

## CANAUX POTASSIQUES ATP-DÉPENDANTS ET INSULINOSECRETION : ROLE ESSENTIEL MAIS NON SUFFISANT

par

J.C. HENQUIN, M. ANELLO et Y. SATO\*

Les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine synthétisent l'insuline et la sécrètent en quantité et à une vitesse appropriées pour que l'organisme puisse, selon les circonstances, constituer ou utiliser ses réserves énergétiques sans que la glycémie sorte de limites relativement étroites. Toute altération du fonctionnement des cellules  $\beta$  a des répercussions importantes sur l'homéostasie glucidique : une sécrétion d'insuline excessive expose au risque d'hypoglycémie et une sécrétion insuffisante conduit au diabète. La simplicité apparente du rôle de la cellule  $\beta$  contraste avec la complexité étonnante de son fonctionnement. Contrairement à beaucoup de cellules endocrines dont le contrôle est assuré par un petit nombre de messagers extracellulaires, la cellule  $\beta$  est constamment soumise à un flux d'informations de type métabolique (glucose et autres nutriments), neural et hormonal, et éventuellement à l'influence d'agents pharmacologiques [1].

L'étude des mécanismes cellulaires de régulation de la sécrétion d'insuline a véritablement débuté au milieu des années soixante du siècle passé. Trois concepts importants remontent à cette époque. L'idée que le glucose doit être métabolisé par les cellules  $\beta$  pour stimuler la sécrétion d'insuline a été proposée sur la base de deux observations : l'effet insulinosécréteur du glucose est inhibé par divers agents qui interfèrent avec le métabolisme cellulaire et n'est reproduit que par les sucres métabolisables [2, 3]. Le rôle essentiel du  $\text{Ca}^{2+}$  a été établi par la démonstration que le glucose est incapable d'augmenter la sécrétion d'insuline en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire [4, 5]. Enfin, l'enregistrement de potentiels d'action dans les cellules  $\beta$  a établi que ces cellules sont électriquement excitables [6]. Métabolisme du glucose, excitabilité électrique et calcium étaient donc les trois premières pièces maîtresses d'un puzzle qui n'a pas encore été complété 35 ans plus tard !

### PRODUCTION D'UN SIGNAL DECLENCHANT PAR UNE VOIE DEPENDANT DES CANAUX $\text{K}^+$ -ATP

Il ne fait plus de doute qu'une élévation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  ionisé ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) dans le cytoplasme des cellules  $\beta$  constitue le signal déclenchant de la sécrétion d'insuline. Les arguments expérimentaux sur lesquels cette affirmation est fondée sont développés dans d'autres articles de synthèse qui traitent également des mécanismes par lesquels le  $\text{Ca}^{2+}$  stimule l'exocytose des granules d'insuline [7-9]. Même si certaines conditions expérimentales permettent une augmentation de la sécrétion d'insuline in vitro alors que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  des cellules  $\beta$  est basse [10], cette curiosité de laboratoire n'a pas de pertinence physiologique [11]. Aucune circonstance rencontrée in vivo n'augmente la sécrétion d'insuline sans augmenter la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (agents initiateurs ou déclenchants) ou sans que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ait déjà été augmentée par un stimulus primaire comme le glucose (agents potentialisateurs).

Les principaux mécanismes physiologiques par lesquels la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  peut être augmentée sont une mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  à partir des pools intracellulaires et une stimulation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, soit par des canaux voltage-indépendants (contrôlés par des protéines G ou des messagers intracellulaires) soit par des canaux voltage-dépendants. Ce dernier mécanisme est, de loin, le plus important pour la réponse des cellules  $\beta$  au glucose. En témoigne l'inefficacité du glucose lorsque le milieu ne contient pas de  $\text{Ca}^{2+}$ , lorsque la dépolarisation membranaire est contrecarrée pharmacologiquement (diazoxide) ou lorsque les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants sont bloqués (dihydropyridines) [12]. C'est l'expression de canaux voltage-dépendants (qui s'ouvrent et se ferment avec les variations du potentiel de membrane) qui rend les cellules  $\beta$  électriquement excitables à l'instar des cellules nerveuses et musculaires. Pour la stimulation d'un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ , le phénomène important est la dépolarisation membranaire, pas

---

\* Unité d'endocrinologie et métabolisme, Faculté de médecine de l'université de Louvain, UCL 55.30, avenue Hippocrate 55, B-1200 Bruxelles, Belgique.

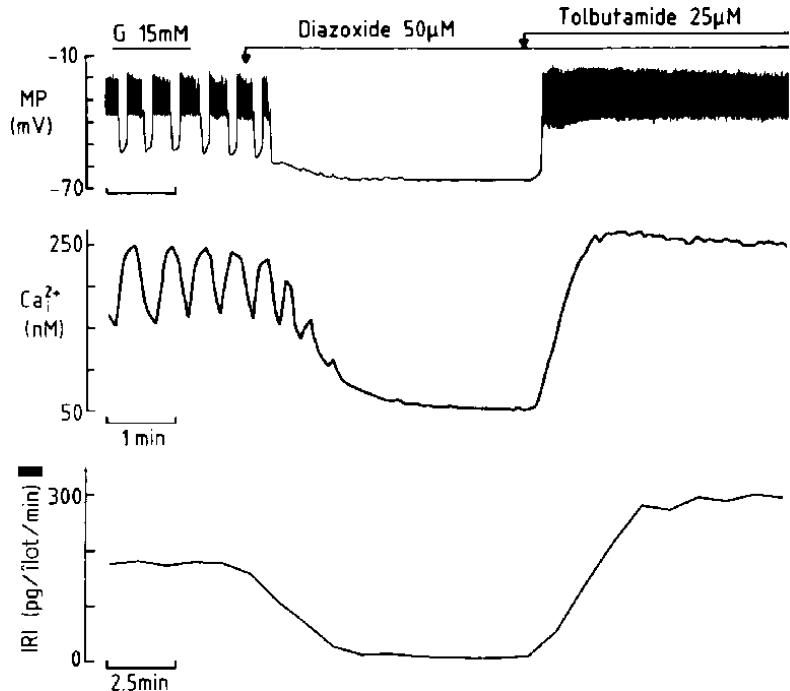
le mécanisme de celle-ci. C'est ainsi que tous les agents qui dépolarisent suffisamment la cellule  $\beta$  augmentent la  $[Ca^{2+}]_i$  et la sécrétion d'insuline (au moins en présence de glucose), que la dépolarisation résulte d'un influx de  $Na^+$  (acétylcholine, alanine), d'un transport électrogénique (arginine) ou du blocage de la pompe à sodium (ouabaïne). In vitro, une augmentation de la concentration extracellulaire de KCl est souvent utilisée pour dépolariser les cellules  $\beta$  (en déplaçant le potentiel d'équilibre du  $K^+$  vers des valeurs moins négatives).

