *et al.*, 1983). La liaison de l'ACTH à son récepteur provoque un changement de conformation de ce dernier et entraîne l'activation de l'adénylate cyclase, une enzyme qui va catalyser la conversion de l'ATP en AMPc. L'AMPc va finalement activer la protéine kinase A (PKA) avant d'être dégradée par des phosphodiesterases. L'activation de la PKA va entraîner l'activation de plusieurs protéines, telle que la P450c17. En effet, la PKA va phosphoryler les sites de phosphorylation de la P450c17 entraînant ainsi son activation. D'un autre côté, il a été démontré que l'administration de doses supraphysiologiques d'ACTH (28 à 40 UI) deux fois par jour durant 4 à 6 jours entraîne une augmentation de l'expression protéique de la P450c17 de 50 fois au niveau des glandes surrénales de lapins (Mach et Fevold, 1994). Ce phénomène pourrait être expliqué par le fait que l'ACTH, administré de façon chronique et supraphysiologique, provoque une hyperplasie des cellules de la zone fasciculée. Ainsi, l'augmentation de l'expression protéique de la P450c17 peut être due à une augmentation du nombre de cellules qui la produisent.

L'ACTH est un des composés principaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et est impliqué dans la gestion du stress en régulant la sécrétion des glucocorticoïdes grâce à une boucle de rétroaction négative (fig. 4). L'ACTH et le cortisol induisent des changements au niveau de leur propre cycle de sécrétion. En effet, le cortisol inhibe la formation de CRH ainsi que la formation de l'ACTH, permettant ainsi d'inhiber sa propre production. De plus, l'ACTH exerce elle aussi des effets rétroactifs sur l'hypothalamus et inhibe la libération de CRH (boucle de rétroaction courte), permettant ainsi d'inhiber sa propre production ainsi que celle du cortisol. D'un autre côté, il est important de noter que les androgènes ne participent pas à la boucle de rétroaction négative.

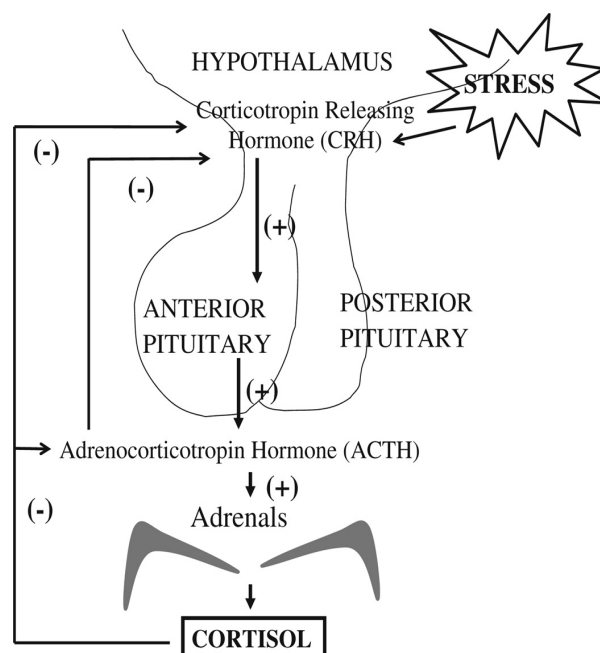


Figure 4. Schématisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Lorsqu'un individu subit un stress physique ou psychologique, l'hypothalamus sécrète la corticolibérine (CRH), entraînant ainsi la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. Cette hormone va par la suite stimuler la sécrétion de cortisol et d'androgènes au niveau des glandes surrénales. L'augmentation des niveaux plasmatiques de cortisol va entraîner l'inhibition de la formation de CRH et d'ACTH, permettant ainsi d'inhiber sa propre production. De plus, l'ACTH exerce elle aussi des effets rétroactifs sur l'hypothalamus en inhibant la libération de CRH (Golden, 2011).

L'ACTH va réguler la synthèse des stéroïdes de façon aiguë et prolongée. En effet, dans les quelques minutes suivant sa libération, l'ACTH va stimuler l'entrée du cholestérol au niveau des cellules surrénaliennes et des mitochondries, initiant ainsi la stéroïdogénèse (Bisgaier *et al.*, 1985, Nishikawa *et al.*, 1996). D'un autre côté, dans les heures suivant sa libération, l'ACTH va stimuler la formation de l'ARNm de plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes. En effet, l'incubation de cellules surrénaliennes humaines en présence d'une dose unique de 10^{-8} M d'ACTH durant 24 h et 48 h augmente la formation de l'ARNm de la P450_{scc} et la P450_{c17} (Di Blasio *et al.*, 1986). De plus, l'ACTH augmente l'activité enzymatique de plusieurs enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, telles que la 3β HSD (Trudel *et al.*, 1991). Pour terminer, il a été démontré que l'ACTH stimule la croissance des cellules de la zone fasciculée et de la zone glomérulée (Stachowiak *et al.*, 1990) ainsi que la synthèse des corticostéroïdes et des androgènes (Vaena de Avalos *et al.*, 1998, Bellanger *et al.*, 2012).

Une des principales maladies reliées à une sécrétion élevée d'ACTH est la maladie de Cushing. Cette pathologie est due à une tumeur sécrétrice d'ACTH qui se retrouve dans l'hypophyse. Cette tumeur stimule le cortex surrénalien, entraînant ainsi une hyperplasie des glandes surrénales avec hypersécrétion de cortisol et d'androgènes. Une autre maladie associée à des niveaux plasmatiques élevés d'ACTH est l'hyperplasie congénitale des glandes surrénales et cette pathologie est due à l'inhibition d'une ou plusieurs enzymes impliquées dans la formation des glucocorticoïdes. Ainsi, les faibles taux plasmatiques de cortisol vont causer une diminution du rétrocontrôle négatif de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, entraînant ainsi une augmentation de la sécrétion de CRH et de l'ACTH, résultant en une augmentation de l'androgénèse par le cortex surrénalien (Gallo-Payet, 2013).

Une autre façon de stimuler la stéroïdogénèse *in vitro* est l'utilisation de la forskoline (Fsk). Ce composé permet d'activer les adénylates cyclases, entraînant ainsi la formation d'AMPc au niveau de plusieurs modèles cellulaires. Cette molécule a la capacité de mimer l'effet de l'ACTH tout en ne se liant pas au récepteur MC2 (Barovsky *et al.*, 1983).

1.2.3.2 Effet de l'insuline sur l'androgénèse

Quelques études ont démontré que l'insuline augmente la production des androgènes, et ce, tant au niveau des ovaires que des glandes surrénales. En effet, il a été démontré que l'incubation de cellules thécales provenant de femmes SOPK avec une concentration de 20 µg/mL d'insuline durant 16 heures augmente de 13 fois la production de testostérone par ces cellules, comparativement à une augmentation de 3,3 fois pour les cellules thécales provenant de femmes saines (Nestler *et al.*, 1998). D'un autre côté, il a été démontré que l'incubation de cellules surrénales humaines à une concentration physiologique d'insulin-like growth factor-1 (IGF-1 ; hormone ayant une structure moléculaire similaire à l'insuline qui est principalement sécrétée par le foie et qui joue un rôle important dans la croissance de l'enfant) ou d'insuline augmente la formation de l'ARN de la P450c17 et de la 3βHSD, et ce, en présence ou en absence d'ACTH (Kristiansen *et al.*, 1997). Pour terminer, une étude de 2007 a démontré qu'une administration de 8 jours de diazoxide (inhibiteur de la sécrétion pancréatique d'insuline) à des femmes minces et insulinosensibles atteintes du SOPK permet de diminuer les niveaux d'androgènes circulants (Baillargeon et Carpentier, 2007).

1.2.4 Régulation de la P450c17

Le gène de la P450c17, nommé CYP17, est localisé sur le chromosome 10q24-q25 (Sparkes *et al.*, 1991) et celui-ci encode pour une protéine de 508 acides aminés ayant un poids moléculaire de 57 kDa (Cloutier *et al.*, 1997). La principale caractéristique de cette enzyme est le fait qu'elle possède deux activités enzymatiques, soit l'activité 17αhydroxylase qui mène à la formation des glucocorticoïdes et l'activité 17,20-lyase qui mène à la formation des androgènes. Comme il a été mentionné précédemment, l'activité 17αhydroxylase de la P450c17 va catalyser l'hydroxylation de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone ainsi que l'hydroxylation de la progestérone en 17OH-progestérone et cette réaction s'effectue principalement au niveau de la zone fasciculée du cortex surrénalien afin de former des glucocorticoïdes. D'un autre côté, l'activité 17,20-lyase de la P450c17 va catalyser la conversion de la 17OH-prégnénolone en DHEA ainsi que la conversion de la 17OH-

progestérone en androstènedione et cette réaction s'effectue essentiellement au niveau de la zone réticulée du cortex surrénalien afin de former des androgènes. Cependant, il est important de noter que la 17OH-prégnénolone et la 17OH-progestérone ne seront pas totalement converties en androgènes puisque ces molécules peuvent être utilisées pour la formation de glucocorticoïdes au niveau de la glande surrénale, ce qui survient surtout dans la zone fasciculée. Finalement, il est important de noter que l'expression de la P450c17 au niveau de la glande surrénale est exclusive aux mammifères et absente chez les rongeurs adultes (Brière *et al.*, 1997)

Ainsi, pour permettre la formation des glucocorticoïdes et des androgènes, la progestérone, la prégnénolone ainsi que leurs dérivés hydroxylés vont se lier au seul et unique site actif de la P450c17, qui est constitué d'un groupement hème et d'un atome de fer (Zuber *et al.*, 1986). La P450c17 possède un autre site de liaison se situant à l'opposé du site actif où la P450oxydoréductase (POR) va se lier afin de catalyser le transfert de deux électrons du NADPH au groupement hème de la P450c17 pour ainsi augmenter son activité 17,20-lyase (Auchus et Miller, 1999). De plus, il a été démontré chez l'humain et le bovin que l'activité 17,20-lyase de la P450c17 convertit de façon plus efficace la 17OH-prégnénolone en DHEA que la 17OH-progestérone en androstènedione dû à la plus grande affinité du 17OH-prégnénolone pour l'enzyme (Miller et Tee, 2014).

L'activité 17,20-lyase de la P450c17 est modulée par la présence de deux cofacteurs, soit par la présence de la P450oxydoréductase et du cytochrome b5 ainsi que par la phosphorylation de ses résidus sérines et thréonines (fig. 5).

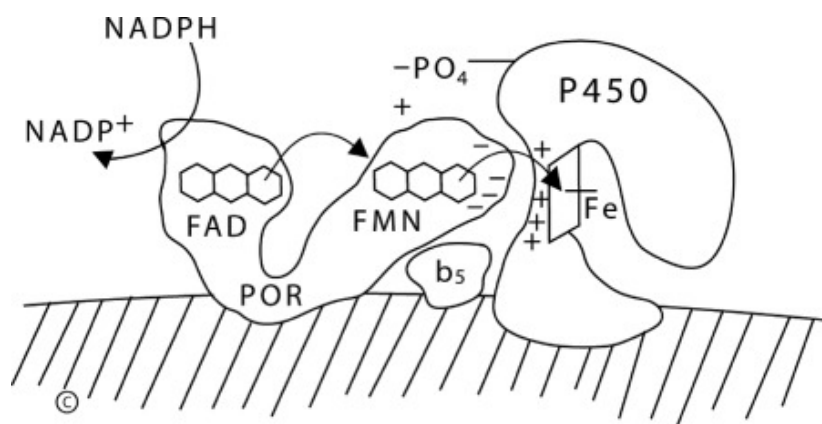


Figure 5. Représentation du transfert d'électrons entre la P450c17 et la P450oxydoréductase

L'activité 17,20-lyase de la P450c17 (P450) est responsable de la synthèse des androgènes. Il a été démontré que le transfert des deux électrons de la P450oxydoréductase (POR) au groupement hème de la P450c17 augmente l'activité 17,20-lyase de l'enzyme. Le cytochrome b5 (b5) ainsi que la phosphorylation des résidus sérines et thréonines de la P450c17 (-PO₄) augmentent l'efficacité de la liaison entre la P450c17 et POR, augmentant ainsi l'activité 17,20-lyase de la P450c17 et subséquemment, la production des androgènes (Miller et Auchus, 2011).

1.2.4.1 P450oxydoréductase

La P450oxydoréductase est une flavoprotéine de 82 KDa qui catalyse le transfert de deux électrons du NADPH au groupement hème de la P450c17. La protéine POR est constituée de deux domaines distincts, soit un domaine associé à la flavine adénine dinucléotide (FAD) et un domaine associé à la flavine mononucléotide (FMN). Lorsque le NADPH transfère deux électrons à la protéine POR, celle-ci va subir un changement de conformation qui va entraîner l'alignement de ses deux domaines et ainsi, le transfert des deux électrons de la protéine POR au groupement hème de la P450c17 (Miller, 2005). Il a été démontré que la présence de POR augmente l'activité 17,20-lyase de la P450c17 et subséquemment, la production d'androgènes. En effet, une étude de Yanagibashi et Hall, publiée en 1986, a démontré que la présence de la protéine POR augmente de façon significative l'activité 17,20-lyase de la

P450c17 tout en affectant très peu l'activité 17 α hydrolase de l'enzyme au niveau des glandes surrénales de porc (Yanagibashi et Hall, 1986).

1.2.4.2 *Cytochrome b5*

Le cytochrome b5 est une protéine de 134 acides aminés qui est principalement exprimée au niveau des cellules de la zone réticulée de la glande surrénale. Cette protéine augmente l'activité 17,20-lyase de la P450c17 en facilitant la liaison ainsi que le transfert d'électrons de la protéine POR au groupement hème de la P450c17 (Miller, 2005). En effet, la présence de ce facilitateur allostérique permet d'augmenter de 10 fois l'activité 17,20-lyase de la P450c17 tout en n'affectant pas l'activité 17 α hydroxylase de l'enzyme (Auchus *et al.*, 1998).

1.2.4.3 *Phosphorylation des résidus sérines et thréonines*

La phosphorylation des résidus sérines et thréonines de la P450c17 est nécessaire afin d'observer l'activité 17-20-lyase de cette enzyme. La phosphorylation des résidus sérines et thréonines de la P450c17 semble être effectuée par une protéine kinase dépendante de l'AMPc mais la nature exacte de cette enzyme n'est toujours pas identifiée, de même que la position des résidus qui subissent l'ajout d'un groupement phosphate (Miller, 2005).

D'un autre côté, il a été démontré que la présence de phosphatase alcaline, enzyme qui catalyse la déphosphorylation de son substrat, inhibe l'activité 17,20-lyase de la P450c17 tout en n'affectant pas l'activité 17 α hydroxylase de l'enzyme (Zhang *et al.*, 1995). Ces données permettent donc de conclure que l'activité 17,20-lyase de la P450c17 est grandement influencée par le niveau de phosphorylation de l'enzyme.

Pour terminer, une étude de Pandey et Miller, publiée en 2005, a démontré les effets du cytochrome b5 et de POR sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17. Ainsi, les auteurs ont exposé la P450c17 en présence de concentration constante de cytochrome b5 et de concentrations croissante de POR. Ainsi, les résultats ont démontré que l'exposition de la

P450c17 en présence de concentrations croissantes de POR augmente son activité 17,20-lyase et que cette activité est toujours plus grande en présence de cytochrome b5 (Pandey et Miller, 2005).

1.3 Lipotoxicité

1.3.1 Cause du SOPK

Les facteurs menant au SOPK ne sont pas bien connus à ce jour, mais plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le développement de cette maladie. Ainsi, les hypothèses émises sont : 1) une anomalie au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse des androgènes (Rodin *et al.*, 1994); 2) une altération au niveau de l'action de l'insuline, entraînant une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie compensatoire (Nestler *et al.*, 1998); 3) une altération dans la sécrétion de différentes adipokines par le tissu adipeux (Escobar-Morreale *et al.*, 2006); 4) un défaut au niveau de la sécrétion de l'hormone gonadolibérine (GnRH) (Henderson *et al.*, 2011) et 5) la présence d'inflammation chez les femmes atteintes du SOPK (Gonzalez, 2015).

Notre laboratoire a proposé l'hypothèse générale que la lipotoxicité pourrait expliquer, du moins en partie, la surproduction androgénique des femmes atteintes du SOPK (Baptiste *et al.*, 2010). Ainsi les différents aspects de cette hypothèse seront décrits dans cette section.

1.3.2 Métabolisme des acides gras

Les acides gras sont des molécules hydrophobes qui jouent un rôle très important au niveau de la cellule et ce, tant au niveau structurel qu'énergétique. Ces molécules lipidiques sont oxydées au niveau des tissus non adipeux par un mécanisme mitochondrial appelé β -oxydation afin de procurer un apport énergétique à la cellule (Marieb *et al.*, 2010). En effet, les acides gras constituent la source énergétique majeure d'un très grand nombre de tissus tels que les muscles, le cœur, le foie ainsi que le cortex rénal et ce, particulièrement en période

interprandiale, qui correspond à la période entre les repas (Owen *et al.*, 1979). Cependant, lorsque les acides gras ne sont pas oxydés en totalité, ces molécules vont être emmagasinées sous forme de triglycérides au niveau des tissus adipeux afin de former une réserve énergétique. Ce phénomène, qui survient lorsque les niveaux d'ATP intracellulaire et de glucose sanguin sont élevés, est appelé lipogénèse (Marieb *et al.*, 2010).

Lorsque les acides gras sont présents en excès au niveau plasmatique et que leur utilisation intracellulaire n'est pas suffisante, une surcharge d'acides gras peut survenir au niveau des tissus non adipeux, dont la capacité de lipogénèse est faible normalement, et ainsi engendrer des effets délétères. Ce phénomène, appelé lipotoxicité, est défini comme étant l'ensemble des conséquences cellulaires néfastes d'une exposition excessive des tissus non adipeux aux acides gras non estérifiés (Carpentier, 2008).

Les acides gras vont déborder du tissu adipeux lorsque celui-ci n'est plus capable de les stocker de façon suffisante. Une étude publiée en 2010 a démontré qu'une dysfonction adipocytaire, caractérisée par la présence d'une hypertrophie cellulaire, d'une altération de la signalisation de l'insuline et d'une infiltration de macrophages, diminue la capacité des cellules graisseuses à emmagasiner des triglycérides entraînant ainsi un débordement des AGNE vers les tissus non adipeux (Cusi, 2010). Cependant, il est important de noter que les phénomènes lipotoxiques peuvent survenir chez des individus non obèses comme chez les individus obèses. En effet, il a été démontré que les patients non obèses qui étaient prédisposés à développer un diabète de type 2 présentaient une dysfonction adipocytaire ainsi que des niveaux plasmatiques de triglycérides et d'insuline à jeun élevés (Henninger *et al.*, 2014). Les résultats de cette étude suggèrent qu'un débordement des AGNE peut aussi survenir chez des individus non obèses, ce qui augmenterait les concentrations d'AGNE au niveau des tissus non adipeux et subséquemment, entraînerait des effets délétères au niveau cellulaire. Ainsi, la lipotoxicité semble être un phénomène qui est associé à une dysfonction du tissu adipeux et non directement à l'obésité. Il est important de noter que l'obésité peut entraîner une dysfonction des adipocytes lorsque la capacité de stockage de ces cellules sera atteinte et nous croyons que ce phénomène pourrait exacerber ou dévoiler le SOPK chez les

femmes qui sont prédisposées génétiquement ainsi que chez les femmes non prédisposées génétiquement à développer ce syndrome.

1.3.3 Mécanismes lipotoxiques

Plusieurs mécanismes intracellulaires sont à l'origine de la lipotoxicité et ceux-ci seront développés brièvement dans cette sous-section (fig. 6).

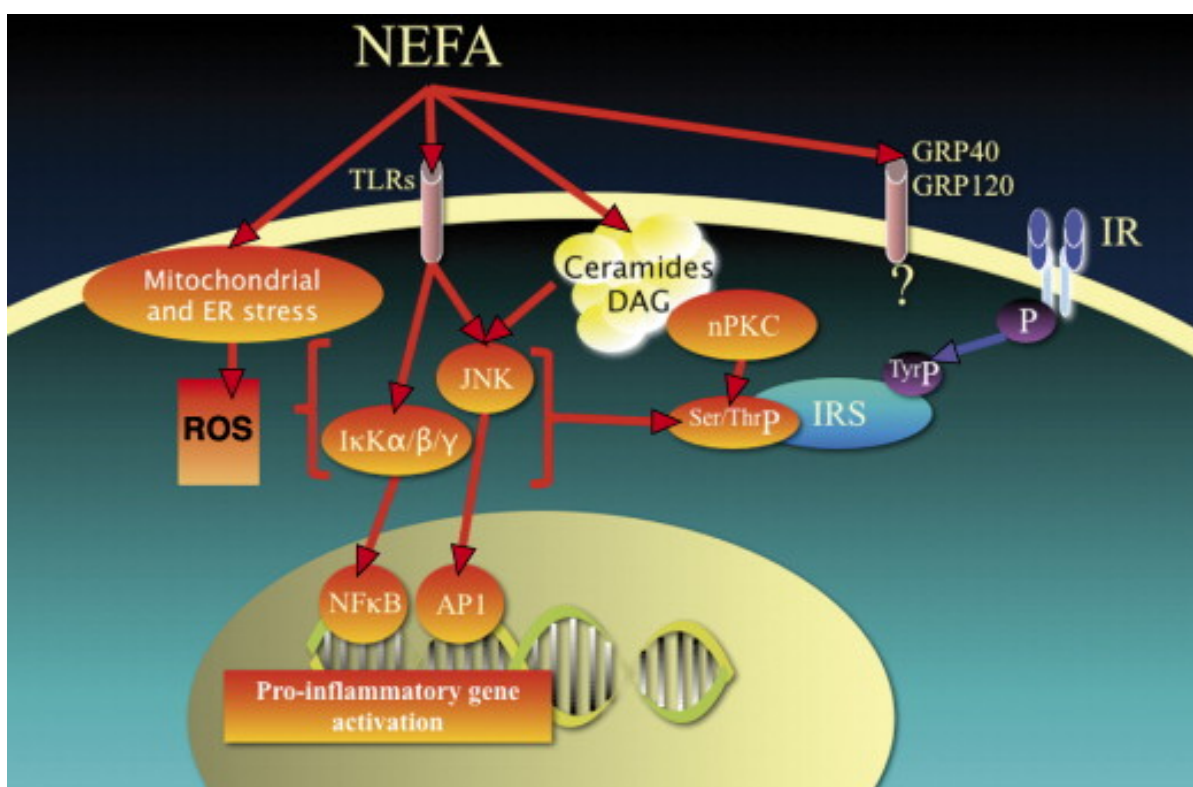


Figure 6. Illustration des mécanismes intracellulaires responsables de la lipotoxicité

Lorsque les acides gras sont présents en trop grande quantité au niveau de la circulation sanguine ou que leur utilisation intracellulaire n'est pas suffisante, une surcharge d'acides gras peut survenir au niveau des tissus non adipeux et engendrer des effets délétères. Ces phénomènes intracellulaires menant à la lipotoxicité sont illustrés à la figure 6 (Carpentier, 2008).

Initialement, l'exposition cellulaire à des concentrations élevées d'AGNE entraîne une augmentation de la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS). Ces molécules vont mener à l'activation de la voie de signalisation de JNK, d'AP1 et de NfκB, entraînant ainsi la formation de molécules proinflammatoires et à l'apoptose cellulaire (Kamata *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que les ROS sont fortement impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline induite par les glucocorticoïdes et le TNFα (Houstis *et al.*, 2006).

D'un autre côté, il a été démontré que les AGNE induisent l'activation des récepteurs de type Toll (TLR). Ces récepteurs, qui sont impliqués dans les mécanismes de l'immunité innée en reconnaissant les motifs moléculaires présents au niveau de la membrane bactérienne, sont aussi dans la capacité de lier les acides gras. De plus, il a été démontré qu'une légère augmentation des niveaux d'AGNE plasmatiques induit une augmentation de l'expression des TLR (Hussey *et al.*, 2014). Ainsi, la liaison du ligand au TLR mène à l'activation des voies de signalisation d'AP1 et de NfκB, entraînant ainsi la formation de cytokines proinflammatoires, de molécules d'adhésion, de chimiokines et de protéines antibactériennes (Carpentier, 2008). Les cytokines proinflammatoires, comme le TNFα, vont induire des effets cellulaires néfastes tels qu'une altération de l'action de l'insuline (Zhou *et al.*, 2015).

De plus, l'exposition cellulaire à des concentrations élevées d'AGNE provoque un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ce stress peut entraîner plusieurs conséquences cellulaires néfastes telles que la résistance à l'insuline, l'activation de voies de signalisation inflammatoire ainsi que l'apoptose cellulaire. En effet, une étude de Ozcan *et al.*, publiée en 2004, a démontré que l'augmentation du stress au niveau du réticulum endoplasmique était associée à la résistance à l'insuline chez un modèle murin (Ozcan *et al.*, 2004). D'un autre côté, l'exposition cellulaire à des concentrations élevées d'AGNE provoque aussi un stress au niveau de la mitochondrie. Ce stress mitochondrial est lui aussi associé à plusieurs conséquences cellulaires néfastes telles qu'à une dysfonction mitochondriale, à une diminution de la β-oxydation et à l'augmentation du stress oxydatif (Carpentier, 2008). Afin de démontrer que la présence d'AGNE augmente l'état de stress oxydatif, le groupe de Tripathy a infusé une solution d'intralipides et d'héparine à 10 patients sains durant 4h. L'héparine permet d'activer les lipoprotéines lipases (LPL), enzymes principalement

exprimées au niveau de l'épithélium vasculaire, afin qu'elles puissent hydrolyser les triglycérides contenus dans la solution d'intralipides en AGNE. Ainsi, les résultats de cette étude démontrent que la présence d'AGNE augmente le stress oxydatif chez les individus sains ayant reçu une infusion d'intralipides/héparine durant 4h (Tripathy *et al.*, 2003). D'un autre côté, puisque la lipotoxicité diminue l'oxydation mitochondriale, les AGNE vont encore plus s'accumuler au niveau du cytosol et leurs effets délétères seront amplifiés.

