

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRE**

**PAR
ELAINE DE REPENTIGNY**

**ÉLABORATION ET ÉVALUATION DU VERROUILLAGE
PANCRÉATIQUE CHEZ LE RAT**

JUILLET 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à te remercier Carole, toi ma directrice de recherche, pour m'avoir accepté dans ton laboratoire et pour m'avoir fait confiance. Merci aussi Carole pour ton écoute et ta compréhension. Merci d'être l'extraordinaire personne que tu es.

Je tiens également à remercier le Dr. François Péronnet, professeur-chercheur à l'Université de Montréal, pour son soutien indéfectible tout au long de mon cheminement.

Alex et Mathieu, mes chers collègues de laboratoire, merci pour votre camaraderie. Grâce à nos francs échanges, vous ne me faites pas regretter d'être une femme (hi ! hi !).

Merci aussi à toi Rollande, ma deuxième maman et responsable de l'animalerie de recherche de l'U.Q.T.R., pour ta contribution technique tout au long de mon projet de recherche, mais aussi pour ton amitié. Tu as été une personne clé dans ma vie, je t'en remercie du fond du cœur.

Merci aussi à toi Julie d'être aussi authentique, sincère et honnête et merci aussi de m'avoir épaulé et réconforté à maintes reprises. Longue vie à notre amitié !

Finalement, un énorme merci à toi maman d'être toujours là pour moi et de toujours partager mes peines et mes joies. Merci de m'endurer. Je t'aime.

Elaine de Repentigny

RÉSUMÉ

Les récepteurs hépatiques au glucagon (RHG) d'animaux sains démontrent une capacité d'adaptation importante. En effet, leur densité augmente suite au jeûne et à l'exercice. Les facteurs responsables de cette hausse de densité des RHG restent à être investigués. Parmi ces facteurs, deux s'avèrent prépondérants soient: la diminution de la charge glucidique hépatocytaire et la variation des concentrations du glucagon et de l'insuline. L'objectif de ce projet de recherche était de documenter, chez le rat via la technique de verrouillage pancréatique, l'effet de ces 2 facteurs sur la modulation des RHG. Au préalable, la technique de verrouillage pancréatique devait être mise sur pied. Premièrement, les valeurs d'hyperglucagonémie, d'hypo- et de normoinsulinémie au niveau portal chez le rat ont été caractérisées. Deuxièmement, les effets inhibiteurs de la somatostatine (SRIF) et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline ont été évalués. Troisièmement, lors du verrouillage pancréatique, les réponses des concentrations du glucagon et d'insuline exogènes, suite à différents taux de perfusion de ces hormones, ont été évaluées. Nos résultats ont indiqué qu'une normoinsulinémie et qu'une hypoinsulinémie correspondent respectivement à $2\,234 \pm 293$ pmol/L (n=8) et à 449 ± 96 pmol/L (n=6). L'hyperglucagonémie reste encore à définir. Lors du verrouillage pancréatique, la SRIF ou le Sandostatin ont aucunement inhibé la sécrétion pancréatique du glucagon et inhibé que partiellement celle de l'insuline. La SRIF a inhibé la sécrétion de l'insuline en moyenne à 81 % et le Sandostatin à 70 %. Malgré l'inefficacité de la SRIF et du Sandostatin à inhiber les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline, nos résultats ont confirmé que les concentrations de ces hormones pancréatiques varient proportionnellement à leurs taux de perfusion. Pour créer une hypo- et une normoinsulinémie au niveau portal, les taux de perfusion de l'insuline devraient être respectivement de $0,4 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $2 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. En conclusion, le verrouillage pancréatique n'a pas semblé être la meilleure technique pour évaluer la diminution de la charge glucidique hépatocytaire et la variation des concentrations du glucagon et de l'insuline sur la modulation des RHG.

MOTS CLÉS : verrouillage pancréatique, glucagon, insuline, récepteur au glucagon,
charge glucidique hépatocytaire, ratio glucagon/insuline

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	x
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Récepteur hépatique au glucagon (RHG)	2
1.3 Paradoxe hormonal à l'exercice	3
1.4 Mécanismes et facteurs de régulation du RHG.....	6
CHAPITRE 2 TECHNIQUE DE VERROUILLAGE PANCRÉATIQUE	10
2.1 Généralités sur la technique de verrouillage pancréatique.....	10
2.2 La SRIF et le Sandostatin : deux substances responsables de l'inhibition des sécrétions pancréatiques de l'insuline et du glucagon.....	11
2.3 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau pré- et post-hépatique.....	15
2.4 Problématique	17
2.5 Objectifs de travail	18
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	19
3.1 Animaux.....	19
3.2 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique	19
3.3 Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline	20

3.4	Concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline aux différents sites de prélèvements sanguins sous verrouillage pancréatique	22
3.5	Essais de la technique de verrouillage pancréatique	23
3.6	Analyses	24
3.6.1	Glucagon et insuline.....	24
3.6.2	Glucose.....	25
3.6.3	Analyses statistiques	25
CHAPITRE 4 RÉSULTATS.....		26
4.1	Données descriptives.....	26
4.2	Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique	26
4.3	Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline	28
4.4	Concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline aux différents sites de prélèvements sanguins sous verrouillage pancréatique	30
4.5	Essais de la technique de verrouillage pancréatique	33
CHAPITRE 5 DISCUSSION		38
5.1	Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique	38
5.2	Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline	41
5.3	Évaluation du verrouillage pancréatique chez le rat	44
5.4	Conclusion et perspective d'avenir	47
BIBLIOGRAPHIE.....		49

LISTE DES TABLEAUX

2.1	Effet inhibiteur de la SRIF sur les concentrations endogènes d'insuline et du glucagon	13
2.2	Concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline à différents sites de prélèvements sanguins suite à une période de jeûne.....	16 16
4.1	Poids des animaux la journée de l'expérimentation.....	26
5.1	Concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline au niveau post- hépatique chez des animaux nourris et à jeun.....	39

LISTE DES FIGURES

1.1	Le RHG et ses deux voies de signalisation intracellulaires	2
1.2	Effet de l'entraînement en endurance sur les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon lors d'une activité physique d'intensité modérée.	4
1.3	Corrélation entre le ratio glucagon/insuline et la densité des RHG dans diverses situations physiologiques.	4
1.4	Concentration totale de glycogène hépatique des groupes d'animaux sédentaires et nourris, à jeun et à l'exercice.....	8
1.5	Schématisation des hypothèses	9
2.1	Technique chirurgicale du verrouillage pancréatique.....	11
2.2	Différence moléculaire entre la SRIF et le Sandostatin.....	14
3.1	Sites de prélèvements sanguins.....	20
3.2	Schématisation du protocole expérimental du point 3.3 de la méthodologie.	21
3.3	Schématisation du protocole expérimental du point 3.4 de la méthodologie.	23
3.4	Schématisation du protocole expérimental du point 3.5 de la méthodologie	24
4.1	Insulinémies des animaux à jeun et nourris aux différents sites de ponctions sanguines	27
4.2	Glucagonémies des animaux à jeun et nourris aux différents sites de ponctions sanguines	28
4.3	Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur l'insulinémie	29
4.4	Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur la glucagonémie	31
4.5	Concentrations plasmatiques de l'insuline au niveau portal et post-hépatique (n=3)	32
4.6	Concentrations plasmatiques du glucagon au niveau portal et post-hépatique (n=3)	33
4.7	Concentrations plasmatiques de l'insuline sous verrouillage pancréatique.....	34
4.8	Concentrations plasmatiques du glucagon sous verrouillage pancréatique	35
4.9	Concentrations plasmatiques du glucose sous verrouillage pancréatique.....	37
5.1	Caractéristiques des cinq sous-types de SSTRs chez l'humain.	43

5.2 Distribution du glucagon et de l'insuline exogènes dans la circulation
sanguine sous verrouillage pancréatique..... 44

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

ARNm	: Acide ribonucléique messenger
B _{max}	: Densité des récepteurs au glucagon
BW	: “Body weight”, masse corporelle
K _D	: Constante de dissociation (affinité des récepteurs)
PHG	: Production hépatique de glucose
RHG	: Récepteur hépatique au glucagon
SRIF	: Somatostatine “Somatotropin releasing inhibiting factor”
SSTR	: Récepteur à la somatostatine
$\dot{V}O_2$ max	: Consommation maximale d’oxygène

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

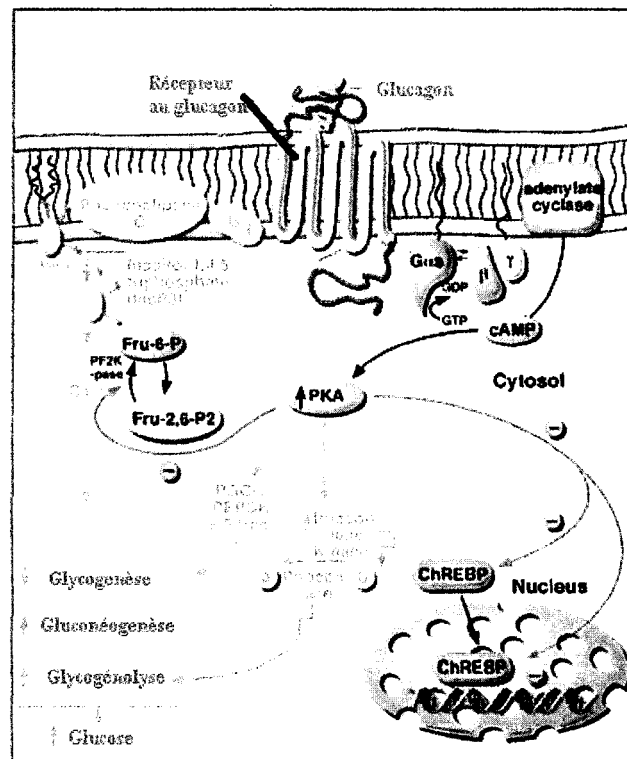
1.1 Généralités

Les îlots de Langerhans du pancréas fabriquent et sécrètent l'insuline et le glucagon, deux hormones dont les rôles sont d'une importance capitale dans la régulation du métabolisme glucidique. En plus de tous ses rôles au niveau périphérique (Plum *et al.* (2006)), l'insuline a un effet principalement hypoglycémiant : lors d'une hyperglycémie, la sécrétion pancréatique de l'insuline augmente et c'est la liaison de cette hormone à son récepteur tyrosine kinase du foie qui permet l'entrée du glucose dans les hépatocytes et la mise en réserve du glucose sous forme de glycogène. Lors d'une hypoglycémie, la sécrétion pancréatique du glucagon augmente car cette hormone produit un effet hyperglycémiant; la liaison du glucagon à son récepteur hépatique couplé à une protéine G au niveau du foie stimule la production hépatique de glucose (PHG) via la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

Une perturbation de l'effet métabolique du glucagon et/ou de l'insuline provoque le déséquilibre de l'homéostasie glucidique à court et à long terme. Sachant que l'effet métabolique d'une hormone débute par sa liaison à son récepteur spécifique, il devient donc primordial d'étudier les propriétés de liaison des récepteurs au glucagon et à l'insuline. Dans le cas de l'insuline, l'effet de sa liaison à ses récepteurs est bien documenté, tant aux niveaux musculaire (Chang *et al.* (2004); Kanzaki (2006)), adipocytaire (Carmen et Victor (2006); Chang *et al.* (2004)) qu'hépatique (Bonen *et al.* (1986); Thirone *et al.* (2006)). Cependant, le glucagon est le parent pauvre du métabolisme glucidique et ses propriétés de liaison à ses récepteurs hépatiques demeurent encore aujourd'hui à être investiguées.

1.2 Récepteur hépatique au glucagon (RHG)

Le RHG est principalement exprimé dans les hépatocytes, mais il est aussi présent dans d'autres tissus soient : le cœur, le pancréas, les reins, le cerveau, l'estomac, les intestins et certains adipocytes (Christophe (1995); Jiang et Zhang (2004); Yamato *et al.* (1997)). Le RHG consiste en une protéine de poids moléculaire d'environ 55 kDa appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Christophe (1995)). Les caractéristiques communes à cette famille de récepteurs sont une structure comprenant sept (7) domaines transmembranaires, comportant chacun 20 à 25 résidus hydrophobes disposés en hélices alpha. Au niveau extracellulaire, le RHG possède un segment N-terminal en plus de trois boucles et, au niveau intracellulaire, trois boucles et un segment C-terminal (figure 1.1).



Adapté de Jiang *et al.* (2003)

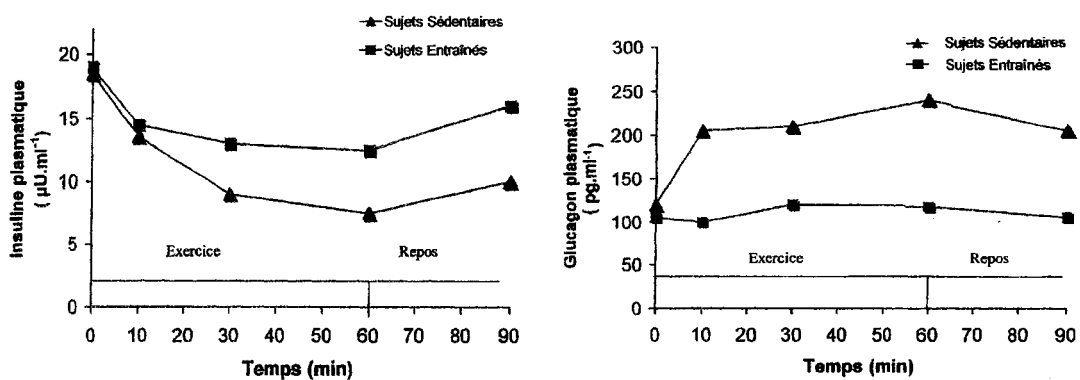
FIGURE 1.1 : Le RHG et ses deux voies de signalisation intracellulaires

Par l'entremise de la protéine G, le récepteur au glucagon transmet ses signaux intracellulaires via deux seconds messagers : l'AMP 3'-5'-cyclique et l'inositol 1, 4, 5 triphosphate (Christophe (1995); Jelinek *et al.* (1993); Jiang et Zhang (2004)) (figure 1.1).

1.3 Paradoxe hormonal à l'exercice

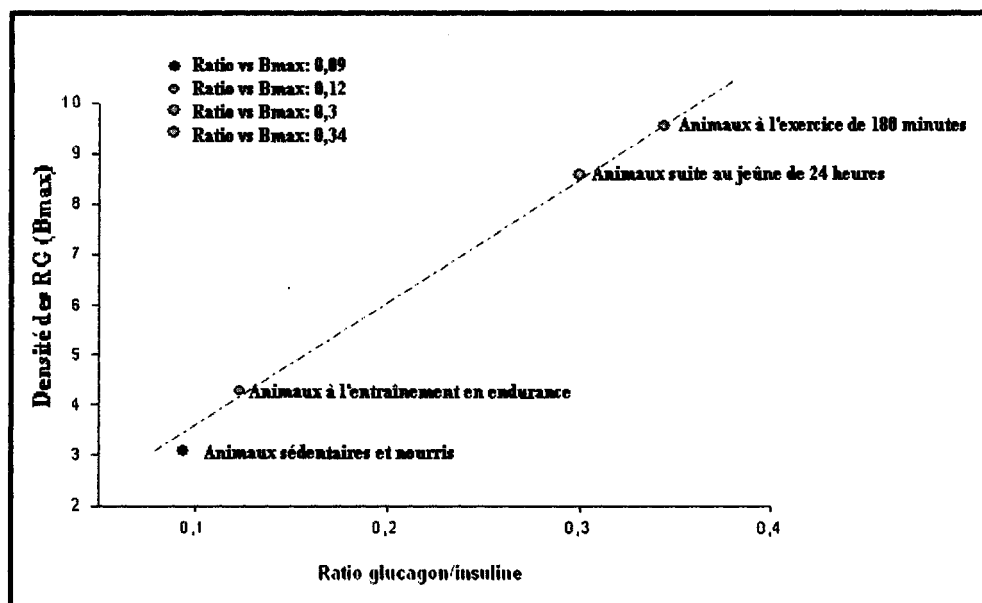
Le RHG est directement impliqué dans l'homéostasie glucidique puisque la liaison du glucagon à son récepteur stimule la PHG pour rétablir la glycémie. Il est bien reconnu dans la littérature que l'activité physique d'intensité modérée est associée à une augmentation de la concentration plasmatique de glucagon et à une baisse de l'insuline (Del Corral *et al.* (1998); Gyltelberg *et al.* (1977); Krishna *et al.* (2000)). Toutefois, les concentrations hormonales à l'entraînement en endurance sont différentes. En effet, la baisse de la concentration de l'insuline et l'augmentation de la concentration du glucagon sont moindres lors d'une période d'exercice chez les sujets entraînés (Gyltelberg *et al.* (1977)) (figures 1.2 et 1.3). Théoriquement, cet environnement hormonal favoriserait une plus faible augmentation de la PHG avec une possibilité d'une baisse de la glycémie. Pourtant, ce n'est pas le cas puisque ces études ont montré une stabilité glycémique supérieure chez les sujets entraînés. Comment expliquer le maintien de l'homéostasie glucidique en présence d'une moins grande glucagonémie lors d'une activité physique chez les sujets entraînés ?

Afin de comprendre ce paradoxe, Drouin (1997) a documenté la sensibilité hépatique au glucagon chez des sujets entraînés ($\dot{V}O_2$ max de $65,9 \pm 1,6$ ml O₂ • kg⁻¹ • min⁻¹; n = 8) et non-entraînés ($\dot{V}O_2$ max de $46,8 \pm 0,6$ ml O₂ • kg⁻¹ • min⁻¹; n = 8). Les résultats de cette étude ont montré qu'une perfusion de glucagon subséquente à la période d'entraînement fait passer la glycémie maintenue à 5 mmol • L⁻¹ durant l'exercice à $11,4 \pm 1,1$ mmol • L⁻¹ chez les sujets entraînés, comparativement à $8,9 \pm 0,8$ mmol • L⁻¹ chez les sujets non-entraînés.



Adapté de : Gyntelberg *et al.* (1977)

FIGURE 1.2 : Effet de l'entraînement en endurance sur les concentrations plasmatiques d'insuline et de glucagon lors d'une activité physique d'intensité modérée.