Le mécanisme par lequel le glucose dépolarise les cellules  $\beta$  est inhabituel. Il a été compris grâce à des mesures radioisotopiques de rétention [13] et d'efflux [14, 15] de  $^{42}K$  (ou de son traceur le  $^{86}Rb$ ) dans des îlots isolés, et à des mesures par microélectrode intracellulaire de la résistance électrique membranaire des cellules  $\beta$  [16]. Dès 1978, on pouvait conclure que la dépolarisation induite par le glucose résulte d'une diminution de conductance membranaire pour le  $K^+$ . La démonstration que le tolbutamide dépolarise les cellules  $\beta$  par un mécanisme similaire alors que le diazoxide les hyperpolarise par un mécanisme inverse a rapidement suivi [17, 18]. En revanche, les techniques disponibles à l'époque n'ont pas permis d'identifier quel canal  $K^+$  se ferme sous l'effet du métabolisme du glucose. C'est l'application aux cellules  $\beta$  de la technique du "patch-clamp" qui a établi, en 1984, qu'il s'agit de canaux  $K^+$  sensibles à l'ATP (canaux  $K^+$ -ATP) [19, 20] et que ces mêmes canaux sont aussi la cible du tolbutamide et du diazoxide [21, 22].

Plus de 10 ans seront nécessaires pour que la structure de ces canaux soit élucidée. Ce sont des tétramères de deux sous-unités : un récepteur pour les sulfonylurées de type 1 (SUR1) et un canal  $K^+$  à rectification entrante (Kir 6.2). Leur régulation est complexe et est le sujet d'autres articles dans cet ouvrage (par U Quast) et ailleurs [23, 24]. Pour la compréhension de ce chapitre il suffit de savoir que l'ATP intracellulaire ferme le canal en se liant à Kir 6.2 alors que l'ADP l'ouvre en se liant à SUR 1. C'est en se liant à des sites distincts de SUR1 que les sulfamidés hypoglycémifiants ferment et que le diazoxide ouvre le canal.

Le rôle essentiel des canaux  $K^+$ -ATP dans la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose est facilement démontré en utilisant le diazoxide et le tolbutamide (fig. 1). Lorsque, sur un îlot stimulé par le glucose, on applique du diazoxide pour ouvrir les canaux  $K^+$ -ATP, la membrane des cellules  $\beta$  se repolarise, l'activité électrique cesse, la  $[Ca^{2+}]_i$  baisse et la sécrétion d'insuline retourne à des valeurs basales. Si, ensuite, on traite l'îlot avec une concentration de tolbutamide suffisante pour fermer les canaux  $K^+$ -ATP malgré la présence de diazoxide, la membrane des cellules  $\beta$  se dépolarise, une activité électrique réapparaît, la  $[Ca^{2+}]_i$  augmente et la sécrétion d'insuline est à nouveau stimulée (voir fig. 1)

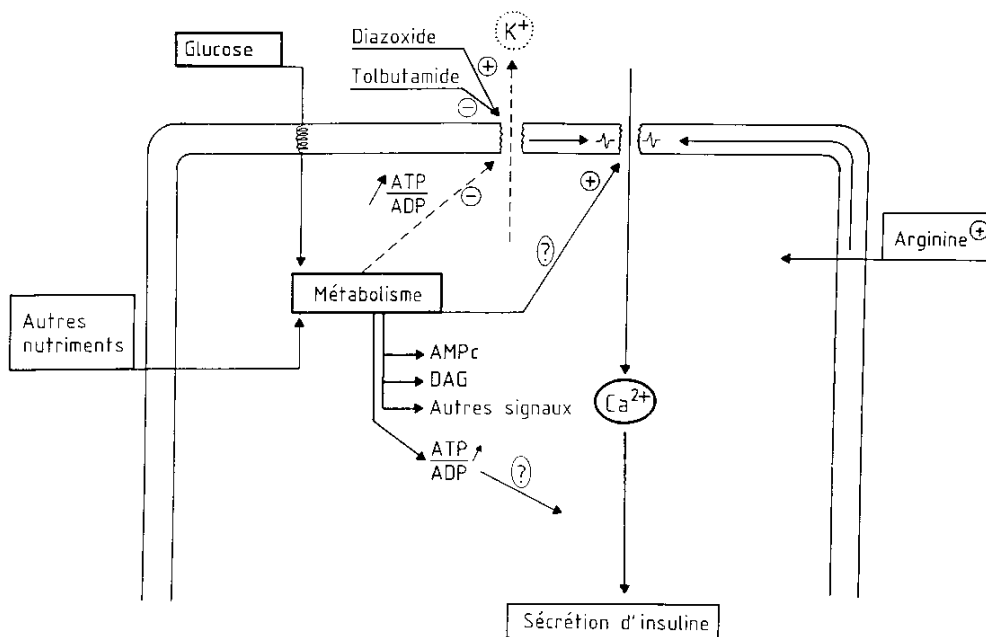
FIG. 1. — Démonstration du rôle essentiel des canaux  $K^+$ -ATP dans la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose. En haut : potentiel de membrane d'une cellule  $\beta$  au sein d'un îlot intact. Au milieu : concentration cytoplasmique de  $Ca^{2+}$  des cellules  $\beta$  dans un îlot intact. En bas : sécrétion d'insuline par un groupe d'îlots. Les oscillations de la sécrétion ne pouvaient pas être détectées dans ces expériences en raison de la présence de plusieurs îlots (non synchronisés) dans la chambre et de la vitesse trop faible de collection des échantillons. Le diazoxide et le tolbutamide ont été ajoutés à un milieu contenant 15 mM glucose pour ouvrir et fermer les canaux  $K^+$ -ATP. (Adapté de [12].)