Finalement, lors d'une altération de la fonction mitochondriale ou en situation d'apport lipidique élevé, les acides gras vont être métabolisés par des mécanismes non oxydatifs. Ces principaux métabolites non oxydatifs sont les diacylglycérols (DAG) et les céramides. La présence de DAG au niveau intracellulaire mène à l'activation des protéines kinases C (PKC). Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de l'activité d'autres enzymes grâce à leur capacité à ajouter un groupement phosphate sur leurs résidus sérines et thréonines. Ainsi, l'activation des PKC par les DAG va entraîner la phosphorylation de différentes protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, ce qui va entraîner la diminution de la translocation du transporteur GLUT4 à la membrane cytoplasmique et subséquentement, une élévation de la glycémie (Carpentier, 2008). De plus, il a été démontré que la phosphorylation des résidus sérines et thréonines des enzymes de la stéroïdogenèse augmente leurs activités et subséquentement, induit la formation de stéroïdes (Zhang *et al.*, 1995). D'un autre côté, la présence de céramides au niveau intracellulaire mène à l'activation des protéines kinases JNK. L'activation de ces enzymes mène à la phosphorylation des résidus sérines et thréonines de différentes protéines impliquées dans la survie des cellules β du pancréas, entraînant ainsi l'altération de leurs fonctions. En effet, il a été démontré que la présence de céramides au niveau des cellules β du pancréas mène à l'altération de la fonction mitochondriale ainsi qu'à l'apoptose de ces cellules (Maedler *et al.*, 2001). Cependant, il est important de noter que seulement les acides gras saturés peuvent entraîner la formation de céramides (Kewalramani *et al.*, 2010).

1.3.4 Effet de la lipotoxicité sur l'androgénèse

Quelques études suggèrent l'implication des AGNE au niveau du développement de l'hyperandrogénie et ce, *in vitro* et *in vivo*.

En effet, une étude de notre laboratoire a mis en évidence l'effet des AGNE sur la production des androgènes au niveau des cellules fasciculées et réticulées provenant de glandes surrénales bovines. Pour y arriver, ces cellules ont été stimulées en présence de 10 nM d'ACTH (2X/jour) ou de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) avant d'être exposées à une concentration de 100 μ M de palmitate (2X/jour; acide gras saturé). Le palmitate est un acide gras constitué de 16 carbones et est l'acide gras saturé le plus prévalent au niveau de la circulation sanguine. Ainsi, suite aux 48 h de stimulation, le milieu de culture a été récolté et le DHEA y a été quantifié par ELISA. Ainsi, cette étude démontre qu'une exposition de ces cellules durant 48 h à 100 μ M de palmitate augmente de façon significative la production de DHEA de 38% et de 69% lorsque les cellules sont stimulées à l'ACTH et à la Fsk respectivement (Bellanger *et al.*, 2012).

De plus, une étude de Mai *et al.*, publiée en 2006, a voulu démontrer l'implication des AGNE au niveau de la production des androgènes chez huit hommes sains. Pour y arriver, les participants ont reçu une infusion de lipides et d'héparine durant 6 h et des échantillons sanguins ont été prélevés au temps 0, 2 et 4 h afin que les niveaux de DHEA, d'androstènedione, de 17OH-progesterone, de testostérone, de cortisol et d'acides gras libres y soit quantifiés. Un des aspects intéressants de cette étude est que chaque sujet constitue son propre contrôle en recevant aussi une infusion de saline et d'héparine lors d'une autre visite. Ainsi, cette étude démontre qu'une infusion de lipides et d'héparine augmente la production de DHEA et d'androstènedione comparativement à une infusion de saline et d'héparine (Mai *et al.*, 2006). En s'appuyant sur ces résultats, ce groupe a refait la même étude chez des femmes saines afin de déterminer si les AGNE pourraient être impliqués dans l'hyperandrogénie. Pour y arriver, 12 femmes saines ont reçu une infusion de lipides et d'héparine durant 330 minutes et des échantillons sanguins ont été prélevés au temps 0, 1, 2 et 4 h afin que les niveaux de DHEA, DHEAS, d'androstènedione, de 17OH-progesterone,

progestérone, de testostérone et d'acides gras libres y soient quantifiés. Comme dans l'étude de 2006, chaque sujet constitue son propre contrôle grâce à une infusion de saline et d'héparine lors d'une autre visite. Ainsi, les résultats de cette étude démontrent qu'une augmentation des niveaux plasmatiques de triglycérides et d'acides gras libres, induite par l'infusion de la solution de lipides et d'héparine, entraîne une augmentation des niveaux plasmatiques de DHEA ($3\ 631 \pm 610$ ng/ml•min vs. $2\ 341 \pm 284$ ng/ml•min; $p < 0,05$), de DHEAS ($538\ 275 \pm 100\ 611$ ng/ml•min vs. $420\ 300 \pm 63\ 471$ ng/ml•min; $p < 0,01$), d'androstènedione (546 ± 44 ng/ml•min vs. 471 ± 44 ng/ml•min; $p < 0,05$) et de testostérone ($1\ 030 \pm 112$ nmol/l•min vs. 412 ± 62 nmol/l•min, $p < 0,005$), et ce, comparativement à l'infusion de saline et d'héparine (Mai *et al.*, 2008)

Notre laboratoire a récemment démontré que les niveaux d'AGNE et de triglycérides au niveau du liquide folliculaire de l'ovule sont associés avec une augmentation du niveau de testostérone sanguin chez des femmes suivant un protocole de fécondation in vitro (Gervais *et al.*, 2014). De plus, nous avons démontré que les niveaux de testostérone sanguins étaient positivement associés avec la captation des AGNE par les ovaires, et ce, dans un modèle de rats s'apparentant au SOPK (Leblanc *et al.*, 2014).

1.3.4.1 Mécanismes cellulaires reliant la lipotoxicité à l'hyperandrogénie

Plusieurs mécanismes cellulaires peuvent expliquer l'effet de la lipotoxicité sur la production des androgènes.

Initialement, il est connu qu'un excès d'AGNE inhibe la voie MEK/ERK1/2, qui a été démontré comme étant inhibitrice de l'androgénèse, avec le potentiel donc d'augmenter la production d'androgènes. En effet, l'étude de Bellanger *et al.*, publiée en 2012 par notre laboratoire, démontre qu'une exposition de 48h à 100 μ M de palmitate diminue les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 et augmente la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines (Bellanger *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que l'exposition de cellules fibroblastiques à 1 mM de palmitate durant 1 à 4h inhibe la voie de MEK/ERK1/2 (Usui *et al.*, 1997) et que l'inhibition de MEK1 induit une augmentation de la

production de DHEA par les cellules thécales humaines (Nelson-Degrave *et al.*, 2005). D'un autre côté, les phénomènes lipotoxiques pourraient permettre d'augmenter la production des androgènes grâce à leurs effets sur l'activité de différentes protéines kinases. Comme il a été mentionné précédemment, lors d'une altération de la fonction mitochondriale ou en situation d'apport lipidique élevé, les acides gras vont être métabolisés par des mécanismes non oxydatifs pour ainsi former des DAG et des céramides. Ces métabolites non oxydatifs vont mener à l'activation de différentes protéines kinases, entraînant ainsi la phosphorylation et l'activation de différentes protéines. Or, une telle phosphorylation de la P450c17 sur ses résidus sérines et thréonines augmente son activité 17,20-lyase et subséquemment, la production des androgènes (Zhang *et al.*, 1995).

1.3.5 Implication des différents acides gras au niveau de la lipotoxicité

Il existe trois formes de gras dans l'alimentation, soit les acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés. L'acide palmitique (palmitate; acide gras saturé) est l'acide gras saturé le plus prévalent retrouvé dans le sérum (28,3% de tous les AGNE) alors que l'acide oléique (oléate; acide gras monoinsaturé) est l'AGNE le plus abondant de la circulation chez l'humain (32,7%) (Hodson *et al.*, 2008).

Il est important de noter que les différents types d'acide gras vont agir de façon différente au niveau cellulaire. En effet, il a été démontré que le palmitate induit la mortalité cellulaire ainsi que la formation de peroxyde au niveau des peroxysomes des cellules β du pancréas. Il a aussi été démontré que le palmitate induit la mortalité des cellules ovariennes humaines de façon temps- et dose-dépendante. Ce phénomène est causé par l'induction de l'apoptose cellulaire par le palmitate (Mu *et al.*, 2001). D'un autre côté, il a été démontré que l'oléate protège des effets du palmitate sur la mortalité cellulaire et la formation de peroxyde (Gehrmann *et al.*, 2015).

Plusieurs interventions sont connues pour améliorer directement la lipotoxicité, telles que l'exercice, la perte de poids et les médicaments insulinosensibilisateurs (ex. : metformine et thiazolidinediones). En effet, il a été démontré que ces interventions entraînent une

amélioration de la résistance à l'insuline et de l'hyperandrogénie des femmes atteintes du SOPK. Ainsi, la prochaine section se penchera sur les thiazolidinediones, qui sont des composés thérapeutiques qui protègent contre le développement de la lipotoxicité en activant les récepteurs PPAR γ , permettant ainsi de favoriser le métabolisme oxydatif des AGNE au niveau des tissus non adipeux.

1.4 Thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (TZD) sont des sensibilisateurs à l'insuline utilisés depuis la fin des années 1990 dans le traitement du diabète de type 2, mais plusieurs études préliminaires démontrent que ces composés pourraient être utilisés dans le traitement de différentes maladies telles que le psoriasis (Lajevardi *et al.*, 2014), l'autisme (Boris *et al.*, 2007), la stéatose hépatique non alcoolique (Takahashi *et al.*, 2015) et le SOPK (Stabile *et al.*, 2014). Les TZD sont des agonistes des récepteurs activés par les proliférateurs des peroxyosomes gamma (PPAR γ). Ces récepteurs sont activés par plusieurs molécules, tels que les acides gras, les eicosanoïdes et les médicaments de la famille des TZD. L'activation de ces récepteurs nucléaires entraîne leurs liaisons avec le récepteur X de rétinoïdes (RXR) ainsi que la liaison de l'hétérodimère à l'ADN, modifiant ainsi les niveaux de transcription de plusieurs gènes impliqués dans une variété de processus physiologiques. La principale conséquence de la liaison de l'hétérodimère à l'ADN est l'augmentation de la lipogenèse au niveau du tissu adipeux, entraînant ainsi une diminution des niveaux d'acides gras plasmatiques. En effet, les récepteurs PPAR γ sont principalement exprimés au niveau du tissu adipeux, où leur activation augmente la transcription des gènes qui induisent l'adipogenèse et l'activation de la LPL. De plus, ces récepteurs sont aussi exprimés au niveau des tissus non adipeux, où leur activation augmente la transcription des gènes qui induisent l'oxydation des AGNE et la formation des mitochondries (Gervois et Fruchart, 2003). Ces phénomènes entraînent une diminution des niveaux d'AGNE plasmatiques et subséquemment, une diminution de la surexposition du tissu non adipeux aux AGNE. De plus, l'activation des récepteurs PPAR γ entraîne aussi une diminution la réponse inflammatoire et de la résistance à l'insuline plusieurs tissus, ainsi qu'une augmentation de la différenciation des adipocytes (Molavi *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'activation des

récepteurs PPAR γ induit une diminution de l'activité enzymatique de la P450c17 et de la 3 β HSD (Arlt *et al.*, 2004) ainsi qu'une diminution de la production de testostérone par les cellules ovariennes porcines (Schoppee *et al.*, 2002). Par ailleurs, une étude de Skov *et al.*, publiée en 2008, a démontré qu'une diminution de l'expression du récepteur PPAR γ au niveau du muscle squelettique de femmes atteintes du SOPK était associée à diminution de la sensibilité à l'insuline (Skov *et al.*, 2008).

Il existe quatre membres dans les familles des TZD, soit la soit la troglitazone, la pioglitazone, la rosiglitazone ainsi que la lobeglitazone. Plusieurs de ces molécules ont des restrictions concernant leur utilisation ou ont tout simplement été retirées du marché dû aux effets secondaires néfastes qu'ils induisent. En effet, la troglitazone a été retirée du marché en 2000 puisque cette molécule engendre des problèmes hépatiques (1 patient sur 20 000). Ainsi, il est recommandé d'effectuer un bilan hépatique à tous les 3 mois durant la première année du traitement aux TZD afin de déceler rapidement les effets secondaires qui sont associés à leur administration. Cependant, aucune étude ne démontre à ce jour que l'administration de rosiglitazone et de pioglitazone pourrait induire des problèmes hépatiques (Salomone, 2011). D'un autre côté, les effets des TZD au niveau cardiaque sont plutôt controversés. En effet, il a été démontré que l'administration de rosiglitazone est associée à une augmentation du risque de développer un arrêt cardiaque et un infarctus du myocarde alors que l'administration de pioglitazone est associée à une augmentation du risque de développer un arrêt cardiaque (Chaggar *et al.*, 2009). Cependant, l'étude prospective RECORD (Rosiglitazone Evaluated for Cardiac Outcomes and Regulation of Glycaemia in Diabete), qui a suivi 4458 patients diabétiques de type 2 traités à la rosiglitazone durant 5,5 années, démontre que la rosiglitazone ne semble pas augmenter l'incidence d'infarctus (Home *et al.*, 2009).

Plusieurs études ont démontré que certaines variantes génétiques au niveau du gène codant pour le récepteur PPAR γ étaient associées au SOPK, mais cette hypothèse reste encore controversée. En effet, une étude de Yilmaz *et al.*, publiée en 2006, a démontré que les femmes atteintes du SOPK possédaient un polymorphisme Pro12A1a au niveau de l'exon 2 du gène du récepteur PPAR γ et une substitution des bases C pour des bases T au niveau de l'exon 6 du gène du récepteur PPAR γ de façon plus fréquente que les femmes contrôles

(Yilmaz *et al.*, 2006). Cependant, d'autres études ont démontré que les différents polymorphismes génétiques au niveau du gène codant pour le récepteur PPAR γ ne semblaient pas être associés à un risque accru de développer un SOPK (Christopoulos *et al.*, 2010). Ainsi, d'autres études seraient nécessaires pour identifier clairement l'implication du gène du récepteur PPAR γ dans le développement du SOPK.

1.5 Préambule

Notre laboratoire a comme objectif de déterminer l'impact des AGNE sur la production des androgènes de façon *in vivo* chez des femmes atteintes du SOPK ou qui sont à risques de développer cette maladie ainsi que de façon *in vitro* au niveau des cellules surrénaliennes et ovariennes canines, bovines ou humaines.

Récemment, nous avons démontré que la présence d'AGNE et de triglycérides au niveau du liquide folliculaire de l'ovule est associée avec une augmentation du niveau de testostérone sanguin chez des femmes suivant un protocole de fécondation *in vitro* (Gervais *et al.*, 2014). De plus, nous avons démontré que les niveaux de testostérone sanguins étaient positivement associés avec la captation des AGNE par les ovaires, et ce, dans un modèle de rats présentant un SOPK (Leblanc *et al.*, 2014). Finalement, l'article de Bellanger *et al.*, publiée en 2012, a démontré qu'une exposition de 48 h à 100 μ M de palmitate augmente la production de DHEA de 69% et diminue la phosphorylation de ERK1/2 de 46% lorsque les cellules fasciculées et réticulées bovines sont stimulées en présence de 10 μ M de Fsk. Cependant, aucune différence significative de l'expression de la P450c17 n'a pu être observée (Bellanger *et al.*, 2012).

Les résultats de ces études démontrent clairement l'association entre les AGNE et l'androgénèse. Cependant, les mécanismes cellulaires expliquant ce phénomène n'ont pas encore été élucidés. Ainsi, mon projet de maîtrise avait comme objectif principal de déterminer les mécanismes sous-jacents à l'hyperandrogénie induite par les AGNE.

1.6 Hypothèse/problématique

L'hypothèse générale émise par notre laboratoire est que le SOPK survient lorsque les cellules sécrétrices d'androgènes sont exposées à un excès d'AGNE dû à un débordement du tissu adipeux et/ou à une diminution de leur oxydation au niveau des tissus non adipeux. Ainsi, nous avons supposé que l'hyperandrogénie présente chez les femmes atteintes du SOPK peut être expliquée, du moins en partie, par les phénomènes lipotoxiques induits par l'exposition des cellules sécrétrices d'androgènes à des niveaux élevés d'AGNE.

L'hypothèse du présent projet est donc que la surexposition de cellules sécrétrices d'androgènes aux AGNE induit des phénomènes lipotoxiques pouvant conduire à une hyperproduction androgénique et que, d'autre part, l'activation des récepteurs PPAR γ protégerait les cellules sécrétrices d'androgènes contre le développement de la lipotoxicité et donc, améliorerait l'hyperandrogénisme induit par les AGNE.

1.6.1 Objectifs

1.6.1.1 Objectif principal

L'objectif principal de mon projet de maîtrise est de déterminer les mécanismes sous-jacents à l'augmentation de la production androgénique induite par la surexposition des cellules productrices d'androgènes aux AGNE.

1.6.1.2 Objectifs secondaires

Les objectifs secondaires de ce projet sont de:

Objectif #1

Déterminer l'effet des AGNE sur l'androgénèse.

Objectif #2

Déterminer l'effet d'une surexposition aux AGNE sur la production des androgènes par les cellules surrénaliennes suite à l'activation aiguë ou prolongée du récepteur PPAR γ au niveau de ces cellules.

Objectif #3

Déterminer l'effet d'une surexposition aux AGNE sur l'expression protéique de différentes protéines impliquées dans la synthèse des androgènes.

Objectif #4

Déterminer l'effet d'une surexposition aux AGNE sur l'activité 17 α hydroxylase et 17,20-lyase de la P450c17 au niveau des cellules surrénaliennes bovines.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Mes travaux ont été réalisés à partir de trois types cellulaires, soit à partir des cellules surrenaliennes bovines, de la lignée cellulaire NCI-H295R et des cellules surrenaliennes humaines. Initialement, les cellules surrenaliennes bovines ont été utilisées puisqu'elles constituent le modèle cellulaire le plus utilisé dans la littérature pour étudier la fonction de la glande surrénale et qu'elles sont facilement accessibles, et ce, en grande quantité. De plus, le modèle bovin est le modèle qui ressemble le plus à l'humain. D'un autre côté, la lignée cellulaire NCI-H295R exprime tous les gènes qui codent pour les enzymes impliqués au niveau de la stéroïdogénèse. Ainsi, ce modèle cellulaire a été utilisé puisqu'il permet d'avoir une source cellulaire pratiquement illimitée et d'obtenir des résultats reproductibles à faible coût. De plus, les cellules NCI-H295R ont aussi été utilisées puisque des expériences futures de transfection seront possibles sur ces cellules. Finalement, les cellules surrenaliennes humaines ont été utilisées afin d'assurer un aspect translationnel avec les résultats obtenus chez l'animal.

2.1.1 Culture primaire bovine

En ce qui a trait à la culture primaire animale, des glandes surrenales de vaches adultes non gestantes ont été obtenues d'un abattoir local. L'isolation cellulaire a été effectuée sur glace et le tissu était maintenu dans du milieu d'isolation, composé de DMEM/F12 (Wisent) froid supplémenté en sérum de veau fœtal (10 %), L-Glutamine (365,10 mg/L), HEPES (8 mM), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et de gentamicine (0,05 g/L) durant l'isolation et la dissociation cellulaire. Initialement, la totalité de la masse grasseuse entourant les glandes surrenales a été enlevée à l'aide d'un scalpel. Ensuite, la capsule, la zone glomérulée ainsi que la médullosurrénale ont été retirées grâce à un microtome Stadie-Riggs (Thomas Scientific) afin de seulement obtenir des tranches des zones fasciculées et réticulées car c'est seulement ces cellules qui sont capable de produire des androgènes. Ces

coupes ont par la suite été coupées en morceaux d'environ 1 mm³ avant d'être déposées dans une solution de DMEM/F12 supplémentée en collagénase de type 1 (500 U/mL) et en DNase de type 1 (160 U/mL) durant 2h à 37 °C afin de rompre les liens entre les cellules et le tissu. De plus, durant ce temps d'incubation, le tissu a subi plusieurs aspirations à l'aide d'une pipette stérile de 10 mL afin de favoriser le détachement cellulaire. Cette solution a par la suite été déposée sur un filtre de 100 µm afin d'éliminer les morceaux de tissus non digérés. Finalement, la solution cellulaire a été centrifugée et le culot a été resuspendu dans du milieu d'isolation avant d'être ensemencée dans une flasque en polystyrène de 75 cm² (T75). Le lendemain, les cellules ont subi un passage. Ainsi, le milieu de culture a été retiré et les cellules adhérentes au T75 ont été lavées avec du PBS (phosphate buffer solution) afin d'éliminer les globules rouges présents dans le milieu de culture. Par la suite, les cellules ont été décollées de la paroi du T75 en présence d'une solution de trypsine (trypsine [0,25 %] et EDTA [1 %]). Après une vérification visuelle du décollement cellulaire, du milieu d'isolation a été ajouté au T75 afin d'inhiber l'action de la trypsine. Les cellules ont été centrifugées et le culot a été resuspendu dans du milieu d'isolation supplémenté avec de l'Ultrosor G (1 %, Pall). Les cellules ont été divisées également dans 3 T75 qui ont été traités à la fibronectine et ce, dans le but d'augmenter l'adhésion cellulaire. Par la suite, le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Lorsque les cellules ont atteint la confluence au terme d'environ 7 jours, elles ont été trypsinisées et ensemencées en duplicata dans des plaques de 6 puits à une densité de 600 000 cellules/puits ou dans des plaques de 12 puits à une densité de 200 000 cellules/puits selon l'expérience désirée. Le lendemain matin, le milieu de culture a été changé et les différentes stimulations ont eu lieu.

2.1.2 Lignée cellulaire NCI-H295R

Les cellules NCI-H295R (ATCC) ont été entretenues dans du milieu de DMEM/F12 supplémenté avec du sérum de veau cosmique (10 %), L-Glutamine (365,10 mg/L), HEPES (9,4 mM), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), gentamicine (0,05 g/L), NaHCO₃ (0,1 %), insuline (0,00625 mg/mL), transferrine (0,00625 mg/mL) et sélénite (6,25 ng/mL). Ces cellules ont subi un passage lorsqu'elles atteignaient environ 90 % de confluence. Pour ce faire, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées avec

du PBS. Par la suite, les cellules ont été décollées du T75 suite à une incubation en présence d'une solution de trypsine (trypsine [0,25 %] et EDTA [1 %]). Après une vérification visuelle du décollement cellulaire, du milieu d'isolation a été ajouté au T75. Cette solution a été centrifugée et le culot a été resuspendu dans du milieu avant d'être déposé dans un T75 afin de remettre les cellules à proliférer à nouveau. Par la suite, le milieu de culture a été changé à tous les deux jours. Lorsque les cellules ont atteint la confluence, elles ont été trypsinisées et ensemencées de la même façon que les cellules surréaliennes bovines. Quarante-huit heures suivant l'ensemencement, le milieu a été changé pour un milieu DMEM/F12 pauvre en sérum de veau cosmique (0,01 %) supplémenté en L-Glutamine (365,10 mg/L), HEPES (9,4 mM), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL) et gentamicine (0,05 g/L) afin de sevrer les cellules de tous les facteurs contenus dans le sérum. Pour terminer, le milieu de culture a été changé pour du milieu frais le matin suivant et les différentes stimulations ont eu lieu.

2.1.3 Culture primaire humaine

Pour terminer, les glandes surrénales humaines ont été obtenues grâce à notre collaboration avec Transplant Québec. Ces glandes proviennent des trois grands centres du Québec, soit Montréal, Québec et Sherbrooke. Entre janvier 2014 et ma fin de maîtrise (mai 2015), nous avons reçu les glandes surrénales de 3 donneurs, composé de 2 femmes, âgés entre 54 et 68 ans. Suite au prélèvement, ces spécimens étaient conservées dans du milieu Opti-MEM jusqu'à leur arrivée au Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. À ce moment, les glandes surrénales ont été dégraissées et des coupes des zones fasciculées et réticulées ont été obtenues avec le même protocole que celui décrit pour les glandes surréaliennes bovines. Cependant, les glandes surrénales étaient conservées dans du milieu MEM supplémenté en HEPES (8 mM), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), L-Glutamine (2 mM) et NaHCO₃ (0,01 %) durant la dissection et l'isolation cellulaire. Par la suite, les morceaux de 1 mm³ des coupes des zones fasciculées et réticulées ont subi trois digestions enzymatiques successives de 20 minutes à 37 °C dans une solution de DMEM/F12 supplémentée en collagénase de type 1 (500 U/mL) et en DNase de type 1 (160 U/mL) avant d'être filtrée et centrifugée. Pour terminer, le culot a été resuspendu dans du milieu Opti-

MEM supplémenté en sérum de veau fœtal (2 %), HEPES (8 mM), bicarbonate de sodium (2,4 g/L), L-Glutamine (2 mM), pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (100 µg/mL) pour finalement êtreensemencées de la même façon que les cellules surrénaliennes bovines. Le lendemain matin, le milieu de culture a été changé et les différentes stimulations ont eu lieu.