Adapté de : Melançon *et al.* (2003) et Légaré *et al.* (2001)

FIGURE 1.3 : Corrélation entre le ratio glucagon/insuline et la densité des RHG dans diverses situations physiologiques.

Parallèlement, la production hépatique de glucose durant la perfusion de glucagon augmente de $15,6 \pm 2,8 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets entraînés, comparativement à $7,1 \pm 1,7 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets non-entraînés. En somme, ces observations indiquent que l'entraînement en endurance est associé à une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon. Légaré *et al.* (2000) ont étudié les mécanismes responsables de cette hausse de la sensibilité du foie pour l'action du glucagon. Ainsi, en étudiant les propriétés de liaison des RHG, soit l'affinité (K_D) et la densité (B_{max}), Légaré *et al.* (2000) ont montré que l'entraînement en endurance (E) chez des rats mâles Sprague-Dawley augmente significativement de 28 % la densité des RHG, par rapport à la densité de ces mêmes récepteurs chez les rats sédentaires (S) (S : $3,09 \pm 0,12$ vs E : $4,28 \pm 0,19$ pmol/mg de protéines).

Parallèlement à ces études sur l'entraînement en endurance, Bonjorn *et al.* (2002) ont observé qu'une seule période d'exercice augmente la sensibilité du foie à l'action du glucagon. Melançon (2003) a élaboré une étude afin de déterminer si les observations de Bonjorn *et al.* (2002) pouvaient être associées à la modulation des RHG. Les résultats de Melançon *et al.* (2003) ont montré que l'exercice aigu chez des rats mâles Sprague-Dawley, soit 180 minutes de nage, engendre une augmentation de la densité des RHG de l'ordre de 165 ± 9 % par rapport à la densité des RHG des animaux sédentaires.

Melançon (2003) a aussi caractérisé les effets d'un jeûne de 24 heures sur les propriétés de liaison des RHG, étant donné le manque de littérature à ce sujet et l'importance du rôle du glucagon dans le maintien de l'homéostasie glucidique en période de jeûne (Alford *et al.* (1974); Brand *et al.* (1995); Hendrick *et al.* (1992)). En effet, lors d'un jeûne, la concentration plasmatique du glucagon augmente en fonction de la durée du jeûne, ce qui permet à l'organisme de maintenir une glycémie constante et adéquate (Aranda *et al.* (1974); Brand *et al.* (1995); Rothman *et al.* (1991)). Un jeûne complet de 48 heures entraîne une augmentation de la production de transcrits de l'ARNm du RHG de plus de 400 % (Burcelin *et al.* (1998)). Dans le but de vérifier si l'augmentation de l'ARNm des RHG obtenue par Burcelin *et al.* (1998) est accompagnée d'une hausse de la densité des RHG, Melançon (2003) a étudié les

propriétés de liaison des RHG suite à une période de jeûne de 24 heures. Les résultats de Melançon (2003) ont montré qu'une période de jeûne de 24 heures chez des rats mâles Sprague-Dawley entraîne une élévation de la densité des RHG de 159 ± 21 % et une hausse de l'ARNm des RHG, comparativement à la densité et à l'ARNm des récepteurs des rats appartenant au groupe de rats nourris.

En conclusion, tous ces résultats indiquent que l'expression des RHG peut être rapidement augmentée suite à une période de jeûne de 24 heures, à une période d'exercice aigu ou chronique et ce, dans le but d'accroître la sensibilité hépatique au glucagon et ainsi maintenir l'homéostasie glucidique.

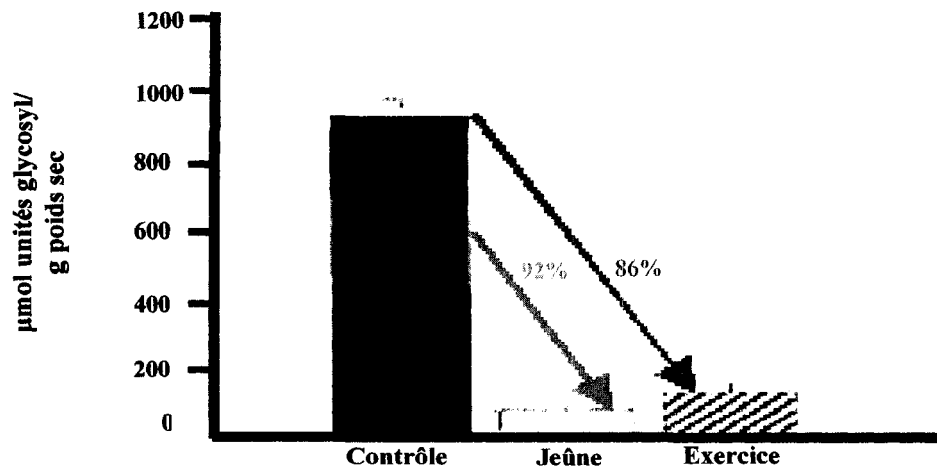
1.4 Mécanismes et facteurs de régulation du RHG

Les mécanismes ou les facteurs impliqués dans la hausse de la densité des RHG demeurent pour le moment mal définis. *In vitro*, plusieurs études ont identifié des régulateurs potentiels. Ces études ont été réalisées au niveau du gène du RHG (Portois *et al.* (1999)), au niveau de l'ARNm du RHG (Abrahamsen *et al.* (1995); Burcelin *et al.* (1998); Krones *et al.* (1998)) et au niveau de l'expression des RHG dans les préparations de membranes plasmiques de foie (Abrahamsen *et al.* (1995); Bhatena *et al.* (1978); Dighe *et al.* (1984)) et/ou à la surface des hépatocytes isolés (Abrahamsen *et al.* (1995)). Ainsi, parmi les facteurs responsables de la modulation des RHG, il est reconnu que le glucose augmente l'expression de l'ARNm du RHG (Abrahamsen *et al.* (1995); Burcelin *et al.* (1998); Krones *et al.* (1998); Portois *et al.* (1999)), que l'AMP cyclique diminue l'expression de l'ARNm du RHG (Abrahamsen *et al.* (1995)), en plus de diminuer le nombre de RHG par hépatocytes, et que l'apport d'oxygène dans la circulation sanguine engendre une augmentation du nombre de transcrits d'ARNm du RHG (Krones *et al.* (1998)). Cependant, en condition *in vivo*, très peu d'études sont disponibles. Parmi les rares, le glucagon est, à notre connaissance, le seul régulateur cité comme étant responsable de la baisse de la densité des RHG (Bhatena *et al.* (1978); Burcelin *et al.* (1998); Dighe *et al.* (1984)). Donc, les facteurs et les mécanismes

responsables de la modulation des RHG en condition *in vivo* restent à être déterminés. Pour notre part, deux facteurs ou mécanismes potentiels suscitent notre intérêt. Le premier consiste en un facteur de source extra-hépatocytaire, soit le ratio glucagon/insuline et le deuxième en un facteur de source intra-hépatocytaire, soit la baisse de la charge glucidique de l'hépatocyte.

Parmi les facteurs potentiellement responsables de la modulation des RHG, nous avons émis l'hypothèse que la baisse de la concentration de l'insuline pourrait être impliquée. Comme nous l'avons vu précédemment, à l'exercice modérée, la concentration plasmatique de l'insuline diminue et celle du glucagon augmente (Hirsch *et al.* (1991); Lavoie *et al.* (1997); Turcotte *et al.* (1997); Vranic *et al.* (1984); Wasserman *et al.* (1989a); Wasserman *et al.* (1989b)), afin de stimuler l'augmentation de la PHG pour répondre à l'utilisation périphérique augmentée à l'exercice. Toutefois, certains auteurs affirment que l'action du glucagon sur la PHG serait davantage marquée si celui-ci était accompagné d'une baisse d'insuline (Wasserman *et al.* (1989a). Aussi, les études de Wasserman *et al.* (1989b) chez le chien et Lavoie *et al.* (1997) chez l'humain, effectuées sous verrouillage pancréatique, ont montré que la chute de la concentration plasmatique de l'insuline est respectivement responsable de 50-60% et de 70% de la hausse de la production hépatique de glucose à l'exercice. Au repos, Lins *et al.* (1983) affirment que le ratio entre de la concentration plasmatique du glucagon et celle de l'insuline serait crucial puisqu'une faible diminution de la concentration d'insuline rend le foie plus sensible aux effets du glucagon et ce, même avec une faible augmentation de la glucagonémie. Bref, une augmentation du ratio glucagon/insuline, comme retrouvée en situation de jeûne ou d'exercice, pourrait être l'un des éléments responsables de la modulation des RHG, ce qui aurait pour conséquence de stimuler la PHG afin de maintenir une glycémie relativement constante dans ces situations physiologiques. Des études réalisées dans notre laboratoire montrent qu'il existe une corrélation positive entre le ratio glucagon/insuline et la densité des RHG chez les rats exposés à diverses situations physiologiques (figure 1.3).

Le deuxième facteur potentiel consiste en la diminution de la charge glucidique de l'hépatocyte. En effet, dans des situations physiologiques comme le jeûne et l'exercice, la glycémie est rétablie par l'augmentation de la PHG par gluconéogenèse qui compense en majeure partie de la déplétion des réserves du glycogène hépatique (Ahlborg et Felig (1982); Drouin (1997); Katz et Tayek (1998); Wasserman (1995)). D'ailleurs, les résultats des études de Melançon *et al.* (2003) effectuées sur des rats montrent qu'une période de jeûne de 24 heures ainsi qu'une période de 180 minutes de nage induisent une déplétion des réserves de glycogène de l'ordre 92 et 86 % respectivement, comparativement aux rats sédentaires et nourris (figure 1.4). Cette baisse de la charge glucidique dans l'hépatocyte pourrait être l'un des facteurs responsables de la hausse de la densité des RHG observée par Melançon (2003) au jeûne et à l'exercice aigu. De plus, notre hypothèse est appuyée par des études en condition *in vitro* (Abrahamsen *et al.* (1995); Burcelin *et al.* (1998); Krones *et al.* (1998)) qui montrent qu'une élévation de la concentration de glucose hépatocytaire a pour conséquence une augmentation du nombre de transcrits d'ARN messenger du RHG. Ces résultats sont supportés par la découverte de Portois *et al.* (1999) d'un élément de réponse au glucose dans le promoteur du gène qui code pour le récepteur du glucagon.



Adapté de Melançon (2003)

FIGURE 1.4 : Concentration totale de glycogène hépatique des groupes d'animaux sédentaires et nourris, à jeun et à l'exercice

En résumé, la baisse de la charge glucidique provenant de la déplétion des réserves de glycogène de l'hépatocyte ainsi que la baisse de la concentration plasmatique de l'insuline pourraient être des facteurs impliqués dans la modulation des RHG. Pour étudier l'impact de la baisse de la charge glucidique de l'hépatocyte sur les RHG, nous n'aurions qu'à comparer la densité des récepteurs des rats mâles Sprague-Dawley sédentaires et nourris avec la densité des récepteurs des rats mâles Sprague-Dawley ayant jeûné durant 24 heures, situation physiologique où il y a déplétion quasi totale des réserves de glycogène (Melançon (2003)) (figure 1.5). Toutefois, l'impact du ratio glucagon/insuline sur les RHG est plus complexe à étudier. En effet, comment fait-on pour faire varier uniquement la concentration plasmatique de l'insuline tout en demeurant dans les concentrations physiologiques de cette hormone ? Autrement dit, comment fait-on pour reproduire une hyperglucagonémie jumelée à une normoinsulinémie ou à une hypoinsulinémie (figure 1.5) ? Par le verrouillage pancréatique : cette technique offre la possibilité d'inhiber les sécrétions hormonales pancréatiques dans le but de contrôler, via un apport exogène, les concentrations plasmatiques de ces hormones. Toutefois, bien qu'elle semble être une technique de choix, nous devons d'abord élaborer cette technique chez le rat, puisque cette dernière n'avait jamais été utilisée au laboratoire.

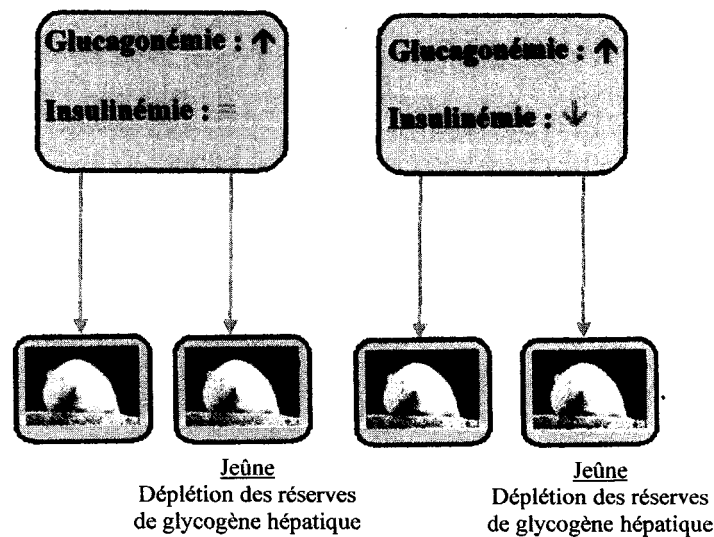


FIGURE 1.5 : Schématisation des hypothèses

CHAPITRE 2

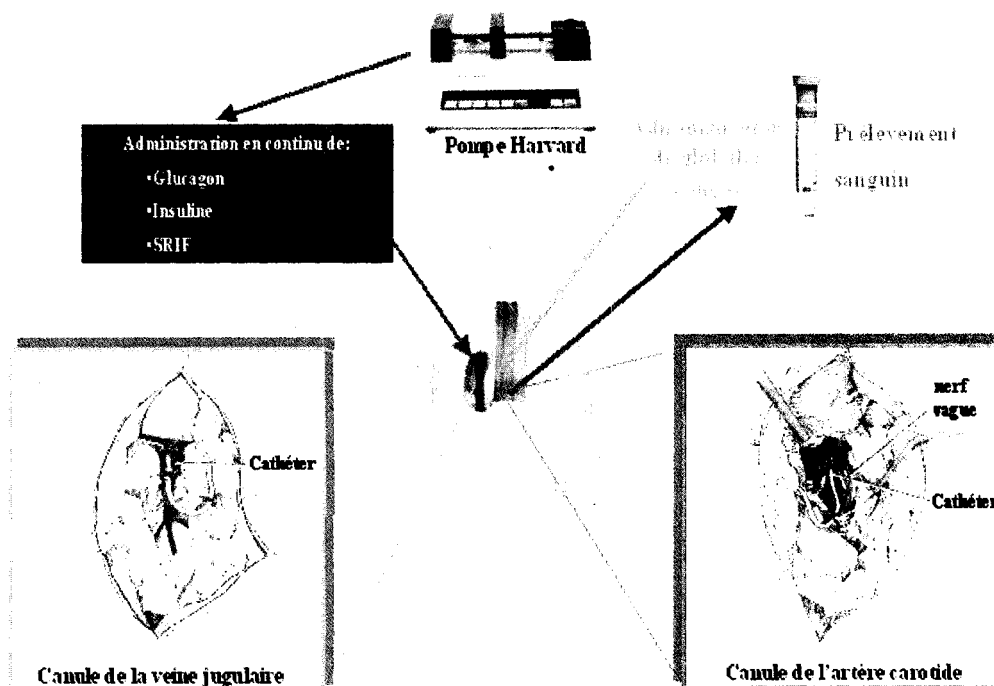
TECHNIQUE DE VERROUILLAGE PANCRÉATIQUE

2.1 Généralités sur la technique de verrouillage pancréatique

Le verrouillage pancréatique est une technique qui permet, en condition *in vivo*, de remplacer de façon exogène les concentrations de glucagon et d'insuline après l'inhibition des sécrétions endogènes de ces dernières. Ceci, sans perturber les autres paramètres physiologiques. Donc, pour exercer un contrôle complet sur les concentrations plasmatiques de l'insuline et du glucagon, les sécrétions pancréatiques endogènes de ces hormones doivent d'abord être supprimées. L'inhibition de la sécrétion hormonale par le pancréas s'obtient avec l'administration de la somatostatine (SRIF), une hormone naturellement produite par les cellules delta des îlots de Langerhans, ou encore par l'administration de molécules chimiques analogues à cette hormone.

La technique de verrouillage pancréatique est fréquemment utilisée chez l'homme (Lavoie *et al.* (1997) ; Monzillo et Hamdy (2003)), le singe (Chideckel *et al.* (1975) ; Koerker *et al.* (1974)), le chien (Cherrington *et al.* (1976) ; Sakurai *et al.* (1974)) et les rongeurs (Ayala *et al.* (2006) ; Cardin *et al.* (1999)) où elle sert, dans la majorité des cas, à étudier le rôle des hormones pancréatiques sur le métabolisme glucidique hépatique (Baron *et al.* (1987) ; Matsuda *et al.* (2002)). Pour les besoins de notre étude, la technique de verrouillage pancréatique élaborée par Cardin *et al.* (1999) nous a servi de canevas. Les techniques chirurgicales sont clairement expliquées et la méthodologie décrite permet de connaître le matériel et les produits à utiliser pour mettre sur pied notre technique. De plus, Cardin *et al.* (1999) nous renseignent sur le taux de SRIF à administrer, soit $1,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, pour inhiber les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline, mais aussi sur l'ordre de grandeur des taux de perfusion du glucagon et de l'insuline à administrer chez le rat (glucagon : $0,8 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, insuline : $2 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Du point de vue chirurgical, l'administration de la SRIF, de l'insuline et du glucagon, contenus dans une seringue installée sur une pompe de modèle Harvard, s'effectue via un cathéter inséré dans la veine jugulaire droite. Si l'expérience nécessite des ponctions sanguines, elles ont lieu au niveau de l'artère carotide, par l'entremise d'un cathéter posé à ce site de prélèvement (Waynforth *et al.* (1992)). De plus, si le volume des prélèvements sanguins est important, les globules rouges sont mis en solution dans un tampon KREBS et sont, par la suite, administrés aussi par ce cathéter (figure 2.1).



Adaptée de : Waynforth *et al.* (1992).