## LA VOIE DU CANAL $K^+$ -ATP : UN MODELE CLASSIQUE

Sur la base des observations décrites ci-dessus, un modèle de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose a été proposé [25] (fig. 2). Le métabolisme du glucose dans la cellule  $\beta$  induit la fermeture des canaux  $K^+$ -ATP de la membrane plasmique, entraînant, en cascade, une dépolarisation membranaire, une ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants, un influx de  $Ca^{2+}$ , une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et, finalement, une stimulation de l'exocytose des granules d'insuline. La plupart de ces phénomènes (activité électrique, élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et sécrétion d'insuline) sont caractérisés par des oscillations (voir fig. 1), dont la signification et les mécanismes sont discutés ailleurs [9, 26-30].

FIG. 2. — Représentation schématique des mécanismes de stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose et d'autres nutriments. Les symboles + indiquent une stimulation, les symboles - une inhibition. (Tiré de [25].)



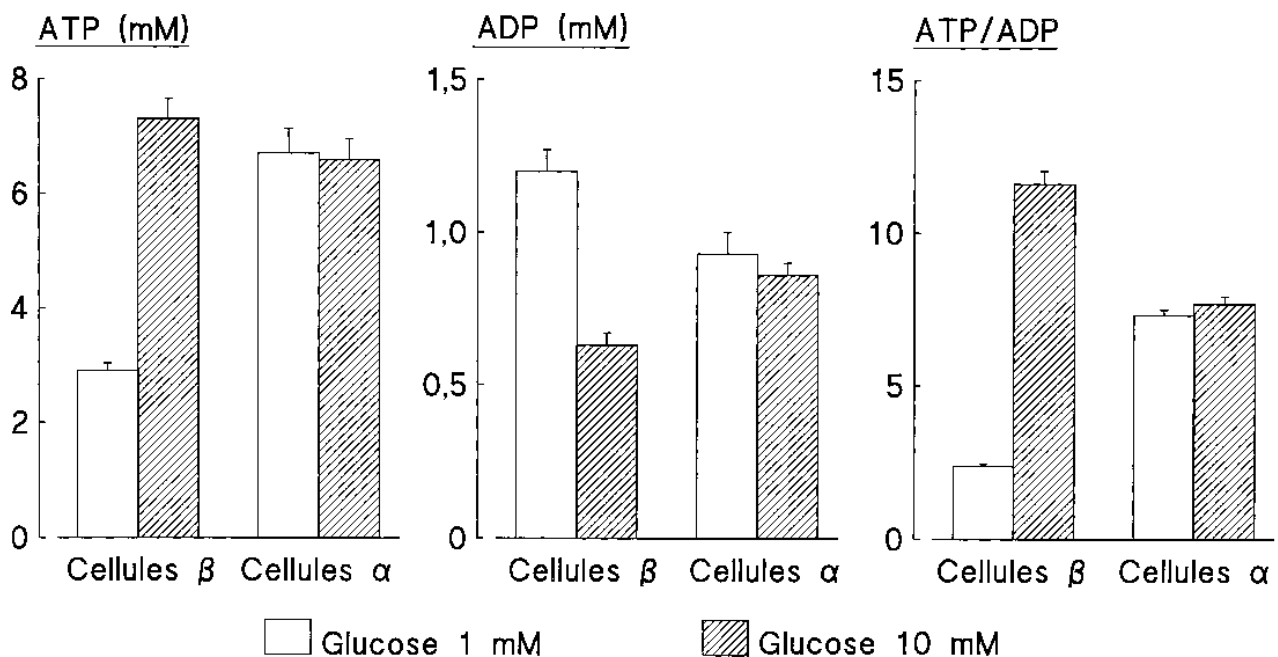
Lorsqu'un modèle devient classique au point d'être utilisé dans toutes les conférences de vulgarisation, ses limites cessent d'être perçues et des erreurs d'interprétation se propagent. Premièrement, il est faux de croire que c'est la rétention de charges positives ( $K^+$ ) à l'intérieur de la cellule qui provoque la dépolarisation lorsque les canaux  $K^+$ -ATP se ferment. Ce qui importe, c'est la diminution de perméabilité pour le  $K^+$  relativement à celle d'autres ions ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ). En l'absence de glucose, suffisamment de canaux  $K^+$ -ATP sont ouverts pour maintenir le potentiel de repos ( $-70$  mV) à proximité du potentiel d'équilibre du  $K^+$  ( $-80$  mV). Lorsque les canaux  $K^+$ -ATP se ferment, la perméabilité pour le  $K^+$  diminue et un courant dépolarisant non identifié (sans doute non spécifique) éloigne alors le potentiel membranaire du potentiel d'équilibre du  $K^+$  pour le rapprocher de celui, moins négatif, des autres ions.

Deuxièmement, bien que le canal  $K^+$ -ATP doive son nom à sa propriété d'être fermé par l'ATP intracellulaire, l'ATP ne peut pas être son seul régulateur physiologique. En effet, sa sensibilité à l'ATP seul est telle ( $K_i < 50 \mu M$ ) [23-24] que tous les canaux devraient être constamment fermés puisque la concentration d'ATP des cellules  $\beta$  excède 1-2 mM même en l'absence de glucose. En réalité, l'ADP et plusieurs autres agents présents dans la cellule intacte diminuent l'efficacité de l'ATP. Il est même possible que dans les effets liés aux changements du rapport ATP/ADP, ce soient les variations de l'ADP qui aient le rôle prépondérant [31, 32].