Tous les types cellulaires ont été incubés à une température de 37 °C et en présence d'une atmosphère humidifiée contenant 5 % de CO₂.

2.2 Stimulation cellulaire

Initialement, les cellules ont été stimulées en présence d'ACTH (2X/jour; eau nano pur pour les conditions contrôles) ou de Fsk (1X/2 jours; DMSO pour les conditions contrôles) afin d'induire l'activation des adénylates cyclases. De plus, les cellules ont été incubées en présence d'AGNE (palmitate ou oléate) ou d'albumine de sérum bovin (BSA) pour les conditions contrôles, et ce, deux fois par jour durant 48h. Le palmitate était couplé au BSA à un ratio molaire de 6:1 alors que l'oléate était couplé au BSA à un ratio molaire de 5:1 (AGNE:BSA) afin de faciliter le transport des acides gras dans le milieu de culture. Pour terminer, les cellules ont été incubées en présence de 10 µM de TZD (rosiglitazone ou pioglitazone) ou 10 µM de DMSO pour les conditions contrôles, et ce, deux fois par jour durant 48 h. Cependant, pour quelques expérimentations, les cellules surrénaliennes ont été exposées en présence de TZD durant la phase de prolifération (10 µM; 1X/jour). Ainsi, au niveau des cellules surrénaliennes, les TZD vont permettre d'augmenter l'oxydation intracellulaire des acides gras pour diminuer la lipotoxicité induite par ces molécules.

2.3 Récolte cellulaire

Suite aux 48h de stimulation, le milieu de culture de chaque puits a été récolté dans deux microtubes afin de limiter leur décongélation avant d'être entreposé à -80°C jusqu'aux moments où les dosages ont été effectués.

Par la suite, les protéines cellulaires ont été récoltées. Pour y arriver, le tapis cellulaire a initialement été lavé avec du PBS froid afin d'enlever toutes traces de milieu cellulaire restant. Par la suite, 60 µl/puit de tampon de lyse RIPA froid ont été ajoutés pour les plaques de 12 puits ou 120 µl/puit de tampon de lyse RIPA froid a été ajoutés pour les plaques de 6 puits et les plaques ont par la suite été déposés sur glace. Le tampon de lyse RIPA était composé de triton (1 %), Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), NaCl (150 mM), SDS (0,1 %) et sodium désoxycholate (0,5 %) et il était complété avec des inhibiteurs de phosphatase (comprimé d'inhibiteurs de phosphatases PhosSTOP, Roche) et de protéases (comprimé d'inhibiteurs de protéases Complete Mini, Roche). Ainsi, suite à l'incubation des cellules avec le tampon de lyse, le fond de chacun des puits a été gratté à l'aide d'un grattoir et le lysat cellulaire a été récolté dans des microtubes. Ceux-ci ont été centrifugés et le surnageant a par la suite été transféré dans un nouveau microtube avant d'être entreposé à -80°C.

2.4 Dosage

2.4.1 *Dosage stéroïdien*

La concentration de DHEA, de cortisol et d'androstènedione présente au niveau du milieu de culture a été mesurée grâce à des ELISA commerciaux (Diagnostics Biochem Canada) afin de déterminer l'effet des différentes stimulations sur la production des stéroïdes. Les limites de détections des dosages du DHEA, du cortisol et de l'androstènedione étaient respectivement de 0,082 ng/mL, 0,4 µg/dL et 0,04 ng/mL. L'absorbance des puits a été déterminée à l'aide d'un lecteur de plaques (Infinite M200, Tecan) à 450 nm.

2.4.2 *Dosage du 8-isoprostane*

La concentration de 8-isoprostane présente au niveau du milieu de culture a été mesurée grâce à un EIA commercial (Cayman Chemical Compagny) afin de déterminer l'effet des différentes stimulations sur l'induction du stress oxydatif. En effet, le 8-isoprostane est formé par l'oxydation des phospholipides membranaires par les radicaux d'oxygène et est un

marqueur reconnu de la peroxydation lipidique (Morrow *et al.*, 1995). Le dosage de 8-isoprostane a été effectué dans la semaine suivant la récolte cellulaire pour minimiser la formation de 8-isoprostane résultant de l'auto-oxydation lipidique. La limite de détection du dosage du 8-isoprostane était de 2,7 pg/mL. L'absorbance des puits a été déterminée à l'aide d'un lecteur de plaques (Infinite M200, Tecan) à 410 nm.

2.4.3 Dosage protéique

Les protéines cellulaires ont été dosées grâce à l'ensemble DCTM Protein Assay (BioRad). La densité optique (DO) a été mesurée à 595 nm (Infinite M200, Tecan) pour ensuite être rapportée à la courbe standard réalisée avec des quantités croissantes de BSA (0 à 2,8 µg/µL) afin d'obtenir la concentration protéique présente au niveau du lysat cellulaire.

Tableau 1. Récapitulatif des différents dosages effectués

Classes	Molécules	Méthodes
Stéroïdes	DHEA	ELISA
	Cortisol	
	Androstènedione	
Marqueur de peroxydation lipidique	8-isoprostane	EIA
N/A	Protéines	Colorimétrique

2.5 Immunobuvardage (Western blot)

Afin de déterminer l'effet des différentes stimulations sur l'expression de différentes protéines d'intérêts, 5 µg de protéines a été dénaturée dans du tampon Laemmli (Tris-HCl [0,125 M, pH 6,8], SDS [4 %], glycérol [20 %], bleu de bromophénol [0,004 %], et β-mercaptoéthanol [10 %]) avant d'être chauffé. Par la suite, les échantillons ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10 % (Acrylamide-bis 37,5:1 [10 %], Tris-HCl [375 mM, pH 8,8], SDS [0,1 %], APS [0,05 %] et TEMED [0,033 %]) et les protéines ont été séparées en fonction de leur poids moléculaire dans un tampon de migration (Tris-Base [25 mM], glycine [192 mM] et SDS [0,1 %]) grâce à l'application d'un courant électrique (100 à 150 V) durant environ 2h30 à température pièce (TP). Finalement, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF à l'aide de tampon de transfert (Tris-Base (25 mM), glycine (192 mM) et méthanol (15 % [>30 kDa] ou 20 % [<30 kDa]) et d'un courant électrique de 0,09 mA durant 16h à 4 °C. Suite au transfert, la membrane a été lavée dans du TBS-Tween (Tris-Base [20 mM, pH 7,5], NaCl [150 mM] et Tween-20 [0,1 %]) pour ensuite être bloquée durant 1h à température ambiante avec 5 % de lait écrémé en poudre dilué dans du TBS-Tween. La membrane a ensuite été incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage durant 2h à température ambiante (voir le tableau 2 afin de connaître les dilutions des différents anticorps utilisés). Après avoir été lavée dans du TBS-Tween, la membrane a été incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (horseradish peroxidase; 1:30 000 dans du TBS-Tween) durant 1h à température ambiante. Finalement, la membrane a été lavée dans du TBS-Tween avant d'être incubée en présence de 500 µL de substrat ECL prime (GE Healthcare). Les bandes protéiques ont été détectées grâce à un film autoradiographique (GE Healthcare) ou à l'aide de l'appareil ChemiDoc MP (Bio-Rad). Pour l'analyse, la densité optique de la bande de la protéine analysée a été rapportée à la densité optique de la bande de l'actine.

Tableau 2. Caractéristiques des anticorps utilisés pour les immunobuvardages

Anticorps	Source	Provenance	Dilution
P450c17	Lapin	Contribution du Dr. Alain Bélanger (CHUL, Québec, Canada)	1:2 000
POR	Lapin	Enzo Life Sciences	1:4 000
Actine	Souris	EMD Millipore	1:10 000

2.6 Immunoprécipitation

Une des méthodes permettant de déterminer les niveaux de phosphorylation en sérine de la P450c17 est d'immunoprécipiter cette enzyme et d'ensuite effectuer un immunobuvardage dirigé envers les sérines phosphorylées. Ainsi, la technique menant à l'immunoprécipitation de la P450c17 sera décrite dans cette section.

Les protéines qui ont été utilisées pour les expérimentations d'immunoprécipitation proviennent des cellules NCI-H295R ayant été stimulées dans des pétris de 100 mm dus à la grande quantité de protéines nécessaires pour cette expérimentation. Ainsi, 1 mg de protéines dont le volume a été ajusté à 1 mL avec du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases ont été incubés sur glace durant 1h en présence de 1 µg d'anticorps dirigés contre la P450c17 (chèvre, Santa Cruz Biotechnology). Par la suite, 60 µL de billes d'agarose liées de façon covalente à des anticorps qui vont reconnaître les immunoglobulines G (Santa Cruz Biotechnology) ont été ajoutés à l'échantillon avant d'être incubés sur un appareil rotatif durant 2h à 4°C. Suite à la centrifugation des billes d'agarose, le surnageant a été aspiré et les billes ont été lavés avec du PBS froid afin d'éliminer tous les composantes qui n'étaient pas liées aux billes. Les billes ont par la suite été asséchées en enlevant la totalité du tampon à l'aide d'une seringue surmontée d'une aiguille 28G et 40 µL de tampon Laemmli 1X ont été ajoutés afin de permettre l'élution des protéines fixées aux billes d'agarose. Finalement, les échantillons ont été chauffés durant 3 minutes à 95°C et un immunobuvardage a été effectué tel qu'à la section 2.7. Deux contrôles ont été effectués à

chaque expérimentation afin de s'assurer de la validité de la manipulation. En effet, l'anticorps utilisé pour effectuer l'immunoprécipitation a été déposé sur le gel de polyacrylamide dans le but de s'assurer que la bande détectée au niveau du puits de l'échantillon immunoprécipité ne correspondait pas aux chaînes lourdes de l'anticorps (50 KDa) et bien à la P450c17 (59 KDa). De plus, le lysat cellulaire utilisé pour effectuer l'immunoprécipitation a été déposé sur le gel de polyacrylamide afin de s'assurer que la P450c17 est bel et bien présente au niveau de l'échantillon initial.

La mise au point de la technique d'immunoprécipitation de la P450c17 a pris environ 10 mois à effectuer. Initialement, nous avons tenté de mettre au point cette technique au niveau des cellules surréaliennes bovines. Cependant, nous n'avons jamais réussi à immunoprécipiter la P450c17 au niveau de ce type cellulaire, et ce, malgré plusieurs changements effectués au niveau du protocole. Parmi ces changements, nous avons fait l'achat d'un nouvel anticorps, changé le tampon RIPA pour du PBS (moins stringent) ainsi qu'augmenter la quantité de protéines initiales. De plus, afin de nous assurer que la technique était appropriée, nous avons effectué en parallèle l'immunoprécipitation de SHP-1, une protéine dont le protocole d'immunoprécipitation avait déjà été mis au point. Par la suite, nous avons effectué l'immunoprécipitation de la P450c17 au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R, que nous avons finalement réussie en suivant le protocole décrit dans cette section.

2.7 Activité enzymatique

Afin de déterminer l'effet de l'oléate sur les activités enzymatiques de la P450c17, les cellules ont été incubées en présence de 10 μ M d'épostane durant les 24 dernières heures de stimulation à la Fsk et à l'oléate. L'épostane est un inhibiteur de la 3 β HSD qui bloque la synthèse des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et de l'androstènedione (fig. 7). Par la suite, les cellules ont été incubées en présence de 14 KBq de [³H]prégnénolone (pour déterminer l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17) et de [³H]17OH-prégnénolone (pour déterminer l'activité 17,20-lyase de la P450c17) durant les 4 dernières heures de stimulation à la Fsk et à l'oléate. Suite aux 48 h de stimulation cellulaire, le milieu de culture et les protéines ont été récoltés en suivant le protocole décrit à la section 2.3. Afin d'extraire les

stéroïdes présents au niveau du milieu de culture, celui-ci a été transféré dans un tube en verre et 4 mL d'éther diéthylique anhydre y ont été ajoutés avant d'être vortexés durant 30 secondes. Les tubes ont par la suite été centrifugés afin de bien séparer la phase organique de la phase aqueuse et cette dernière a été gelée en déposant le fond des tubes de verre dans un contenant ayant de la glace sèche et de l'éthanol 100 %. Par la suite, la phase organique a été transférée dans un nouveau tube de verre et la phase aqueuse a subi une deuxième extraction des stéroïdes. Suite à la mise en commun des deux phases organiques, les tubes en verre ont été déposés dans une centrifugeuse à vide (SPD121P SpeedVac, Thermo Scientific) pour ensuite être centrifugés afin d'évaporer l'éther diéthylique et d'ainsi concentrer les stéroïdes. Ces molécules ont par la suite été resuspendues dans du dichlorométhane avant d'être déposées à environ 2 cm du bas d'une plaque de silice flexible (Selecto Scientific, 200 µm). De plus, 2,2 KBq de [³H]prégnénolone, [³H]17OH-prégnénolone et [³H]DHEA purs ont été déposés sur la plaque de silice en guise de contrôle. La plaque de silice a par la suite été déposée dans une chambre de chromatographie sur couche mince en verre borosilicaté contenant 100 mL de toluène:acétone (4:1) afin de séparer les stéroïdes en fonction de leur polarité. Lorsque le front de migration a atteint 3 cm du haut de la plaque de silice, celle-ci a été asséchée avant d'être déposée dans une cassette avec un film autoradiographique (GE Healthcare; 3 semaines d'exposition) ou un Phosphor Screen (Kodak; 3 jours d'exposition) (fig. 8). L'activité 17αhydroxylase de la P450c17 a été calculée de cette façon : $(DO\ DHEA + DO\ 17OH\text{-prégnénolone}) / (DO\ DHEA + DO\ 17OH\text{-prégnénolone} + DO\ \text{prégnénolone})$ alors que l'activité 17,20-lyase de la P450c17 a été calculée de cette façon : $(DO\ DHEA) / (DO\ DHEA + DO\ 17OH\text{-prégnénolone})$.

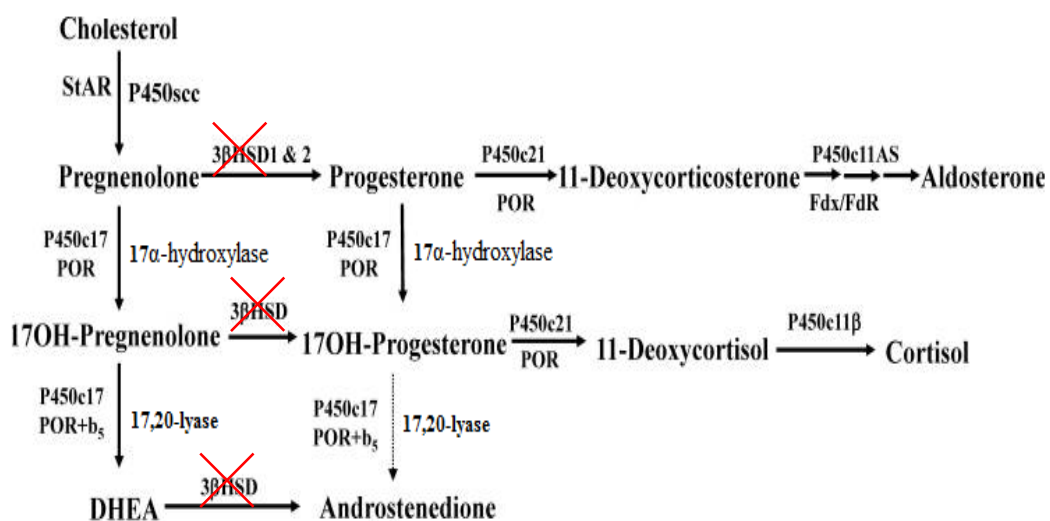


Figure 7. Inhibition de la 3 β HSD par l'épostane

L'épostane inhibe la 3 β HSD, bloquant ainsi la formation des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et de l'androstènedione (Miller et Auchus, 2011).

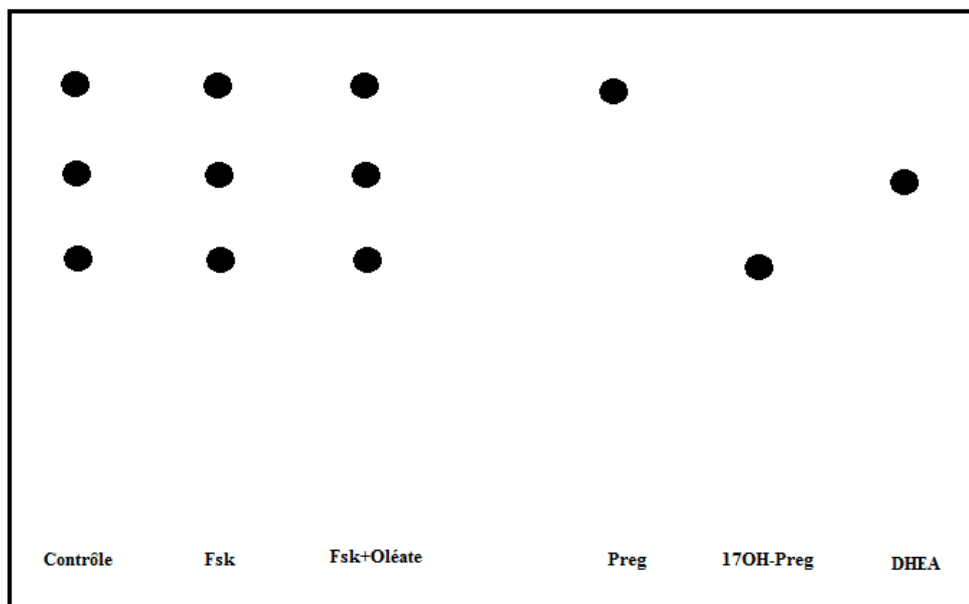


Figure 8. Schématisation d'une plaque de silice suite à la séparation des stéroïdes

Suite à la séparation des différents stéroïdes sur une plaque de silice, la place de silice a été asséchée avant d'être déposée dans une cassette avec un film autoradiographique ou un Phosphor Screen durant respectivement 3 semaines ou 3 jours. Par la suite, la plaque de silice a été révélée et la densité de chacun des stéroïdes a été déterminée. Preg = contrôle de la prégnénolone. 17OH-Preg = contrôle de la 17OH-prégnénolone. DHEA = contrôle du DHEA.

2.7.1 Bloc stéroïdien

Afin de confirmer les résultats de l'activité enzymatique de la P450c17 obtenus par la méthode précédente, la concentration de 17OH-prégnénolone, prégnénolone, 17OH-progestérone et 11-deoxycortisol présente au niveau du milieu de culture a été déterminée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) par le laboratoire clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke. Les différentes activités enzymatiques de la P450c17 ont été calculées en effectuant le ratio produit/substrat.

2.8 Présentation des résultats

Les résultats de ce mémoire sont présentés en valeur brute (ex. : ng/mL) lorsque les expérimentations ont été effectuées au niveau d'une seule culture cellulaire. Lorsque les expérimentations ont été effectuées sur plus d'une culture cellulaire, les résultats sont présentés en pourcentage d'une condition précise (ex: pourcentage d'augmentation de la production de DHEA rapportée à la condition contrôle) afin d'augmenter la comparabilité des résultats entre les différentes cultures. En effet, puisque l'ampleur des résultats est variable d'une culture cellulaire à l'autre, le fait de rapporter les valeurs de chaque culture à une condition précise permet de diminuer l'erreur due à la variabilité entre les différentes cultures et donc, la variabilité inter-expérience. Finalement, lorsque les données étaient disponibles, les résultats ont été rapportés en fonction de la quantité de protéines afin de s'assurer que le nombre de cellules soit comparable entre les différents puits puisque les cellules peuvent avoir proliférées ou détachées lors des stimulations et que la quantité de protéines est proportionnelle à la quantité de cellules.

2.8.1 *Analyses statistiques*

La moyenne des duplicatas ou des triplicatas de chaque condition a été utilisée pour les différentes analyses et les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM (erreur type de la moyenne). Les données ont été statistiquement analysées en utilisant le test des rangs signés de Wilcoxon non pairé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6. À noter que la comparaison entre les expériences exprimées en tant que pourcentage d'une expérience contrôle et cette expérience contrôle revient à faire un test de Wilcoxon pairé, ce qui est adéquat car il s'agit de la même expérience. Dans ces cas, l'expérience contrôle fixée à 100% n'a pas de SEM.

3. RÉSULTATS

3.1 Cellules surrénaliennes bovines

3.1.1 Effet de différents activateurs de la stéroïdogénèse sur la production de DHEA

3.1.1.1 Effet de l'ACTH sur la production de DHEA

Initialement, l'effet de concentrations croissantes d'ACTH sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines en présence ou en absence de 100 μ M de palmitate a été déterminé (n=1; fig. 9). Il est important de noter qu'aucune analyse statistique n'a été effectuée sur ces résultats car ils proviennent d'une expérience unique. Ainsi, lorsque les cellules sont incubées en présence de 0,001; 0,01 ou 0,1 nM d'ACTH, la concentration de DHEA présente au niveau du milieu de culture se situe en dessous de la limite de détection de la technique de dosage. Par la suite, il est possible de constater que la production de DHEA est maximale sous stimulation à 10 nM d'ACTH, et ce, en présence ou en absence de 100 μ M de palmitate. Ainsi, puisque la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines est maximale sous stimulation à 10 nM d'ACTH, les expérimentations ont été poursuivies avec cette concentration. Finalement, il est possible de constater que la production de DHEA induite par 1 nM et 10 nM d'ACTH est potentialisée par la présence de 100 μ M de palmitate. Notre hypothèse concernant la diminution de la production de DHEA par ces cellules en présence de 100 nM d'ACTH est que cette molécule induit une toxicité cellulaire à cette concentration. De plus, il est possible de constater une diminution encore plus marquée lors de l'ajout de 100 μ M de palmitate, ce qui peut être expliqué par la toxicité cellulaire induite par le palmitate (Mu *et al.*, 2001).

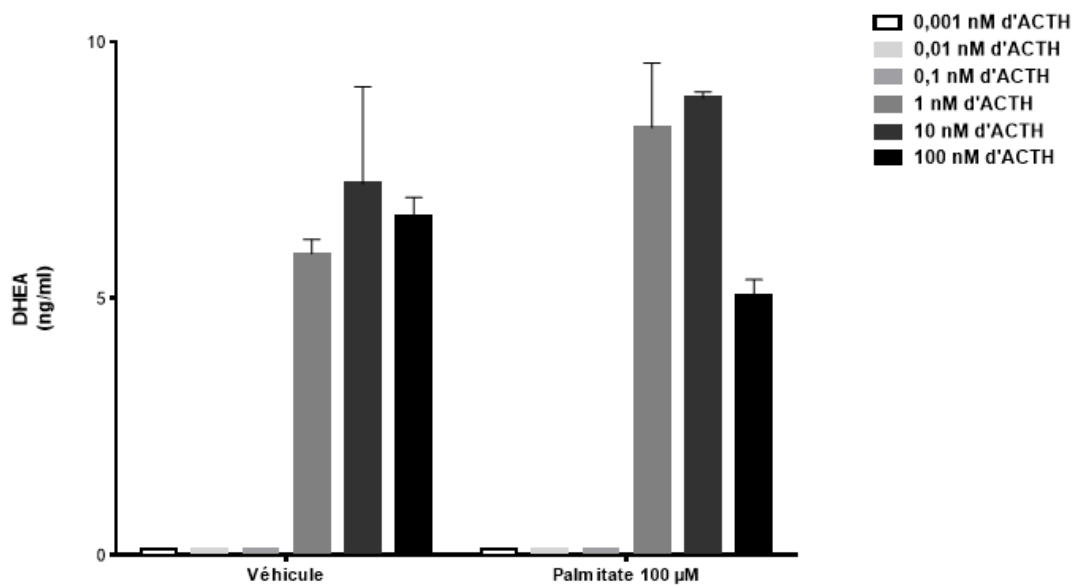


Figure 9. Effet de concentrations croissantes d'ACTH sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été stimulées avec des concentrations croissantes d'ACTH (2X/jour) et ce, en présence ou en absence de 100 µM de palmitate (2X/jour). Suite aux 48 h de stimulation à l'ACTH et aux AGNE, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM ainsi qu'en ng/mL. Ces expérimentations ont été effectuées sur un n=1.

3.1.1.2 *Effet de la Fsk sur la production de DHEA*

Les effets de concentrations croissantes de Fsk sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines en présence ou en absence de palmitate (100 μM) et d'oléate (100 μM et 200 μM) ont été déterminés (n=3 expériences distinctes à partir de 3 vaches différentes; fig. 10). Initialement, il est possible de constater que la production de DHEA est maximale sous stimulation à 10 μM de Fsk, et ce, en présence ou en absence de 100 μM de palmitate et d'oléate. Ainsi, puisque la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines est généralement maximale sous stimulation à 10 μM de Fsk, les expérimentations ont été poursuivies avec cette concentration de Fsk. De plus, il est possible de constater que la production de DHEA induite par 1, 10 et 25 μM de Fsk est augmentée en présence de palmitate (100 μM) et d'oléate (100 et 200 μM). Finalement, la production de DHEA est plus importante en présence de 200 μM d'oléate qu'en présence de 100 μM de palmitate et d'oléate, et ce, sous stimulation à 1, 10 et 25 μM de Fsk.