FIGURE 2.1 : Technique chirurgicale du verrouillage pancréatique

2.2 La SRIF et le Sandostatine : deux substances responsables de l'inhibition des sécrétions pancréatiques de l'insuline et du glucagon

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la SRIF constitue la seule molécule produite par l'organisme qui soit dotée d'un pouvoir inhibiteur de la libération du glucagon et de l'insuline par le pancréas. Chez l'homme et l'animal, cette hormone

pancréatique se retrouve sous deux formes, soit sous la forme SRIF-14 et la forme SRIF-28. Plus précisément, ces deux formes de SRIF sont produites par le clivage protéolytique de la prosomatostatine, laquelle dérive elle-même de la préprosomatostatine (Schonbrunn *et al.* (1996)). L'action de ces deux types de SRIF s'effectue par la liaison à leurs récepteurs spécifiques. Il existe cinq sous-types de récepteurs à la SRIF : le SSTR1, le SSTR2, le SSTR3, le SSTR4 et le SSTR5. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G, en particulier des protéines Gi (Moller *et al.* (2003)). Des études immunohistochimiques ont permis d'approfondir sur le rôle des récepteurs à la SRIF dans la régulation de la sécrétion d'insuline et de glucagon. Le récepteur SSTR2 se retrouve au niveau des cellules α du pancréas, soit les cellules des îlots de Langerhans qui produisent et sécrètent le glucagon, tandis que le SSTR5 est exprimé exclusivement dans les cellules β des îlots de Langerhans, soit les cellules qui produisent et sécrètent l'insuline (Hunyady *et al.* (1997); Mitra *et al.* (1999)). Encore aujourd'hui, la manière dont la SRIF inhibe les sécrétions de l'insuline et du glucagon pancréatique n'est pas entièrement comprise. Toutefois, certaines études (Hsu *et al.* (1991)) proposent un mécanisme intracellulaire par lequel le complexe récepteur à la SRIF-protéine Gi serait associé aux canaux calcium voltage-dépendant de type L. L'activation de Gi entraînerait l'hyperpolarisation de la membrane plasmique et donc à l'inhibition de l'influx de calcium à travers ces canaux. Puisque la sécrétion de l'insuline et du glucagon est un phénomène calcium-dépendant, la sécrétion de ces hormones est inhibée.

L'avis des chercheurs concernant l'efficacité de la SRIF à inhiber les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline est partagé. En effet, les résultats des recherches chez l'humain et chez le babouin montrent que la SRIF inhibe presque complètement la sécrétion de glucagon et/ou d'insuline (Chideckel *et al.* (1975); Koerker *et al.* (1974); Lavoie *et al.* (1997); Mortimer *et al.* (1974)) (tableau 2.1). Cependant, les résultats d'études chez le rat et le chien montrent que la SRIF réduit les concentrations plasmatiques basales du glucagon et/ou de l'insuline sans mener à l'inhibition totale des sécrétions pancréatiques de ces hormones (Brown *et al.* (1976); Emmanouel *et al.* (1978); Johnson *et al.* (1975); Sakurai *et al.* (1974)) (tableau 2.1).

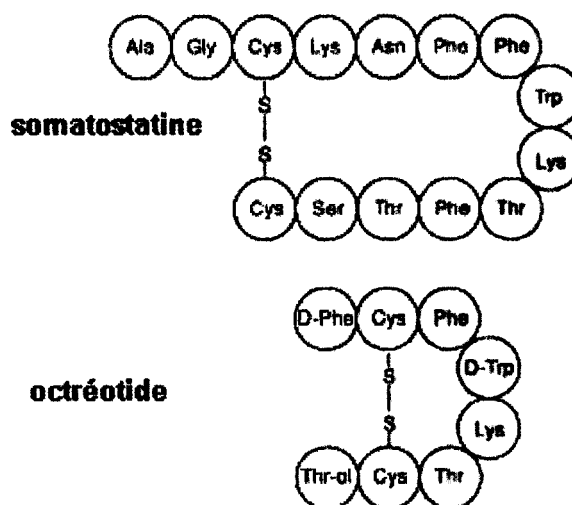
TABLEAU 2.1
Effet inhibiteur de la SRIF sur les concentrations endogènes d'insuline et du glucagon

Auteurs	Espèce	Taux de SRIF	% d'inhibition de la concentration endogène d'insuline	% d'inhibition de la concentration endogène de glucagon
Lavoie <i>et al.</i> (1997)	Humain	0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 6)	100	100
Mortimer <i>et al.</i> (1974)	Humain	2 $\mu\text{g}/\text{min}$ (n = 2)	100	80
Chideckel <i>et al.</i> (1975)	Babouin	0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 4)	89	100
Koerker <i>et al.</i> (1974)	Babouin	0.83 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ + 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ "BW" en bolus (n = 4)	100	100
Emmanouel <i>et al.</i> (1978)	Rat	1.7 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 36)	-	71
Brown <i>et al.</i> (1976)	Rat	100 $\mu\text{g}/100$ g "BW" (n = 6)	75	70
Johnson <i>et al.</i> (1975)	Rat	10 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 3)	75	55
Sakurai <i>et al.</i> (1974)	Chien	3.3 $\mu\text{g}/\text{min}$ (n = 9)	42	38

En médecine, l'utilisation de la SRIF est aussi contestable (Roelfsema *et al.* (2005); Tichomirowa *et al.* (2005)). Par exemple, bien que la SRIF ait prouvé son efficacité à inhiber l'hypersécrétion de l'hormone de croissance retrouvée dans les acromégalies, sa demi-vie extrêmement courte de moins de 2 minutes remet en doute l'utilisation thérapeutique de la SRIF (Ezzat et Melmed (1992); Pless (1992)). C'est pourquoi de nouvelles molécules de synthèse à action plus puissante et sélective ont été développées. Parmi ces molécules analogues à la SRIF, l'acétate d'octréotide, mieux connu sous son nom commercial le Sandostatin, est davantage utilisé que la SRIF en médecine humaine (Pless (1992)).

En effet, le Sandostatin est un octapeptide de synthèse dont les effets pharmacologiques sont comparables à ceux de la SRIF endogène, mais dont la demi-vie

est nettement plus grande, soit entre 72 et 98 minutes lorsqu'il est injecté de manière intraveineuse (Katz et Erstad (1989)). Plus précisément, c'est un peptide de synthèse de 8 acides aminés au lieu de 14, comme retrouvé chez la SRIF, avec substitution de trois de ces quatorze acides aminés, ce qui permettrait à la molécule d'être très résistante à la dégradation métabolique (Ezzat et Melmed (1992); Pless (1992)) (figure 2.2).



Adaptée de : Pless *et al.* (1992)

FIGURE 2.2 : Différence moléculaire entre la SRIF et le Sandostatin

Le Sandostatin est d'abord utilisé à des fins cliniques, Ezzat *et al.* (1992) affirment que l'action du Sandostatin s'exerce par l'intermédiaire des mêmes récepteurs que la SRIF et, étant donné que cette molécule est métabolisée moins rapidement que la SRIF, l'inhibition des sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline est respectivement de 11 et 1.3 fois plus élevées avec l'utilisation du Sandostatin, comparativement à l'utilisation de la SRIF. En somme, dans l'élaboration d'une technique de verrouillage pancréatique, il est essentiel de déterminer l'efficacité de la SRIF et du Sandostatin à inhiber complètement le glucagon et l'insuline endogènes, car l'inhibition pancréatique partielle engendre un contrôle moins rigoureux des

concentrations plasmatiques désirées de glucagon et d'insuline provenant de la perfusion.

2.3 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau pré- et post-hépatique

Comme nous l'avons vu précédemment, le verrouillage pancréatique est surtout utilisé dans les études portant sur l'impact hormonal dans le métabolisme glucidique. Néanmoins, cette technique peut être ajustée pour les besoins de l'étude à effectuer. Pour notre part, nous désirons créer une hyperglucagonémie jumelée soit à une hypoinsulinémie ou à une normoinsulinémie au niveau de la veine porte hépatique. Pourquoi au niveau de la veine porte hépatique ? Parce que le pancréas y sécrète le glucagon et l'insuline qu'il produit et parce qu'il est la principale source d'approvisionnement du foie en sang.

Pour reproduire une hyperglucagonémie, une normoinsulinémie ou une hypoinsulinémie au niveau portal, les concentrations endogènes de l'insuline et du glucagon à ce site doivent être évaluées. Pour obtenir la valeur d'une normoinsulinémie au niveau portal, il suffit de prélever le sang à ce niveau chez des animaux nourris et sédentaires car, dans cette condition physiologique, l'insuline est en concentration normoinsulinémique. Pour obtenir des résultats sur les valeurs d'une hyperglucagonémie et d'une hypoinsulinémie, il suffit d'effectuer des prélèvements sanguins au niveau portal chez des animaux à jeun puisque, dans cette condition physiologique, le glucagon et l'insuline sont en concentrations hyperglucagonémique et hypoinsulinémique. Ces étapes sont essentielles puisqu'il y a peu de données sur les concentrations endogènes de ces hormones dans différents contextes physiologiques au niveau portal, notamment pour une situation où les animaux sont nourris et sédentaires.

En effet, les données retrouvées dans la littérature correspondent principalement à des concentrations endogènes de glucagon et d'insuline dans la circulation sanguine post-hépatique suite à un jeûne (tableau 2.2). Au niveau post-hépatique, la concentration endogène du glucagon dans la circulation sanguine périphérique est de 45 pmol/L

(Koerker *et al.* (1974)) chez le babouin, en moyenne de 30 pmol/L chez l'homme (Felig *et al.* (1974); Mortimer *et al.* (1974)), de 67 pmol/L chez le rat (Emmanouel *et al.* (1978)) et de 16 pmol/L chez le chien (Sakurai *et al.* (1974)). Parallèlement, pour ces mêmes espèces, la concentration endogène de l'insuline au niveau post-hépatique est de 460 pmol/L chez le babouin (Koerker *et al.* (1974)), en moyenne de 54 pmol/L chez l'humain (Felig *et al.* (1974); Mortimer *et al.* (1974)) et de 55 pmol/L chez le chien (Sakurai *et al.* (1974)). Felig *et al.* (1974), chez l'humain, et Sakurai *et al.* (1974), chez le chien, semblent les seuls auteurs à avoir obtenu des valeurs au sujet des concentrations endogènes de glucagon et d'insuline au niveau portal. Ainsi, chez l'humain, les concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline sont respectivement de 1.5 et de 3 fois plus élevées au niveau portal qu'au niveau post-hépatique. Parallèlement, chez le chien, les concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline sont respectivement de 4 et de 10 fois plus élevées au niveau portal qu'au niveau post-hépatique.

TABLEAU 2.2
Concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline à différents sites de prélèvements sanguins suite à une période de jeûne

Auteurs	Temps de jeûne (hrs)	Espèce	Lieu de prélèvement sanguin	Concentration endogène d'insuline (pmol/L)	Concentration endogène de glucagon (pmol/L)
Mortimer <i>et al.</i> (1974)	7	Humain (n = 2)	Post-hépatique	76	23
Felig <i>et al.</i> (1974)	9	Humain (n = 6)	Post-hépatique	32	36
			Portal	85	49
Koerker <i>et al.</i> (1974)	12	Babouin (n = 4)	Post-hépatique	460	45
Emmanouel <i>et al.</i> (1978)	24	Rat (n = 36)	Post-hépatique	-	67
Sakurai <i>et al.</i> (1974)	12	Chien (n = 9)	Post-hépatique	55	16
			Portal	539	70

Melançon (2003) a obtenu des valeurs de concentrations d'insuline et de glucagon au niveau post-hépatique chez des rats nourris, mais aussi à jeun pour une période de 24 heures. Le groupe de rats nourris ont en moyenne une concentration plasmatique de 327 d'insuline et de 34 pmol/L de glucagon. Parallèlement, le groupe de rats ayant jeûné durant 24 heures ont en moyenne des concentrations plasmatiques de 179 d'insuline et de 35 pmol/L de glucagon. En comparant la concentration plasmatique d'insuline des animaux nourris avec celle des animaux à jeun, et en comparant la concentration plasmatique du glucagon des animaux nourris avec celle des animaux à jeun, il devient possible d'établir le ratio entre les concentrations d'insuline et de glucagon chez les animaux nourris et à jeun. Dans le cadre de ce présent projet de maîtrise, ces données servent de référence pour cibler les valeurs d'une hyperglucagonémie jumelée à une normo- ou à une hypoinsulinémie au niveau portal. En effet, en dosant le glucagon et l'insuline plasmatiques au niveau portal, mais aussi au niveau post-hépatique, nous pouvons comparer nos résultats obtenus avec ceux de Melançon (2003) au niveau post-hépatique.

Toutefois, les résultats de Melançon ne peuvent servir qu'à titre comparatif puisque les concentrations post-hépatiques de l'insuline et du glucagon ne reflètent pas nécessairement les concentrations de ces hormones au niveau portal (Gerich (1981)). En effet, le glucagon et l'insuline sont en majeure partie métabolisés par le foie; 50% de l'insuline sécrétée par le pancréas qui passe par la suite dans la veine porte hépatique est métabolisée dès le premier passage hépatique et n'atteint pas la circulation sanguine systémique (Duckworth (1988); Duckworth (1981); Engelking (1997)). Tout comme l'insuline, le glucagon est métabolisé en majeure partie par le foie : sa concentration au niveau portal est plus élevée qu'au niveau post-hépatique et son catabolisme par le premier passage hépatique engendre une diminution de 25 % de sa concentration plasmatique au niveau post-hépatique par rapport au niveau portal (Engelking (1997)).

2.4 Problématique

Le verrouillage pancréatique semble être une technique de choix pour étudier l'effet du facteur de source extra-hépatocytaire sur la modulation des RHG, tel que

présenté dans le chapitre 1 au point 1.4. Toutefois, bien qu'elle permette de travailler en condition *in vivo* et qu'elle modifie peu les paramètres physiologiques, l'avis des chercheurs concernant l'utilisation de la technique de verrouillage pancréatique demeure partagé. Selon certains, la SRIF, l'hormone utilisée dans cette technique pour inhiber les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline, ne supprime que partiellement ces hormones. Parallèlement, bien que Ezzat *et al.* (1992) affirment que le Sandostatin, l'analogue de la SRIF, possède un potentiel suppressif plus puissant que la SRIF sur l'inhibition du glucagon et de l'insuline pancréatiques, il reste qu'il manque encore des données pour appuyer cette affirmation. De plus, comme nous le mentionnions antérieurement, nous désirons reproduire au niveau portal une hyperglucagonémie jumelée à une hypo- ou à une normoinsulinémie. Cependant, la littérature scientifique est presque dépourvue en données quantitatives se rapportant aux concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline retrouvées au niveau de la veine porte hépatique.

2.5 Objectifs de travail

Via le présent projet de maîtrise, nous avons élaboré et évalué la technique de verrouillage pancréatique. Premièrement, nous avons déterminé chez des rats nourris et à jeun, les valeurs d'hyperglucagonémie, d'hypo- et de normoinsulinémie au niveau aux niveaux portal et post-hépatique. Deuxièmement, nous avons évalué les effets inhibiteurs de la SRIF et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline. Troisièmement, la technique de verrouillage pancréatique que nous avons élaborée pour le rat est pratiquée dans le but d'identifier les concentrations de glucagon et d'insuline à perfuser via la veine jugulaire pour reproduire au niveau portal une hyperglucagonémie, une hypoinsulinémie et une normoinsulinémie.

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

3.1 Animaux

Pour le présent projet de recherche, 44 rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada) sont utilisés. Aléatoirement attribués aux groupes expérimentaux, ces animaux sont nourris (n = 17) ou à jeun pour une période de 24 heures (n = 27). Avant l'expérimentation, les animaux ont accès *ad libitum* à la nourriture Rat Chow et à l'eau. Cependant, même s'ils gardent l'accès libre à l'eau, à partir de 8 :00 am le matin et 24 heures avant l'expérimentation, les animaux du groupe jeûne sont privés de nourriture. Dans le local d'hébergement, les animaux sont soumis à des cycles diurne : nocturne 12 :12 et la température ambiante est maintenue à 20°C et l'humidité relative à 55 %. Toutes les procédures concernant les animaux respectent les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux et sont approuvées par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

3.2 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique

Les rats nourris (n = 8) ou à jeun (n = 6) durant une période de 24 heures sont anesthésiés (pentobarbital sodique 55 mg/kg i.p., CDMV, Saint-Hyacinthe, QC, Canada) entre 8 :30 et 9 :00 am. Une incision est pratiquée à environ 1 cm sous le menton de l'animal jusqu'au niveau de l'épaule. Par la suite, l'artère carotide gauche est dégagée de tous les tissus adipeux et musculaires environnant pour permettre la cathétérisation de ce vaisseau sanguin. Une fois l'artère dégagée, une canule en polyéthylène (PE 50, BD, Oakville, ON, Canada) est insérée et fermée à son extrémité par une pince hémostatique afin d'éviter l'épanchement de sang. Parallèlement à cette chirurgie, une laparotomie est

effectuée dans le but d'isoler la veine porte hépatique et la veine hépatique. Des cathéters de 21 G sont installés au niveau de ces deux vaisseaux (figure 3.1). La pince hémostatique est retirée de la canule en même temps que les bouchons des cathéters, permettant ainsi d'effectuer toutes les prises de sang en même temps et de récolter environ 2.5 ml de sang par site de prélèvement. Chaque prélèvement est déposé dans un tube contenant de l'EDTA et de l'aprotinine (trasyolol, Sigma, Oakville, ON, Canada), un anti-protéolytique; les échantillons sont centrifugés à 3 000 g durant 10 minutes afin de récupérer le plasma et de le conserver à -80°C pour doser les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline. Finalement les animaux sont euthanasiés par sectionnement de l'aorte.