Troisièmement, pour que les variations du rapport ATP/ADP puissent servir de second messenger dans le contrôle de l'activité du canal  $K^+$ -ATP par le glucose, il faut que ces variations soient suffisantes et surviennent dans une gamme de concentrations physiologiques de glucose. Or, la plupart des cellules ont une organisation métabolique qui vise à stabiliser la concentration des adénine nucléotides. Les cellules  $\beta$  font exception à cette règle générale [33]. Lorsque des cellules  $\beta$  de rat purifiées sont incubées en présence de 10 au lieu de 1 mM glucose, leur contenu en ATP augmente, leur contenu en ADP diminue et le rapport ATP/ADP s'élève de 4 à 5 fois (fig. 3). Un premier doublement

survient entre 1 et 5 mM glucose et un deuxième entre 5 et 10 mM glucose, donc aussi pour des variations physiologiques. En revanche, le rapport ATP/ADP ne change pas avec la concentration de glucose dans les cellules  $\alpha$  purifiées (voir fig. 3). Il s'agit donc bien d'une particularité des cellules  $\beta$ , attribuable au couplage très étroit entre la glycolyse et le métabolisme mitochondrial [34].

FIG. 3. — Le glucose a des effets distincts sur le rapport ATP/ADP dans les cellules  $\beta$  et  $\alpha$  du pancréas endocrine. Les cellules ont été purifiées par *autofluorescence-activated cell sorting* à partir de suspensions de cellules d'îlots de rat. Après culture pendant une nuit, les cellules ont été incubées pendant 1 h en présence de 1 ou 10 mM glucose, avant détermination de leur contenu en ATP et ADP. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SE pour 15 lots de cellules obtenues dans 5 expériences distinctes. (Adapté de [34].)



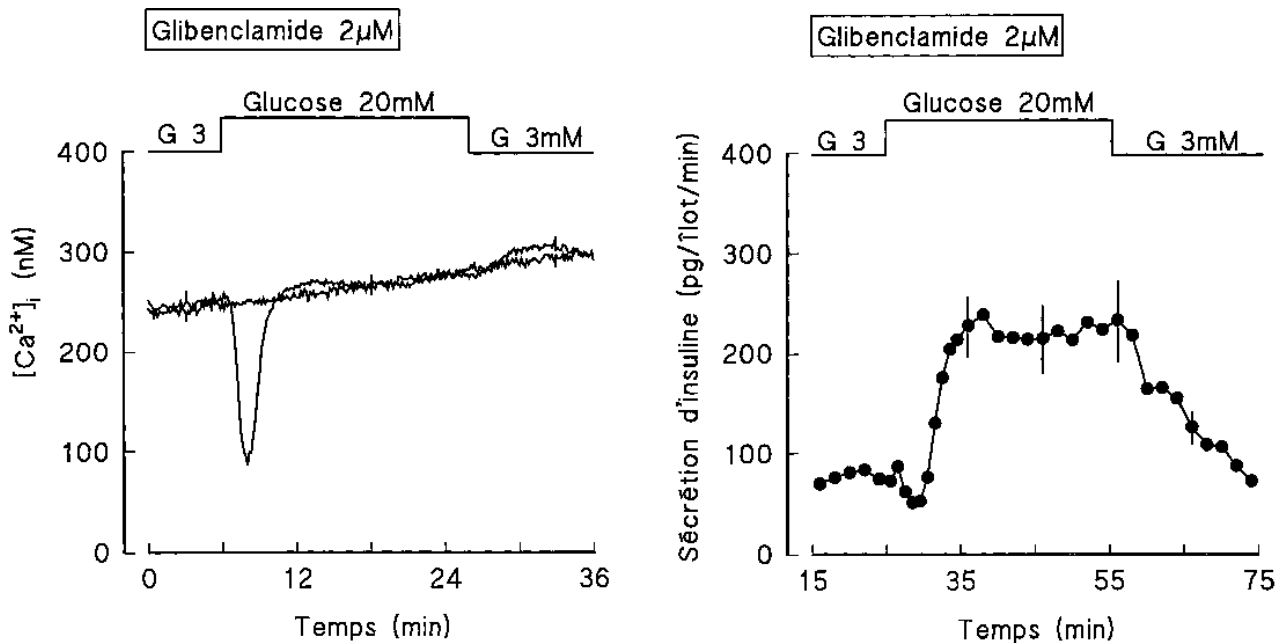
#### LA VOIE DU CANAL $K^+$ -ATP : UN MODELE INSUFFISANT

Le glucose exerce un deuxième type de contrôle de la sécrétion d'insuline, par un mécanisme indépendant de son action sur les canaux  $K^+$ -ATP [35-37]. Deux approches expérimentales permettent d'en démontrer l'existence.

La première consiste à empêcher le glucose de fermer les canaux  $K^+$ -ATP en maintenant ceux-ci ouverts par le diazoxide [35, 36]. Ce faisant, on empêche la dépolarisation et l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . En l'absence de signal déclenchant la sécrétion d'insuline n'est pas stimulée. Toutefois, lorsqu'on dépolarise la membrane en augmentant la concentration de  $K^+$  extracellulaire, l'influx de  $Ca^{2+}$  est rétabli et la sécrétion d'insuline est stimulée, même en l'absence de glucose. Dans ces conditions, le glucose reste capable d'augmenter la sécrétion de façon dose-dépendante. Comme cet effet ne s'accompagne d'aucune élévation supplémentaire de la  $[Ca^{2+}]_i$ , on peut conclure qu'il résulte d'une potentialisation de l'action du  $Ca^{2+}$  sur ses cibles intracellulaires [35, 37] (voir fig. 2).