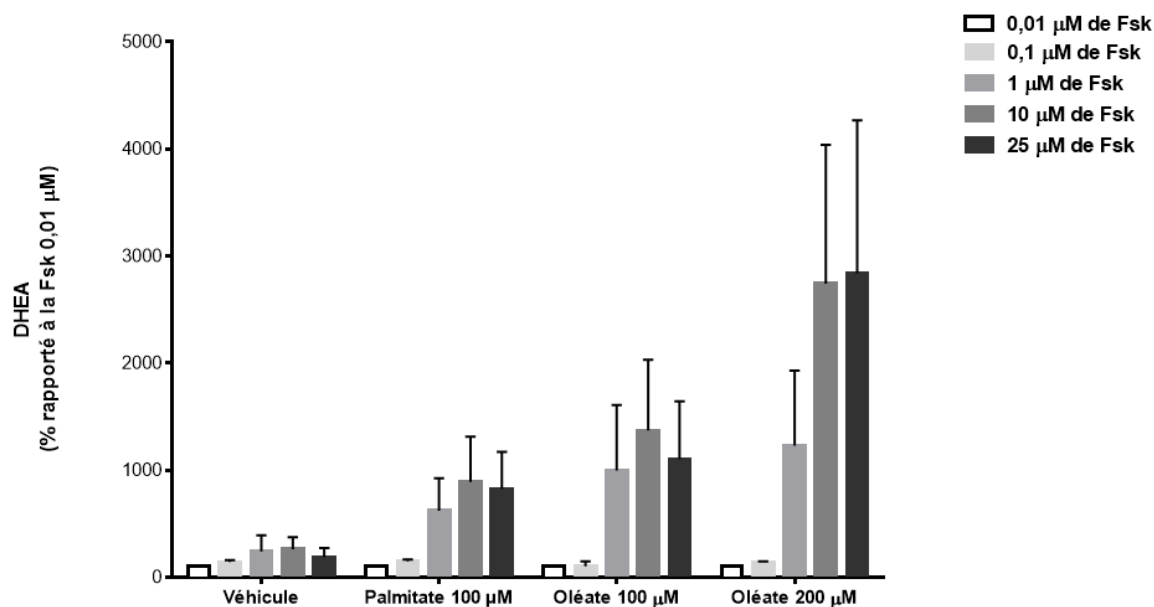


Figure 10. Effet de concentrations croissantes de Fsk sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été stimulées avec des concentrations croissantes de Fsk (1X/2 jours) et ce, en présence ou en absence de palmitate (100 µM; 2X/jour) ou d'oléate (100 µM et 200 µM; 2X/jour). Suite aux 48 h de stimulation à la Fsk et aux AGNE, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 3 expériences distincte ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à 0,01 µM de Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL avant leur conversion en pourcentage.

3.1.1.3 Effets du palmitate 100 μ M et de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA

Par la suite, l'effet de l'ACTH et de la Fsk sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été comparé afin de s'assurer que la Fsk induit une réponse semblable à celle de l'ACTH et déterminer si l'oléate 200 μ M induit une plus grande augmentation de la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines que le palmitate 100 μ M. Cependant, il est important de noter qu'aucune analyse statistique n'a été effectuée sur ces résultats car ils proviennent d'une expérience unique. Ainsi, à la fig. 11, il est possible de voir l'effet du palmitate 100 μ M et de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines et ce, sous stimulation à 10 nM d'ACTH ou à 10 μ M de Fsk. Il est possible de constater qu'en absence de stimulation à l'ACTH ou à la Fsk, la concentration de DHEA présente au niveau du milieu de culture est très faible et ce, même en présence de palmitate 100 μ M et d'oléate 200 μ M. De plus, il est possible de constater que l'oléate 200 μ M induit une augmentation plus importante de la production de DHEA par les cellules surrénaliennes bovines que le palmitate 100 μ M et ce, sous stimulation à 10 nM d'ACTH et à 10 μ M de Fsk. Ainsi, les expérimentations ont été poursuivies avec l'oléate 200 μ M. Finalement, l'augmentation de la production de DHEA induite par la Fsk et ce, en présence ou en absence de palmitate 100 μ M et d'oléate 200 μ M, est semblable à la réponse induite par l'ACTH. Ainsi, les expérimentations ont été poursuivies avec la Fsk car ce composé permettait d'obtenir des résultats plus reproductibles, en plus de nécessiter qu'une seule administration par jour.

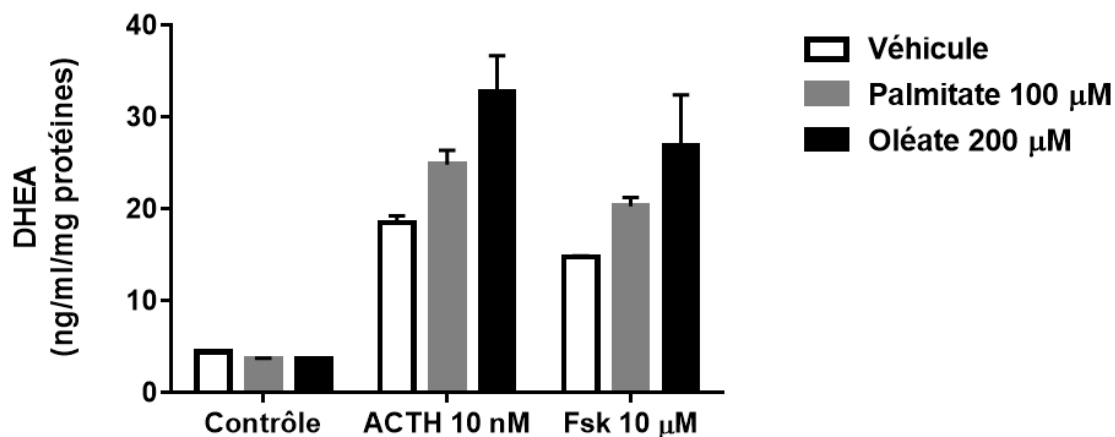


Figure 11. Effets du palmitate 100 µM et de l'oléate 200 µM sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines sous stimulation à l'ACTH 10 nM et à la Fsk 10 µM

Les cellules surrénaliennes bovines ont été exposées à 100 µM de palmitate (2X/jour) et 200 µM d'oléate (2X/jour) et ce, sous stimulation à 10 nM d'ACTH (2X/jour) et 10 µM de Fsk (1X/2 jours). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk, à l'ACTH et aux AGNE, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM ainsi qu'en ng/mL/mg protéines. Ces expérimentations ont été effectuées sur un n=1.

3.1.2 Effet de l'oléate 200 μ M sur la synthèse de plusieurs molécules

Suite à la détermination de la concentration optimale de Fsk et d'oléate, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'androgénèse, la glucocorticogénèse et le stress oxydatif a été déterminé au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines. Ainsi, la concentration de DHEA et d'androstènedione a été mesurée au niveau du milieu de culture puisque ces deux composés constituent les deux principaux androgènes surrénaliens. D'un autre côté, la concentration de cortisol, soit le principal glucocorticoïde produit et sécrété par la glande surrénale, a été mesurée au niveau du milieu de culture afin de déterminer si la présence d'oléate induit un changement de direction au niveau de la stéroïdogénèse en faveur de l'androgénèse. Finalement, la concentration de 8-isoprostane a été mesurée au niveau du milieu de culture puisqu'il s'agit d'un marqueur de peroxydation lipidique qui illustre les niveaux de stress oxydatif intracellulaire.

3.1.2.1 Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA

L'effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été déterminé à l'aide de 17 expériences distinctes faites à partir de 17 vaches différentes ($n=17$; fig. 12). Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk augmente d'environ 6 fois la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines comparativement à la condition contrôle ayant été exposées au DMSO (631 ± 72 % vs. 100 %; $p < 0,0001$). D'un autre côté, il est possible de constater que l'oléate 200 μ M augmente de 114 % la production de DHEA par les cellules surrénaliennes bovines comparativement à la Fsk seule (214 ± 20 % vs. 100 %; $p < 0,0001$).

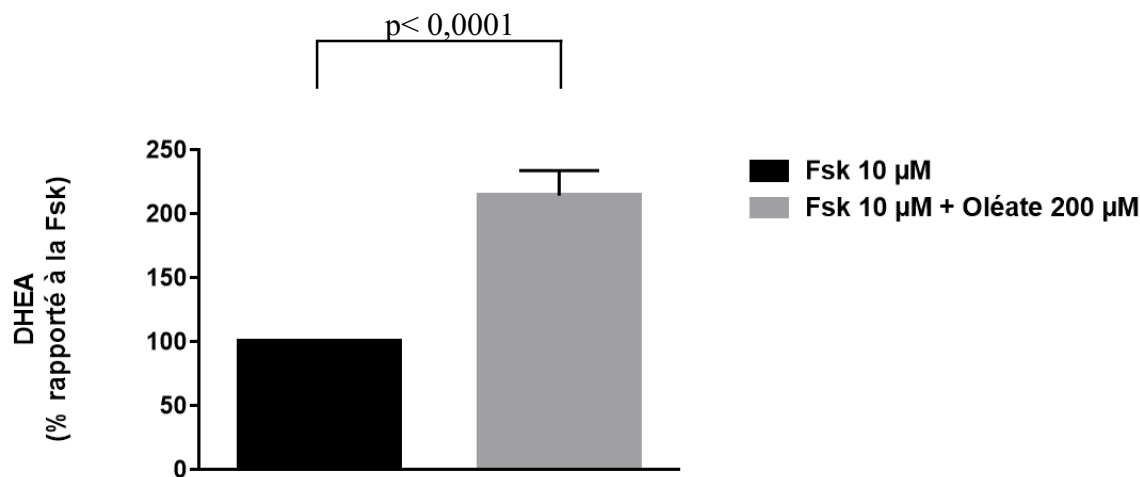


Figure 12. Augmentation de la production de DHEA par l'oléate 200 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 17 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.1.2.2 Effet de l'oléate 200 μM sur la production d'androstènedione

L'effet de l'oléate 200 μM sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines a par la suite été déterminé ($n=4$; fig. 13). Ainsi, la présence de 10 μM de Fsk augmente la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines de 30 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposées au DMSO ($2882 \pm 695 \%$ vs. 100% ; $p=0,13$). D'un autre côté, il est possible de constater que l'oléate 200 μM tend à augmenter la production d'androstènedione de 74 % comparativement à la Fsk seule ($174 \pm 19 \%$ vs. 100% ; $p=0,13$).

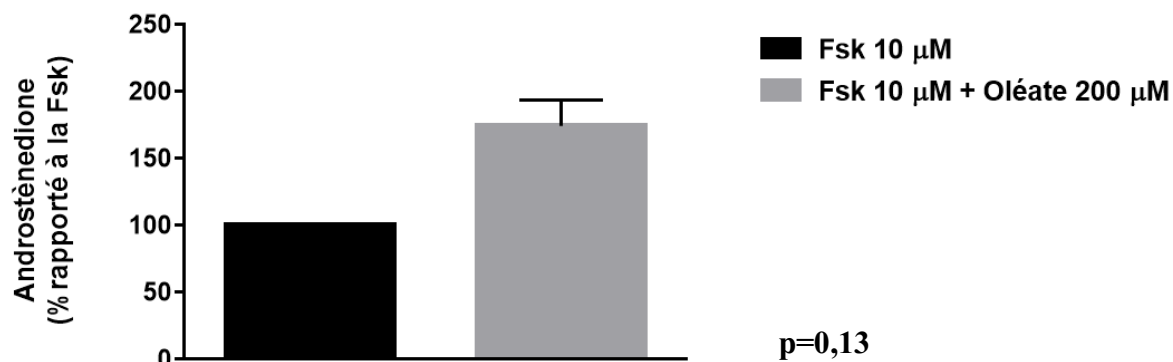


Figure 13. Effet de l'oléate 200 μM sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration d'androstènedione a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 4 expériences distincte ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL avant leur conversion en pourcentage.

3.1.2.3 Effet de l'oléate 200 μM sur la production de cortisol

De plus, l'effet de l'oléate 200 μM sur la production de cortisol par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été déterminé ($n=6$; fig. 14). Ainsi, la présence de 10 μM de Fsk augmente la production de cortisol par les cellules fasciculées et réticulées bovines d'environ 6 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposées au DMSO ($636 \pm 103\%$ vs. 100% ; $p=0,03$). D'un autre côté, la présence de 200 μM d'oléate diminue de 17 % la production de cortisol comparativement à la Fsk seule ($83 \pm 8\%$ vs. 100% ; $p=0,03$).

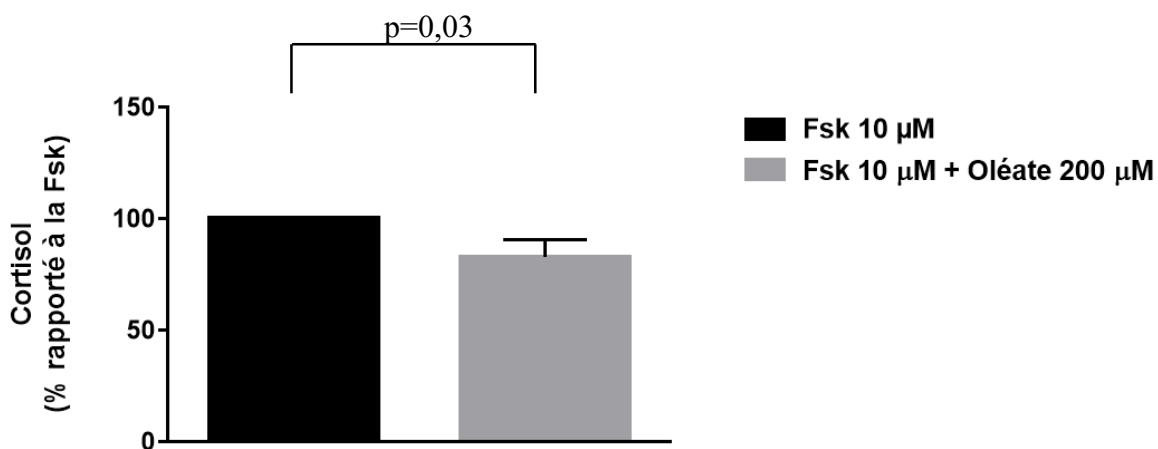


Figure 14. Augmentation de la production de cortisol par l'oléate 200 μM au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). Suite aux 48 h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de cortisol a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 6 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en $\mu\text{g}/\text{dl}/\text{mg}$ de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.1.2.4 Effet de l'oléate 200 μM sur la production de 8-isoprostane

Finalement, l'effet de l'oléate 200 μM sur la production de 8-isoprostane par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été déterminé ($n=6$; fig. 15). Ainsi, la présence de 10 μM de Fsk augmente la production de 8-isoprostane d'environ 10 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposés au DMSO ($965 \pm 500 \%$ vs. 100 %; $p=0,03$). D'un autre côté, sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μM d'oléate ne modifie pas la production de 8-isoprostane comparativement à la Fsk seule ($83 \pm 14 \%$ vs. 100 %; $p=0,44$).

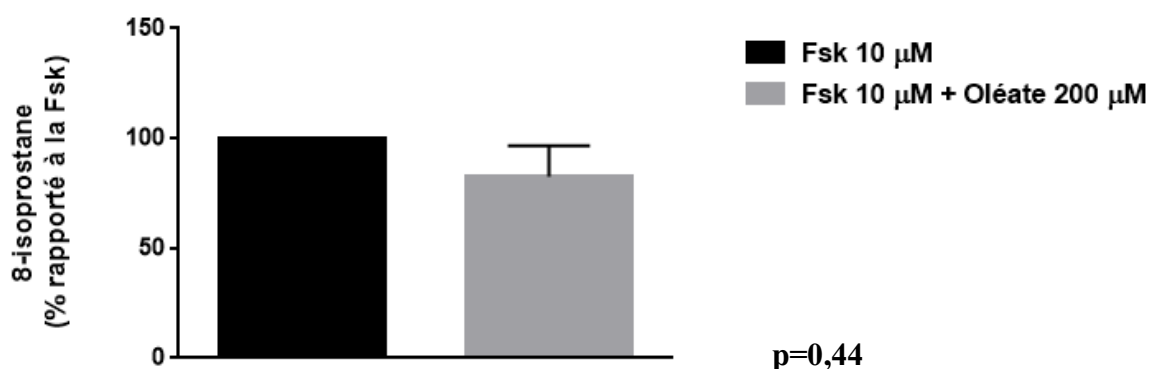


Figure 15. Effet de l'oléate 200 μM sur la production de 8-isoprostane par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de 8-isoprostane a été mesurée par EIA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 6 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en pg/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.1.3 Effet de la rosiglitazone 10 μ M sur la synthèse de DHEA

Par la suite, comme l'activation du récepteur PPAR γ augmente l'oxydation des AGNE intracellulaires et diminue les effets lipotoxiques qu'ils induisent (Medina-Gomez *et al.*, 2007), les effets de la rosiglitazone sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines ont été déterminés.

3.1.3.1 Effet d'une exposition de 48h à la rosiglitazone 10 μ M sur la production de DHEA

Il est possible de constater que le traitement de 48h des cellules surrénaliennes bovines à la rosiglitazone 10 μ M n'affecte pas la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M, comparativement à la condition ayant été traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M (103 ± 18 % vs. 100 %; $p > 0,99$; $n=3$; fig. 16).

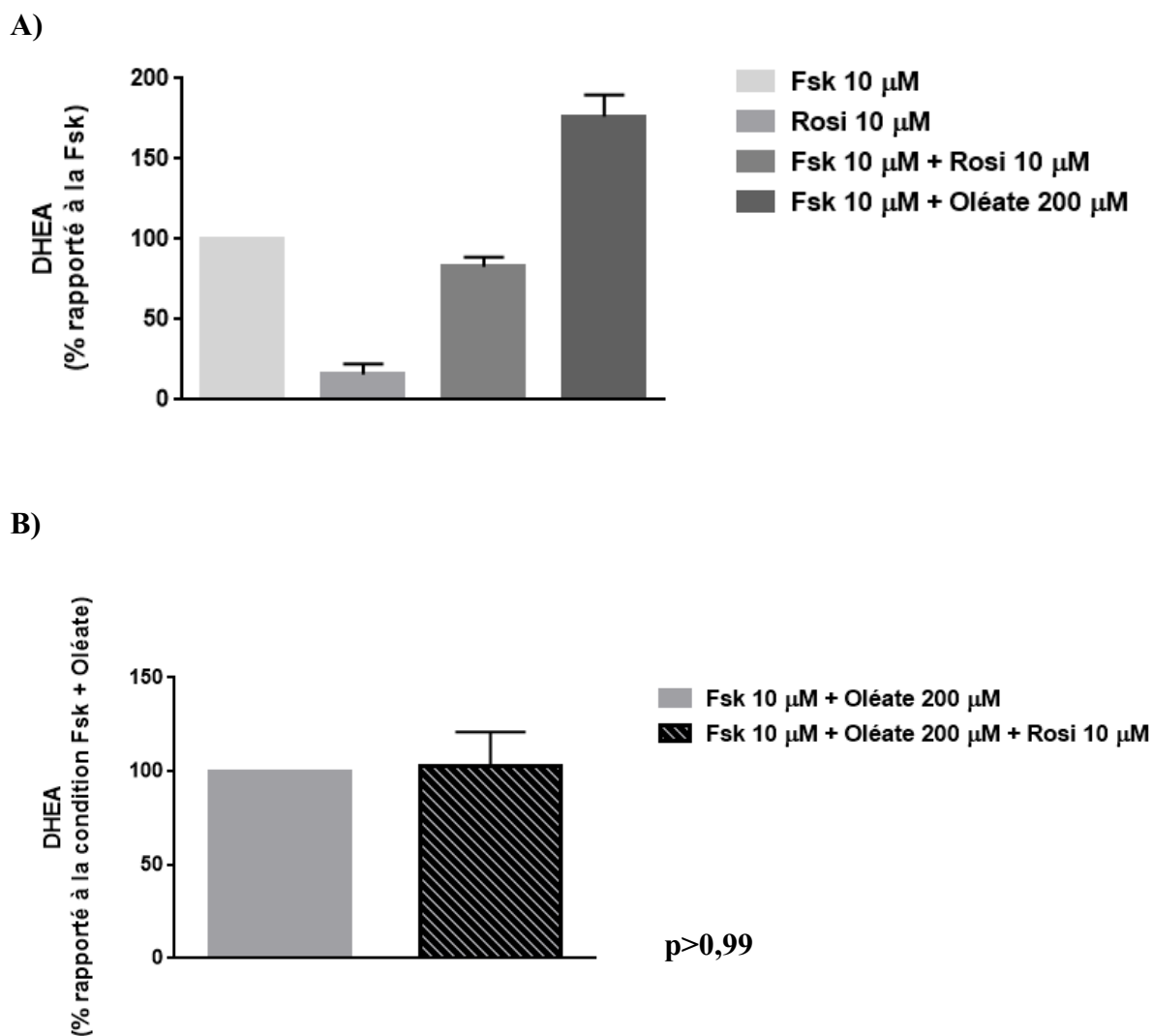


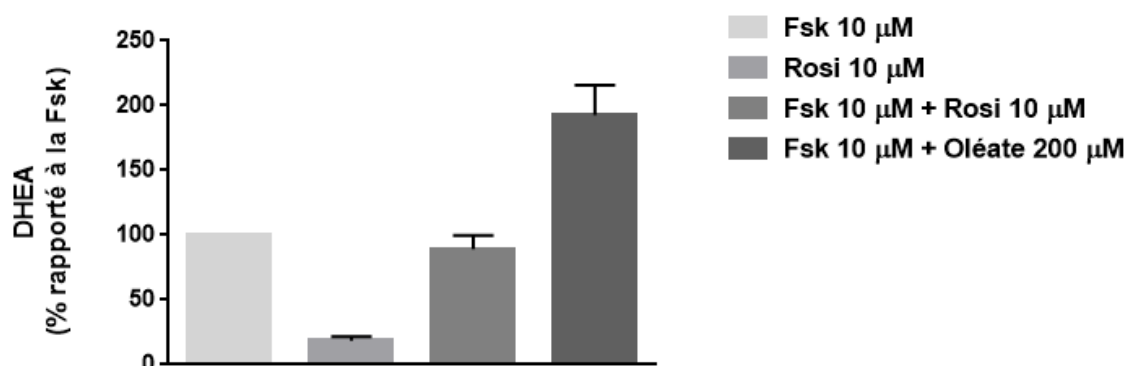
Figure 16. Effet d'une exposition de 48h à la rosiglitazone 10 μM sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μM par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours), 200 μM d'oléate (2X/jour) et 10 μM de rosiglitazone (2X/jour). Suite aux 48 h d'exposition à la Fsk, à l'oléate et à la rosiglitazone, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 3 expériences distinctes. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage. A) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. B) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et à oléate.

3.1.3.2 *Effet d'une exposition prolongée à la rosiglitazone 10 μ M sur la production de DHEA*

Par la suite, comme l'effet maximal des TZD est généralement obtenu suite à une administration de 2 à 10 jours (Day, 2001), l'effet d'une exposition prolongée à la rosiglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été déterminé. Ainsi, les cellules ont été incubées en présence de 10 μ M de rosiglitazone durant la phase de stimulation aux acides gras et à la Fsk, et ce, deux fois par jour, comme à la section 3.1.3.1. Cependant, dans ce cas d'exposition prolongée, les cellules ont aussi été exposées à la rosiglitazone durant la phase de prolifération, et ce, à une concentration de 10 μ M une fois par jour. La phase de prolifération durait en moyenne 7 jours et la phase de stimulation durait 48h. Ainsi, il est possible de constater que le traitement prolongé des cellules surrénaliennes bovines à la rosiglitazone 10 μ M n'affecte pas la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M, comparativement à la condition ayant été traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M (95 ± 11 % vs. 100 %; $p=0,81$; $n=7$; fig. 17).