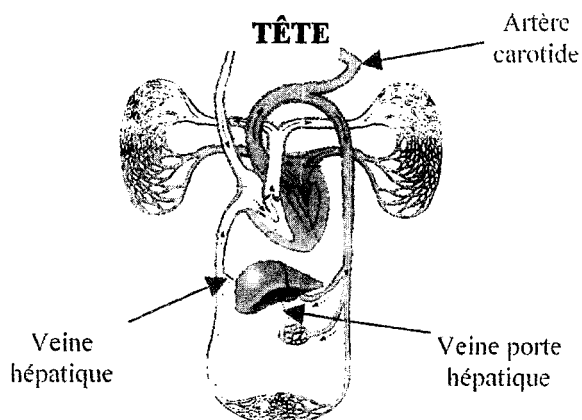


FIGURE 3.1 : Sites de prélèvements sanguins

3.3 Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline

Les rats nourris ($n = 9$) ou à jeun ($n = 13$) durant une période de 24 heures sont anesthésiés (pentobarbital 55 mg/kg i.p.) entre 8:30 et 9:00 am. Tout comme l'expérience précédente, une chirurgie est pratiquée pour canuler l'artère carotide gauche, à la différence que, cette fois-ci, la veine jugulaire droite externe est isolée et

canulée à l'aide d'un tube de polyéthylène de grandeur PE 60 (PE 60, BD, Oakville, ON, Canada). Suite à ces traitements, l'artère carotide sert de lieu de prélèvement sanguin, tandis que la cathétérisation de la veine jugulaire sert de site de perfusion pour les solutions de SRIF (Somatostatine min. 97%, Sigma, Oakville, ON, Canada) ou de Sandostatin (Sandostatin, Novartis Pharmaceuticals Canada inc., Dorval, QC, Canada). La perfusion des solutions s'effectue à l'aide d'une pompe Harvard (Harvard Apparatus, South Natick Mass, UAS 01760) calibrée sur laquelle est fixée une seringue contenant les solutions de SRIF ou de Sandostatin. Aléatoirement choisis, les animaux du groupe jeûne ont reçu de la SRIF (n=3) ou du Sandostatin (n=2) à un taux de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 3), taux qui correspond à $40 \mu\text{g/hr}$, et du Sandostatin à des taux de $25 \mu\text{g/hr}$ (n = 2), de $50 \mu\text{g/hr}$ (n = 2), de $100 \mu\text{g/hr}$ (n = 2) ainsi que de $200 \mu\text{g/hr}$ (n = 2). Parallèlement, les animaux nourris ont reçu de la SRIF à un taux de $1,3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 3), qui correspond à $28 \mu\text{g/hr}$, et à un taux de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 2), qui correspond à $43 \mu\text{g/hr}$, ou de Sandostatin à des taux de $100 \mu\text{g/hr}$ (n = 2) ou de $200 \mu\text{g/hr}$ (n = 2). L'expérience se déroule sur une période de 75 minutes. Une première ponction sanguine est prélevée au temps -15 minutes au niveau de l'artère carotide canulée. Au temps expérimental -5 min, la pompe Harvard est mise en marche et la perfusion de SRIF ou de Sandostatin débute. Donc, à partir du moment de l'administration des solutions de SRIF ou de Sandostatin, des ponctions sanguines sont prises aux temps expérimentaux 0, 30 et 60 minutes (figure 3.2).

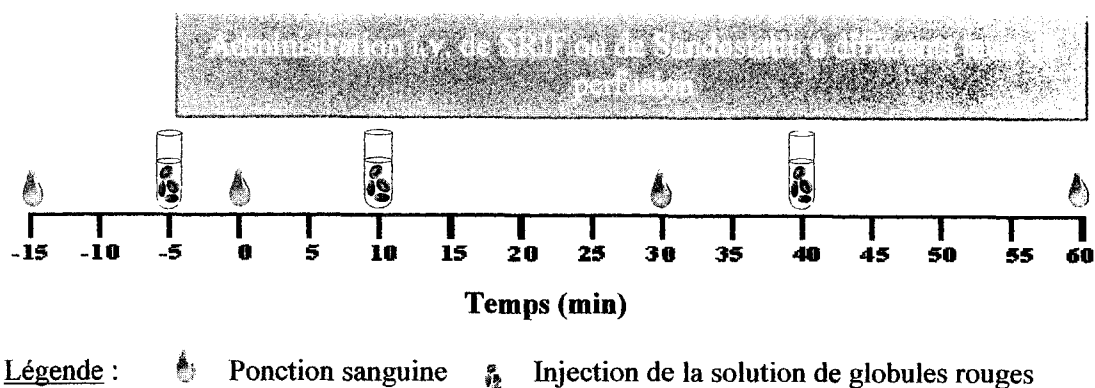


FIGURE 3.2 : Schématisation du protocole expérimental du point 3.3 de la méthodologie.

Le sang est prélevé dans des tubes, contenant de l'EDTA et de l'aprotinine, puis centrifugé à 3 000 g durant 10 minutes. Le plasma est retiré et préservé à -80°C pour les analyses ultérieures. Les globules rouges sont remis en suspension dans une solution d'albumine sérique de bovin 2% (BSA 2%) et de tampon KREBs pH 7.2. Toutes les 10 minutes suivant les prises de sang, le sang reconstitué est réinjecté à l'animal via la canule placée dans l'artère carotide dans le but de rétablir le volume sanguin. Finalement, à la fin de l'expérimentation, les animaux sont euthanasiés par sectionnement de l'aorte.

3.4 Concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline aux différents sites de prélèvements sanguins sous verrouillage pancréatique

Chez des animaux à jeun ($n = 3$) durant une période de 24 heures, des chirurgies sont pratiquées afin d'insérer des canules PE 50 et 60 au niveau de l'artère carotide gauche et de la veine jugulaire droite externe. L'expérience se déroule sur une période de 60 minutes et débute au temps 0 minute par la perfusion de la solution contenant du glucagon synthétique (Glucagon (1-29), Bachem, Torrance, CA, États-Unis), de l'insuline de souche porcine (Iletin II regular insulin, Eli Lilly Canada inc., Toronto, ON, Canada) et de SRIF. Les concentrations de glucagon, d'insuline et de SRIF sont calculées de manière à obtenir des taux de perfusion de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de glucagon, de $0,3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ d'insuline et de $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de SRIF (figure 3.3). Au bout de 60 minutes de perfusion, une laparotomie est effectuée afin de cathétériser la veine porte hépatique ainsi que la veine hépatique tel que présenté à la figure 3.1. Suite à la laparotomie, des prélèvements sanguins sont pris au niveau de l'artère carotide, de la veine porte hépatique et de la veine hépatique en même temps. Le sang est prélevé dans des tubes EDTA, centrifugé à 3 000 g durant 10 minutes. Le plasma est retiré et préservé à -80°C pour les analyses ultérieures. Finalement, une fois l'expérimentation terminée, les animaux sont euthanasiés par sectionnement de l'aorte.

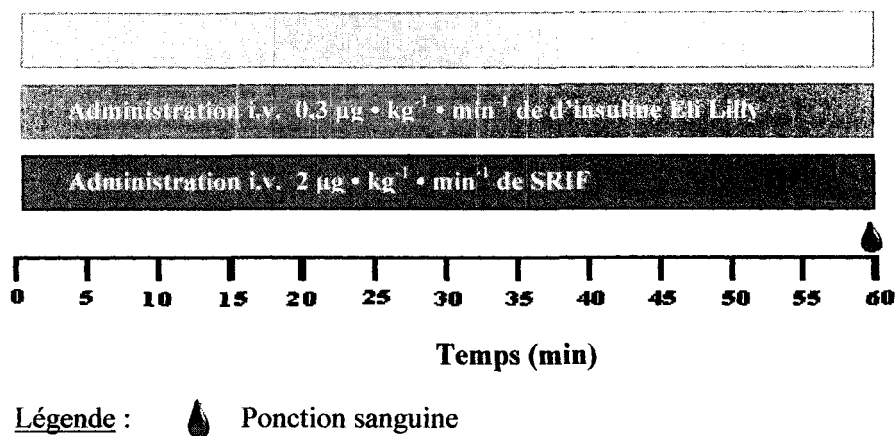


FIGURE 3.3 : Schématisation du protocole expérimental du point 3.4 de la méthodologie.

3.5 Essais de la technique de verrouillage pancréatique

Tout comme les expériences précédentes, des chirurgies sont pratiquées sur des animaux ($n = 4$) ayant subi une période de jeûne de 24 heures afin d'insérer une canule PE 50 dans l'artère carotide et une canule PE 60 dans la veine jugulaire. La canule posée dans l'artère carotide sert aux diverses prises de sang. La canule posée dans la veine jugulaire est connectée à une seringue installée sur la pompe Harvard et sert à la perfusion de la solution contenant la SRIF, l'insuline et du glucagon. Deux animaux ont reçu du glucagon ADN complémentaire d'humain (Glucagon Human DNAC, Eli Lilly Canada inc., Toronto, ON, Canada) à un taux de $0,75 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, d'insuline de souche porcine à un taux de $0,6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de SRIF à un taux de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et deux autres animaux ont reçu du glucagon ADN complémentaire d'humain à un taux de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, d'insuline à un taux de $3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et du SRIF à $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. L'expérience se déroule sur une période de 135 minutes. Six ponctions sanguines sont effectuées soit au temps $-15, 0, 30, 60, 90$ et 120 minutes (figure 3.4). Le sang est prélevé dans des tubes EDTA et centrifugé à $3\ 000 \text{ g}$ durant 10 minutes. Le plasma est retiré et préservé à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pour doser ultérieurement le glucagon et l'insuline plasmatique. Les globules rouges sont remis en suspension dans une solution d'albumine sérique de bovin 2% (BSA 2%) et de tampon KREBS pH 7,2, et à toutes les 10 minutes

suivants les prises de sang , le sang reconstitué est réinjecté à l'animal via la canule placée dans l'artère carotide dans le but de rétablir le volume sanguin. Au temps -5 minutes, la SRIF est administrée seule durant 30 minutes, puis en combinaison avec l'insuline et le glucagon à partir du temps 35 minutes jusqu'au temps 120 minutes. En même temps que les ponctions sanguines, la glycémie est mesurée à ces temps. Une injection de glucose (Dextrose 20 % v/v, C.D.M.V., Saint-Hyacinthe, QC, Canada) est pratiquée au niveau de la carotide en même temps que l'administration de la solution contenant les globules rouges si la glycémie descend sous à 8,0 mmol/L, soit en concentration normoglycémique. Finalement, à la fin de l'expérimentation, les animaux sont euthanasiés par sectionnement de l'aorte.

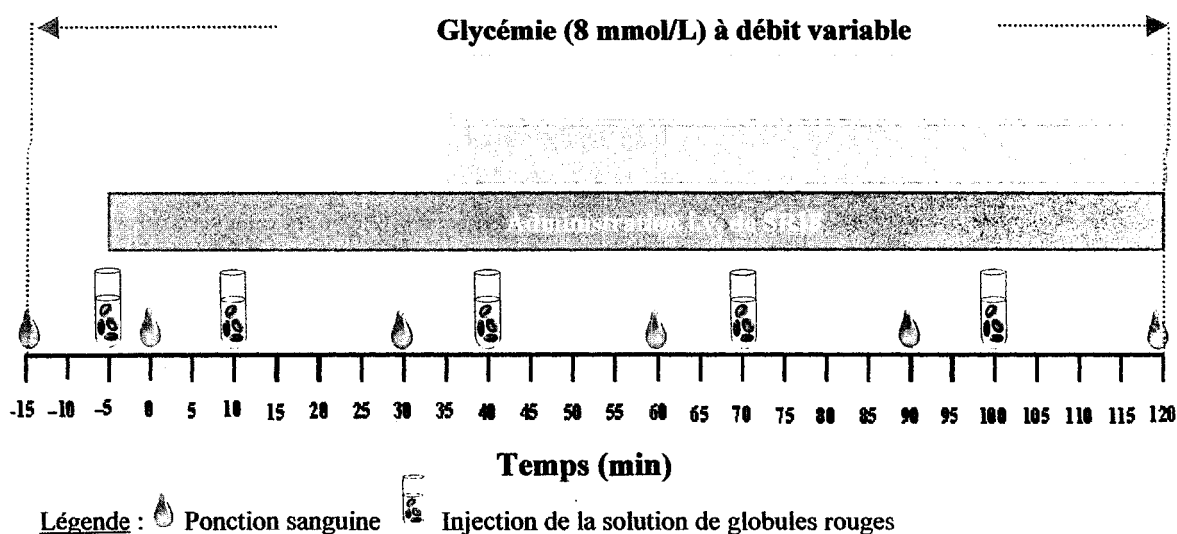


FIGURE 3.4 : Schématisation du protocole expérimental du point 3.5 de la méthodologie

3.6 Analyses

3.6.1 Glucagon et insuline

Les concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline sont déterminées grâce aux essais de dosage commerciaux qui utilisent la méthode radio-immunologique

(dosage de l'insuline, Mediacorp, Montréal, QC, Canada; dosage du glucagon, Inter Medico, Markham, ON, Canada). Le principe de cette technique implique la liaison compétitive d'un antigène radiomarqué (glucagon I¹²⁵ ou insuline I¹²⁵) et d'un antigène non marqué (glucagon ou insuline froid contenu dans le plasma à tester) à des anticorps de haute affinité (anti-glucagon ou anti-insuline).

3.6.2 Glucose

La glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre de marque commerciale One touch ultra (LifeSCan, Burnaby, BC, Canada).

3.6.3 Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés sous la forme : moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). L'évaluation des données est réalisée par une analyse de la variance à une dimension (Anova) avec ou sans mesures répétées pour comparer tous les paramètres mesurés dans cette étude. Quand ces analyses ont révélé des différences significatives, un test post hoc Tukey-Kramer a été utilisé afin de mieux identifier les différences entre les deux groupes. Un seuil significatif de $P < 0,05$ est retenu.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

4.1 Données descriptives

La journée de l'expérimentation, les animaux qui ont subi une période de jeûne de 24 heures ont vu leur masse corporelle chuter de 8 % comparativement à celle des animaux qui ont eu accès *ad libitum* à la nourriture la journée qui précède celle de l'expérimentation (tableau 4.1).

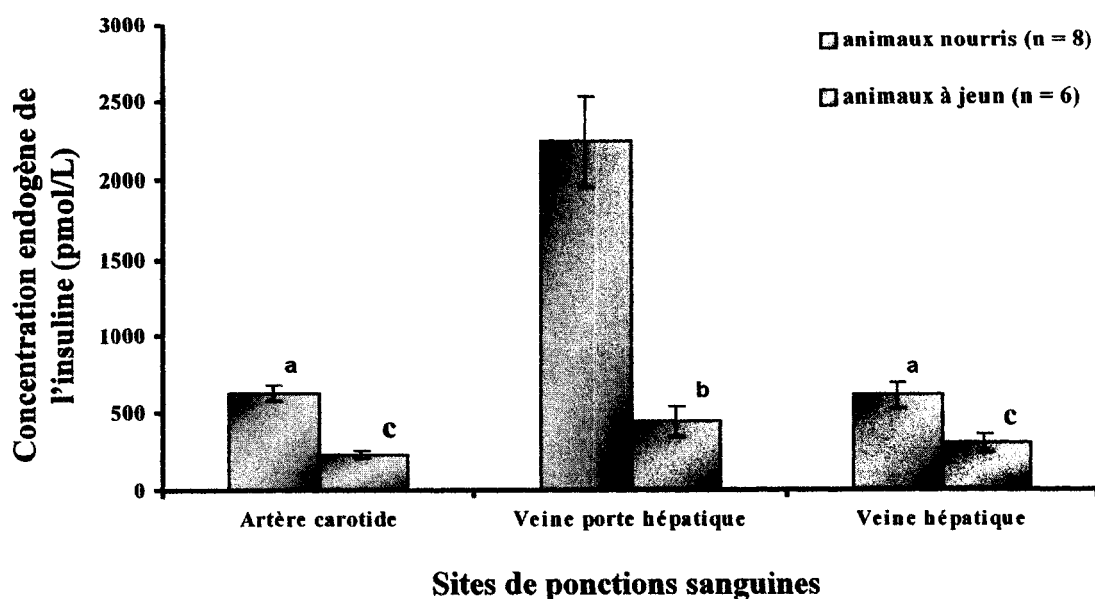
TABLEAU 4.1
Poids des animaux la journée de l'expérimentation

	Animaux nourris	Animaux à jeun
Poids (g)	355 ± 2	330 ± 1

4.2 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique

Tel que présenté à la figure 4.1, qui illustre les concentrations d'insuline au niveau de trois sites de prélèvement chez des animaux sédentaires et à jeun durant 24 heures, le jeûne induit une baisse significative de la concentration endogène de l'insuline et ce, autant au niveau post- que pré-hépatique. Mesurée au niveau de la veine porte hépatique, l'insulinémie a diminué de 80 % chez les animaux à jeun (449 ± 96 pmol/L) comparativement aux animaux nourris ($2\,234 \pm 293$ pmol/L). En comparant la concentration d'insuline mesurée dans la veine porte hépatique avec celles de l'artère carotide et de la veine hépatique chez les animaux nourris, les résultats montrent des concentrations d'insuline significativement diminuées dans l'artère carotide et dans la veine hépatique. En comparant ces mêmes sites de prélèvement chez les animaux à jeun

pour une période de 24 heures, ces mêmes résultats sont observés. En effet, par le passage hépatique, l'insulinémie au niveau post-hépatique chez les animaux nourris est de 72 % plus faible en moyenne qu'au niveau portal, autrement dit, soit de 626 ± 52 pmol/L dans l'artère carotide et de 613 ± 80 pmol/L dans la veine hépatique, comparativement à 2234 ± 293 pmol/L dans la veine porte hépatique. Parallèlement, chez les animaux à jeun, l'insulinémie baisse de 32 % au niveau de la veine hépatique (305 ± 142 pmol/L) et de 48 % au niveau de l'artère carotide (232 ± 50 pmol/L), comparativement à la veine porte hépatique (449 ± 235 pmol/L).



- a $P < 0,001$ en comparant ces données avec l'insulinémie de la veine porte hépatique des animaux nourris
 b $P < 0,001$ en comparant cette donnée avec l'insulinémie de la veine porte hépatique des animaux nourris
 c $P < 0,05$ en comparant ces données avec l'insulinémie de la veine porte hépatique des animaux à jeun

FIGURE 4.1 : Insulinémies des animaux à jeun et nourris aux différents sites de ponctions sanguines

À la figure 4.2, qui représente les concentrations de glucagon au niveau de trois sites de prélèvement chez des animaux sédentaires et à jeun durant 24 heures, l'évaluation statistique des résultats de dosage du glucagon endogène révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux de glucagon retrouvés aux différents sites de prélèvements sanguins et ce, autant chez les animaux nourris que à jeun. Toutefois,

bien qu'il n'y ait pas de différence significative, la glucagonémie tend à augmenter au niveau portal, soit au lieu où le pancréas sécrète le glucagon. Plus précisément, la glucagonémie chez les animaux nourris est respectivement de 17 ± 1 pmol/L au niveau de l'artère carotide, de 19 ± 1 pmol/L au niveau de la veine porte hépatique et de 16 ± 1 pmol/L de la veine hépatique et, dans le même ordre, de 15 ± 1 pmol/L, de 18 ± 1 pmol/L et de 17 ± 1 pmol/L chez les animaux à jeun.