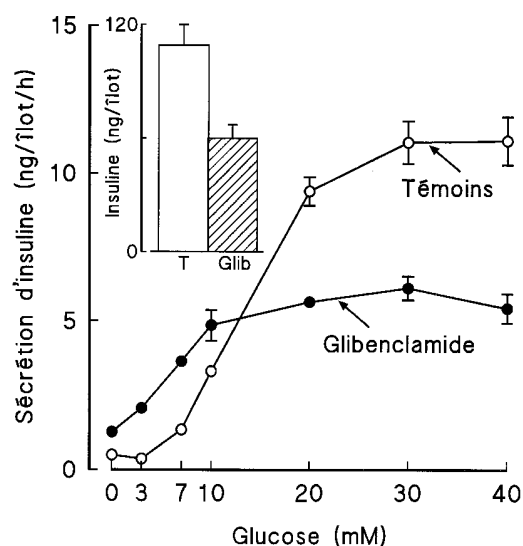
La deuxième approche consiste à fermer complètement les canaux  $K^+$ -ATP en utilisant une concentration élevée d'une sulfonurée comme le glibenclamide [38]. Il en résulte évidemment une dépolarisation continue de la membrane des cellules  $\beta$  avec une élévation soutenue de la  $[Ca^{2+}]_i$  et une stimulation de la sécrétion d'insuline même lorsque la concentration de glucose est basse (fig. 4). Lorsque la concentration de glucose est augmentée dans ces conditions, la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue transitoirement (sans doute en raison de la séquestration du  $Ca^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique) puis revient au niveau des valeurs témoins mesurées en présence de glucose bas. Parallèlement, avec un délai qui correspond à la phase initiale de baisse de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la sécrétion d'insuline augmente de trois fois (voir fig. 4). On peut donc à nouveau conclure que le glucose augmente l'efficacité du  $Ca^{2+}$  sur le processus sécrétoire (voir fig. 2).

FIG. 4. — Stimulation de la sécrétion d'insuline par une voie indépendante du canal  $K^+$ -ATP. Des îlots de souris ont été perfusés avec un milieu contenant une forte concentration de glibenclamide ( $2 \mu\text{M}$ ) destinée à fermer tous les canaux  $K^+$ -ATP des cellules  $\beta$ . En cours d'expérience la concentration de glucose a été augmentée de 3 à 20 mM. Dans le panneau de gauche, le tracé stable illustre la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans des îlots qui n'ont pas été stimulés par 20 mM glucose. La concentration de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et la sécrétion d'insuline ont été mesurées séparément dans 5 expériences distinctes chacune. Les valeurs sont des moyennes  $\pm$  SE. (Adapté de [38].)



Il n'est cependant pas nécessaire d'utiliser une concentration très élevée de glibenclamide pour observer le phénomène. Il suffit d'exposer des îlots de souris pendant 18 h à une concentration de glibenclamide ( $10 \text{ nM}$ ) équivalente à celles qui sont atteintes dans le plasma des patients traités avec le médicament [39]. Lorsque la sécrétion d'insuline par ces îlots est ensuite étudiée en l'absence de glibenclamide, de grosses perturbations sont évidentes (fig. 5). La relation entre la concentration de glucose et la sécrétion d'insuline n'est plus sigmoïde comme pour les îlots témoins, mais hyperbolique. Les faibles concentrations de glucose provoquent déjà une augmentation de la sécrétion parce que la membrane est dépolarisée et la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  élevée. Ces effets du glucose ne s'accompagnent pratiquement d'aucune augmentation supplémentaire de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Ce tableau est dû à l'accumulation du glibenclamide dans la membrane des cellules  $\beta$  [40]. Il n'est reproduit par le tolbutamide que si celui-ci est constamment présent dans le milieu à une concentration supérieure aux concentrations thérapeutiques [39]

FIG. 5. — Impact d'un prétraitement par le glibenclamide sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Des îlots de souris ont été cultivés pendant 20 h en présence de 10 mM glucose, sans ( $\circ$ ) ou avec 10 nM glibenclamide ( $\bullet$ ). Ils ont ensuite été incubés pendant 1 h en l'absence de glibenclamide mais en présence de différentes concentrations de glucose. La sécrétion d'insuline a été mesurée à l'issue de la période d'incubation. L'encart illustre la différence de contenu en insuline des îlots témoins et prétraités par le glibenclamide. Moyennes  $\pm$  SE pour 25 lots d'îlots. (Adapté de [39].)



.Ce processus d'amplification de l'action du  $\text{Ca}^{2+}$  par le glucose s'observe donc aussi bien lorsque les canaux  $\text{K}^+$ -ATP sont ouverts et que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est augmentée par le  $\text{K}^+$  extracellulaire que lorsque les canaux  $\text{K}^+$ -ATP sont fermés et que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est augmentée par la dépolarisation que cette fermeture provoque. En utilisant au moins une des approches expérimentales décrites ci-dessus, plusieurs autres laboratoires ont confirmé l'existence d'une voie de régulation indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP tant dans les îlots de rongeurs [41-44] que dans les îlots humains [45].

## MECANISMES DE LA VOIE INDEPENDANTE DU CANAL $\text{K}^+$ -ATP

Cet effet est incontestablement lié à l'accélération du métabolisme des cellules  $\beta$  : il est prévenu par les agents qui interfèrent avec le métabolisme du glucose et peut être reproduit par d'autres sucres ou des acides aminés métabolisés alors que les sucres non métabolisés sont sans effet [35, 37, 46]. Il ne s'agit donc pas d'une propriété spécifique du glucose, mais plutôt une propriété générale des nutriments métabolisés. Les acides gras libres font cependant exception ; ils n'ont d'effet qu'en présence de glucose et cet effet s'accompagne d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [47].

La plupart des hormones et des neurotransmetteurs potentialisent l'effet du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la sécrétion d'insuline en activant soit la voie AMP cyclique-protéine kinase A soit la voie diacylglycerol-protéine kinase C [7, 48, 49]. Tous les arguments que nous avons pu accumuler plaident contre la participation de ces deux voies dans l'effet du glucose indépendant du canal  $\text{K}^+$ -ATP [37, 46]. D'autres auteurs n'excluent pas un rôle de la protéine kinase C [50]. Par ailleurs, il a été suggéré que les acyl-CoA à longue chaîne servent de second messenger dans la réponse des cellules  $\beta$  au glucose [51], notamment dans l'effet indépendant du canal  $\text{K}^+$ -ATP [52]. Avec des réserves pour un des auteurs de cet article (YS), nous ne pensons pas que ce rôle soit significatif [46].