A)



B)

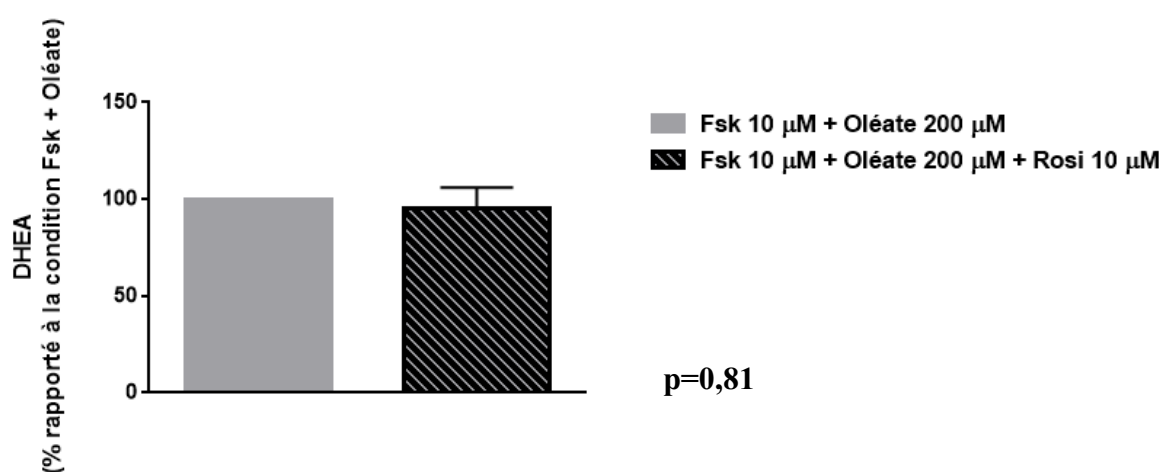


Figure 17. Effet d'une exposition prolongée à la rosiglitazone 10 μM sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μM par les cellules fasciculées et réticulées bovines

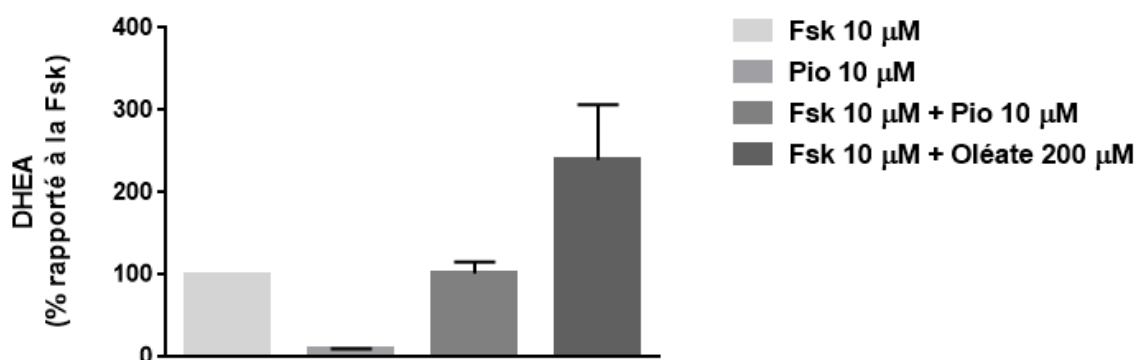
Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours), 200 μM d'oléate (2X/jour) et 10 μM de rosiglitazone (1X/jour durant la prolifération cellulaire et 2X/jour durant la stimulation cellulaire). Suite aux 48 h de stimulation à la Fsk, à l'oléate et à la rosiglitazone, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition ± SEM de 7 expériences distinctes. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage. A) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. B) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et à oléate.

3.1.4 Effet de la pioglitazone 10 μ M sur la synthèse de DHEA

3.1.4.1 Effet d'une exposition de 48h à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA

Comme aucune différence significative concernant la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M était détectée lorsque les cellules fasciculées et réticulées bovines étaient exposées à 10 μ M de rosiglitazone de façon aiguë ou prolongée, l'effet de la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines induite par l'oléate 200 μ M a été déterminés puisque ces deux TZD n'induisent pas tout à fait les mêmes effets. En effet, il a été démontré que la pioglitazone induit des effets plus favorables sur les niveaux de lipides plasmatiques ainsi que sur les lipoprotéines comparativement à la rosiglitazone (Deeg et Tan, 2008). Ainsi, il est possible de constater que le traitement de 48h des cellules surrenaliennes bovines à la pioglitazone 10 μ M n'affecte pas la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M, comparativement à la condition ayant été traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M (114 ± 6 % vs. 100 %; $p=0,25$; $n=3$; fig. 18).

A)



B)

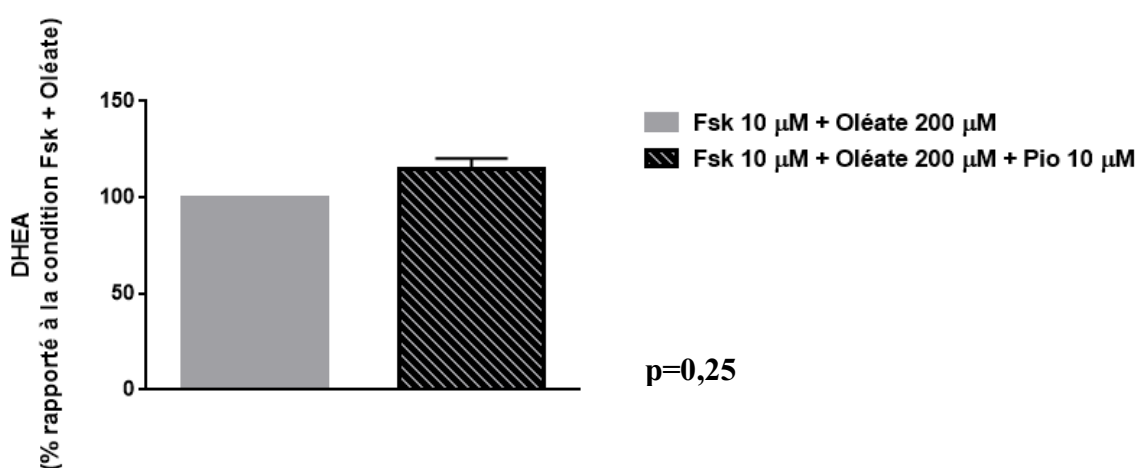


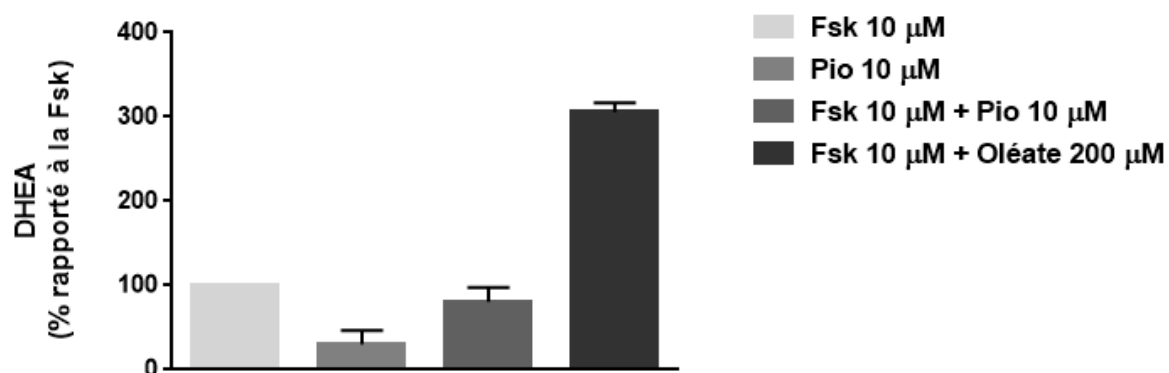
Figure 18. Effet d'une exposition de 48h à la pioglitazone 10 µM sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 µM par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 µM de Fsk (1X/2 jours), 200 µM d'oléate (2X/jour) et 10 µM de pioglitazone (2X/jour). Suite aux 48h d'exposition à la Fsk, à l'oléate et à la pioglitazone, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 3 expériences distinctes. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage. A) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. B) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et à oléate.

3.1.4.2 *Effet d'une exposition prolongée à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA*

Finalement, l'effet d'une exposition prolongée à la pioglitazone 10 μ M sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules fasciculées et réticulées bovines a été déterminé. Ainsi, les cellules ont été incubées en présence de 10 μ M de pioglitazone durant la phase de stimulation aux acides gras et à la Fsk, et ce, deux fois par jour, comme à la section 3.1.4.1. Cependant, dans ce cas d'exposition prolongée, les cellules ont aussi été exposées à la pioglitazone durant la phase de prolifération, et ce, à une concentration de 10 μ M une fois par jour. La phase de prolifération durait en moyenne 7 jours et la phase de stimulation durait 48h. Ainsi, il est possible de constater que le traitement prolongé des cellules surrénaliennes bovines à la pioglitazone 10 μ M ne semble pas affecter la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M, comparativement à la condition ayant été traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M (91 ± 28 % vs. 100 %; n=2; fig. 19). Cependant, ces valeurs ne peuvent pas subir d'analyse statistique puisque les expérimentations ont été effectuées sur deux glandes.

A)



B)

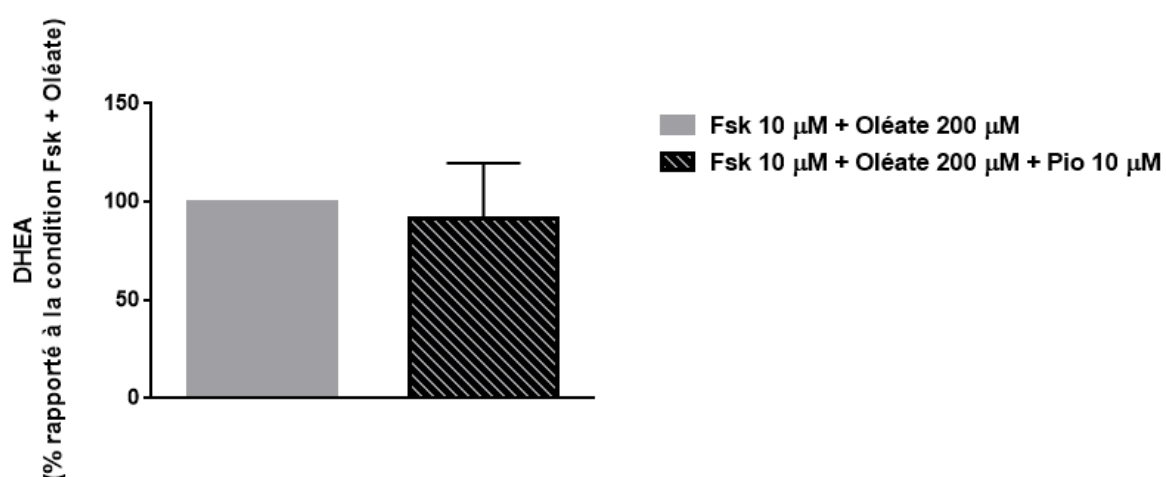


Figure 19. Effet d'une exposition prolongée à la pioglitazone 10 μM sur la production de DHEA induite par l'oléate 200 μM par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours), 200 μM d'oléate (2X/jour) et 10 μM de pioglitazone (1X/jour durant la prolifération cellulaire et 2X/jour durant la stimulation cellulaire). Suite aux 48 h de stimulation à la Fsk, à l'oléate et à la pioglitazone, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition ± SEM de 2 expériences distinctes. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage. A) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. B) Les valeurs de DHEA sont exprimées en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et à oléate.

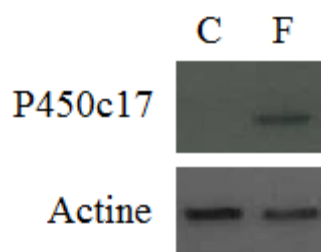
3.1.5 Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la synthèse des androgènes

Puisqu'il a été démontré que l'oléate augmente de façon significative la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines, nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène puisse être dû à l'augmentation de l'expression protéique de la P450c17 ou de son cofacteur POR par cet AGNE. Ainsi, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de la P450c17 et de POR au niveau des cellules surrénaliennes bovines a été déterminé.

3.1.5.1 Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de la P450c17

Initialement, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de la P450c17 a été déterminé. Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk augmente l'expression de la P450c17 d'environ 100 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposés au DMSO ($10\,912 \pm 3455$ % vs. 100 %; $p=0,008$; $n=8$; fig. 20). D'un autre côté, il est possible de constater que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate n'affecte pas l'expression de la P450c17 comparativement à la Fsk seule (98 ± 6 % vs. 100 %; $n=8$; $p=0,74$; fig. 21).

A)



B)

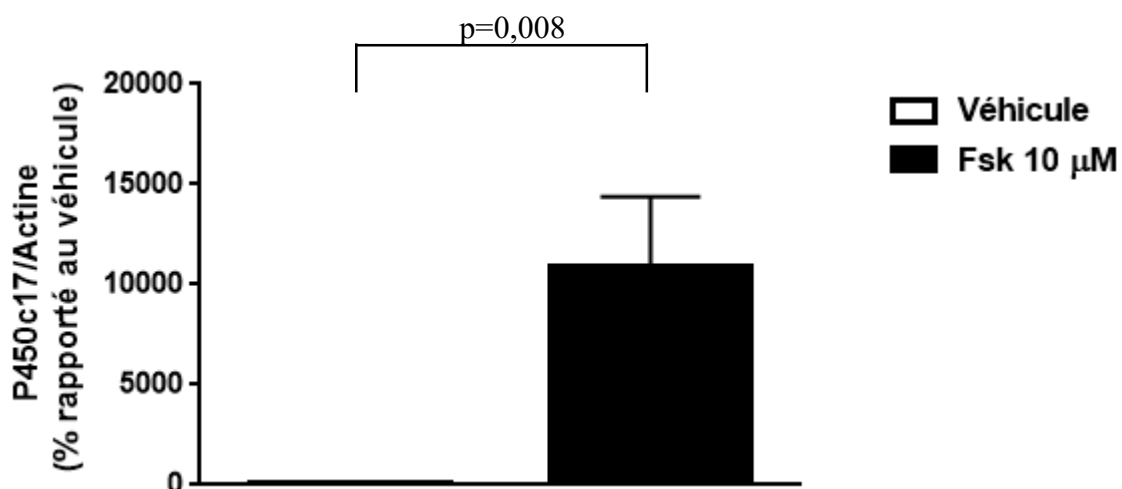
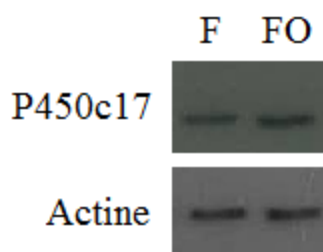


Figure 20. Augmentation de l'expression protéique de la P450c17 par la Fsk 10 μM au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) durant 48h. Par la suite, les protéines cellulaires ont été récoltées et 5 μg de protéines ont été séparées en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel de polyacrylamide avant d'être transférées sur une membrane de PVDF. A) L'expression de la P450c17 et de l'actine a été déterminée grâce à des anticorps spécifiques. C = condition contrôle et F = condition traitée à la Fsk 10 μM. B). Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition ± SEM de 8 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition contrôle traitée au DMSO et sont rapportés sur l'expression de l'actine.

A)



B)

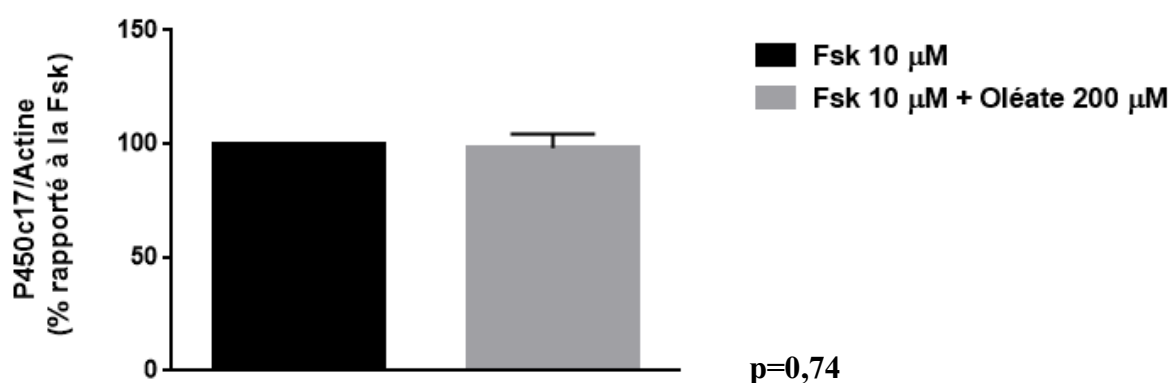


Figure 21. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, les protéines cellulaires ont été récoltées et 5 μ g de protéines ont été séparées en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel de polyacrylamide avant d'être transférées sur une membrane de PVDF. A) L'expression de la P450c17 et de l'actine a été déterminée grâce à des anticorps spécifiques. F = condition traitée à la Fsk 10 μ M et FO = condition traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M. B) Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 8 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et sont rapportés sur l'expression de l'actine.

3.1.5.2 Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression de POR

Par la suite, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de POR, soit un des principaux cofacteurs de la P450c17, a été déterminé. Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk augmente l'expression de POR de 3,5 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposée au DMSO (350 ± 53 % vs. 100 %; $p=0,02$; $n=7$; fig. 22). D'un autre côté, sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate n'influence pas l'expression de POR comparativement à la Fsk seule (119 ± 13 % vs. 100 %; $p=0,22$; $n=7$; fig. 23).

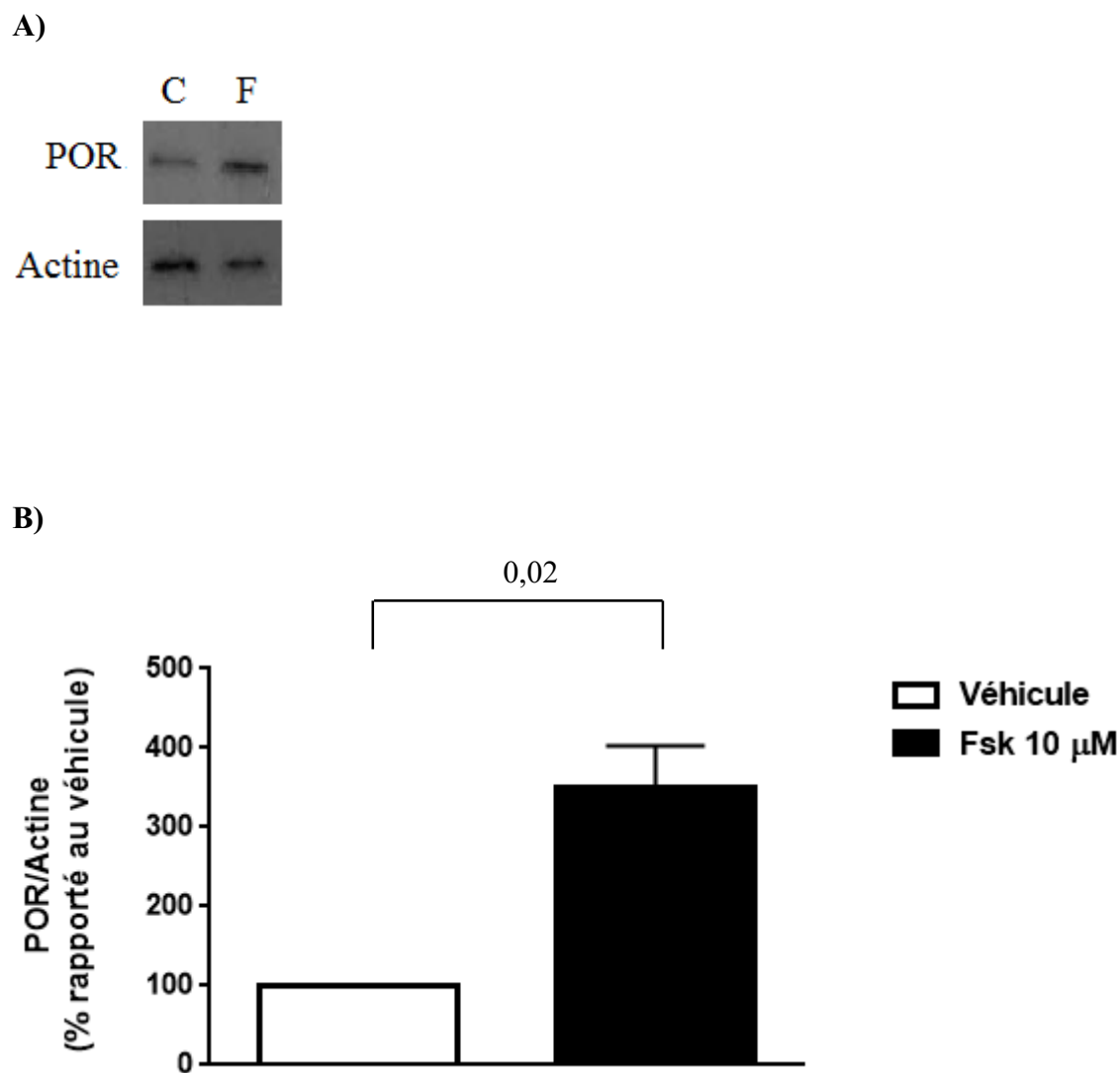


Figure 22. Augmentation de l'expression protéique de POR par la Fsk 10 μ M au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrenaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) durant 48h. Par la suite, les protéines cellulaires ont été récoltées et 5 μ g de protéines ont été séparées en fonction de leurs poids moléculaires sur un gel de polyacrylamide avant d'être transférées sur une membrane de PVDF. A) L'expression de POR et de l'actine a été déterminée grâce à des anticorps spécifiques. C = condition contrôle et F = condition traitée à la Fsk 10 μ M. B) Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 7 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition contrôle traitée au DMSO et sont rapportés sur l'expression de l'actine.

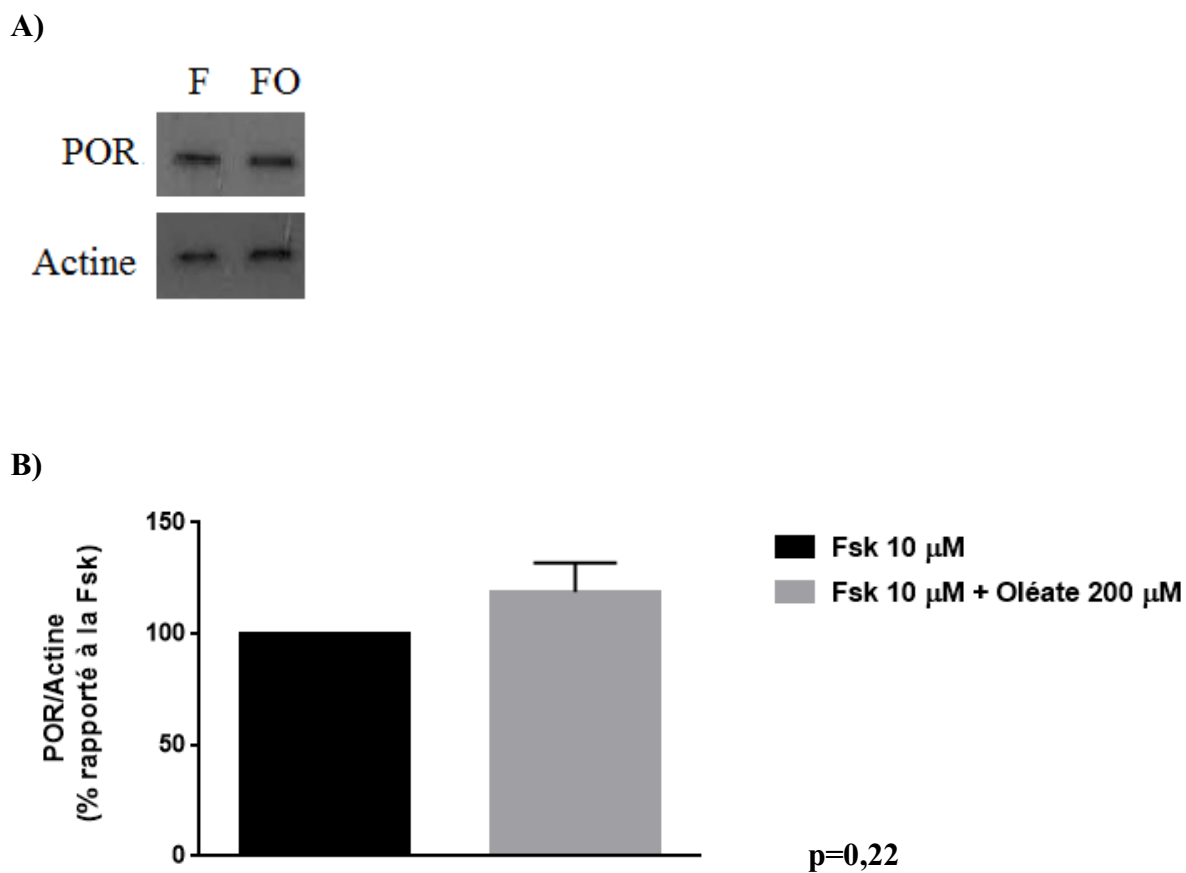


Figure 23. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'expression protéique de POR par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, les protéines cellulaires ont été récoltées et 5 μ g de protéines ont été séparées en fonction de leur poids moléculaires sur un gel de polyacrylamide avant d'être transférées sur une membrane de PVDF. A) L'expression de POR et de l'actine a été déterminée grâce à des anticorps spécifiques. F = condition traitée à la Fsk 10 μ M et FO = condition traitée à la Fsk 10 μ M et à l'oléate 200 μ M. B) Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 7 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk et sont rapportés sur l'expression de l'actine.

3.1.6 Immunoprécipitation

Puisque l'oléate augmente de façon significative la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines tout en n'affectant pas significativement l'expression protéique de la P450c17 et de POR, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la production de DHEA induite par l'oléate pourrait être due à l'augmentation des niveaux de phosphorylation en sérine de la P450c17 par cet AGNE. Ainsi, nous avons voulu déterminer l'effet de l'oléate 200 μ M sur la phosphorylation en sérine de la P450c17 au niveau des cellules surrénaliennes bovines. Pour y arriver, une immunoprécipitation de la P450c17 devait initialement être effectuée afin d'isoler cette protéine. Cependant, malgré tous les changements effectués au niveau du protocole, nous n'avons pas réussi à immunoprécipiter la P450c17 au niveau des cellules surrénaliennes bovines. De façon parallèle, afin de s'assurer que la technique d'immunoprécipitation utilisée était adéquate, l'immunoprécipitation de SHP-1 a été effectuée à titre de contrôle négatif (fig. 24). Ainsi, puisque l'expression de cette protéine est augmentée suite à son immunoprécipitation, il est possible de conclure que les manipulations d'immunoprécipitation étaient adéquates.

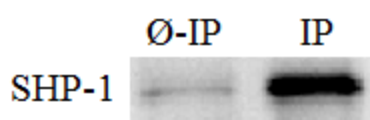


Figure 24. Immunoprécipitation de SHP-1 au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

L'expression de SHP-1 a été déterminée grâce à un anticorps spécifique. Ø-IP = échantillons n'ayant pas été immunoprécipité et IP = échantillons ayant été immunoprécipité.

