

**PRIX APOLLINAIRE BOUCHARDAT 2003**

## **ÉQUILIBRE GLYCÉMIQUE ET DÉTECTEURS DE GLUCOSE**

par

**R. BURCELIN\***

### **INTRODUCTION**

Le contrôle de l'homéostasie glucidique dépend d'un arc reflexe métabolique organisé globalement en trois séquences d'événements biologiques : 1) des cellules spécialisées de l'organisme détectent en permanence les variations de la glycémie : ce sont les détecteurs de glucose ou glucostats ; 2) des signaux d'origine nerveuse, endocrinienne, et métabolique sont alors envoyés vers de nouvelles cellules qui intègrent l'ensemble des messages véhiculés par ces facteurs et génèrent une nouvelle information adressée à des cellules cibles ; 3) ces dernières cellules déclenchent leur fonction qui permet d'utiliser de manière appropriée l'énergie glucose et de maintenir la glycémie à une valeur physiologique normale. Les syndromes diabétiques sont caractérisés par une combinaison de défauts affectant cet arc reflexe métabolique et il est donc d'intérêt physiopathologique de comprendre chaque étape pour élaborer une thérapie appropriée. Les mécanismes moléculaires responsables de la détection des variations glycémiques, des messages transmis et des fonctions impliquées n'ont été que récemment et que partiellement élucidés grâce aux développements des expérimentations sur animaux génétiquement modifiés.

### **Pourquoi détecter finement les variations de la glycémie ?**

Les mécanismes qui contrôlent l'utilisation des acides gras et du glucose en tant que molécules énergétiques sont très finement régulés. En effet, ces mécanismes sont particulièrement précis et élaborés en ce qui concerne le glucose. Une des

\* UMR 5018, CNRS-UP5, CHU Rangueil, Toulouse, France.

raison importante est que le cerveau dépend presque uniquement du glucose comme source énergétique. L'organisme a développé des mécanismes capables de détecter les plus petites variations de la glycémie. Ainsi, chez l'homme la glycémie varie au maximum, en conditions physiologiques, de 2 mM autour d'une concentration de 5,5 mM lors de sa vie quotidienne. En réponse à des perturbations variées de l'équilibre glycémique l'organisme va adapter une réponse physiologique d'intensité appropriée afin d'utiliser et d'épargner au mieux l'énergie glucose et de maintenir la glycémie autour d'une valeur physiologique. La régulation fine de la glycémie et son maintien à une valeur physiologique sont des critères importants pour éviter des réactions biologiques inappropriées qui interfèrent avec le bon fonctionnement de l'organisme. Ainsi, au cours des syndromes diabétiques la glycémie atteint des valeurs qui ne sont plus dans le cadre physiologique des mécanismes de détection. Ces variations trop importantes de la glycémie aboutissent à la sécrétion de médiateurs hormonaux et nerveux par excès ou par défaut, à l'inhibition ou à l'activation d'activités enzymatiques, à l'augmentation ou à la diminution de l'expression de gènes. Ainsi de nouvelles informations biologiques activent des mécanismes biologiques inappropriés. Les mécanismes de détection, de transmission des informations et les réponses déclenchées sont altérées, ce qui perturbe la glycémie. L'équilibre glycémique ne pouvant être maintenu, l'état diabétique s'installe.

### Existence des glucostats

Le premier à mettre en évidence que la glycémie pouvait être contrôlée par un arc réflexe métabolique a été Claude Bernard en 1849 [1] en montrant que le cerveau pouvait détecter des variations de la glycémie. L'activation électrique d'un des planchés du tronc cérébral aboutissait à la production du glucose par le foie par un arc réflexe initié par les cellules du système nerveux autonome. Par la suite Mayer en 1955 proposa que la prise alimentaire pouvait être augmentée en présence d'une glycémie basse [2]. La présence de neurones cérébraux sensibles au glucose a été confirmée par les études électrophysiologiques de Oomura et coll. [3, 4]. Leurs résultats montraient que l'activité électrique de quelques neurones hypothalamiques changeait en présence de concentrations de glucose variables ou lors de variations de la glycémie. Trois classes de neurones ont été identifiées : les neurones pour lesquels l'activité électrique augmentait (gluco-répondeurs), diminuait (gluco-sensibles), ou ne changeait pas en présence du glucose.