Une approche systématique a également permis d'exclure que les voies suivantes jouent un rôle : phospholipase A2-acide arachidonique, oxyde nitrique-protéine kinase G, phosphatidylinositol-3 kinase, etc. [46]. Nous proposons que l'effet  $\text{K}^+$ -ATP indépendant est, lui aussi, lié à une augmentation du rapport ATP/ADP dans les cellules  $\beta$  [33, 37, 46, 53] (voir fig. 2). Jusqu'ici notre hypothèse n'a pu être basée que sur des corrélations de sorte qu'il reste possible qu'un facteur variant comme l'ATP, ou en sens inverse, soit le véritable deuxième messenger. Toutefois deux études utilisant une approche totalement différente des nôtres (estimation de la sécrétion par mesure des changements de capacitance membranaire dans des cellules  $\beta$  uniques) arrivent aussi à la conclusion que l'ATP augmente l'action du  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'exocytose [54, 55]. Une hypothèse complémentaire récente propose que le métabolisme mitochondrial libère du glutamate dans le cytosol et que ce glutamate potentialise la sécrétion d'insuline induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'ATP [56].

## ROLES DE LA VOIE INDEPENDANTE DU CANAL $\text{K}^+$ -ATP

Il est relativement simple de démontrer l'existence de la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP en utilisant les artifices expérimentaux décrits plus haut. En revanche, il est beaucoup plus difficile d'établir que le phénomène participe significativement à la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose dans des conditions physiologiques. En effet, comme le glucose peut alors aussi agir sur le canal  $\text{K}^+$ -ATP et, donc, modifier la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , il n'est pas possible de déterminer les contributions respectives du signal déclenchant et du système d'amplification. Les arguments qui plaident en faveur d'un rôle important de la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP dans les conditions physiologiques sont indirects. Premièrement, lorsqu'un signal déclenchant (dépolarisation et élévation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) équivalent à celui provoqué par le glucose est induit par des moyens pharmacologiques, la réponse sécrétoire est toujours plus faible et moins soutenue que lors d'une stimulation par le glucose. Deuxièmement, lorsque la concentration de glucose est augmentée d'un niveau stimulant à un autre plus élevé, les oscillations de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  s'allongent mais leur pic n'augmente pas alors que les oscillations de sécrétion d'insuline qui surviennent en même temps augmentent en durée et en amplitude [57]. En d'autres termes, la voie du canal  $\text{K}^+$ -ATP augmente seulement la durée du signal déclenchant alors que la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP augmente l'amplitude de la réponse sécrétoire à ce signal.

On sait depuis longtemps que le glucose non seulement stimule la sécrétion d'insuline, mais qu'il influence aussi la réponse des cellules  $\beta$  à d'autres sécrétagogues comme l'arginine [58]. L'action potentialisatrice du glucose [59] résulte d'un double mécanisme : une augmentation de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  et une augmentation de l'action du  $\text{Ca}^{2+}$  [60]. Nous proposons que cette dernière correspond à la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP. Comme cette potentialisation est déficiente chez les diabétiques de type 2 [61], il est vraisemblable que la deuxième voie d'action du glucose a un rôle physiopathologique important.

Bien que la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP soit activée par des concentrations de glucose plus faibles que celles qui sont requises pour activer la voie dépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP [53], la sécrétion d'insuline ne survient pas de façon inappropriée lorsque la concentration de glucose est trop basse. En effet, la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP est inopérante jusqu'à ce qu'un signal déclenchant soit produit par la voie dépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP qui est donc

prépondérante. L'autre voie optimalise la réponse sécrétoire au signal  $\text{Ca}^{2+}$ . In vivo, cette hiérarchie peut cependant être perturbée dans diverses situations qui ont en commun de mettre les canaux  $\text{K}^+$ -ATP hors circuit. C'est le cas chez certains nouveau-nés atteints du syndrome d'hypoglycémie hyperinsulinémique (*persistent hyperinsulinemic hypoglycaemia of infancy*). En raison de mutations touchant surtout SUR 1 (voir les chapitres par B. Glaser et C. Junien dans ce volume) les cellules  $\beta$  de ces enfants sont dépolarisées de façon constante et la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est élevée. Les effets du glucose sur la sécrétion d'insuline résultent donc d'une amplification par la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP [62].

Une situation analogue peut survenir chez des patients traités par des sulfonylurées à longue durée d'action. Le blocage continu des canaux  $\text{K}^+$ -ATP ne permet plus au glucose d'influencer la sécrétion d'insuline que par la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP. Le risque de sécrétion inappropriée d'insuline et d'hypoglycémie s'explique par la disparition d'un seuil de glycémie en dessous duquel la cellule  $\beta$  cesse normalement de produire un signal déclenchant. On se retrouve dans la situation qui a été reproduite in vitro par les expériences de la fig. 5.

## PERSPECTIVES

L'existence de deux systèmes de contrôle de la sécrétion d'insuline par le glucose a des implications physiopathologiques et thérapeutiques. En effet, les anomalies de la sécrétion d'insuline chez les diabétiques de type 2 ne sont pas forcément dues à des altérations de la voie dépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP. Or, les sulfamidés hypoglycémisants et substances apparentées agissent tous sur la même cible, les canaux  $\text{K}^+$ -ATP. Bien qu'un effet des sulfonylurées sur l'exocytose ait été décrit dans des conditions expérimentales bien particulières [63, 64], nous ne pensons pas que cette action ait une pertinence thérapeutique [65, 66]. Il est donc important de poursuivre l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la voie indépendante du canal  $\text{K}^+$ -ATP. Seule l'identification de ceux-ci permettra le développement de nouveaux médicaments capables de corriger les dysfonctionnements de cette voie.

*Remerciements.* — Les programmes de recherche des auteurs ont bénéficié du soutien financier de l'Université Catholique de Louvain, du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, du Ministère de la Recherche Scientifique de la Communauté Française de Belgique et des Services Fédéraux des Affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles, à Bruxelles.