3.1.7 Effet de l'oléate 200 μ M sur les activités enzymatiques de la P450c17

Puisque l'oléate augmente de façon significative la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines tout en n'affectant pas l'expression protéique de la P450c17 et de POR, nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait être dû à l'augmentation de l'activité enzymatique de la P450c17 par cet AGNE. Ainsi, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17 α hydroxylase et 17,20-lyase de la P450c17 au niveau des cellules surrénaliennes bovines a été déterminé.

3.1.7.1 Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17

Initialement, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17, soit l'activité qui va conduire à la synthèse des glucocorticoïdes et des androgènes, a été déterminé. Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk augmente l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 de 1,8 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposée au DMSO (175 ± 22 % vs. 100 %; n=3; p=0,06). D'un autre côté, il est possible de constater que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate n'affecte pas l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 comparativement à la Fsk seule (101 ± 2 % vs. 100 %; p=0,75; n=3; fig. 25).

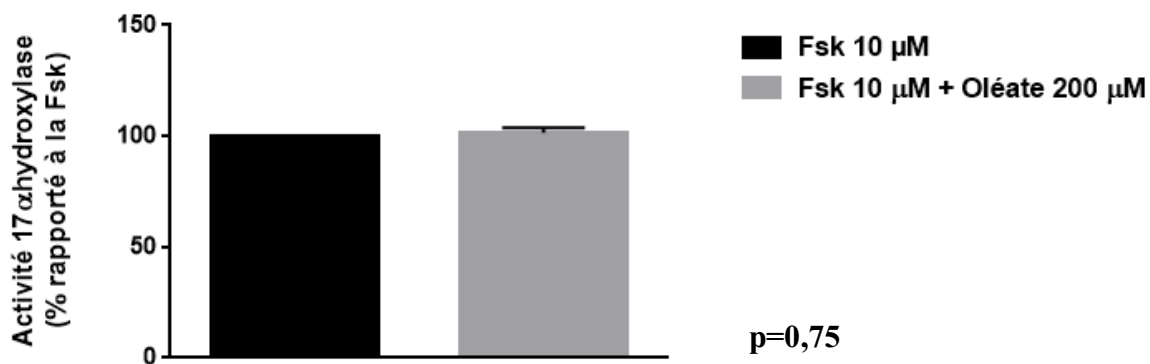


Figure 25. Effet de l'oléate 200 μM sur l'activité 17αhydroxylase de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). De plus, de l'épostane (10 μM; 24h avant la récolte cellulaire) et de [³H]prégnénolone (14 KBq; 4h avant la récolte cellulaire) ont été ajoutés au milieu de culture. Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et les stéroïdes ont été extraits grâce à une extraction liquide-liquide avant d'être séparés sur une plaque de silice. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition ± SEM de 3 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines et les glandes dont la sécrétion de DHEA n'augmentait pas en réponse à l'oléate 200 μM ont été exclues.

3.1.7.2 Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17

Par la suite, l'effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17, soit l'activité qui va mener à la synthèse des androgènes, a été déterminé. Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk tends à augmenter l'activité 17,20-lyase de la P450c17 de 1,8 fois comparativement à la condition contrôle ayant été exposés au DMSO (176 ± 41 % vs. 100 %; $n=4$; $p=0,13$). D'un autre côté, il est possible de constater que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate n'affecte pas l'activité 17,20-lyase de la P450c17 comparativement à la Fsk seule (110 ± 10 % vs. 100 %; $p=0,38$; $n=4$; fig. 26).

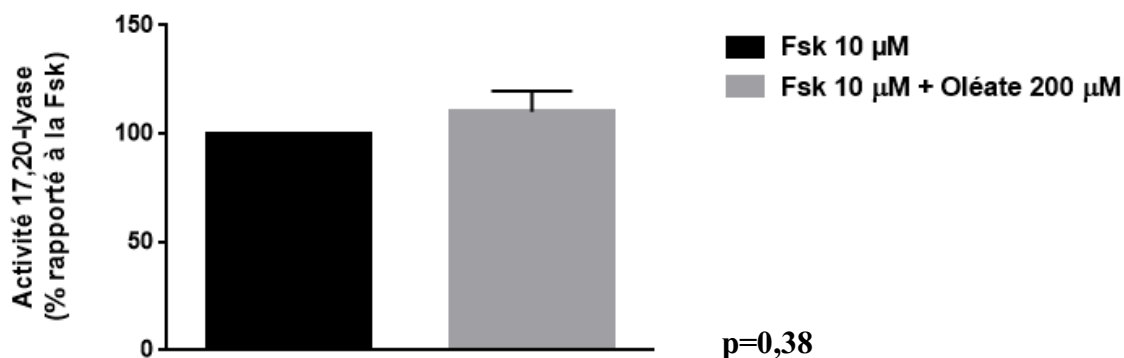


Figure 26. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). De plus, de l'épostane (10 μ M; 24h avant la récolte cellulaire) et différents précurseurs radioactifs ($[^3\text{H}]17\text{OH}$ -prégnénolone; 14 KBq; 4h avant la récolte cellulaire) ont été ajoutés au milieu de culture. Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et les stéroïdes ont été extraits grâce à une extraction liquide-liquide avant d'être séparés sur une plaque de silice. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 4 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines et les glandes dont la sécrétion de DHEA n'augmentait pas en réponse à l'oléate 200 μ M ont été exclues.

3.1.8 *Bloc stéroïdien*

Par la suite, puisque les résultats d'activité enzymatique obtenus avec la méthode d'incorporation cellulaire de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince démontraient que la présence d'acide gras n'augmente pas significativement l'activité 17,20-lyase de la P450c17, nous avons douté de la validité de cette méthode lorsqu'employée dans ce contexte. En effet, l'augmentation importante de la production d'androgènes, face à une baisse de celle du cortisol, ne peut pas se faire sans une certaine augmentation de l'activité 17,20-lyase de cette enzyme. Ainsi, nous avons voulu mesurer l'activité de l'enzyme d'une autre façon, soit en déterminant la concentration de son substrat et de son produit afin d'effectuer le ratio produit/substrat. Cette méthode mesure de façon moins directe l'activité enzymatique, mais elle se fait sans inhibiteurs et directement sur les milieux des expériences déjà effectuées. Donc, des échantillons de milieu de culture de cellules n'ayant pas été traités en présence d'épostane ont été envoyés au laboratoire clinique du CHUS afin de déterminer la concentration de plusieurs stéroïdes par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Un des aspects intéressants de cette méthode est qu'elle permet de vérifier la voie de la progestérone, contrairement à la méthode de l'incorporation cellulaire de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince, qui utilisait de l'épostane. Ainsi, les résultats obtenus par le laboratoire clinique du CHUS ont démontrés que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate augmente de 124 % l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 mesurée par la conversion de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone, comparativement à la Fsk seule (224 ± 19 % vs. 100 %; $p=0,02$; $n=7$; fig. 27). De plus, l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 mesurée par la conversion de la progestérone en 17OH-progestérone n'a pas été déterminée puisque la concentration de progestérone présente au niveau du milieu de culture n'a pas encore été mesurée (non incluse dans le bloc stéroïdien par LC-MS/MS). Cependant, le dosage de la progestérone sera effectué éventuellement. D'un autre côté, les résultats obtenus par le laboratoire clinique du CHUS ont démontrés que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate n'affecte pas l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-prégnénolone en DHEA, comparativement à la Fsk seule (96 ± 12 % vs. 100 %; $p=0,94$; $n=7$; fig. 28). Finalement, les résultats du bloc stéroïdien ont démontré que sous

stimulation à la Fsk, la présence de 200 μM d'oléate tends à augmenter de 81 % l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-progestérone en androstènedione, comparativement à la Fsk seule ($181 \pm 28 \%$ vs. 100 %; $p=0,08$; $n=7$; fig. 29).

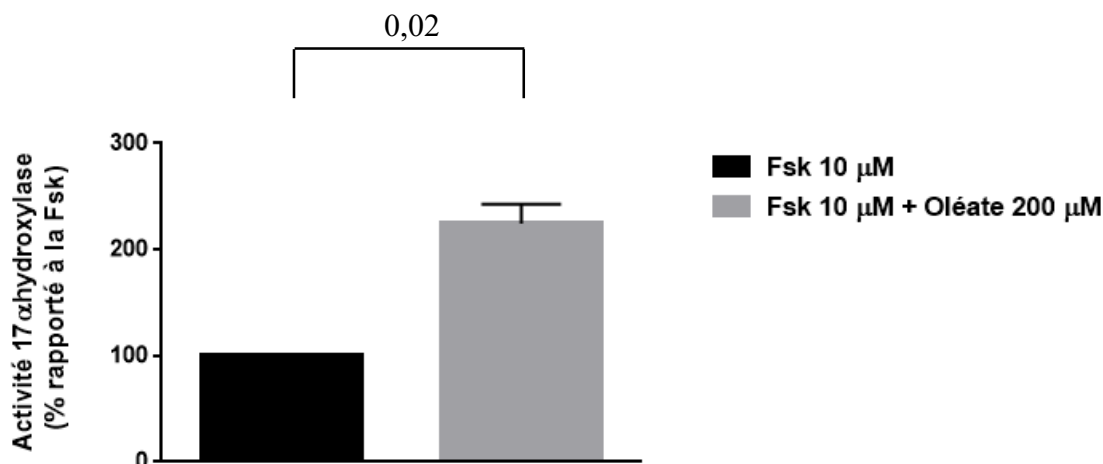


Figure 27. Augmentation de l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 mesurée par la conversion de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone par l'oléate 200 μM au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration des stéroïdes y a été quantifiés par LC-MS/MS. L'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 a été déterminée en effectuant le ratio 17OH-prégnénolone/prégnénolone. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM de 7 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines.

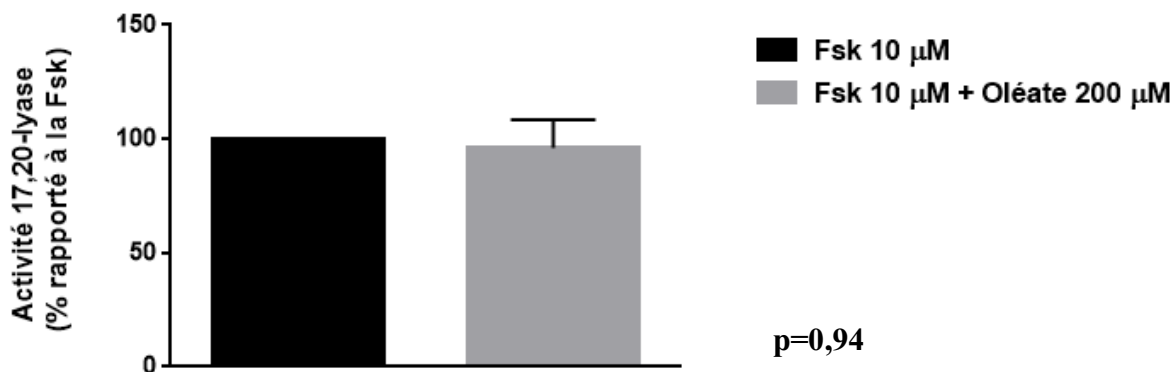


Figure 28. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-prégnénolone en DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration des stéroïdes y a été quantifiés par LC-MS/MS. L'activité 17,20-lyase de la P450c17 a été déterminée en effectuant le ratio DHEA/17OH-prégnénolone. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM de 7 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines.

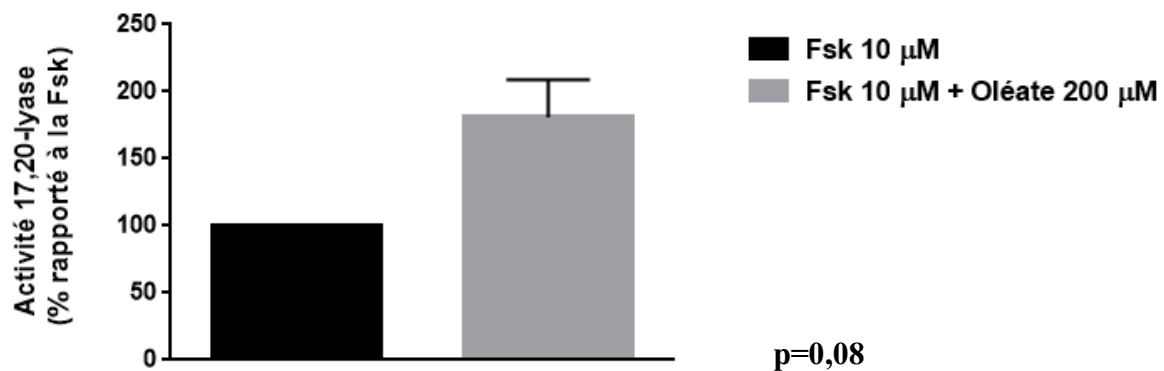


Figure 29. Effet de l'oléate 200 μ M sur l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-progestérone en androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovines

Les cellules surrénaliennes bovines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration des stéroïdes y a été quantifiés par LC-MS/MS. L'activité 17,20-lyase de la P450c17 a été déterminée en effectuant le ratio androstènedione/17OH-progestérone. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM de 7 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs n'ont pas été corrigées par la quantité de protéines.

3.2 Cellules NCI-H295R

3.2.1 Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production de DHEA

Initialement, nous avons voulu déterminer quel AGNE augmenterait de façon la plus marquée la synthèse de DHEA au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R et ce, à quelle concentration. Ainsi, à la fig. 30, il est possible de voir les effets de doses croissantes de palmitate et d'oléate sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R (n=3). Initialement, en ce qui a trait à l'exposition des cellules NCI-H295R au palmitate, il est possible de constater que la production de DHEA est maximale en présence de 50 μ M de palmitate. D'un autre côté, en ce qui a trait à l'exposition des cellules NCI-H295R à l'oléate, il est possible de constater que la production de DHEA augmente en fonction de la concentration d'oléate, pour atteindre son maximum en présence de 200 μ M d'oléate. Il est important de noter qu'il n'existe pas de différence significative entre ces valeurs. Cependant, ces résultats exploratoires ont influencés notre choix de poursuivre les expérimentations avec l'oléate 200 μ M, supporté par le fait que cette façon de procéder permet que les résultats obtenus à l'aide de ces expérimentations soient plus comparables avec les résultats obtenus au niveau des cellules surrénaliennes bovines.

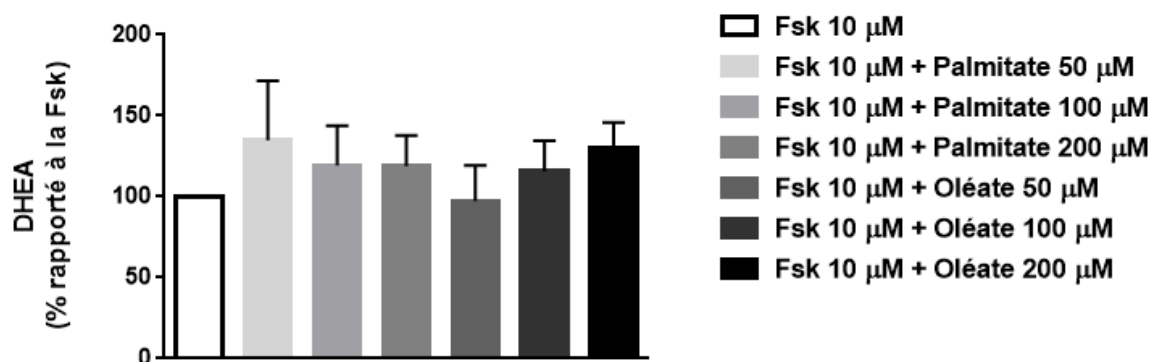


Figure 30. Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R

Les cellules NCI-H295R ont été stimulées à 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et incubées en présence de concentrations croissantes de palmitate (50, 100 et 200 μM ; 2X/jour) et d'oléate (50, 100, 200 μM ; 2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et aux AGNE, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 3 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.2.2 Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA

L'effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R a été déterminé (n=6; fig. 31). Ainsi, la présence de 10 μ M de Fsk augmente de 2 fois la production de DHEA par les cellules NCI-H295R comparativement à la condition contrôle ayant été exposée au DMSO (227 ± 41 % vs. 100 %; p=0,25). De plus, il est possible de constater que la présence de 200 μ M d'oléate tend à augmenter de 49 % la production de DHEA par les cellules NCI-H295R comparativement à la Fsk seule (149 ± 23 % vs. 100 %; n=6; p=0,09).

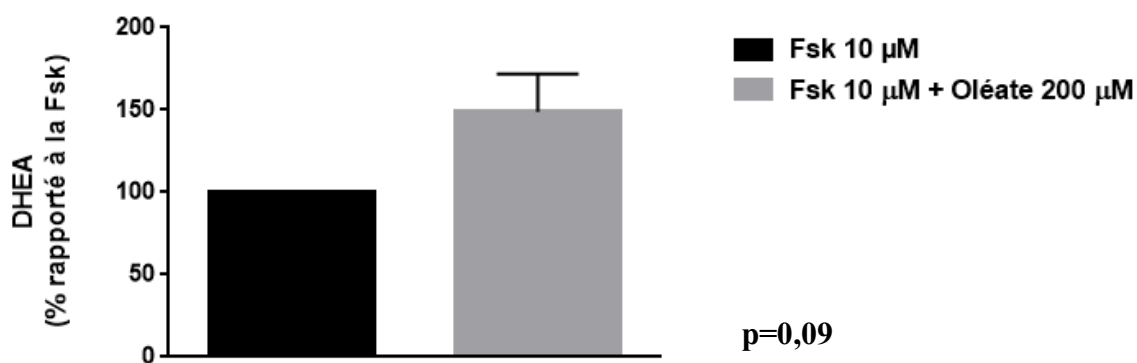


Figure 31. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production de DHEA par la lignée cellulaire NCI-H295R

Les cellules NCI-H295R ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de DHEA a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 6 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.2.3 Immunoprécipitation

Puisque l'immunoprécipitation de la P450c17 au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines ne fonctionne pas et que cette technique est nécessaire pour déterminer l'effet de l'oléate 200 μ M sur les niveaux de phosphorylation de la P450c17, nous avons réussi à mettre au point cette technique au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R. Ainsi, à la fig. 32, il est possible de constater que le protocole décrit à la section 2.6 est adéquat puisque l'expression de la P450c17 est augmentée dans l'échantillon dont la protéine a été immunoprécipité en comparaison à l'échantillon non immunoprécipité. Cependant, l'effet de l'oléate sur les niveaux de phosphorylation en sérine de la P450c17 n'a pas encore été déterminé puisque la technique de l'immunobuvardage des phosphosérines suivant l'immunoprécipitation de la P450c17 est présentement en train d'être mise au point.



Figure 32. Immunoprécipitation de la P450c17 au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R

Afin de déterminer l'effet de l'oléate 200 μ M sur les niveaux de phosphorylation en sérine de la P450c17, cette protéine devait initialement être isolée grâce à une immunoprécipitation. Ainsi, cette technique a été mise au point au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R. L'expression de la P450c17 a été déterminée grâce à un anticorps spécifique. Ø-IP = échantillon n'ayant pas été immunoprécipité et IP = échantillon ayant été immunoprécipité.

3.3 Cellules surrénaliennes humaines

3.3.1 Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production d'androstènedione

Initialement, nous avons voulu déterminer quel AGNE augmenterait de façon la plus marquée la synthèse des androgènes par les cellules surrénaliennes humaines et ce, à quelle concentration. Ainsi, les cellules fasciculées et réticulées humaines ont été exposées à des concentrations croissantes de palmitate ou d'oléate durant 48h. La production d'androstènedione a été mesurée dans ce modèle cellulaire puisque les cellules surrénaliennes humaines sécrètent peu de DHEA lorsqu'exposées à nos conditions de culture. Ainsi, l'effet de doses croissantes de palmitate ou d'oléate sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées humaines a été déterminé (n=1; fig. 33). La présence de 10 μ M de Fsk augmente d'environ 24 fois la production d'androstènedione comparativement à la condition contrôle ayant été exposés au DMSO (480 ± 53 ng/mL/mg protéines vs. 20 ± 5 ng/mL/mg protéines). Par la suite, il est possible de constater que la production d'androstènedione par les cellules surrénaliennes humaines est maximale en présence de 200 μ M d'oléate. En effet, cette concentration d'oléate augmente de 2,7 fois la production d'androstènedione comparativement à la Fsk seule (1311 ± 44 ng/mL/mg protéines vs. 480 ± 53 ng/mL/mg protéines). Ainsi, les expérimentations ont été poursuivies avec l'oléate 200 μ M.

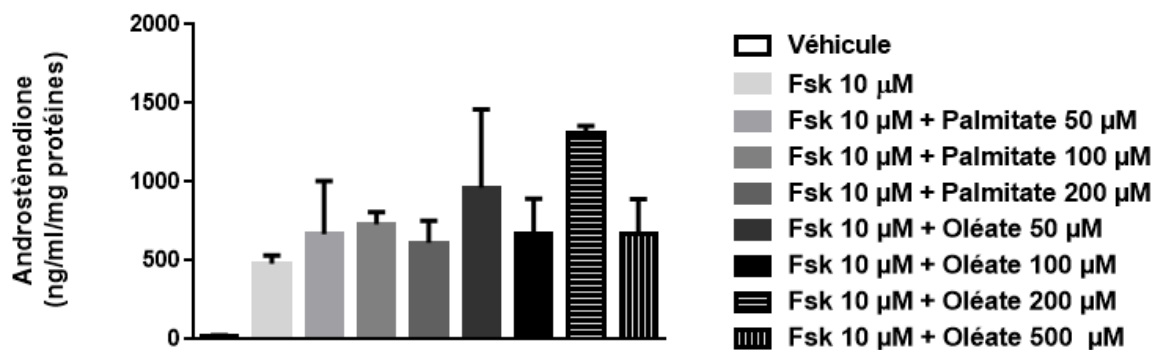


Figure 33. Effets de différents AGNE à différentes concentrations sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées humaines

Les cellules surrénaliennes humaines ont été stimulées à la Fsk (10 µM; 1X/2 jours) et incubées en présence de concentrations croissantes de palmitate (50, 100 et 200 µM; 2X/jour) et d'oléate (50, 100, 200 et 500 µM; 2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et aux AGNE, le milieu de culture a été récupéré et la concentration d'androstènedione a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM d'une expérience distincte ainsi qu'en ng/mL/mg protéines.

3.3.2 Effet de l'oléate 200 µM sur la synthèse d'androstènedione et de cortisol

3.3.2.1 Effet de l'oléate 200 µM sur la production d'androstènedione

Au niveau des cellules fasciculées et réticulées humaines, la présence de 10 µM de Fsk tends à augmenter de 34 fois la production d'androstènedione comparativement à la condition contrôle ayant été exposée au DMSO (3415 ± 2092 % vs. 100 %; $n=3$; $p=0,25$). De plus, il est possible de constater que l'oléate 200 µM tend à augmenter de 97 % la production d'androstènedione par ces cellules comparativement à la Fsk seule (197 ± 58 % vs. 100 %; $p=0,50$; $n=3$; fig. 34).

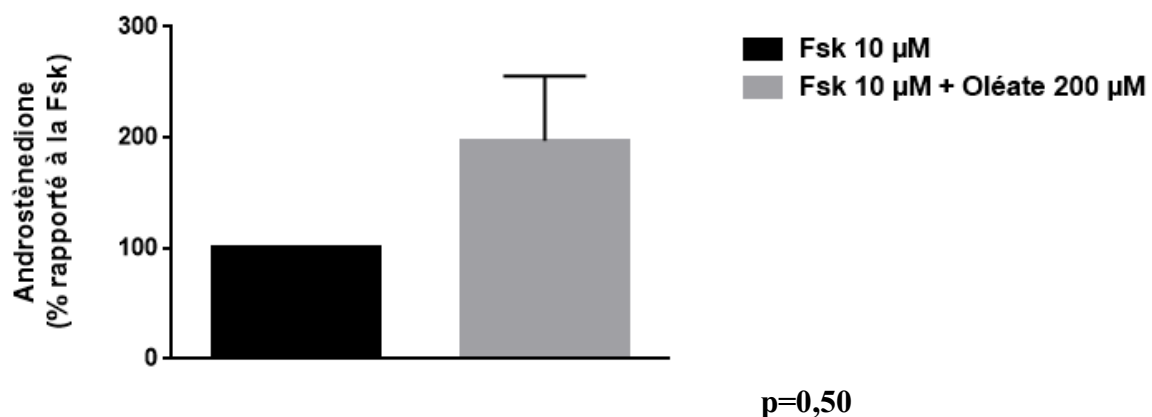


Figure 34. Effet de l'oléate 200 μ M sur la production d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées humaines

Les cellules surrénaliennes humaines ont été incubées en présence de 10 μ M de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μ M d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration d'androstènedione a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM de 3 expériences distinctes ainsi qu'en pourcentage de la condition traitée à la Fsk. Les valeurs étaient exprimées en ng/mL/mg de protéines avant leur conversion en pourcentage.

3.3.2.2 Effet de l'oléate 200 μM sur la production de cortisol

Au niveau des cellules fasciculées et réticulées humaines, la Fsk 10 μM augmente d'environ 17 fois la production de cortisol comparativement à la condition contrôle traitée au DMSO (5223 ± 488 vs. 304 ± 11 $\mu\text{g}/\text{dl}/\text{mg}$ de protéines). Sous stimulation à la Fsk, la présence d'oléate 200 μM diminue la production de cortisol d'environ 2 fois comparativement à la Fsk seule (2880 ± 429 vs. 5223 ± 488 $\mu\text{g}/\text{dl}/\text{mg}$ de protéines). Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée sur ces données puisque les expérimentations ont été effectuées sur une seule glande ($n=1$; fig. 35).