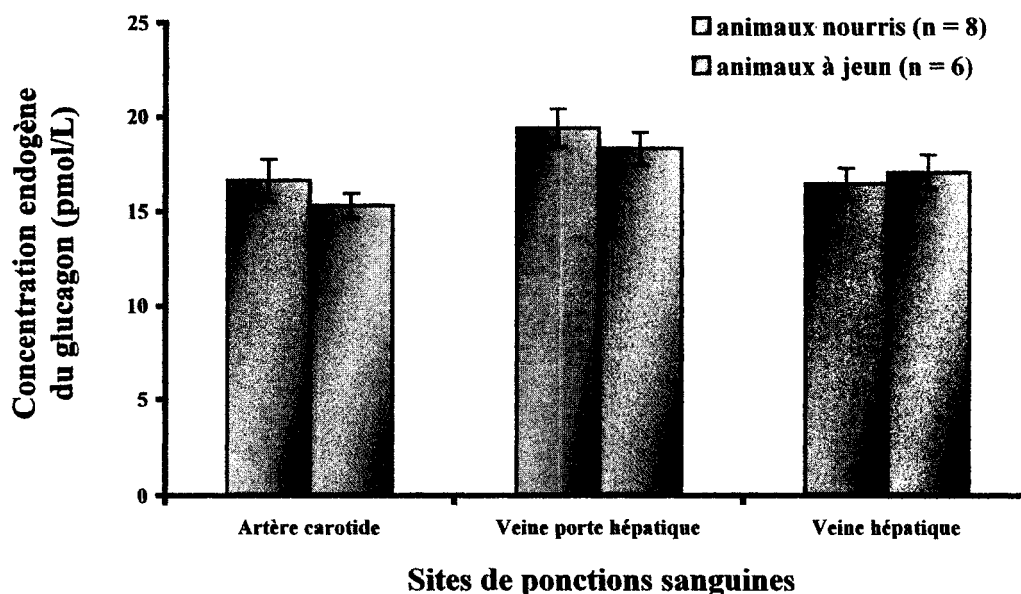
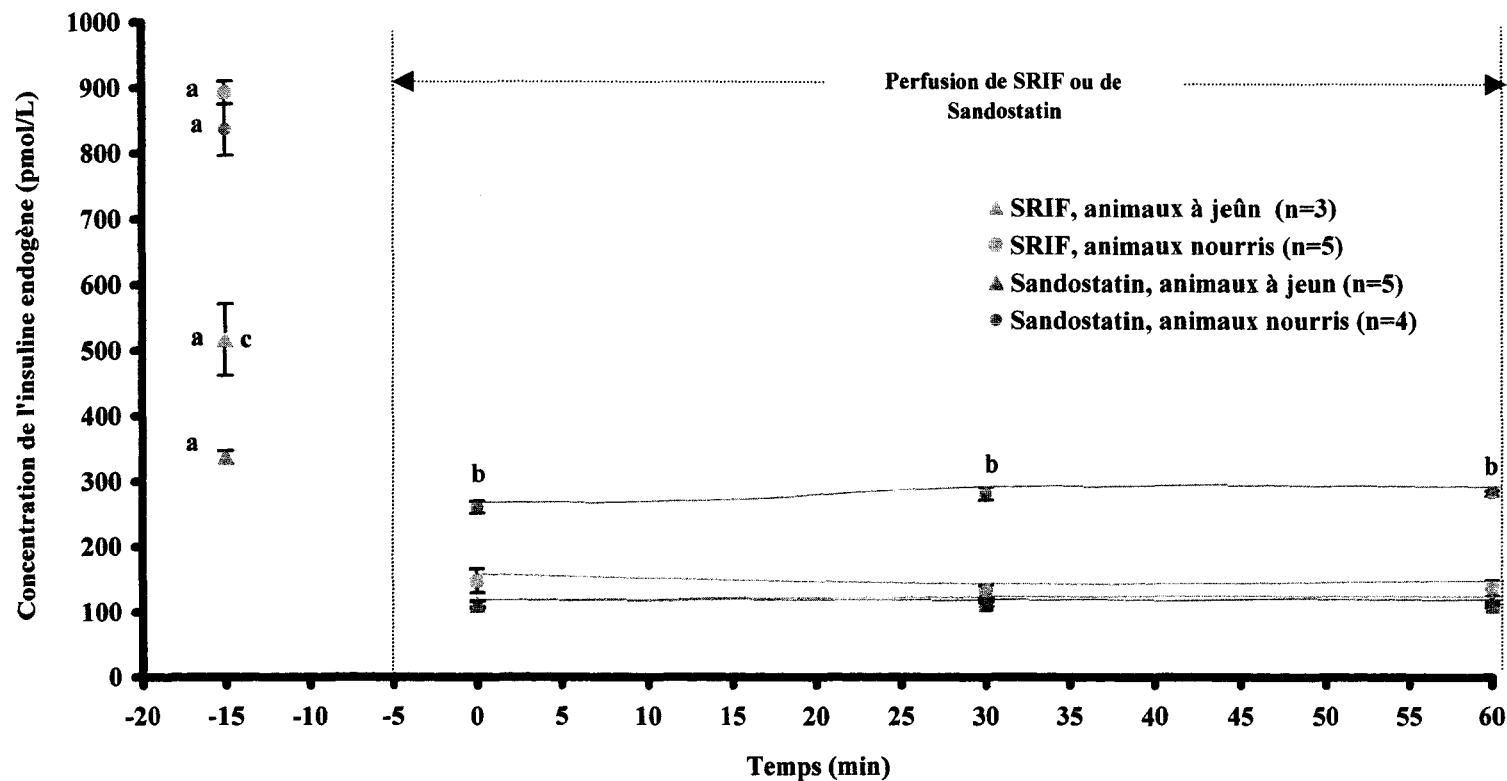


FIGURE 4.2 : Glucagonémies des animaux à jeun et nourris aux différents sites de ponctions sanguines

4.3 Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline

Les résultats de la figure 4.3 illustrent l'effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatatin sur l'insulinémie des animaux à jeun et nourris. Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre 3 au point 3.3, plusieurs taux de perfusion de SRIF et de Sandostatatin ont été utilisés. Toutefois, la figure 4.3 illustre les résultats regroupés des différents dosages des concentrations d'insuline endogènes. En effet, peu importe le taux de perfusion de SRIF utilisé chez les animaux à jeun ou nourris, la SRIF a inhibé de manière constante l'insuline endogène. Plus précisément, suite à la perfusion de SRIF,

FIGURE 4.3 : Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur l'insulinémie



a $P < 0,001$ en comparant les données du temps -15 min. avec les temps 0, 30, et 60 min. pour chacun des groupes expérimentaux au sein du même groupe expérimental

b $P < 0,001$ en comparant ces données à celles des mêmes temps expérimentaux du groupe de perfusion de Sandostatin des animaux à jeun

c $P < 0,001$ en comparant cette donnée à la donnée du temps -15 min. du groupe de perfusion de SRIF des animaux nourris

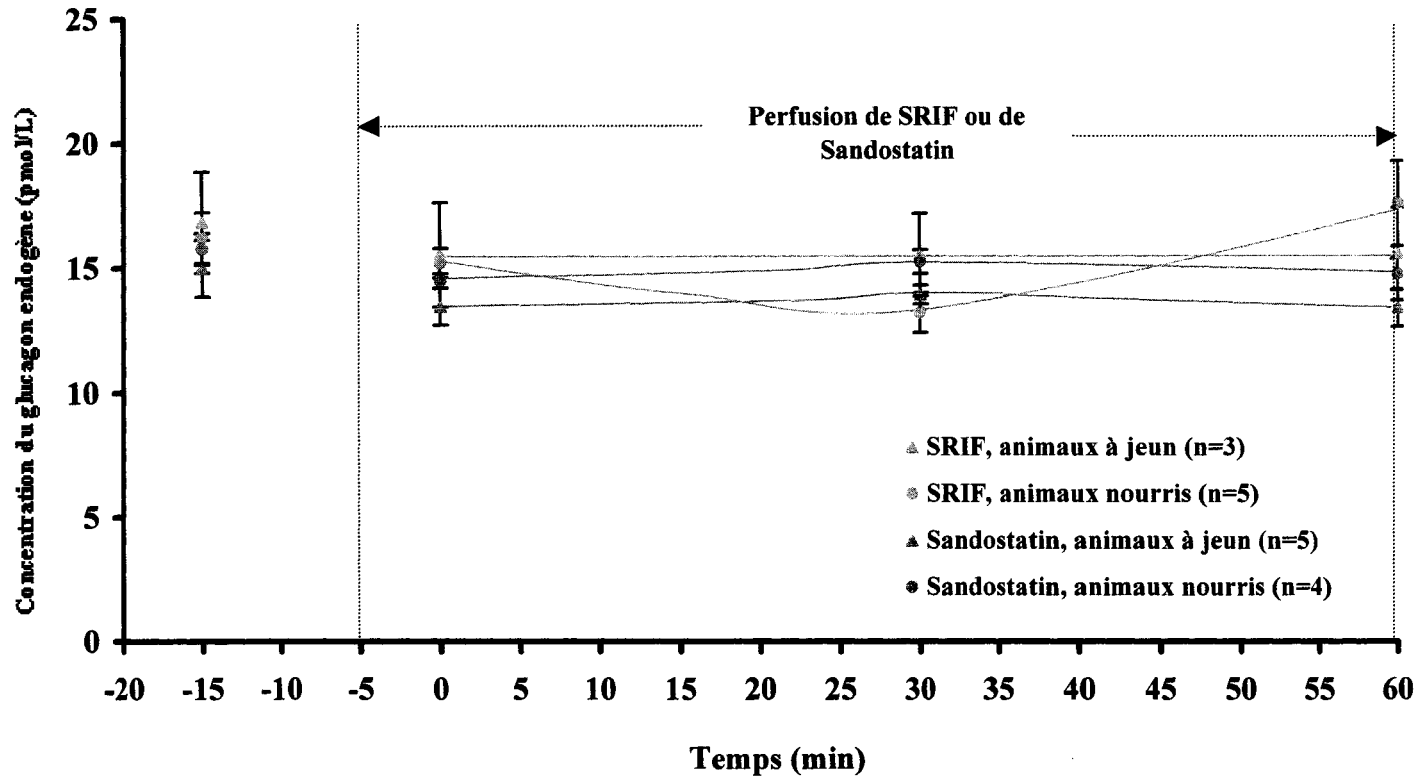
les concentrations basales d'insuline de 516 ± 55 pmol/L retrouvées chez les animaux à jeun et de 892 ± 18 pmol/L retrouvées chez les animaux nourris ont diminué respectivement de 78 % (112 ± 5 pmol/L) et de 84% (147 ± 18 pmol/L), et cette diminution est demeurée constante tout le temps de la perfusion. Suite à la perfusion du Sandostatin à différents taux, les résultats ont été aussi regroupés. Contrairement, aux résultats obtenus avec la SRIF, l'effet inhibiteur du Sandostatin dépend des concentrations basales d'insuline. En effet, l'utilisation du Sandostatin fait chuter de 70 % l'insulinémie : la concentration d'insuline des animaux nourris est de 836 ± 40 pmol/L et, suite à la perfusion de Sandostatin, elle passe à 260 ± 9 pmol/L. Chez les animaux à jeun, l'insulinémie passe de 337 ± 10 pmol/L à 110 ± 12 pmol/L suite à la perfusion de Sandostatin.

La figure 4.4 représente l'effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur la glucagonémie des animaux à jeun et nourris. Les résultats des dosages du glucagon endogène ont été regroupés pour les différents taux de perfusion de SRIF et de Sandostatin administrés aux animaux à jeun et nourris, taux retrouvés dans la section 3.3 du chapitre 3. Aucun changement significatif n'a été observé suite à ces dosages. Les résultats montrent que les perfusions de SRIF et de Sandostatin n'ont, en aucun temps, fait diminué les concentrations basales de glucagon endogène.

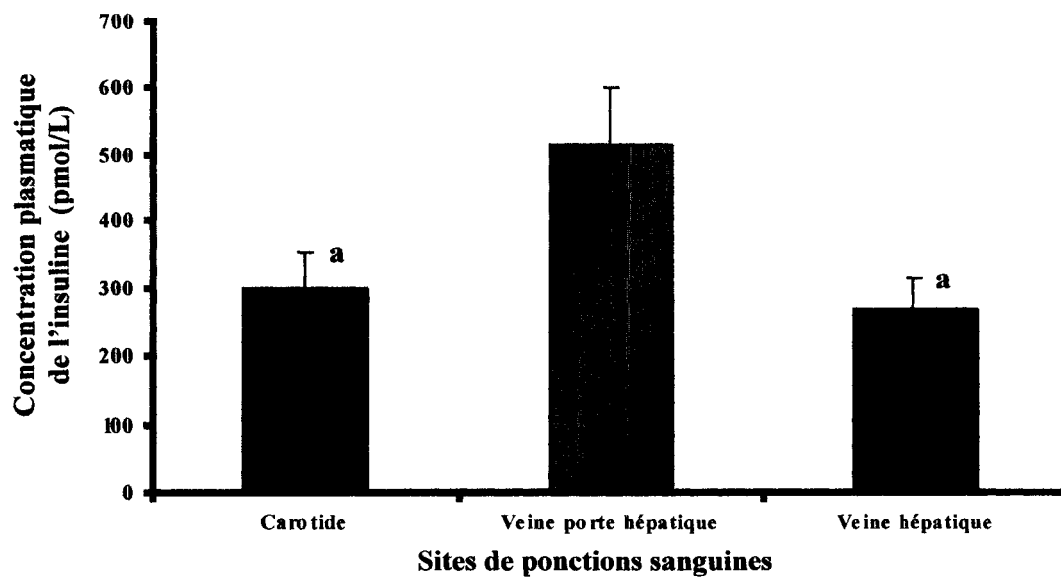
4.4 Concentrations plasmatiques de glucagon et d'insuline aux différents sites de prélèvements sanguins sous verrouillage pancréatique

La figure 4.5 illustre l'insulinémie à trois sites de prélèvements sanguins suite à la perfusion de SRIF et d'insuline à un taux de $0,3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Ainsi, les concentrations plasmatiques d'insuline de source exogène ont été dosées aux différents sites de prélèvements sanguins, soit au niveau de la veine porte hépatique, de la veine hépatique et de l'artère carotide. Bien que trois rats seulement ont été utilisés pour procéder à cette expérience, les résultats ont tout de même révélé une insulinémie significativement plus élevée au niveau portal (516 ± 84 pmol/L) qu'au niveau post-hépatique (artère carotide : 300 ± 54 pmol/L, veine hépatique : 269 ± 47 pmol/L). De

FIGURE 4.4 : Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur la glucagonémie



plus, bien qu'il n'y a pas de différence significative entre la concentration d'insuline au niveau de l'artère carotide et de la veine hépatique, il reste que, sous verrouillage pancréatique, la concentration d'insuline au niveau de l'artère carotide tend à augmenter par rapport à la concentration d'insuline dans la veine hépatique.



a $P < 0,0001$ en comparant ces données avec la concentration plasmatique d'insuline au niveau de la veine porte hépatique

FIGURE 4.5 : Concentrations plasmatiques de l'insuline au niveau portal et post-hépatique (n=3)

La figure 4.6 illustre la glucagonémie à trois sites de prélèvements sanguins suite à la perfusion de SRIF et de glucagon synthétique provenant de la compagnie Bachem à un taux de $0,3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Suite à la perfusion de SRIF et de glucagon, les concentrations plasmatiques de glucagon ont été dosées à différents sites de prélèvements sanguins, soit au niveau de la veine porte hépatique, de la veine hépatique et de l'artère carotide. Bien que l'échantillonnage soit faible ($n=3$), les résultats obtenus suite aux dosages du glucagon plasmatique ne montrent aucune différence significative entre les concentrations de glucagon portal ($19 \pm 1 \text{ pmol/L}$) et post-hépatique (artère carotide : $17 \pm 1 \text{ pmol/L}$, veine hépatique : $16 \pm 1 \text{ pmol/L}$), mais suggèrent une légère augmentation de la concentration du glucagon au niveau portal.