La localisation des glucostats n'est pas réduite aux cellules hypothalamiques [5, 6]. Des cellules sensibles au glucose sont présentes dans le tronc cérébral et notamment dans le noyau du tractus solitaire (NTS) [7-11], dans les corps carotidiens [12], et dans les afférences du système nerveux autonome d'organes viscéraux tels le tractus digestif pour la sécrétion des gluco-incréтины, le foie et dans la veine hépatoportale [13, 14]. Ces glucostats génèrent en présence ou en absence de glucose un signal d'origine nerveuse ou endocrinienne qui est alors interprété par des centres intégrateurs, notamment dans certains noyaux cérébraux et le plexus viscéral gastro-hépto-intestinal.

La détection du glucose n'est, cependant, pas limitée à l'induction d'un signal extracellulaire nécessaire à la transmission de l'information glucose vers des cellules cibles pour l'induction d'une réponse physiologique rapide. La détection du glucose peut se traduire par une modification de l'activité de certaines enzymes

notamment hépatiques telles que la synthèse du glycogène [15], ou l'expression de gènes comme la synthèse des acides gras [16].

Les principales fonctions physiologiques déclenchées par l'arc reflexe glucométabolique sont la sécrétion d'insuline, de gluco-incréтины, d'hormones de contre-régulation tels le glucagon [17] et les catécholamines, la prise alimentaire [18, 19], la production hépatique de glucose, et l'utilisation du glucose par les muscles. Ces fonctions sont donc essentielles pour le maintien de l'équilibre glycémique. Les syndromes diabétiques sont caractérisés par une désensibilisation au glucose. Les variations de la glycémie ne sont pas perçues par les glucostats des diabétiques et l'ensemble des réponses physiologiques contrôlées par l'arc reflexe glucométabolique est anormal. L'hyperglycémie consécutive aggrave alors la désensibilisation au glucose.

## DÉTECTEUR DE LA VEINE HÉPATOPORTALE

Après un repas les nutriments sont absorbés par l'intestin, collectés et transportés par les capillaires mésentériques puis par la veine hépatoportale jusqu'au foie. Les nutriments sont ensuite utilisés par tous les tissus de l'organisme. Un détecteur de glucose existe dans la veine hépatoportale. Plus précisément, il a été identifié en amont du hilus hépatique [20]. Il est connecté à l'afférence hépatique du nerf vague jusqu'au tronc cérébral et à l'hypothalamus [21-23]. L'activité électrique des nerfs est inversement proportionnelle à la concentration de glucose [13, 24]. Cependant, l'activation du détecteur hépatoportal ne dépend pas seulement de la présence du glucose dans la veine hépatoportale mais de la présence d'un gradient positif de glucose entre la veine porte et l'artère hépatique [25-30]. Ainsi, chez le chien une perfusion de glucose dans la veine porte contribue à activer la synthèse du glycogène et permet d'augmenter le captage et le stockage du glucose dans le foie. Cet effet est aboli chez les chiens après dénervation. Ce mécanisme implique donc l'activation par le glucose du détecteur hépatoportal, la transmission de l'information par le nerf vague jusqu'à un centre intégrateur qui pourrait être le plexus gastrique et/ou le cerveau, puis l'activation de la synthèse du glycogène. Cet arc réflexe hépatoportal contrôle d'autres fonctions. Il contribue également à la régulation de la production d'hormones de la contre-régulation telles que les catécholamines [31, 32], à la régulation de la prise alimentaire et l'induction de l'anorexie [33, 34].