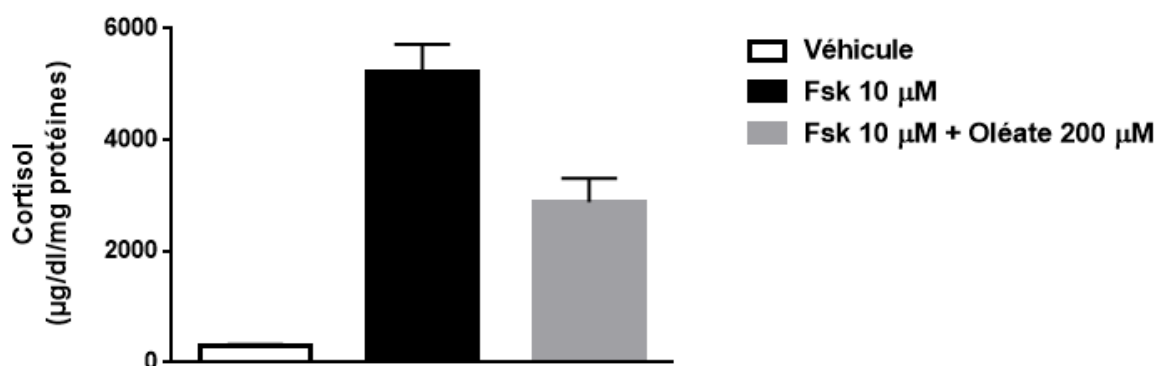


Figure 35. Effet de l'oléate 200 μM sur la production de cortisol par les cellules fasciculées et réticulées humaines

Les cellules surrénaliennes humaines ont été incubées en présence de 10 μM de Fsk (1X/2 jours) et de 200 μM d'oléate (2X/jour). Suite aux 48h de stimulation à la Fsk et à l'oléate, le milieu de culture a été récupéré et la concentration de cortisol a été mesurée par ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne des duplicatas d'ensemencement par condition \pm SEM d'une expérience distincte ainsi qu'en $\mu\text{g}/\text{dl}/\text{mg}$ de protéines.

4. DISCUSSION

En résumé, les résultats de mon projet de maîtrise démontrent que la présence d'oléate induit un changement de direction au niveau de la stéroïdogénèse chez les cellules fasciculées et réticulées bovines, résultant en une augmentation de la production des androgènes (DHEA) et en une diminution de la production des glucocorticoïdes (cortisol). Par la suite, les résultats de cette étude montrent que l'oléate ne modifie pas l'expression protéique de la P450c17 et de son cofacteur, POR. De plus, les résultats de cette étude démontrent que la présence d'oléate permet d'augmenter l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 lorsque mesurée à l'aide du bloc stéroïdien. Finalement, l'oléate tends à augmenter l'activité 17,20-lyase de la P450c17 lorsque mesurée par la conversion de la 17OH-progesterone en androstènedione à l'aide du bloc stéroïdien.

Tel que mentionné dans l'introduction, le SOPK est une maladie endocrinienne qui touche entre 5 à 10% des femmes en âge de procréer, qui est principalement caractérisée par une hyperandrogénie et qui est associée au développement de plusieurs complications, tel que le diabète de type 2 et la dyslipidémie. Cependant, les causes de cette pathologie ne sont pas encore connues mais quelques études ont démontré l'implication des acides gras au niveau du développement de l'hyperandrogénie et ce, de façon *in vivo* et *in vitro*. En effet, notre laboratoire a récemment démontré que l'exposition des cellules surrénaliennes à des niveaux élevés d'acides gras entraîne une augmentation de la sécrétion des androgènes (Bellanger *et al.*, 2012). Ainsi, mon projet de maîtrise avait comme objectif principal de déterminer les impacts moléculaires d'un excès d'acides gras sur la production des androgènes par les cellules de la glande surrénale afin de permettre de mieux comprendre le lien entre la lipotoxicité et le développement de l'hyperandrogénie ainsi que les mécanismes cellulaires sous-jacents à ce phénomène.

Les expérimentations de mon projet de maîtrise ont été effectuées sur trois types cellulaires, soit au niveau de cultures cellulaires primaires bovines, de la lignée cellulaire NCI-H295R et au niveau de cultures cellulaires primaires humaines. Un des aspects intéressants de cette étude est l'utilisation de deux différents types d'acides gras. En effet, les cellules ont été

exposées durant 48h à des concentrations élevées de palmitate (acides gras saturés) ou d'oléate (acides gras monoinsaturé). Il a été démontré que le palmitate induit la mortalité cellulaire ainsi que la formation de peroxyde au niveau des peroxysomes des cellules β du pancréas alors que l'oléate protège contre les effets du palmitate (Gehrmann *et al.*, 2015). L'utilisation de ces deux types d'AGNE permet d'investiguer concernant la différence quant à leur implication au niveau de la production des androgènes.

Un des points forts de ce projet est l'utilisation de deux différents thiazolidinediones, soit la rosiglitazone et la pioglitazone. Ces insulinosensibilisateurs sont des composés thérapeutiques qui protègent contre le développement de la lipotoxicité en activant les récepteurs PPAR γ , permettant ainsi de favoriser le métabolisme oxydatif des AGNE au niveau des tissus non adipeux ainsi que l'augmentation de la lipogenèse au niveau du tissu adipeux (Gervois et Fruchart, 2003). Ainsi, nous avons supposé que les TZD entraîneraient une augmentation de l'utilisation des AGNE au niveau des cellules fasciculées et réticulées pour ainsi mener à une diminution de l'exposition de ces cellules aux AGNE. De plus, nous avons supposé que cette diminution de l'exposition cellulaire aux AGNE permettrait de diminuer la lipotoxicité induite par ces molécules pour subséquemment permettre de déterminer les effets des AGNE sur la production des androgènes de façon indirecte. Ces derniers résultats seront discutés de façon plus détaillée à la section 4.3.

4.1 Effets de l'oléate sur la production de différents stéroïdes

Un des principaux objectifs de cette étude était de déterminer l'effet des AGNE sur la production des androgènes au niveau de différents modèles de cellules surrénaliennes. Pour y arriver, ces cellules ont été exposées en présence de Fsk 10 μ M et d'oléate 200 μ M durant 48h et le milieu de culture a par la suite été retiré afin de déterminer la concentration de plusieurs stéroïdes par ELISA.

Notre étude montre que lorsque stimulées à la Fsk et en présence d'oléate 200 μ M, en comparaison à la Fsk seule, les cellules fasciculées et réticulées bovines sécrètent significativement plus de DHEA (fig. 12) et tendent à augmenter la production

d'androstènedione (fig. 13). Cet effet pourrait être expliqué par l'action de l'oléate sur les voies de signalisations intracellulaires menant à l'androgénèse. En effet, il a été démontré que les AGNE induisent une inhibition de la voie inhibitrice MEK/ERK1/2, ce qui pourrait alors entraîner une augmentation de la production des androgènes. En effet, une précédente étude de notre laboratoire a démontré qu'une exposition de 48h à 100 μ M de palmitate diminue les niveaux de phosphorylation de ERK1/2 et augmente la production de DHEA par les cellules fasciculées et réticulées bovines (Bellanger *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que la présence de 1 mM de palmitate inhibe la voie de MEK/ERK1/2 au niveau des cellules fibroblastiques (Usui *et al.*, 1997) et que l'inhibition de MEK1 induit une augmentation de la production de DHEA par les cellules thécales humaines (Nelson-Degrave *et al.*, 2005). L'effet direct de l'oléate sur la voie inhibitrice MEK/ERK1/2 n'a pas été déterminé dans cette étude mais il s'agit d'une hypothèse qui pourrait le mécanisme par lequel l'oléate augmente la production des androgènes. D'un autre côté, la différence entre la significativité de la sécrétion de DHEA et la non-significativité de la sécrétion d'androstènedione par les cellules fasciculées et réticulées bovine en réponse à une exposition à l'oléate peut être expliquée par le nombre d'expérimentations effectuées, soit 17 expérimentations concernant la sécrétion de DHEA et 4 expérimentations concernant la sécrétion d'androstènedione.

D'un autre côté, notre laboratoire a récemment démontré qu'une exposition de 48h au palmitate 100 μ M augmente la production de DHEA de 69% par les cellules fasciculées et réticulées bovines (Bellanger *et al.*, 2012) alors que cette nouvelle étude montre que l'oléate 200 μ M augmente la production de DHEA de 114%. La différence concernant la sécrétion de DHEA induite par ces deux AGNE peut être expliquée par le fait que le palmitate (acide gras saturé) est plus toxique que l'oléate (acide gras monoinsaturé) au niveau cellulaire. En effet, il a été démontré que le palmitate induit la mortalité cellulaire ainsi que la formation de peroxyde au niveau des cellules β du pancréas alors qu'il a été démontré que l'oléate protège des effets du palmitate (Gehrmann *et al.*, 2015). Ainsi, puisque l'oléate induit moins de mortalité cellulaire que le palmitate, il est possible d'exposer les cellules à une plus grande concentration d'AGNE, et d'ainsi, constater des effets plus prononcés de cet AGNE sur la production des androgènes par les cellules surrénaliennes bovines (fig. 11).

De plus, les résultats de cette étude démontrent que sous stimulation à la Fsk et en comparaison à la Fsk seule, l'oléate 200 μM tend à augmenter la production de DHEA de 49% dans la lignée cellulaire NCI-H295R (fig. 31) et tend à augmenter la production d'androstènedione de 97% dans les cellules fasciculées et réticulées humaines (fig. 34). Ainsi, malgré le fait que ces résultats ne sont pas significatifs, il est possible de constater que l'oléate exerce une propension à augmenter la production des androgènes et ce, tant dans les cellules surrénaliennes humaines qu'au niveau des cellules NCI-H295R. La non-significativité de ces résultats peut être expliquée par le fait que ces expérimentations ont été effectuées que sur un petit nombre de cultures cellulaires. En effet, les résultats obtenus au niveau des cellules NCI-H295R proviennent de 6 cultures cellulaires alors que les résultats obtenus au niveau des glandes surrénales humaines proviennent de 3 cultures cellulaires. La faible quantité d'expérimentations effectuées au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R est due au fait que la technique de culture cellulaire a été plutôt longue à mettre au point et que j'ai eu peu de temps pour répliquer ces expérimentations. Ces expériences pourront, par contre, être poursuivies par le laboratoire.

Finalement, il est possible de constater que sous stimulation à la Fsk, l'oléate 200 μM diminue la production de cortisol de 17% au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines comparativement à la Fsk seule (fig. 14). Ces résultats démontrent que la présence de l'oléate provoque un changement de direction au niveau de la stéroïdogénèse, résultant en une diminution de la production des glucocorticoïdes et en une augmentation de la production des androgènes. Ces résultats concordent avec une précédente étude du laboratoire, qui démontrait que la présence de 100 μM de palmitate diminue de 25% la production de cortisol par les cellules fasciculées et réticulées bovines comparativement à la Fsk seule (Bellanger *et al.*, 2012). De plus, ces résultats concordent aussi avec une étude *in vivo*, qui démontre qu'une infusion d'une solution de lipides et d'héparine diminue significativement les niveaux de cortisol plasmatique chez 7 hommes sains âgés entre 25 et 33 ans comparativement à l'infusion de saline (Coiro *et al.*, 2007). Finalement, il est aussi possible de constater que l'oléate 200 μM tend à diminuer la production de cortisol de 2 fois au niveau des cellules fasciculées et réticulées humaines, mais ces résultats n'ont pas subi d'analyses statistiques puisqu'ils ont été effectués que sur une seule culture cellulaire (fig. 35).

4.2 Effets de l'oléate sur la production de 8-isoprostane

Après avoir déterminé les effets des AGNE sur la stéroïdogénèse au niveau des cellules surrenaliennes bovines et humaines ainsi qu'au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R, nous avons montré que sous stimulation à la Fsk, l'oléate 200 μM n'affecte pas la production de 8-isoprostane par les cellules fasciculées et réticulées bovines, comparativement à la Fsk seule (fig. 15). Tel que mentionné précédemment, la formation de 8-isoprostane est le reflet de l'oxydation des phospholipides membranaires par les radicaux d'oxygène. Ce produit est reconnu dans la littérature comme étant un marqueur de la peroxydation lipidique (Morrow *et al.*, 1995). Ces résultats permettent de conclure que la présence de l'oléate n'augmente pas les niveaux de stress oxydatif cellulaire et ce, contrairement au palmitate. En effet, une étude que nous avons publiée récemment a démontré que sous stimulation à la Fsk, le palmitate 100 μM augmente la production de 8-isoprostane de 27,6% au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines comparativement à la Fsk seule (Bellanger *et al.*, 2012). Ainsi, les résultats obtenus dans notre laboratoire quant aux effets du palmitate et de l'oléate sur les niveaux de stress oxydatif cellulaire concordent avec les résultats d'autres études. En effet, il a été démontré que la production de peroxyde (molécule qui illustre les niveaux de stress oxydatif intracellulaire) par les cellules β provenant de pancréas de rat est significativement moins élevée suite à une exposition à 100 μM d'oléate, comparativement à une exposition à 100 μM de palmitate (Gehrmann *et al.*, 2015). Ainsi, l'étude de Gehrmann *et al.* démontre elle aussi que le palmitate induit un plus grand stress oxydatif au niveau intracellulaire que l'oléate.

D'un autre côté, nous avons pu observer que la présence de Fsk seule augmente la production de 8-isoprostane de 10 fois comparativement à la condition contrôle. Ces résultats correspondent à ceux obtenus dans la littérature, qui montre qu'une stimulation à la Fsk et à l'ACTH se traduit par une augmentation des niveaux de stress oxydatif (Hornsby et Crivello, 1983; Lefrancois *et al.*, 1999). Ainsi, il est intéressant de constater que l'exposition des cellules fasciculées et réticulées aux AGNE n'exacerbe pas les niveaux de stress oxydatif cellulaire engendrés par la stimulation à la Fsk seule, permettant ainsi de conclure que les

effets observés ne sont probablement pas secondaires à un stress oxydatif généralisé de ce type.

4.3 Effets des thiazolidinediones sur la production de DHEA

Puisque les thiazolidinediones protègent contre le développement de la lipotoxicité en activant le métabolisme oxydatif des AGNE au niveau des tissus non adipeux et en augmentant le stockage des AGNE au niveau des tissus adipeux (Gervois et Fruchart, 2003), un des objectifs de cette étude était de déterminer l'effet d'une surexposition aux AGNE sur la production des androgènes par les cellules surrénaliennes bovines suite à l'activation aiguë ou prolongée du récepteur PPAR γ par différents TZD au niveau de ces cellules.

Ainsi, nous avons démontré que le traitement aiguë ou plus prolongé des cellules surrénaliennes bovines à la rosiglitazone ou à la pioglitazone 10 μ M ne renverse pas la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M (fig. 16-19). Les effets aigus et prolongés des TZD qui ont été observés dans cette étude ne correspondent pas aux résultats qui étaient attendus. En effet, nous nous serions attendus à observer une diminution de la production de DHEA induite par l'oléate 200 μ M par les cellules surrénaliennes bovines lorsqu'elles sont exposées aux TZD de façon aiguë ou prolongée puisque ces molécules permettent d'augmenter l'oxydation des AGNE et d'ainsi diminuer leurs effets lipotoxiques. De plus, nos résultats ne correspondent pas aux résultats obtenus dans la littérature. En effet, une étude de Seto-Young *et al.*, publiée en 2005, a démontré que l'exposition des cellules ovariennes humaines à des concentrations de 20 μ M de pioglitazone et de rosiglitazone diminue la production de testostérone par ces cellules (Seto-Young *et al.*, 2005). La différence entre les résultats obtenus au cours de mon projet de maîtrise et les résultats de l'étude de Seto-Young *et al.* peut être expliquée par la concentration de TZD utilisée et le modèle cellulaire employé. En effet, lors de nos expérimentations, nous utilisons une concentration de 10 μ M de TZD alors que l'équipe de Seto-Young utilisait des concentrations de 20 μ M de TZD. Nous avons exposé nos cellules surrénaliennes bovines en présence de 10 μ M de TZD puisque cette concentration produisait une réponse maximale quant à la réduction de la production des androgènes au niveau des cellules surrénaliennes, tel que dans l'article de Kempna *et al.*,

2007. Ainsi, l'utilisation de concentration plus faible de TZD lors de mes expérimentations pourrait expliquer, du moins en partie, que les TZD n'affectent pas la production des androgènes. De plus, la différence entre les résultats de cette étude et celle de l'équipe de Seto-Young peut être expliquée par la différence entre les modèles cellulaires employés. En effet, mes expérimentations ont été effectuées au niveau des cellules surrenaliennes bovines alors que les expérimentations de l'équipe de Seto-Young ont été effectuées au niveau des cellules ovariennes humaines. Ainsi, ces deux modèles cellulaires n'ont pas la même physiologie et peuvent ne pas répondre de façon similaire à l'exposition aux TZD. Finalement, contrairement à l'équipe de Seto-Young, je n'ai pas utilisé d'insuline lors de mes expérimentations mais des essais antérieurs du laboratoire ont démontré que l'insuline n'affectait pas la production des androgènes au niveau du modèle cellulaire utilisé (résultats non-publiés).

D'un autre côté, il est possible de supposer que la stimulation des récepteurs PPAR γ n'induit pas une augmentation de l'expression des mitochondries et de l'activité de la β -oxydation dans les cellules surrenaliennes, dont la physiologie des mitochondries au niveau de ces cellules est fortement axée vers la stéroïdogénèse. Ainsi, il est possible de supposer que la β -oxydation des AGNE au niveau de ces cellules est faible, ce qui pourrait expliquer leur susceptibilité à une exposition aux AGNE. Toutes ces hypothèses devront toutefois être explorées dans le futur.

4.4 Effets de l'oléate sur l'expression de la P450c17 et de POR

Puisque nous avons démontré que les AGNE augmentent la production des androgènes tout en diminuant la production des glucocorticoïdes, l'objectif suivant était de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à ce phénomène. Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'oléate sur l'expression protéique de la P450c17 et de POR, un des principaux cofacteurs de la P450c17 favorisant son activité 17,20-lyase.

Nous avons montré que sous stimulation à la Fsk, l'oléate 200 μ M n'affecte pas l'expression de la P450c17 dans les cellules fasciculées et réticulées bovines (fig. 21). Ces résultats ne

correspondent pas aux résultats attendus. En effet, comme il a été mentionné dans l'introduction, la P450c17 est une des enzymes principales de la stéroïdogénèse qui dicte vers quelle voie la prégnénolone va se diriger, soit vers la voie des glucocorticoïdes ou vers la voie des androgènes. Ainsi, nous nous serions attendus à ce que l'augmentation de la production des androgènes induite par les acides gras soit due à l'augmentation de l'expression de la P450c17 par ces derniers. Cependant, ces résultats correspondent aux précédents résultats du laboratoire, qui démontraient que le palmitate 100 μM n'affectait pas l'expression de la P450c17 et ce, sous stimulation à l'ACTH ou à la Fsk (Bellanger et al., 2012).

D'un autre côté, il est possible de constater que sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μM d'oléate ne modifie pas l'expression de POR au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines comparativement à la Fsk seule (fig. 23). Ces résultats ne correspondent pas aux résultats attendus. En effet, tel que mentionné dans l'introduction, la protéine POR catalyse le transfert de deux électrons du NADPH au groupement hème de la P450c17 afin d'augmenter son activité 17,20-lyase et de façon subséquente, la production des androgènes. Ainsi, nous nous serions attendus à ce que l'augmentation de la production des androgènes induite par les acides gras soit due à l'augmentation de l'expression de POR par ces derniers.

4.5 Effets de l'oléate sur l'activité enzymatique de la P450c17

Puisque nos résultats ont démontré que les AGNE entraînent un changement de direction au niveau de la stéroïdogénèse résultant en une augmentation de la production des androgènes tout en n'affectant pas l'expression protéique de la P450c17 et de POR, nous avons voulu déterminer si l'effet de l'oléate sur l'androgénèse pourrait être dû à son effet sur l'activité enzymatique de la P450c17. Pour y arriver, la technique d'incorporation de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince a initialement été utilisée au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines.

Ainsi, les résultats de cette technique semblent démontrer que l'oléate 200 μM n'affecte pas l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 (fig. 25). Ces résultats correspondent aux résultats

attendus puisque les résultats de sécrétion démontrent que les AGNE induisent une diminution de la production de cortisol et une augmentation de la production des androgènes, suggérant un changement de direction de la voie des glucocorticoïdes vers la voie des androgènes.

De plus, contrairement à nos attentes, l'oléate 200 μM ne semble pas affecter l'activité 17,20-lyase de la P450c17 au niveau de ces mêmes cellules selon cette technique (fig. 26). En effet, puisque les résultats obtenus dans cette étude démontrent que les acides gras augmentent la production des androgènes et diminuent celle des glucocorticoïdes (ce qui est principalement modulé par l'activité 17,20-lyase de la P450c17), nous nous étions attendu à ce que les acides gras augmentent l'activité 17,20-lyase de cette enzyme. Ainsi, puisque les résultats d'activité enzymatique obtenus grâce à la méthode d'incorporation cellulaire de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince démontrent que la stimulation à la Fsk n'affecte pas l'activité 17,20-lyase de la P450c17 et ce, en présence ou en absence d'acide gras, nous avons douté de la validité de cette méthode lorsqu'employée dans ce contexte. Ainsi, nous avons donc voulu mesurer l'activité de l'enzyme d'une autre façon, soit en déterminant le ratio produit/substrat de l'enzyme.

Suite à l'analyse des résultats du bloc stéroïdien par LC-MS/MS obtenus par le laboratoire clinique du CHUS, nous avons démontré que la présence d'oléate n'affecte pas l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-prégnénone en DHEA (fig. 28). Ces résultats corroborent donc les résultats obtenus par la méthode de mesure de l'incorporation cellulaire de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince. Par contre, les résultats ont démontré que la présence d'oléate 200 μM tend à augmenter de 81 % l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-progestérone en androsténone (fig. 29). Ces résultats permettent ainsi de suggérer que l'oléate semble favoriser la conversion du 17OH-progestérone en androsténone aux dépens de la conversion du 17OH-prégnénone en DHEA par la P450c17.

D'un autre côté, les résultats obtenus suggèrent que l'oléate augmente de 124 % l'activité 17 α hydroxylase de la P450c17 mesurée par la conversion de la prégnénone en

17OH-prégnénolone (fig. 27). Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par incorporation cellulaire de substrats radiomarqués par chromatographie sur couche mince. Cependant, nous croyons que la mesure obtenue par LC-MS/MS permet de prendre en compte plus de déterminants de l'activité enzymatique de la P450c17 que la mesure par chromatographie sur couche mince. En effet, la technique par chromatographie ne mesure que la voie de formation des stéroïdes découlant de la prégnénolone comparativement à la méthode par LC-MS/MS, qui permet de mesurer les voies de formation des stéroïdes découlant de la prégnénolone et de la progestérone. D'un autre côté, la méthode par chromatographie nécessite l'utilisation d'épostane, qui pourrait modifier les phénomènes physiologiques. En effet, l'utilisation d'épostane entraîne l'inhibition de la 3 β HSD et de façon subséquente, la conversion de la 17OH-prégnénolone en 17OH-progestérone ainsi que la conversion du DHEA en androstènedione. L'inhibition de la production de ces stéroïdes pourrait modifier les phénomènes physiologiques survenant au niveau de ces cellules. En effet, des niveaux physiologiques d'androstènedione inhibe la 3 β HSD afin d'effectuer un rétrocontrôle négatif (Thomas *et al.*, 2015). Ainsi, l'inhibition de la 3 β HSD et de la formation d'androstènedione pourrait modifier les phénomènes physiologiques normaux. Cependant, il est impossible d'effectuer une comparaison entre nos résultats et ceux de la littérature puisque cette étude est la première à notre connaissance à déterminer l'effet de l'oléate sur l'activité 17 α hydroxylase et 17,20-lyase de la P450c17 au niveau des cellules fasciculées et réticulées bovines.

5. CONCLUSION

Le SOPK est une maladie endocrinienne qui touche entre 5 à 10% des femmes en âge de procréer, qui est principalement caractérisée par une hyperandrogénie et qui est associée au développement de plusieurs complications. Cependant, les causes de cette pathologie ne sont pas encore connues mais quelques études ont démontré l'implication des acides gras au niveau du développement de l'hyperandrogénie, et ce, de façon *in vivo* et *in vitro*. Ainsi, la compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents à ce phénomène pourrait permettre de développer des traitements ciblés qui seraient plus efficaces pour traiter le SOPK et ses conséquences à long terme. Ainsi, l'objectif de cette étude était de déterminer les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'hyperandrogénie induite par la surexposition des cellules productrices d'androgènes aux AGNE.

Pour répondre à cet objectif, nous avons exposés des cultures cellulaires primaires bovines, la lignée cellulaire NCI-H295R et des cultures cellulaires primaires humaines en présence d'acides gras durant 48 heures. Par la suite, le milieu de culture a été prélevé afin d'y doser différents stéroïdes par ELISA. De plus, les protéines ont été récoltées afin de déterminer l'expression protéique de la P450c17 et de POR par Western blot. Finalement, pour déterminer les activités 17 α hydroxylase et 17,20-lyase de la P450c17, la concentration de plusieurs stéroïdes a été déterminé par LC-MS/MS et le ratio produit/substrat a été effectué. Les résultats sont présentés selon la façon suivante : moyenne \pm SEM.