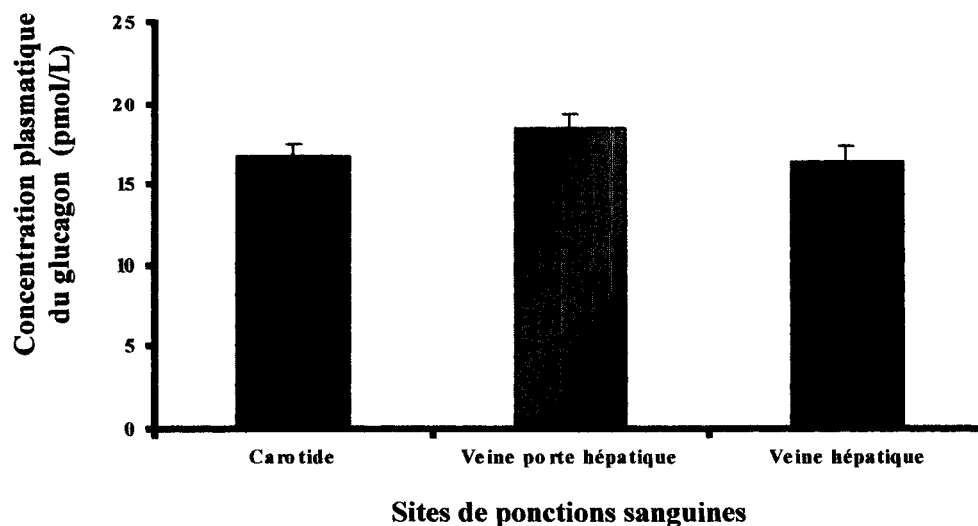


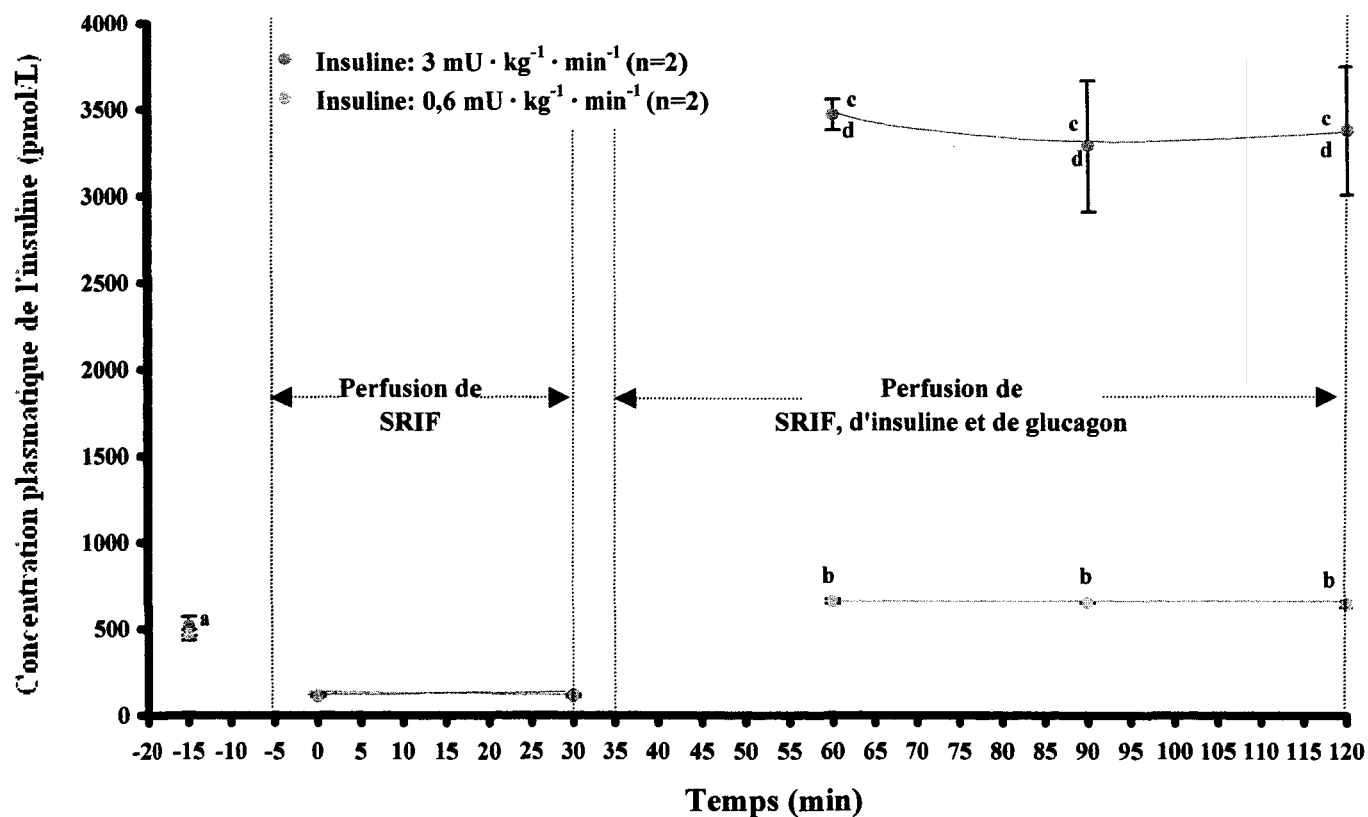
FIGURE 4.6 : Concentrations plasmatiques du glucagon au niveau portal et post-hépatique (n=3)

4.5 Essais de la technique de verrouillage pancréatique

La figure 4.7 illustre la variation de l'insulinémie suite à l'administration de SRIF et d'insuline. Ainsi, bien qu'il a été montré qu'une perfusion de SRIF de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ n'inhibe pas complètement la sécrétion pancréatique de l'insuline, la technique de verrouillage pancréatique a été tout de même pratiquée pour évaluer la variation de la concentration plasmatique de l'insuline suite à la perfusion de cette hormone. Les résultats du dosage de l'insuline plasmatique ont révélé des différences significatives entre les concentrations plasmatiques de l'insuline, suite aux différents taux de perfusion de cette hormone. Ainsi, des taux de perfusion d'insuline de $0,6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n=2) et de $3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n=2) donnent en moyenne des concentrations d'insuline de 650 pmol/L et de 3379 pmol/L respectivement aux temps expérimentaux 60, 90 et 120 minutes.

La figure 4.8 illustre la variation de la glucagonémie suite à l'administration de SRIF et du glucagon. Des taux de perfusion de $0,75 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 2) et de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (n = 2) de glucagon, provenant de l'ADN complémentaire de souche humaine de la compagnie Eli Lilly, ont produit des concentrations plasmatiques

FIGURE 4.7 : Concentrations plasmatiques de l'insuline sous verrouillage pancréatique



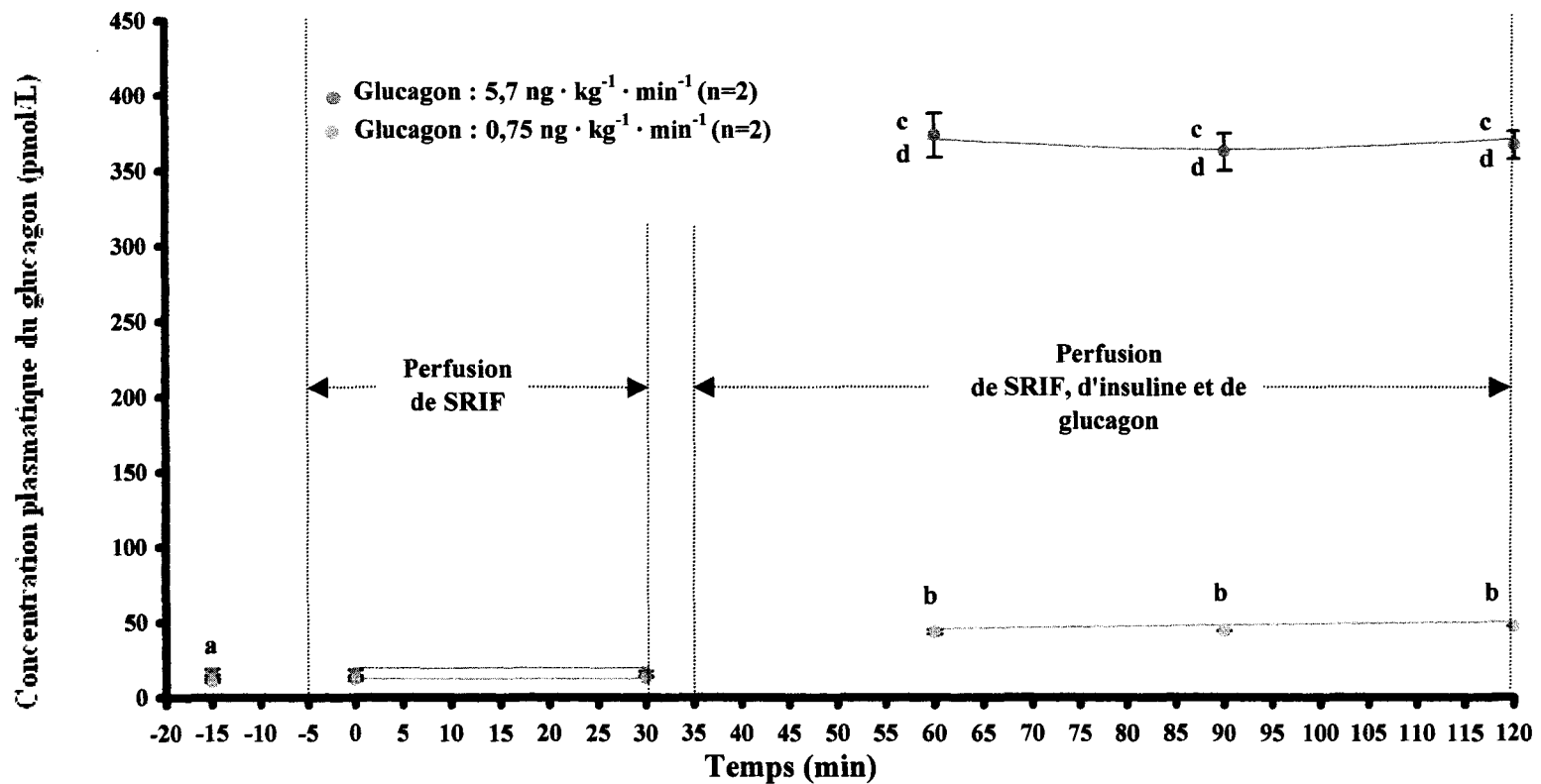
a $P < 0,001$ en comparant ces données avec les temps expérimentaux 0, 30, 60, 90 et 120 min. des deux groupes d'animaux dont les taux de perfusion de l'insuline sont différents

b $P < 0,001$ en comparant les données de ces temps expérimentaux avec les temps expérimentaux 0 et 30 min. de ce même groupe d'animaux

c $P < 0,001$ en comparant les données de ces temps expérimentaux avec les temps expérimentaux 0 et 30 min. de ce même groupe d'animaux

d $P < 0,001$ en comparant ces données avec les données de ces mêmes temps expérimentaux du groupe d'animaux où le taux de perfusion d'insuline est de $0,6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

FIGURE 4.8 : Concentrations plasmatiques du glucagon sous verrouillage pancréatique



a $P < 0,001$ en comparant ces données avec les temps expérimentaux 60, 90 et 120 min. des deux groupes d'animaux dont les taux de perfusion du glucagon sont différents

b $P < 0,001$ en comparant les données de ces temps expérimentaux avec les temps expérimentaux 0 et 30 min. de ce même groupe d'animaux

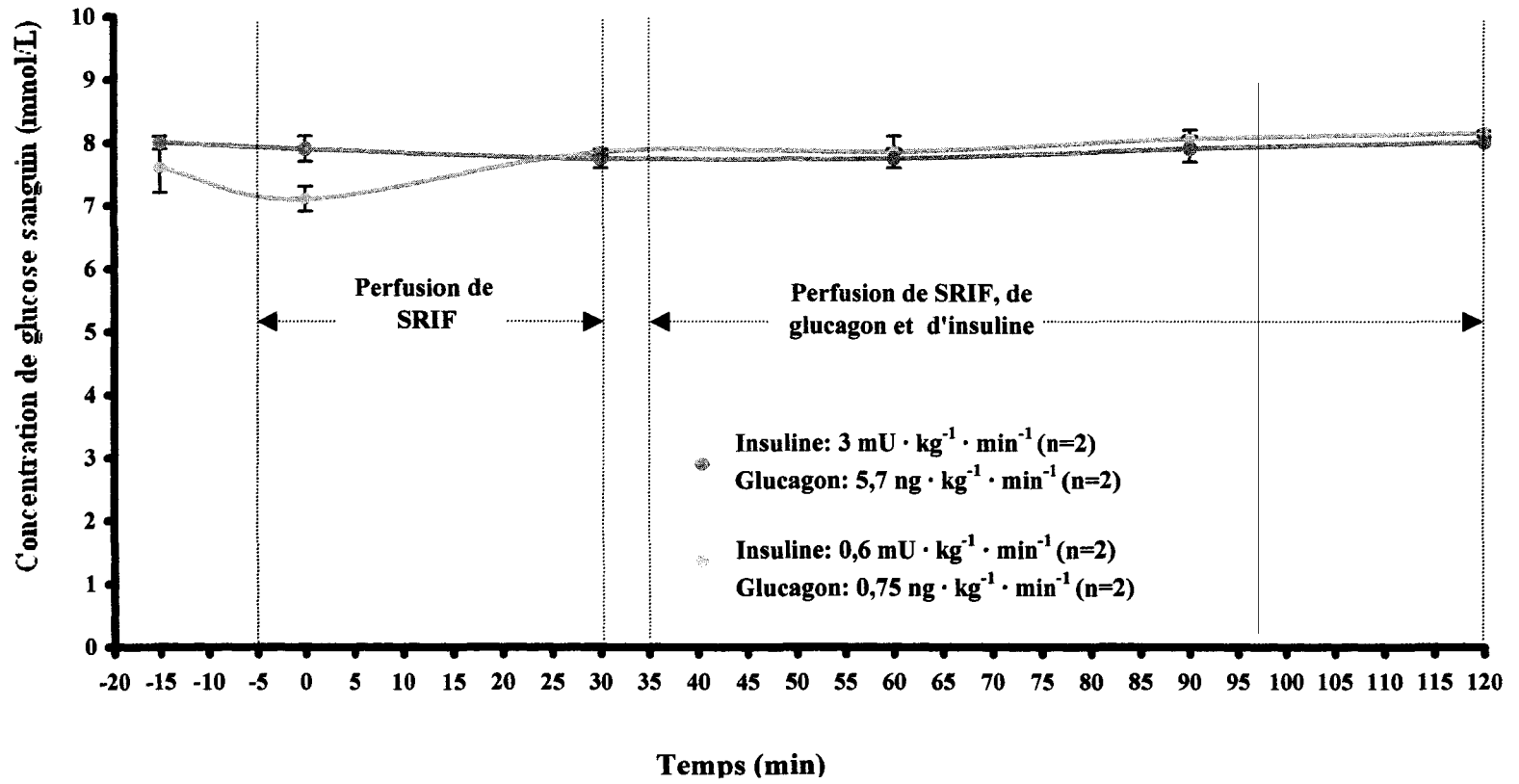
c $P < 0,001$ en comparant les données de ces temps expérimentaux avec les temps expérimentaux 0 et 30 min. de ce même groupe d'animaux

d $P < 0,001$ en comparant ces données avec les données de ces mêmes temps expérimentaux du groupe d'animaux où le taux de perfusion de glucagon est de $0,75 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

moyennes de glucagon de 45 pmol/L et de 360 pmol/L respectivement, tel qu'observé aux temps expérimentaux 60, 90 et 120 minutes. Donc, contrairement aux résultats obtenus avec le glucagon de souche porcine (figure 4.6), la perfusion de glucagon provenant de l'ADN complémentaire de l'humain à un taux de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ augmente la concentration plasmatique du glucagon. En somme, les résultats des figures 4.7 et 4.8 montrent que les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline augmentent avec le taux de perfusion de ces hormones.

La figure 4.9 représente les concentrations de glucose durant les essais de la technique de verrouillage pancréatique. Ainsi, pour tous les prélèvements sanguins, la glycémie a été mesurée pour déterminer si la concentration du glucose sanguin varie. Les résultats des différentes glycémies obtenus avec le glucomètre indiquent que la concentration du glucose sanguin demeure à une concentration normoglycémique, soit en moyenne à $7,8 \pm 0,16 \text{ mmol/L}$.

FIGURE 4.9 : Concentrations plasmatiques du glucose sous verrouillage pancréatique



CHAPITRE 5

DISCUSSION

L'objectif de ce présent projet de maîtrise consistait à mettre sur pied une technique de verrouillage pancréatique et d'en déterminer l'efficacité afin d'étudier ultérieurement l'effet du ratio glucagon/insuline sur la modulation des RHG. Pour élaborer et évaluer cette technique, ce projet de maîtrise a été divisé en trois grandes parties. Premièrement, nous avons déterminé à quoi correspond une hyperglucagonémie ainsi qu'une normo- et une hypo-insulinémie au niveau portal chez le rat. Deuxièmement, nous avons évalué l'efficacité du SRIF et du Sandostatine à inhiber les sécrétions pancréatiques de l'insuline et du glucagon. Troisièmement, nous avons utilisé la technique de verrouillage pancréatique pour évaluer, dans un premier temps, l'efficacité des marques commerciales de glucagon disponibles comme source hormonale exogène. Dans un deuxième temps, lors de la perfusion du glucagon et de l'insuline, nous avons mesuré la distribution de ces hormones dans la circulation sanguine, soit au niveau post- et pré- hépatique. Finalement, nous avons déterminé si les concentrations de glucagon et d'insuline sous verrouillage pancréatique varient en fonction de leurs taux de perfusion.

5.1 Concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique

La première étape de ce projet a consisté à déterminer les concentrations de glucagon et d'insuline endogène au niveau post- et pré-hépatique chez des rats Sprague-Dawley nourris ou ayant jeûné durant 24 heures. Cette étape était indispensable puisqu'il existe très peu d'informations dans la littérature concernant les valeurs d'une hyperglucagonémie, d'une hypoinsulinémie et d'une normoinsulinémie au niveau portal et ce, pour toutes espèces confondues. Donc, les dosages de glucagon et d'insuline

endogènes ont été fait au niveau portal, mais aussi au niveau post-hépatique dans le but de comparer nos résultats à ceux de Melançon *et al.* (2003).

Nos résultats de dosage suite aux prélèvements sanguins au niveau post-hépatique sont en accord avec les résultats de Melançon *et al.* (2003) (tableau 5.1). En effet, nos résultats et les leurs montrent une augmentation du ratio glucagon/insuline suite à une période de 24 heures de jeûne de 115 % et de 91 % respectivement par rapport à celui des rats nourris. De plus, nos résultats, tout comme ceux de Melançon *et al.* (2003), montrent qu'une période de jeûne de 24 heures n'induit pas de hausse significative de la concentration endogène du glucagon, mais engendre une baisse de 50 % et de 45 % respectivement de la concentration endogène de l'insuline (tableau 5.1).

TABLEAU 5.1
Concentrations endogènes du glucagon et de l'insuline au niveau post-hépatique chez des animaux nourris et à jeun

Auteurs	Conditions physiologiques	Concentration du glucagon endogène (pmol/L)	Concentration de l'insuline endogène (pmol/L)	Ratio glucagon/insuline des rats à jeun versus des rats nourris
Melançon <i>et al.</i> (2003)	Rats nourris	34 ± 3	327 ± 13	↑ de 91 %
	Rats à jeun	35 ± 12	179 ± 35	
Nos résultats	Rats nourris	16 ± 3	613 ± 226	↑ de 115 %
	Rats à jeun	17 ± 3	305 ± 142	

Néanmoins, bien que nos résultats suivent la même tendance que ceux de Melançon *et al.* (2003), nos valeurs absolues des concentrations de glucagon et d'insuline endogènes sont différentes d'eux. Plus précisément, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les concentrations endogènes de glucagon des animaux à jeun et des animaux nourris de Melançon *et al.* (2003), leurs résultats montrent une glucagonémie deux fois plus grande que celle que nous avons obtenue (tableau 5.1). Parallèlement, même si Melançon *et al.* (2003) ont observé une baisse de l'insulinémie

comparable à la nôtre chez leurs animaux à jeun, il n'en demeure pas moins que leurs concentrations endogènes d'insuline, autant chez les animaux à jeun que nourris, sont deux fois moins élevées que les insulinémies que nous avons obtenues (tableau 5.1). Ceci pourrait s'expliquer par des différences dans l'ordre chronologique des étapes chirurgicales. En effet, avant d'effectuer les ponctions sanguines, Melançon *et al.* (2003) ont procédé, autant chez leurs animaux nourris qu'à jeun, à l'ablation du *rectus femoris* et du gastrocnémien, deux muscles retrouvés au niveau des membres inférieurs. Par conséquence, nous suspectons que le stress, provenant de l'ablation des muscles, aurait provoqué une libération de catécholamines, d'adrénaline et de noradrénaline suffisamment importante pour bouleverser la production et la sécrétion des hormones pancréatiques. D'ailleurs, divers travaux ont montré que la libération des catécholamines endogènes est l'une des conséquences primitives et essentielles de la réaction à la chirurgie. Au niveau pancréatique, cette libération de catécholamines provoque de manière presque instantanée la libération du glucagon, mais aussi une diminution de la sécrétion de l'insuline (Doyle et Egan (2003) ; Russell *et al.* (1975)). Donc, suite aux différences observées entre nos concentrations absolues du glucagon et de l'insuline et celles de Melançon (2003) chez des rats nourris et à jeun, nous n'avons pas employé les données de Melançon (2003) comme référence pour valider nos valeurs absolues de concentrations de glucagon et d'insuline au niveau post-hépatique.