## BIBLIOGRAPHIE

1. HENQUIN JC. The cell biology of insulin secretion. *In* : CR Kahn, GC Weir. Joslin's diabetes mellitus, 13th Ed., Philadelphia, Lea and Febiger, 1984 : 56-80.
2. GRODSKY GM, BATTIS AA, BENNETT LL et al. Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am J Physiol*, 1963, 205 : 638-644.
3. COORE HG, RANDLE PJ. Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J*, 1964, 93 : 66-78.
4. GRODSKY GM, BENNETT LL. Cation requirements for insulin secretion in the isolated perfused pancreas. *Diabetes*, 1966, 15 : 910-913.
5. MILNER RDG, HALES CN. The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia*, 1967, 3 : 47-49.
6. DEAN PM, MATTHEWS EK. Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature*, 1968, 219 : 389-390.
7. PRENTKI M, MATSCHINSKY FM.  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev*, 1987, 67 : 1185-1243.
8. WOLLHEIM CB, LANG J, REGAZZI R. The exocytotic process of insulin secretion and its regulation by  $\text{Ca}^{2+}$  and G-proteins. *Diabetes Rev*, 1996, 4 : 276-297.
9. HENQUIN JC, JONAS JC, SATO Y et al. Regulation of insulin secretion by changes in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and action in pancreatic  $\beta$ -cells. *Adv Mol Cell Biol*, 1999, 29 : 247-275.
10. KOMATSU M, SCHERMERHORN T, NODA M et al. Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . New insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes*, 1997, 46 : 1928-1938.
11. SATO Y, HENQUIN M, HENQUIN JC. Relative contribution of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mechanisms to the regulation of insulin secretion by glucose. *FEBS Lett*, 1998, 421 : 115-119.
12. GILON P, HENQUIN JC. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J Biol Chem*, 1992, 267 : 20713-20720.
13. SEHLIN J, TALJEDAL IB. Glucose-induced decrease in  $\text{Rb}^+$  permeability in pancreatic  $\beta$  cells. *Nature*, 1975, 253 : 635-636.
14. HENQUIN JC. Tetraethylammonium potentiation of insulin release and inhibition of rubidium efflux in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 77 : 551-556.
15. HENQUIN JC. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. *Nature*, 1978, 271 : 271-273.
16. ATWATER I, RIBALET B, ROJAS E. Cyclic changes in potential and resistance of the  $\beta$ -cell membrane induced by glucose in islets of Langerhans from mouse. *J Physiol*, 1978, 278 : 117-139.
17. HENQUIN JC. Tolbutamide stimulation and inhibition of insulin release : studies of the underlying ionic mechanisms in isolated rat islets. *Diabetologia*, 1980, 18 : 151-160.
18. HENQUIN JC, MEISSNER HP. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on  $^{86}\text{Rb}^+$  fluxes and membrane potential in pancreatic  $\beta$ -cells.