Ainsi, sous stimulation à la Fsk, la présence de 200 μ M d'oléate (vs absence d'oléate) augmente la production de DHEA de 114% par les cellules fasciculées et réticulées bovines (n=17; 214 \pm 20% vs 100 \pm 0%; p<0,0001). De plus, l'ajout d'oléate n'affecte pas l'expression de la P450c17 (n=8; 98 \pm 6% vs 100 \pm 0%; p=0,74) et de POR (n=7; 119 \pm 13% vs 100 \pm 0%; p= 0,22). Finalement, la présence d'oléate augmente l'activité 17 α hydroxylase mesurée par la conversion de la prégnénolone en 17OH-prégnénolone de 124% (n=7; 224 \pm 19% vs 100 \pm 0%; p= 0,02) et tends à augmenter l'activité 17,20-lyase de la P450c17 mesurée par la conversion de la 17OH-progestérone en androstènedione de 81% (n=7; 181 \pm 28% vs 100 \pm 0%; p= 0,08).

Ainsi, l'augmentation de la production des androgènes induite par les AGNE pourrait être due principalement à leurs effets sur l'augmentation des deux activités enzymatiques de la P450c17, sans effet significatifs sur l'expression de la P450c17 ni de son cofacteur POR. Ainsi, ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à l'hyperandrogénie induite par les AGNE mais les mécanismes sous-jacents à l'augmentation des activités de la P450c17 demeurent à élucider.

6. PERSPECTIVES

En perspectives, il serait intéressant de déterminer l'effet des AGNE sur l'expression protéique du cytochrome b5 ainsi que sur les niveaux de phosphorylation en sérine de la P450c17 afin de déterminer si l'augmentation de la production des androgènes induite par les acides gras est due aux effets des AGNE sur ces deux facteurs. En effet, le cytochrome b5 et la phosphorylation des résidus sérines de la P450c17 permettent d'augmenter la liaison entre la protéine POR et la P450c17, résultant en une augmentation de l'activité 17,20-lyase de la P450c17 et de façon subséquente, en une augmentation de la production des androgènes.

De plus, nous aimerions aussi déterminer l'effet des AGNE sur l'expression protéique de la P450c17 et de POR au niveau des cellules surrénaliennes humaines puisque ce modèle cellulaire permet de mieux illustrer les phénomènes physiologiques qui surviennent chez l'humain. Ainsi, cette perspective permettrait de s'assurer que les résultats obtenus au niveau des cellules surrénaliennes bovines illustrent de façon adéquate les phénomènes qui surviennent chez l'humain.

Finalement, malgré les résultats négatifs concernant l'activation des récepteurs PPAR γ , nous souhaiterions déterminer l'effet de l'inhibition de l'expression du récepteur PPAR γ grâce à la transfection de shARN au niveau de la lignée cellulaire NCI-H295R afin de déterminer l'implication de ce récepteur au niveau de l'hyperandrogénie induite par les acides gras. En effet, nous croyons que l'inhibition de l'expression du récepteur PPAR γ par la transfection de shARN diminuerait l'oxydation cellulaire des AGNE pour ainsi augmenter la surexposition des cellules sécrétrices d'androgènes aux acides gras et de façon subséquente, amplifier l'hyperandrogénie induite par les AGNE. De plus, il serait aussi intéressant de vérifier le niveau de β -oxydation des AGNE en absence d'activité des récepteurs PPAR γ afin de pouvoir ensuite déterminer si cette voie est augmentée par les agonistes PPAR γ .

7. REMERCIEMENTS

Initialement, je tiens à remercier le Pr Jean-Patrice Baillargeon de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Son sens scientifique très développé et sa grande facilité à transmettre ses connaissances m'ont permis de développer un très grand nombre de compétences. De plus, je souhaite remercier tous les étudiants du laboratoire ainsi que Marie-Claude Battista pour le temps que vous m'avez accordé et les conseils judicieux que vous m'avez donnés. Pour terminer, je tiens à remercier grandement mon conjoint, Benoît Têtu, pour m'avoir toujours supporté et encouragé dans tous les projets que j'ai entrepris. Merci infiniment pour l'écoute, l'aide et tout l'amour que tu me donnes.

LISTE DES RÉFÉRENCES

Arlt, W., Neogi, P., Gross, C., Miller, W.L. (2004). Cinnamic acid based thiazolidinediones inhibit human P450c17 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and improve insulin sensitivity independent of PPAR gamma agonist activity. *J. Mol. Endocrinol.* **32**, 425–436.

Arnold, J. (1866). Ein Beitrag zu der feiner Struktur und dem Chemismus der Nebennieren. *Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* **35**, 64-107.

Auchus, R.J., Lee, T.C., Miller, W.L. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J. Biol. Chem.* **273**, 3158–3165.

Auchus, R.J., Miller, W.L. (1999). Molecular modeling of human P450c17 (17alpha-hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. *Mol. Endocrinol.* **13**, 169-182.

Azziz, R., Carmina, E., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Escobar-Morreale, H.F., Futterweit, W., Onno, J.E., Legro, R.S., Norman, R.J., Taylor, A.E., Witchel, S.F. (2006). Position statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An androgen excess society guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 4237–4245.

Azziz, R., Sanchez, L.A., Knochenhauer, E.S., Moran, C., Lazenby, J., Stephens, K.C., Taylor, K., Boots, L. R. (2004). Androgen excess in women: Experience with over 1000 consecutive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 453–462.

Baillargeon, J.P., Carpentier, A. (2013). Role of insulin in the hyperandrogenism of lean women with polycystic ovary syndrome and normal insulin sensitivity. *Fertil. Steril.* **88**, 1–12.

Baptiste, C.G., Battista, M.C., Trottier, A., Baillargeon, J.P. (2010). Insulin and hyperandrogenism in women with polycystic ovary syndrome. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **122**, 42–52.

Barovsky, K., Pedone, C., Brooker, G. (1984). Distinct mechanisms of forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation and forskolin-potentiated hormone responses in C6-2B cells. *Mol. Pharmacol.* **25**, 256–260.

Bellanger, S., Battista, M.C., Fink, G. D., Baillargeon, J.P. (2012). Saturated fatty acid exposure induces androgen overproduction in bovine adrenal cells. *Steroid.* **77**, 347–353.

Bidey, S. (1998). Endocrine cell culture. *Cambridge. Univ. Pr.* Cambridge.

Bisgaier, C.L., Chanderbhan, R., Hinds, R.W., Vahouny, G.V. (1985). Adrenal cholesterol esters as substrate source for steroidogenesis. *J. Steroid. Biochem.* **23**, 967–974.

Brière, N., Martel, D., Cloutier, M., LeHoux J.G. (1997) Immunolocalization and Biochemical Determination of Cytochrome P450C17 in Adrenals of Hamsters Treated with ACTH. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 1409-1416.

Boris, M., Kaiser, C. C., Goldblatt, A., Elice, M. W., Edelson, S. M., Adams, J. B., & Feinstein, D. L. (2007). Effect of pioglitazone treatment on behavioral symptoms in autistic children. *J. Neuroinflamm.* **4**.

Carpentier, A.C. Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes. Metab.* 2008, **34**(2), 97–107. Copyright © 2008, Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Cedars, M.I., Steingold, K.A., de Ziegler, D., Lapolt, P.S., Chang, R.J., Judd, H.L. (1992). Long-term administration of gonadotropin-releasing hormone agonist and dexamethasone: assessment of the adrenal-role in ovarian dysfunction. *Fertil. Steril.* **57**, 495-500.

Chaggar, P.S., Shaw, S.M., Williams, S.G. (2009). Review article: Thiazolidinediones and heart failure. *Diabetes. Vasc. Dis. Re.* **6**, 146–152.

Charmichael, S.W. (1997). The adrenal medulla. *Mol. Cell. Endocrinol.* **10**, 207–225.

Christopoulos, P., Mastorakos, G., Gazouli, M., Deligeoroglou, E., Katsikis, I., Diamanti-Kandarakis, E., Panidis, D., Creatsas, G. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor polymorphisms in women with polycystic ovary syndrome. *Ann. NY. Acad. Sci.* **1205**, 185–191.

Cloutier, M., Fleury, A., Courtemanche, J., Ducharme, L., Mason, J.I., Lehoux, J.G. (1997) Characterization of the adrenal cytochrome P450C17 in the hamster, a small animal model for the study of adrenal dehydroepiandrosterone biosynthesis. *DNA. Cell. Biol.* **16**, 357-368.

Coiro, V., Casti, A., Rubino, P., Manfredi, G., Maffei, M.L., Melani, A., Saccani, J.G., Chiodera, P. (2007). Free fatty acids inhibit adrenocorticotropin and cortisol secretion stimulated by physical exercise in normal men. *Clin. Endocrinol.* **66**, 710-743.

Cusi, K. (2010). The role of adipose tissue and lipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr. Diabetes. Rep.* **10**, 306–315.

Day, C. (1999). Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet. Med.* **16**, 179-192.

Deeg, M.A., Tan, M.H. (2008). Pioglitazone versus Rosiglitazone: Effects on lipids, lipoproteins and apolipoproteins in head-to-head randomized clinical studies. *PPAR. Res.* **2008**, 520465.

Di Blasio, A.M., Voutilainen, R., Jaffe, R.B., Miller, W.L. (1986). Hormonal Regulation of Messenger Ribonucleic Acids for P450scc (Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme) and P450c17 (17 α -Hydroxylase/17,20-lyase) in Cultured Human Fetal Adrenal Cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **65**, 170-175.

Eisner, J.R., Barnett, M.A., Dumesic, D.A., Abbott, D.H. (2002). Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil. Steril.* **77**, 167–172.

Escobar-Morreale, H.F., Villuendas, G., Botella-Carretero, J.I., Alvarez-Blasco, F., Sanchón, R., Luque-Ramírez, M., San Millán, J.L. (2006). Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum. Reprod.* **21**, 2257–2265.

Franks, S. (1995). Polycystic ovary syndrome. *New. Engl. J. Med.* **333**, 853–861.

Gallo-Payet, N. (2013). Les interactions de la corticostimuline (ACTH) avec son récepteur MC2 : Nouvelles connaissances et perspectives. *Med. Sci. Ame.* **2**, 1–21.

Gallo-Payet, N., Battista, M.C. (2014). Steroidogenesis - Adrenal cell signal transduction. *Compr. Phys.* **4**, 889–964.

Gallo-Payet, N., Payet, M.D. (1989). Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* **120**, 409–421.

Gardner, D.G., Shoback, D. (2007). Female reproductive endocrinology & infertility. McGraw-Hill. 502–561.

Gehrmann, W., Wurdemann, W., Plotz, T., Jorns, A., Lenzen, S., Elsner, M. (2015). Antagonism between saturated and unsaturated fatty acids in ROS mediated lipotoxicity in rat insulin-producing cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**, 852–865.

Gervais, A., Battista, M.C., Carranza-Mamane, B., Lavoie, H.B., Baillargeon, J.P. (2015). Follicular fluid concentrations of lipids and their metabolites are associated with intraovarian gonadotropin-stimulated androgen production in women undergoing in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 1845–1854.

Gervois, P., Fruchart, J.C. (2003). PPAR γ : un récepteur nucléaire majeur de l'adipogenèse. *Med. Sci.* **19**, 20-23.

Golden, S.H. (2013). Reliability of hypothalamic–pituitary–adrenal axis assessment methods for use in population-based studies. *Eur. J. Epidemiol.* **26**, 511-525.

Gonzalez, F. (2015) Nutrient-Induced Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome: Role in the Development of Metabolic Aberration and Ovarian Dysfunction. *Semin. Reprod. Med.* **33**, 276-286.

Gormsen, L.C., Nielsen, C., Jessen, N., Jørgensen, J.O.L., Møller, N. (2011). Time-course effects of physiological free fatty acid surges on insulin sensitivity in humans. *Acta. Physiol.*, **201**, 349–356.

Henderson, M., Rabasa-Lhoret, R., Bastard, J.P., Chiasson, J.L., Baillargeon, J.P., Hanley, J.A., Lambert, M. (2011). Measuring insulin sensitivity in youth: How do the different indices compare with the gold-standard method. *Diabetes. Metabol.* **37**, 72–78.

Henninger, A.M.J., Eliasson, B., Jenndahl, L.E., Hammarstedt, A. (2014). Adipocyte hypertrophy, inflammation and fibrosis characterize subcutaneous adipose tissue of healthy, non-obese subjects predisposed to type 2 diabetes. *Plos. One.* **9**, e105262.

Hodson, L., Skeaff, C.M., Fielding, B.A. (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog. Lipid. Res.* **47**, 348-380.

Home, P.D., Pocock, S.J., Beck-Nielsen, H., Curtis, P.S., Gomis, R., Hanefeld, M., Jones, N.P., Komajda, M., McMurray, J.J. (2009). Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet*. **373**, 2125–2135.

Hornsby, P.J., Crivello, J.F. (1983) The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **30**, 123–147.

Houstis, N., Rosen, E.D., Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*. **440**, 944–948.

Hussey, S.E., Lum, H., Alvarez, A., Cipriani, Y., Garduño-Garcia, J., Anaya, L., Dube, J., Musi, N. (2014). A sustained increase in plasma NEFA upregulates the Toll-like receptor network in human muscle. *Diabetologia*. **57**, 582–591.

Kamata, H., Honda, S.I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. **120**, 649–661.

Kempna, P., Hofer, G., Mullis, P.E., Fluck, C.E. (2007). Pioglitazone Inhibits Androgen Production in NCI-H295R Cells by Regulating Gene Expression of CYP17 and HSD3B2. *Mol. Pharmacol.* **71**, 787-798.

Kewalramani, G., Bilan, P.J., Klip, A. (2010). Muscle insulin resistance: assault by lipids, cytokines and local macrophages. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **13**, 382–390.

Kramer, R.E., McCarthy, J.L., Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1983). Effects of ACTH on steroidogenesis in bovine adrenocortical cells in primary culture-increased secretion of 17 alpha-hydroxylated steroids associated with a refractoriness in total steroid output. *J. Steroid. Biochem.* **18**, 715-723

Kristiansen, S.B., Endoh, A., Casson, P.R., Buster, J.E., Hornsby, P.J. (1997). Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids*, **62**, 258–265.

Kumar, A., Woods, K.S., Bartolucci, A.A., Azziz, R. (2005). Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). *Clin. Endocrinol.* **62**, 644–649.

Lajevardi, V., Hallaji, Z., Daklan, S., Abedini, R., Goodarzi, A., Abdolreza, M. (2015). The efficacy of methotrexate plus pioglitazone vs . methotrexate alone in the management of patients with plaque-type psoriasis : a single-blinded randomized controlled trial, *Int. J. Derm.* **54**, 95–101.

Laue, L., Cutler, G.B. (1997). The adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **10**, 227–254.

Leblanc, S., Battista, M.C., Noll, C., Hallberg, A., Gallo-Payet, N., Carpentier, A.C., Vine, D.F., Baillargeon, J.P. (2014). Angiotensin II type 2 receptor stimulation improves fatty acid ovarian uptake and hyperandrogenemia in an obeserat model of polycystic ovary syndrome. *Endocrinol.* **155**, 3684–3693.

Lefrancois-Martinez, A.M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G., Jean, C. (1999) Product of sidechain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductaselike protein in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 32875–32880.

Liakos, P., Chambaz, E.M., Feige, J.J., Defaye, G. (1998). Expression of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticularis zones of bovine adrenal cortex. *Endocr. Res.* **24**, 427-432.

Liakos, P., Chambaz, E.M., Jacques F.J., Defaye, G. (2000). Expression and regulation of melanocortin receptor-5 (MC5-R) in the bovine adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **159**, 99–107.

Mach, K.E., Fevold, R.H. (1994). Post-transcriptional action of ACTH in the control of P450c17 expression in rabbit adrenal glands. *J. Steroid Biochem. Molec.* **51**, 149–156.

Maedler K., Spinas, G.A., Dyntar, D., Moritz, W., Kaiser, N., Donath, M.Y. (2001). Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on β -cell turnover and function. *Diabetes.* **50**, 69–76.

Mai, K., Bobbert, T., Kullmann, V., Andres, J., Rochlitz, H., Osterhoff, M.O., Bahr, V., Mohlig, M., Pfeiffer, A.F.H, Diedrich, S., Spranger, J. (2006). Free fatty acids increase androgen precursors in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1501–1507.

Mai, K., Bobbert, T., Reinecke, F., Andres, J., Maser-Gluth, C., Wudy, S., Mohlig, M., Weickert, M.O., Hartmann, M.F., Schulte, H.M., Diedrich, S., Pfeiffer, A.F.H, Spranger, J. (2008). Intravenous lipid and heparin infusion-induced elevation in free fatty acids and triglycerides modifies circulating androgen levels in women: A randomized, controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3900–3906.

Marieb, E., Hoehn, K., Moussakova, L., Lachaine, R. (2010). Anatomie et physiologie humaines. Paris Saint-Laurent (Québec: Pearson ERPI), p. 708 et 1079.

Medina-Gomez, G., Gray, S.L., Yetukuri, L., Shimomura, K., Virtue, S., Campbell, M., Vidal-Puig, A. (2007). PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS. Genetics.* **3**, 634–647.

Meunier, J.C. (2005). Testostérone libre ou biodisponible : dosages ou calculs. Comparaison critique de différents modes d'approche. *Imm. Bio.* **20**, 65-77.

Miller, W.L. (2005). Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinol.* **146**, 2544–2550.

Miller, W.L., Auchus, R.J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.* **32**, 81–151.

Miller, W.L., Tee, M.K. (2015). The post-translational regulation of 17,20 lyase activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 99–106.

Molavi, B., Rassouli, N., Bagwe, S., Rassouli, N. (2007). A review of thiazolidinediones and metformin in the treatment of type 2 diabetes with focus on cardiovascular complications. *Vasc. Health. Risk. Manag.* **3**, 967–973.

Montero-Melendez, T. (2015). ACTH: The forgotten therapy. *Semin. Immunol.*

Morán, C., Knochenhauer, E., Boots, L.R., Azziz, R. (1999). Adrenal androgen excess in hyperandrogenism: Relation to age and body mass. *Fertil. Steril.* **71**, 671–674.

Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, L.J. (1995). Increase in circulating product of lipid peroxidation (F-isoprostanes) in smokers. *New. Engl. J. Med.* **332**, 1198–1203.

Mu, Y.M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C. H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H. (2001). Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinol.* **142**, 3590–3597.

Nelson-Degrave, V.L., Wickenheisser, J.K., Hendricks, K.L., Asano, T., Fujishiro, M., Legro, R.S., Kimball, S.R., Strauss, J.F., McAllister, J.M. (2005). Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol. Endocrinol.* **19**, 379–390.

Nestler, J.E., Jakubowicz D.J., De Vargas, A.F., Brik, C., Quintero, N., Medina, F.. (1998). Insulin stimulates testosterone biosynthesis by human theca cells from women with polycystic ovary syndrome by activating its own receptor and using inositoglycan mediators as the signal transduction system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 2001–2005.

Owen, O.E., Reichard, G.A., Patel, M.S., Boden, G. (1979). Energy metabolism in feasting and fasting. *Adv. Exp. Med. Biol.* **111**, 169-188.

Ozcan, U., Cao, Q, Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action and type 2 diabetes. *Science.* **306**, 457–461.

Pandey, A.V., Miller, W.L. (2005). Regulation of 17,20-lyase activity by cytochrome b5 and by serine phosphorylation of P450c17. *J. Biol. Chem.* **280**, 13265–13271.

Piltonen, T., Koivunen, R., Morin-Papunen, L., Ruokonen, A., Huhtaniemi, I.T., Tapanainen, J.S. (2002). Ovarian and adrenal steroid production: regulatory role of LH/HCG. *Hum. Reprod.* **17**, 620–624.

Pratt, J.H., Manatunga, A.K., Wagner, M.A., Jones, J.J., Meaney, F.J. (1990). Adrenal androgen excretion during adrenarche. Relation to race and blood pressure. *Hypertension.* **16**, 462–467.

Rizner, T.L. (2016). The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases. *Pharmacol.* **7**, 30.

Rodin, A., Thakkar, H., Taylor, N., Clayton, R. (1994). Hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *New. Engl. J. Med.* **330**, 460–465.

Salomone, S. (2011). Pleiotropic effects of glitazones: A double edge sword. *Front. Pharmacol.* **2**, 1–6.

Schoppee, P.D., Garmey, J.C., Veldhuis, J.D. (2002). Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol. Reprod.* **66**, 190–198.

Seto-Young, D., Paliou, M., Schlosser, J., Avtanski, D., Park, A., Patel, P., Holcomb, K., Chang, P., Poretsky, L. (2005). Direct thiazolidinedione action in the human ovary: Insulin-independent and insulin-sensitizing effects on steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6099–6105.

Sewer, M.B., & Waterman, M.R. (2003). ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc. Res. Techniq.* **61**, 300–307.

Skov, V., Glintborg, D., Knudsen, S., Tan, Q., Jensen, T., Kruse, T.A., Beck-Nielsen, H., Højlund, K. (2008). Pioglitazone enhances mitochondrial biogenesis and ribosomal protein biosynthesis in skeletal muscle in polycystic ovary syndrome. *Plos. One.* **3**, e2466.

Sparkes, R.S., Klisak, I., Miller, W.L. (1991) Regional mapping of genes encoding human steroidogenic enzymes: P450scc to 15q23-q24, adrenodoxin to 11q22; adrenodoxin reductase to 17q24-q25; and P450c17 to 10q24-q25. *DNA. Cell. Biol.* **10**, 359-365.

Stabile, G., Borrielli, I., Arsenio, A.C., Bruno, L.M., Benvenga, S., Giunta, L., La Marca, A., Volpe, A., Pizzo, A. (2014). Effects of the insulin sensitizer pioglitazone on menstrual irregularity, insulin resistance and hyperandrogenism in young women with polycystic ovary syndrome. *J. Pediatr. Adol. Gynec.* **27**, 177–182.

Stachowiak, A., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K. (1990). Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH- or dexamethasone-treated rats. *Histol. Histopathol.* **5**, 25–29.

Takahashi, Y. (2015). Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World. J. Gastroentero.* **21**, 3777.

Thomas, J.L., Rajapaksha, M., Mack, V.L., DeMars, G.A., Majzoub, J.A., Bose, H.S. (2015). Regulation of human 3β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 by adrenal corticosteroids and product-feedback by androstenedione in human adrenarche. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **352**, 67-76.

Torre, A., Fernandez, H. (2007). Le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). *J. Gynecol. Obst. Bio. R.* **36**, 423–446.

Tripathy, D., Mohanty, P., Dhindsa, S., Syed, T., Ghanim, H., Aliada, A., Dandona, P. (2003). Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* **52**, 2882–2887.

Trudel, C., Couet, J., Martel, C., Labrie, C., Labrie, F. (1991). Regulation of Adrenal 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\delta 4$ -Isomerase Expression and Activity by Adrenocorticotropin and Corticosterone in the Rat. *J. Endocrinol.* **129**, 2077–2084.

Usui, I., Takata, Y., Imamura, T., Morioka, H., Sasaoka, T., Sawa, T., Ishihara, M., Ishiki, M., Kobayashi, M. (1997). Fatty acid induced insulin resistance in rat-1 fibroblasts overexpressing human insulin receptors: Impaired insulin-stimulated mitogen-activated protein kinase activity. *Diabetologia.* **40**, 894–901.

Vaena de Valos, S., Lima, C., Martini, C., de Lederkremer, R.M., Vila, M.D.C. (1998). ACTH-mediated glucocorticoid and mineralocorticoid production is inhibited by an inositolphosphoglycan and a glycosylphosphatidylinositolphospholipase C is activated by the hormone in mammalian adrenocortical cells. *Steroids.* **63**, 70–75.

Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C., Stocco, D.M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Diabetologia*. **108**, 769–776.

Wild, R.A., Umstot, E.S., Andersen, R.N., Ranney, G.B., Givens, J.R. (1983). Androgen parameters and their correlation with body weight in one hundred thirty-eight women thought to have hyperandrogenism. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **146**, 602-606.

Yaguchi, H., Tsutsumi, K., Shimono, K., Omura, M., Sasano, H., Nishikawa, T. (1998). Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal fasciculo-reticularis cells. *Life. Sci.* **62**, 1387–1395.

Yanagibashi, K., Hall, P.F. (1986). Role of electron transport in the regulation of the lyase activity of side-chain cleavage P-450 from porcine adrenal and testicular microsomes. *J. Biol. Chem.* **261**, 8429–8433.

Yilmaz, M., Ergu, M.A., Karakoc, A., Yurtcu, E., Cakir, N., Arslan, M. (2006). Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ gene in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **22**, 336–342.

Zhang, L., Rodriguez, H., Ohno, S., Miller, W.L. (1995). Serine phosphorylation of human P450c17 increases 17,20-lyase activity: Implications for adrenarche and the polycystic ovary syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 10619–10623.

Zhou, L., Wang, L., Yang, B., Zeng, J., Zhang, Q., Lei, H., Xu, S. (2015). Protective effect of pretreatment with propofol against tumor necrosis factor- α -induced hepatic insulin resistance. *Exp. Therap. Med.* **10**, 289–294.

Zuber, M.X., Simpson, E.R., Waterman, M.R. (1986). Expression of bovine 17 α -hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science*. **234**, 1258–1261.