Malgré ce fait, les analyses plasmatiques de l'insuline et du glucagon chez les animaux nourris et à jeun au niveau portal nous indiquent qu'une hypoinsulinémie ainsi qu'une normoinsulinémie correspondraient respectivement à environ 450 et 2 235 pmol/L. Toutefois, la valeur d'une hyperglucagonémie demeure à être investiguée car, suite au dosage de cette hormone, aucune différence significative n'a été remarquée entre les résultats des animaux nourris (19 pmol/L) et à jeun (18 pmol/L). Autrement dit, l'hyperglucagonémie que nous croyions obtenir s'avère davantage une normogluconémie. Des études supplémentaires devraient être menées afin de déterminer la valeur d'une hyperglucagonémie au niveau portal puisque la concentration de glucagon demeure dans les normales suite à un jeûne de 24 heures.

5.2 Effet inhibiteur de la SRIF et du Sandostatin sur les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline

Nos résultats, tout comme ceux d'Emmanouel *et al.* (1978), Brown *et al.* (1976) ainsi que Johnson *et al.* (1975), montrent que la SRIF, chez le rat, n'inhibe que partiellement la sécrétion pancréatique de l'insuline. Cependant, bien que ces auteurs aient obtenu une inhibition partielle de la sécrétion pancréatique du glucagon, nos résultats indiquent plutôt que la SRIF n'affecte pas la sécrétion du glucagon. Parallèlement, bien que Ezzat *et al.* (1992) ont montré que le Sandostatin inhibe 11 fois plus la sécrétion pancréatique du glucagon et 1,3 fois plus celle de l'insuline que ne le fait la SRIF, nos résultats indiquent, au contraire, que le Sandostatin inhibe encore moins efficacement, chez le rat, la sécrétion pancréatique de l'insuline que la SRIF, et que le Sandostatin, tout comme la SRIF, n'ont pas d'effet sur l'inhibition de la sécrétion pancréatique du glucagon. Pourtant, la SRIF et le Sandostatin ont été administrés à des taux de perfusion identiques. Toutefois, en comparant les résultats de l'effet inhibiteur du Sandostatin et de la SRIF sur la sécrétion pancréatique de l'insuline, on pourrait émettre l'hypothèse que le Sandostatin se lie aux récepteurs à la SRIF (SSTR) avec une moins grande affinité. Cette hypothèse a été infirmée par les résultats de l'étude de Bruns *et al.* (1996). Dans cette étude, Bruns *et al.* (1996) ont utilisé la technique de radiolisation pour déterminer l'affinité de la SRIF et du Sandostatin pour les SSTRs. Leurs résultats montrent que le Sandostatin ainsi que la SRIF ont une très haute affinité pour les SSTR 2 et 5, soit les SSTRs qui se retrouvent respectivement à la surface membranaire des cellules pancréatiques responsables de la production et de la sécrétion du glucagon et de l'insuline. Bref, bien que la SRIF inhibe que partiellement la sécrétion pancréatique de l'insuline et aucunement celle du glucagon, l'utilisation du Sandostatin pour inhiber les sécrétions hormonales pancréatiques chez le rat est encore moins efficace. Dans les tests subséquents, nous avons donc poursuivi l'évaluation du verrouillage pancréatique en utilisant la SRIF et non le Sandostatin.

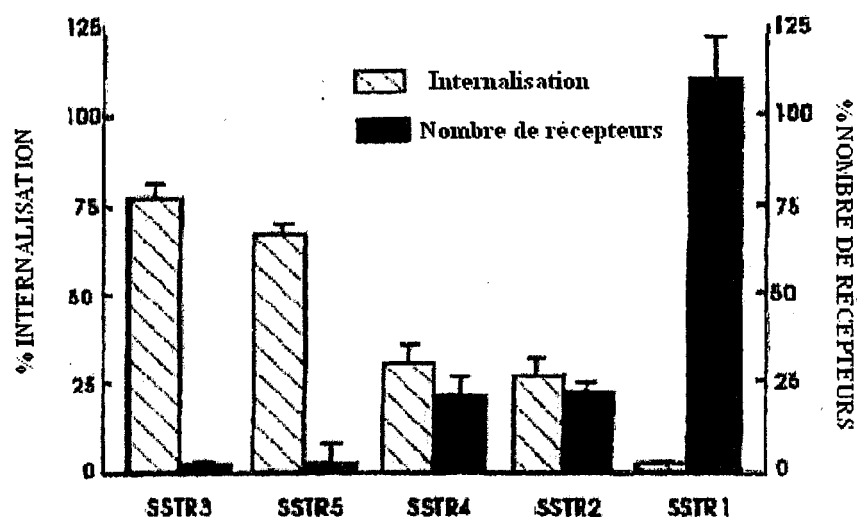
Comme présenté précédemment, la SRIF n'inhibe pas complètement les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline chez le rat. Pourtant, Lavoie *et al.* (1997),

Mortimer *et al.* (1974), Chideckel *et al.* (1975) ainsi que Koerker *et al.* (1974) ont montré que, chez l'humain et le babouin, la SRIF inhibe presque complètement la sécrétion pancréatique de l'insuline, soit à 97 % en moyenne, et à 90 % en moyenne celle du glucagon et ce, avec des taux de perfusion de SRIF moins importants que ceux que nous avons utilisés chez le rat. Par exemple, si Lavoie *et al.* (1997) avaient utilisé chez l'humain un taux de perfusion de $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, taux que nous avons utilisé chez le rat, les sujets de leur étude auraient reçu une quantité de SRIF 20 fois plus grande. Donc, la SRIF inhibe presque complètement la sécrétion pancréatique de l'insuline et du glucagon chez le babouin et l'humain mais non chez le rat.

La source du problème ne semble pas provenir d'une différence dans la structure primaire des SSTR 2 et 5 chez ces espèces. En comparant la séquence d'acides aminés du SSTR2 de l'humain (Brunicardi *et al.* (2003)) avec celle du SSTR 2 du rat (Cejvan *et al.* (2003)), un taux d'homologie de 94 % est remarqué. Pareillement, en comparant la structure primaire du SSTR5 de l'humain (Filopanti *et al.* (2005)) avec celle du rat (Kluxen *et al.* (1992)), un taux d'homologie de 88 % a été obtenu. En somme, l'inefficacité de la SRIF à inhiber les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline chez le rat ne semble pas dépendre des propriétés de liaison des SSTR 2 et 5. Néanmoins, il existe peut-être une différence dans les sous-types de SSTR retrouvés au niveau des cellules α et β des îlots de Langerhans.

Chez le rat, seul le SSTR2 est présent à la surface des membranes plasmiques des cellules α des îlots de Langerhans et seul le SSTR5 est présent à la surface des cellules β de ces îlots. Chez l'homme, ces sous-types de récepteurs sont aussi retrouvés à la surface membranaire des cellules α et β , mais en plus, ces cellules possèdent le SSTR1 (Hukovic *et al.* (1996)). Les résultats de l'étude de Hukovic *et al.* (1996) montrent que le SSTR1 est le sous-type de récepteur qui prédomine à la surface des cellules β chez l'humain, puisqu'il est présent au niveau de la membrane plasmique de toutes les cellules β , comparativement au SSTR5 qui est présent sur 87 % de ces cellules. Aussi, seulement 25 % des cellules α possèdent le SSTR1 à leur surface membranaire : tout comme chez le rat, c'est davantage le SSTR2 qui prédomine puisqu'il est présent sur 89 % de ces

cellules. Selon Hukovic *et al.* (1996), le SSTR1 se différencie des autres SSTRs car, premièrement, il ne subit pas d'internalisation lorsqu'il est en présence d'une quantité sursaturante de son ligand (figure 5.1) et, deuxièmement, parce que la densité de ces récepteurs augmente de 110 % lors d'une exposition prolongée avec son ligand. Ces deux caractéristiques du SSTR1 auraient pour conséquence d'augmenter la sensibilité des cellules α et β à l'action de la SRIF (figure 5.1).



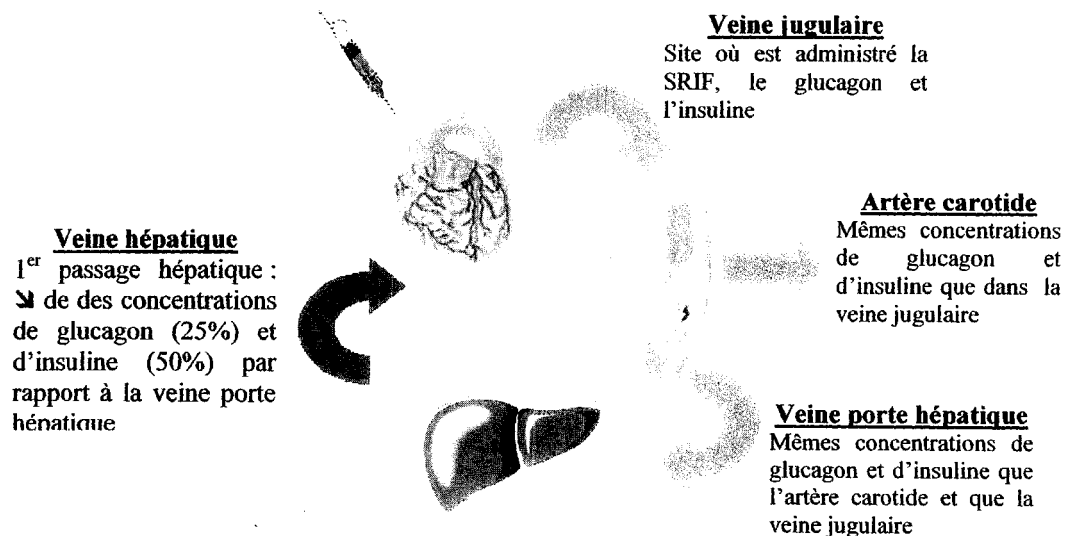
Adaptée de Hukovic *et al.* (1996)

FIGURE 5.1 : Caractéristiques des cinq sous-types de SSTRs chez l'humain.

L'étude des sous-types de SSTR chez l'humain élaborée par Hukovic *et al.* (1996) pourrait être un élément pour expliquer l'inefficacité de la SRIF dans l'inhibition des sécrétions pancréatiques de l'insuline et du glucagon chez le rat. Plus précisément, cette inefficacité de la SRIF observée chez le rat pourrait provenir de l'absence du sous-type SSTR1 dans les cellules pancréatiques de cette espèce.

5.3 Évaluation du verrouillage pancréatique chez le rat

Normalement, lors d'un verrouillage pancréatique, les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline deviennent uniformes presque à tous les niveaux de la circulation sanguine. Plus précisément, la perfusion de la SRIF inhibe les sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline endogènes : quant à elles, les perfusions de glucagon et d'insuline exogènes font en sorte qu'il y a remplacement des concentrations sanguines des hormones endogènes inhibées. La figure 5.2 illustre l'ordre des différents sites de la circulation sanguine que franchissent les hormones suite à la perfusion au niveau de la veine jugulaire. Suite à l'administration des hormones dans la veine jugulaire, les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline devraient être les mêmes au niveau de l'artère carotide et de la veine porte hépatique. Cependant, suite au premier passage hépatique, les concentrations de glucagon et de l'insuline devraient être plus faibles au niveau de la veine hépatique puisque ces hormones sont en majeure partie métabolisées par le foie.



Adapté de Engelking *et al.* (1997)

FIGURE 5.2 : Distribution du glucagon et de l'insuline exogènes dans la circulation sanguine sous verrouillage pancréatique.

Pour notre part, au point 4.4 de la section résultats de ce mémoire, nous avons évalué, sous verrouillage pancréatique, la distribution du glucagon et de l'insuline de source exogène à différents sites de la circulation sanguine. Les résultats que nous avons obtenus sont suggestifs de par le faible échantillonnage ($n=3$). Néanmoins, suite au dosage de l'insuline, les résultats montrent une concentration d'insuline significativement plus élevée au niveau de la veine porte hépatique qu'au niveau de l'artère carotide. Ces résultats pourraient donc être une preuve supplémentaire pour appuyer nos affirmations concernant l'inefficacité de la SRIF chez le rat à inhiber la sécrétion pancréatique de l'insuline. Ce fait pourrait aussi s'appliquer pour les résultats des dosages du glucagon car, bien qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les concentrations plasmatiques du glucagon aux trois sites de prélèvements sanguins, la concentration du glucagon tend à augmenter au niveau de la veine porte hépatique.

En plus de vérifier la distribution du glucagon et de l'insuline exogènes dans la circulation sanguine sous verrouillage pancréatique, cette expérience nous a aussi servi à déterminer si le glucagon synthétique de la compagnie Bachem pouvait substituer le glucagon discontinué de la compagnie Eli Lilly, produit commercial généralement utilisé dans les verrouillages pancréatiques (Cardin *et al.* (1999) ; Lavoie *et al.* (1997)). Pour ce faire, nous avons perfusé le glucagon de la compagnie Bachem à un taux fort élevé, soit de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et, suite au dosage du glucagon, les concentrations de glucagon aux différents sites de prélèvements sanguins sous verrouillage pancréatique furent les mêmes que les concentrations obtenues aux différents sites de prélèvements sanguins sans l'apport de glucagon exogène, résultats présentés au point 4.4 de la section résultat de ce mémoire. Ces résultats nous indiquent donc que le glucagon de Bachem ne pouvait pas remplacer le glucagon de la compagnie Eli Lilly : la dissolution de ce produit dans la solution physiologique utilisée pour administrer les hormones entraînerait peut-être la dégradation de ce glucagon synthétique. Nous ne pouvons pas remettre en doute la molécule du glucagon synthétique de la compagnie Bachem puisque la structure primaire et le poids moléculaire de ce glucagon sont les mêmes que le glucagon

endogène de l'humain et du rat (Handal *et al.* (1980)). De par cette similarité, le choix de la trousse de RIA, ne pouvait être remis en question.

Après avoir constaté que le glucagon de la compagnie Bachem ne pouvait pas être utilisé à des fins d'études *in vivo*, le glucagon provenant de l'ADN complément d'humain de la compagnie Eli Lilly a été de nouveau disponible. C'est alors que nous avons procédé à des essais de verrouillages pancréatiques complets, malgré le fait que la SRIF inhibe que partiellement la sécrétion de l'insuline endogène et nullement celle du glucagon. Le but de ces essais consistait à déterminer si les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline variaient de manière proportionnelle aux taux de perfusion de ces hormones. Donc, deux verrouillages pancréatiques ont été effectués : dans l'un des verrouillages, les taux de perfusion de l'insuline et du glucagon étaient respectivement de $0,6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $0,75 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et dans l'autre verrouillage, les taux de perfusion de l'insuline et du glucagon étaient respectivement de $3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Suite aux dosages des concentrations plasmatiques de l'insuline et du glucagon, les résultats ont montré que les concentrations plasmatiques de ces hormones variaient de manière proportionnelle au taux de perfusion : des taux de perfusion d'insuline de $0,6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $3 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ produisent en moyenne des concentrations plasmatiques d'insuline de 650 et 3300 pmol/L respectivement. Parallèlement, des taux de perfusion de glucagon de $0,75 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et de $5,7 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ produisent en moyenne des concentrations plasmatiques de glucagon de 45 et 360 pmol/L.

Les objectifs de la mise au point de la technique de verrouillage pancréatique consistait à déterminer les valeurs d'une hyperglucagonémie, d'une normo- et d'une hypoinsulinémie au niveau portal chez le rat. Tel que mentionné au point 4.2 de la section résultats de ce mémoire, une normoinsulinémie correspondrait à environ 2 234 pmol/L et une hypoinsulinémie à environ 450 pmol/L, mais la valeur d'une hyperglucagonémie demeure à être investiguée car c'est plutôt une normoglucagonémie qui a été observée. En somme, sachant que les concentrations plasmatiques de l'insuline et du glucagon varient en fonction des taux de perfusion de ces hormones,

l'administration d'insuline au niveau de la veine jugulaire à des taux de perfusion de 2 et 0,4 mU • kg⁻¹ • min⁻¹ pourraient reproduire, dans l'ordre, une normoinsulinémie et une hypoinsulinémie au niveau portal.

5.4 Conclusion et perspective d'avenir

La réussite d'un verrouillage pancréatique passe d'abord par l'efficacité de la SRIF à inhiber les sécrétions pancréatiques de l'insuline et du glucagon. Lors de l'évaluation de cette technique, nous avons constaté que la SRIF inhibe que partiellement les sécrétions pancréatiques de l'insuline et aucunement celle du glucagon. Ainsi, bien que le verrouillage pancréatique soit une technique de choix pour travailler en condition *in vivo*, il reste qu'elle ne nous permettra pas d'étudier l'effet de la variation des concentrations de glucagon et de l'insuline sur la modulation des RHG. En effet, pour étudier ce facteur de source extra-hépatocytaire que nous croyons impliqué dans la modulation des RHG, nous devons contrôler les concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau de la veine porte hépatique, et ce contrôle s'effectue via la perfusion de ces hormones par la veine jugulaire. Toutefois, suite à l'administration de la SRIF, il demeure dans la circulation sanguine des concentrations résiduelles de glucagon et d'insuline endogènes, dû à l'inefficacité de la SRIF à inhiber complètement les sécrétions pancréatiques de ces hormones. Par le fait même, un contrôle aussi rigoureux des concentrations plasmatiques du glucagon et de l'insuline au niveau portal ne peut être exercé.