- Biochem Pharmacol, 1982, 31 : 1407-1415.
19. COOK DL, HALES CN. Intracellular ATP directly blocks K<sup>+</sup> channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 1984, 311 : 271-273.
  20. ASHCROFT FM, HARRISON DE, ASHCROFT SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic  $\beta$ -cells. *Nature*, 1984, 312 : 446-448.
  21. STURGESS NC, ASHFORD MLJ, COOK DL, HALES CN. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet*, 1985, 2 : 474-475.
  22. TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup> channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Arch*, 1986, 47 : 493-499.
  23. TUCKER SJ, GRIBBLE FM, PROKS P et al. Molecular determinants of K<sup>+</sup>-ATP channel inhibition by ATP. *EMBO J*, 1998, 17 : 3290-3296.
  24. AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Rev*, 1999, 20 : 101-135.
  25. HENQUIN JC, DETIMARY P, GEMBAL M et al. Aspects biophysiques du contrôle de la sécrétion d'insuline. *Journées de Diabétologie de l'Hôtel Dieu, Paris, Flammarion Médecine-Sciences*, 1994 : 21-32.
  26. TORNHEIM K. Are metabolic oscillations responsible for normal oscillatory insulin secretion ? *Diabetes*, 1997, 46 : 1375-1380.
  27. HENQUIN JC, JONAS JC, GILON P. Functional significance of Ca<sup>2+</sup> oscillations in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes Metab*, 1998, 24 : 30-36.
  28. BERGSTEN P, LIN J, WESTERLUND J. Pulsatile insulin release : role of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Diabetes Metab*, 1998, 24 : 41-45.
  29. GYLFE E, GRAPENGIESSER E, LIU YJ et al. Generation of glucose-dependent slow oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in individual pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetes Metab*, 1998, 24 : 25-29.
  30. SORIA B, MARTIN F. Cytosolic calcium oscillations and insulin release in pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes Metab*, 1998, 24 : 37-40.
  31. HOPKINS WF, FATHERAZI S, PETER-RIESCH B et al. Two sites for adenine-nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels in mouse pancreatic  $\beta$ -cells and HIT cells. *J Membr Biol*, 1992, 129 : 287-295.
  32. NICHOLS CG, SHYNG SL, NESTOROWICZ A et al. Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science*, 1996, 272 : 1785-1787.
  33. DETIMARY P, VAN DEN BERGHE G, HENQUIN JC. Concentration dependence and time course of the effects of glucose on adenine and guanine nucleotides in mouse pancreatic islets. *J Biol Chem*, 1996, 271 : 20559-20565.
  34. DETIMARY P, DEJONGHE S, LING Z et al. The changes in adenine nucleotides measured in glucose-stimulated rodent islets occur in  $\beta$  cells but not in  $\alpha$  cells and are also observed in human islets. *J Biol Chem*, 1998, 273 : 33905-33908.
  35. GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B-cells. *J Clin Invest*, 1992, 89 : 1288-1295.
  36. SATO Y, AIZAWA T, KOMATSU M et al. Dual functional role of membrane depolarization/Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes*, 1992, 41 : 438-443.
  37. GEMBAL M, DETIMARY P, GILON P et al. Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mouse B-cells. *J Clin Invest*, 1993, 91 : 871-880.
  38. SATO Y, ANELLO M, HENQUIN JC. Glucose regulation of insulin secretion independent of the opening or closure of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in  $\beta$  cells. *Endocrinology*, 1999, 140 : 2252-2257.
  39. ANELLO M, GILON P, HENQUIN JC. Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas : perturbations of Ca<sup>2+</sup> regulation prevail over changes in insulin content. *Br J Pharmacol*, 1999, 127 : 1883-1891.
  40. HELLMAN B, SEHLIN J, TALJEDAL IB. Glibenclamide is exceptional among hypoglycaemic sulphonylureas in accumulating progressively in  $\beta$ -cell-rich pancreatic islets. *Acta Endocrinol*, 1984, 105 : 389-390.
  41. KELLEY GG, ZAWALICH KC, ZAWALICH WS. Calcium and a mitochondrial signal interact to stimulate phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion in rat islets. *Endocrinology*, 1994, 134 : 1648-1654.
  42. MEREDITH M, RABAGLIA ME, METZ SA. Evidence of a role for GTP in the potentiation of Ca<sup>2+</sup>-induced insulin secretion by glucose in intact rat islets. *J Clin Invest*, 1995, 63 : 811-821.
  43. CHAN CB, MACPHAIL RM. K<sup>+</sup>-ATP channel-dependent and independent pathways of insulin secretion in isolated islets from fa/fa Zucker rats. *Biochem Cell Biol*, 1996, 74 : 403-410.
  44. FUJIMOTO S, SHIDA H, KATO S et al. The novel insulinotropic mechanism of pimobendan : direct enhancement of the exocytotic process of insulin secretory granules by increased Ca<sup>2+</sup> sensitivity in  $\beta$ -cells. *Endocrinology*, 1998, 139 : 1133-1140.
  45. STRAUB SG, JAMES RFL, DUNNE MJ, SHARP GWG. Glucose activates both K<sup>+</sup>-ATP channel-dependent and K<sup>+</sup>-ATP channel-independent signaling pathways in human islets. *Diabetes*, 1998, 47 : 758-763.
  46. SATO Y, HENQUIN JC. The K<sup>+</sup>-ATP channel-independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose. In search of the underlying mechanism. *Diabetes*, 1998, 47 : 1713-1721.
  47. WARNOTTE C, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC. Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids : a study of palmitate effects in mouse beta-cells. *Diabetes*, 1994, 43 : 703-711.
  48. AHREN B. Potentiators and inhibitors of insulin secretion. *Adv Mol Cell Biol*, 1999, 29 : 175-197.
  49. JONES PM, PERSAUD SJ. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocrine Rev*, 1998, 19 : 429-461.
  50. ZAWALICH WS, ZAWALICH KC. Regulation of insulin secretion via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel independent mechanisms : role of phospholipase C. *Am J Physiol*, 1997, 272 : E671-E677.
  51. PRENTKI M, CORKEY BE. Are the  $\beta$ -cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM ? *Diabetes*, 1996, 45 : 273-283.
  52. KOMATSU M, YAJIMA H, YAMADA S et al. Augmentation of Ca<sup>2+</sup>-stimulated insulin release by glucose and long-chain fatty acids in rat pancreatic islets : free fatty acids mimic ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-independent insulinotropic action of glucose. *Diabetes*, 1999, 48 : 1543-1549.
  53. DETIMARY P, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC. Two sites of glucose control of insulin release with distinct dependence on the energy state in pancreatic B cells. *Biochem J*, 1994, 297 : 455-461.
  54. ELLASSON L, RENSTRM E, DING WG et al. Rapid ATP-dependent priming of secretory granules precedes Ca<sup>2+</sup>-induced exocytosis in mouse pancreatic  $\beta$  cells. *J Physiol*, 1997, 503 : 399-412.
  55. TAKAHASHI N, KADOWAKI T, YAZAKI Y et al. Post-priming actions of ATP on Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 : 760-765.
  56. MAECHLER P, WOLLHEIM CB. Glutamate acts as a mitochondrially derived messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Diabetes Metab*, 1999, 25 (Suppl. 4) : XI (abstract).
  57. GILON P, HENQUIN JC. Distinct effects of glucose on the synchronous oscillations of insulin release and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration measured simultaneously in single mouse islets. *Endocrinology*, 1995, 136 : 5725-5730.
  58. EFENDIC S, CERASI E, LUFT R. Role of glucose in arginine-induced insulin release in man. *Metabolism*, 1971, 20 : 568-579.

59. CERASI E. Mechanisms of glucose stimulated insulin secretion in health and in diabetes : some reevaluations and proposals. *Diabetologia*, 1974, *11* : 1-14.
60. HERMANS MP, SCHMEER W, HENQUIN JC. The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K<sup>+</sup> on arginine stimulation of insulin release in isolated mouse islets. *Diabetologia*, 1987, *30* : 659-665.
61. HOLLANDER PM, CHRISTOPHER MA, PALMER JP. Glucose modulation of insulin and glucagon secretion in nondiabetic and diabetic man. *Diabetes*, 1982, *31* : 489-495.
62. MACFARLANE WM, CHAPMAN JC, SHEPHERD RM et al. Engineering a glucose-responsive human insulin-secreting cell line from islets of Langerhans isolated from a patient with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Biol Chem*, 1999, *274* : 34059-34066.
63. ELIASSON L, RENSTRÖM E, ÖRSKÖLD C et al. PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic  $\beta$  cells. *Science*, 1996 : 271 , 810-813
64. TIAN YM, JOHNSON G, ASHCROFT SJH. Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic  $\beta$  cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C. *Diabetes*, 1998, *47* : 1722-1726.
65. GARCIA-BARRADO MJ, JONAS JC, GILON P, HENQUIN JC. Sulphonylureas do not increase insulin secretion by a mechanism other than a rise in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic B cells. *Eur J Pharmacol*, 1996, *298* : 279-286.
66. MARIOT P, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC. Tolbutamide and diazoxide influence insulin secretion by changing the concentration but not the action of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in  $\beta$ -cells. *Diabetes*, 1998, *47* : 365-373.