Par le biais de la mise sur pied et l'évaluation de la technique de verrouillage pancréatique, nous avons obtenu les valeurs d'une hypo- et d'une normoinsulinémie au niveau de la veine porte hépatique chez le rat. La valeur d'une hyperglucagonémie demeure à être investiguée puisque, contrairement à nos attentes, un jeûne de 24 heures n'a pas induit d'hyperglucagonémie, mais plutôt une normogluconémie. Pour obtenir une valeur hyperglucagonémique, il suffirait de doser la concentration plasmatique du glucagon au niveau portal chez des rats ayant subi une période d'exercice de 180 minutes : les résultats de Melançon *et al.* (2003) ont indiqué une augmentation significative de la concentration du glucagon au niveau post-hépatique chez leurs

animaux à l'exercice (60 ± 12 pmol/L) comparativement à celle de leurs animaux sédentaires (34 ± 3 pmol/L).

Un verrouillage pancréatique fonctionnel aurait permis d'établir l'effet de la charge glucidique et des concentrations de glucagon et d'insuline sur la modulation des RHG. Par le fait même, évaluer si un effet synergique et/ou additif entre ces deux facteurs existent. À moyen terme, ce verrouillage aurait aussi permis de documenter des situations physiologiques où il y a absence de modulation des RHG, comme dans le cas du diabète de type 1. À long terme, une fois les facteurs bien identifiés, les mécanismes d'action de ces facteurs auraient pu être caractérisés.

En conclusion, l'étude du facteur extra-hépatocytaire, c'est-à-dire hormonal, sur la modulation des RHG ne s'effectuera pas sous verrouillage pancréatique. Nous devons donc envisager l'essai d'autres techniques. D'ailleurs, deux autres techniques ont suscité notre intérêt, soient la pancréatectomie totale jumelée à la perfusion de glucagon et d'insuline par la veine jugulaire et la perfusion de foie *in situ* avec du glucagon et de l'insuline. Cependant, l'utilisation de ces techniques comporte certains inconvénients. Dans la technique de perfusion de foie *in situ*, la circulation sanguine est court-circuitée : le sang provenant de la veine hépatique passe ensuite dans un appareil de perfusion pour ensuite être réintroduit au niveau de la veine porte hépatique. Donc, bien qu'elle permet de ne plus tenir compte des sécrétions pancréatiques du glucagon et de l'insuline, l'utilisation de cette technique modifie la circulation sanguine et rend cette dernière moins compatible avec des conditions *in vivo*. Quant à elle, la pancréatectomie totale chez le rat demeure une technique très laborieuse car le pancréas du rat est un organe difficilement différentiable du tissu adipeux.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamsen, N., Lundgren, K., Nishimura, E. (1995) "Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP", *J. Biol. Chem.* 270: 15853-15857.

Ahlborg, G., Felig, P. (1982) "Lactate and glucose exchange across the forearm, legs, and splanchnic bed during and after prolonged leg exercise", *J. Clin. Invest.* 69: 45-54.

Alford, F.P., Bloom, S.R., Nabarro, J.D., Hall, R., Besser, G.M., Coy, D.H., Kastin, A.J., Schally, A.J. (1974) "Glucagon control of fasting glucose in man", *Lancet* 26: 974-977.

Aranda, A., Herrera, E. (1974) "The effect of food deprivation on *in vivo* gluconeogenesis in the suckling rat", *Horm. Metab. Res.* 6: 381-385.

Ayala, J.E., Bracy, D.P., McGuinness, O.P., Wasserman, D.H. (2006) "Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse", *Diabetes* 55: 390-397.

Baron, A.D., Schaeffer, L., Shragg, P., Kolterman, O.G. (1987) "Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics", *Diabetes* 36: 274-283.

Bhathena, S.J., Voyles, N.R., Smith, S., Recant, L. (1978) "Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia", *J. Clin. Invest.* 61: 1488-1497.

Bonen, A., Clune, P.A., Tan, M.H. (1986) "Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver", *Am. J. Physiol.* 251: E196-E203.

Bonjorn, V.M., Latour, M.G., Bélanger, P., Lavoie, J.M. (2002) "Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon", *J. Appl. Physiol.* 92: 188-194.

Brand, C.L., Jorgensen, P.N., Knigge, U., Warberg, J., Svendsen, I., Kristensen, J.S., Holst, J.J. (1995) "Role of glucagon in maintenance of euglycemia in fed and fasted rats", *Am. J. Physiol.* 269: E469-E477.

Brown, M., Rivier, J., Vale, W. (1976) "Biological activity of somatostatin and somatostatin analogs on inhibition of arginine-induced insulin and glucagon release in the rat", *Endocrinology* 98: 336-343.

- Brunnicardi, F.C., Atiya, A., Moldovan, S., Lee, T.C., Fagan, S.P., Kleinman, R.M., Adrian, T.E., Coy, D.H., Walsh, J.H., Fisher, W.E. (2003) "Activation of somatostatin receptor subtype 2 inhibits insulin secretion in the isolated perfused human pancreas" *Pancreas* 27: 84-89.
- Bruns, C., Raulf, F., Hoyer, D., Schloos, J., Lübbert, H., Weckbecker, G. (1996) "Binding properties of Somatostatin receptor subtypes", *Metabolism* 45: 17-20.
- Burcelin, R., Mrejen, C., Decaux, J.F., De Mouzon, S.H., Girard, J., Charron, M.J. (1998) "*In vivo* and *in vitro* regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism", *J. Biol. Chem.* 273: 8088-8093.
- Cardin, S., Emshwiller, M., Jackson, P.A., Snead, W.L., Hastings, J., Edgerton, D.S., Cherrington, A.D. (1999) "Portal glucose infusion increases hepatic glycogen deposition in conscious unrestrained rats", *J. Appl. Physiol.* 87: 1470-1475.
- Carmen, G.Y., Victor S.M. (2006) "Signalling mechanisms regulating lipolysis", *Cell. Signal.* 18: 401-408.
- Cejvan, K., Coy, D.H., Efendie, S. (2003) "Intra-islet somatostatin regulates glucagon release via type 2 somatostatin receptors in rats", *Diabetes* 52: 1176-1181.
- Chang, L., Chiang, S.H., Saltiel, A.R. (2004) "Insulin signalling and the regulation of glucose transport", *Mol. Med.* 10: 65-71.
- Cherrington, A.D., Chiasson, J.L., Liljenquist, J.E., Jennings, A.S., Keller, U., Lacy, W.W. (1976) "The role of insulin and glucagon in the regulation of basal glucose production in the postabsorptive dog", *J. Clin. Invest.* 58: 1407-1418.
- Chideckel, E.W., Palmer, J., Koerker, D.J., Ensinnck, J., Davidson, M.B., Goodner, C.J. (1975) "Somatostatin blockade of acute and chronic stimuli of the endocrine pancreas and the consequences of this blockade on glucose homeostasis", *J. Clin. Invest.* 55: 754-762.
- Christophe, J. (1995) "Glucagon receptors : from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses", *Biochem. Biophys. Acta.* 1241: 45-57.
- Del Corral, P., Howley, E.T., Hartsell, M., Ashraf, M., Younger, M.S. (1998) "Metabolic effects of low cortisol during exercise in humans", *J. Appl. Physiol.* 84: 939-947.
- Dighe, R.R., Rojas, F.J., Birnbaumer, L. Garber, A.J. (1984) "Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver: The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus", *J. Clin. Invest.* 73: 1013-1023.
- Doyle, M.E., Egan, J.M. (2003) "Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion", *Pharmacol. Rev.* 55: 105-131.

Drouin, R. (1997) "Augmentation de la sensibilité du foie au glucagon chez des sujets entraînés en endurance", Mémoire de maîtrise en biophysique et biologie cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières.

Duckworth, W.C. (1988) "Insulin degradation: mechanisms, products, and significance", *Endocr. Rev.* 9: 319-345.

Duckworth, W.C., Kitabchi, A.E. (1981) "Insulin metabolism and degradation", *Endocr. Rev.* 2: 210-233.

Emmanouel, D.S., Jaspan, J.B., Rubenstein, A.H., Huen, A.H., Fink, E., Katz, A.I. (1978) "Glucagon metabolism in the rat", *J. Clin. Invest.* 62: 6-13.

Engelking, L.R. (1997) "Physiology of the endocrine pancreas", *Semin. Vet. Med. Surg.* 12: 224-229.

Ezzat, S., Melmed, S., (1992) "Endocrine applications of the somatostatin analogue octreotide (Sandostatin)", *Metabolism* 41: 34-38.

Felig, P., Gusberg, R., Hendler, R., Gump, F.E., Kinney, J.M., Mulrow, P.J. (1974) "Concentrations of glucagon and the insulin:glucagon ratio in the portal and peripheral circulation", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147: 88-90.

Filopanti, M., Ronchi, C., Ballare, E., Bondioni, S., Lania, A.G., Losa, M., Gelmini, S., Peri, A., Orlando, C., Beck-Peccoz, P., Spada, A. (2005) "Analysis of somatostatin receptors 2 and 5 polymorphisms in patients with acromegaly", *J. Clin. Metab.* 90: 4824-4828.

Gerich, J.E. (1981) "Physiology of glucagon", *Int. Rev. Physiol.* 24: 243-275.

Gyltelberg, F., Rennie, M.J., Hickson, R.C., Holloszy, J.O. (1977) "Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise", *J. Appl. Physiol.* 43: 302-305.

Handal, K.A. (1980) "The lower oesophagus and glucagon", *Ann. Emerg. Med.* 9: 577-579.

Hendrick, G.K., Wasserman, D.H., Frizzell, R.T., Williams, P.E., Lacy, D.B., Jaspan, J.B., Cherrington A.D. (1992) "Importance of basal glucagon in maintaining hepatic glucose production during a prolonged fast in conscious dogs", *Am. J. Physiol.* 263: E541-E549.

Hirsch, I.R., Marker, J.C., Smith, L.J., Spina, R.J., Parvin, C.A., Hollosky, J.O., Cryer, P.E. (1991) "Insulin and glucagon in prevention of hypoglycemia during exercise in humans", *Am. J. Physiol.* 260: E695-E704.

Hukovic, N., Panetta, R., Kumar, U., Patel, Y.C. (1996) "Agonist-dependent regulation of cloned human somatostatin receptor types 1-5 (hSSTR1-5): subtype selective internalization or upregulation", *Endocrinology* 137: 4046-4049.

Hunyady, B., Hipkin, R.W., Schonbrunn, A., Mezey, E. (1997) "Immunohistochemical localization of somatostatin receptor SST2 in the rat pancreas", *Endocrinology* 138: 2632-2635.

Hsu, W.H., Xiang, H.D., Rajan, A.S., Kunze, D.L., Boyd, A.E. (1991) "Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in Ca²⁺ entry through voltage-dependent Ca²⁺ channels in the beta cell", *J. Biol. Chem.* 266: 837-843.

Jelinek, L.J., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijper, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, C.A. (1993) "Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor", *Science* 259: 1614-1616.

Jiang, G., Zhang, B.B., "Glucagon and regulation of glucose metabolism", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E671-E678.

Johnson, D.G., Ensinnck, J.W., Koerker, D., Palmer, J., Goodner, C.J. (1975) "Inhibition of glucagon and insulin secretion by somatostatin in the rat pancreas perfused in situ", *Endocrinology* 96: 370-374.

Kanzaki, M. (2006) "Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics", *Endocr. J.* 53: 267-293.

Katz, J., Tayek, J.A. (1998) "Gluconeogenesis and the cori cycle in 12-, 20- and 40-h-fasted humans", *Am. J. Physiol.* 275: E537-E542.

Katz, M.D., Erstad, B.L. (1989) "Octreotide, a new somatostatin analogue", *Clin. Phar.* 8: 255-73.

Kluxen, F.W., Bruns, C., Lubbert, H. (1992) "Expression cloning of a rat brain somatostatin receptor cDNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4618-4622.

Koerker, D.J., Ruch, W., Chideckel, E., Palmer, J., Goodner, C.J., Ensinnck, J., Gale, C.C. (1974) "Somatostatin: hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas", *Science* 184: 482-484.

Krishna, M.G., Coker, R.H., Lacy, D.B., Zinker, B.A., Halseth, A.E., Wasserman, D.H. (2000) "Glucagon response to exercise is critical for accelerated hepatic glutamine metabolism and nitrogen disposal", *Am. J. Physiol.* 297: E638-E645.

Krones, A., Kietzmann, T., Jungermann, K. (1998) "Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures", *FEBS Lett.* 421: 136-140.

Lavoie, C., Ducros, F., Bourque, J., Langelier, H., Chiasson, J.L. (1997) "Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis", *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 26-35.

Légaré, A., Drouin, R., Milot, R., Massicotte, D., Péronnet, F., Massicotte, G., Lavoie, C. (2001) "Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats", *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: E193-E196.

Légaré, A. (2001) "Changement des propriétés des récepteurs hépatiques du glucagon induit par l'entraînement en endurance", Mémoire de maîtrise de biophysique et biologie cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières.

Lins, P., Wajngot, A., Adamson, U., Vranic, M., Ependic, S. (1983) "Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia", *Diabetes* 32: 633-636.

Matsuda, M., DeFronzo, R.A., Glass, L., Consoli, A., Giordano, M., Bressier, P., Delprato, S. (2002) "Glucagon dose-response curve for hepatic glucose production and glucose disposal in type 2 diabetic patients and normal individuals", *Metabolism* 51: 1111-1119.

Melançon, A. (2005) "Augmentation de la densité des récepteurs hépatiques au glucagon induite par une période de jeûne et d'exercice", Mémoire de maîtrise de biophysique et biologie cellulaire, Université du Québec à Trois-Rivières.

Mitra, S.W., Mezey, E., Hunyady, B., Chamberlain, L., Hayes, E., Foor, F., Wang, Y., Schonbrunn, A., Schaeffer, J.M. (1999) "Colocalization of somatostatin receptor *sst5* and insulin in rat pancreatic beta-cells", *Endocrinology* 140: 3790-3796.

Moller, L.N., Stidsen, C.E., Hartmann, B., Holst, J.J. (2003) "Somatostatin receptors", *Biochem. Biophys. Acta.* 1616: 1-84.

Monzillo, L.U., Hamdy, O. (2003) "Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings", *Nutr. Rev.* 61: 397-412.

Mortimer, C.H., Tunbridge, W.M., Carr, D., Yeomans, L., Lind, T., Coy, D.H., Bloom, S.R., Kastin, A., Mallinson, C.N., Besser, G.M., Schally, A.V., Hall, R. (1974) "Effects of growth-hormone release-inhibiting hormone on circulating glucagon, insulin, and growth hormone in normal, diabetic, acromegalic, and hypopituitary patients", *Lancet* 1: 697-701.

Pless, J. (1992) "From somatostatin to Sandostatin: history and chemistry", *Metabolism* 41: 5-6.

- Plum, L., Belgardt, B.F., Bruning, J.C. (2006) "Central insulin action in energy and glucose homeostasis", *J. Clin. Invest.* 116: 1761-1766.
- Portois, L., Maget, B., Tastenoy, M., Perret, J., Svoboda, M. (1999) "Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene", *J. Biol. Chem.* 274: 8181-8190.
- Roelfsema, F., Biermasz, N.R., Romijn, J.A., Pereira, A.M. (2005) "Treatment strategies for acromegaly", *Expert. Opin. Emerg. Drugs.* 10: 875-890.
- Rothman, D.L., Magnusson, I., Katz, L.D., Schulman, R.G., Schulman, G.I. (1991) "Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ^{13}C NMR", *Science* 254: 573-576.
- Russell, R.C., Walker, C.J., Bloom, S.R. (1975) "Hyperglucagonaemia in the surgical patient", *Br. Med. J.* 1: 10-12.
- Sakurai, H., Dobbs, R., Unger, R.H. (1974) "Somatostatin-induced changes in insulin and glucagon secretion in normal and diabetic dogs", *J. Clin. Invest.* 54: 1395-13402.
- Schonbrunn, A., Gu, Y.Z., Dournard, P., Beaudet, A., Tannenbaum, G.S., Brown, P.J. (1996) "Somatostatin receptor subtypes: specific expression and signaling properties", *Metabolism* 45: 8-11.
- Tichomirowa, M.A., Daly, A.F., Beckers, A. (2005) "Treatment of pituitary tumors: somatostatin", *Endocrine.* 28: 93-100.
- Thirone, A.C., Huang, C., Klip, A. (2006) "Tissue-Specific roles of IRS proteins in insulin signalling and glucose transport", *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 72-78.
- Turcotte, L.P., Srivastava, A.K., Chiasson, J.-L. (1997) "Fasting increases plasma membrane fatty acid-binding protein (FAB-Pm) in red skeletal muscle", *Mol. Cell. Biochem.* 166: 153-158.
- Vranic, M., Gauthier, C., Bilinski, D., Wasserman, D.H., El Tayeb, K., Hetenyi, G. Jr., Lickley, H.L. (1984) "Catecholamine responses and their interactions with other glucoregulatory hormones", *Am. J. Physiol.* 247: E145-E156.
- Wasserman, D.H. (1995) "Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state", *Annu. Rev. Physiol.* 57: 191-218.
- Wasserman, D.H., Williams, P.E., Lacy, D.B., Goldstein, R.E., Cherrington, A.D. (1989a) "Exercise-induced fall in insulin and hepatic carbohydrate metabolism during muscular work", *Am. J. Physiol.* 256: E500-E509.

Wasserman D.H., Spalding, J.A., Bracy, D., Lacy, D.B., Cherrington, A.D. (1989b) "Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work", *Diabetes* 38: 799-807.

Waynforth, H.B., Flecknell, P.A. (1992) "Experimental and surgical technique in the rat", 2e éd., Academic Press, Californie, É.-U., pp.215-226.

Yamato, E., Ikegami, H., Takekawa, K., Fujisawa, T., Nakagawa, Y., Hamada, Y., Ueda, H., Ogihara, T. (1997) "Tissue-specific and glucose-dependent expression of receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1 (GLP-1)", *Horm. Metab. Res.* 29: 56-59.