### **Le détecteur de la veine hépatoportale stimule l'utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux brun**

Une des fonctions essentielles au maintien de l'équilibre glycémique est l'utilisation du glucose par les tissus périphériques notamment le muscle squelettique. L'action du détecteur de glucose hépatoportal sur cette fonction n'avait pas été explorée jusqu'à récemment. Nous avons étudié l'action d'une perfusion de glucose par la veine hépatoportale chez la souris [35]. Nous avons perfusé du glucose par la veine hépatoportale à un débit équivalent à la production endogène de glucose. Dans ces conditions la glycémie des souris augmentait légèrement et transitoirement puis baissait de manière surprenante et très progressive (fig. 1). La

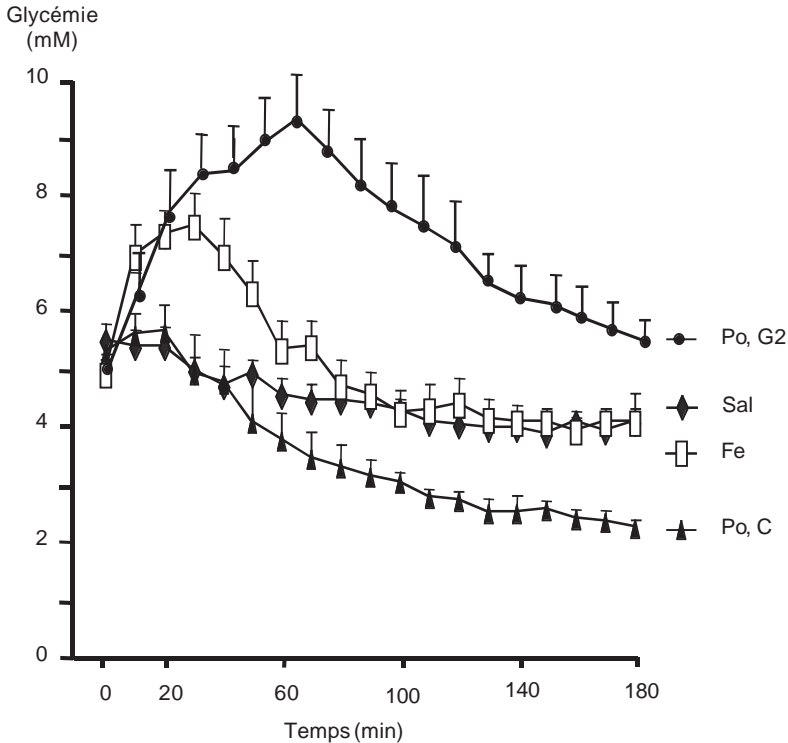


FIG. 1. — La perfusion de glucose dans la veine hépatoportale induit une hypoglycémie paradoxale. Des souris éveillées témoins (C) ou délétées du gène GLUT2 (G2) ont été perfusées avec du glucose, à un débit équivalent à la production hépatique de glucose, ou avec du NaCl (Sal) par la veine hépatoportale (Po) ou fémorale (Fe). L'hypoglycémie paradoxale des souris C perfusées avec du glucose dans la veine hépatoportale n'est pas retrouvée chez les souris G2 ni chez les souris C perfusées avec du glucose par la veine fémorale. Le GLUT2 est donc nécessaire à la détection hépatoportale du glucose. Figure adaptée de [35, 71].

glycémie était alors de 2-3 mM après 3 heures de perfusion intraveineuse. L'hypoglycémie était due à une augmentation de la clairance du glucose plutôt qu'à une inhibition de la production hépatique de glucose (fig. 2). De manière intéressante l'hypoglycémie n'était pas associée à l'augmentation du glucagon circulant ni à l'activation de la production endogène de glucose. Les mécanismes de contre-régulation étaient inhibés par le gradient hépatoportale de glucose.

Nous avons ensuite déterminé les tissus responsables de cette augmentation de clairance du glucose. Nous avons montré que dans les muscles squelettiques à fibres oxydatives du glucose l'utilisation du glucose était fortement augmentée. Ceci a été observé pour le cœur et le tissu adipeux brun également mais pas pour le tissu adipeux blanc (fig. 3). Pour analyser l'action spécifique du détecteur hépatoportale sur la clairance du glucose, des expériences similaires ont été réalisées où du glucose a été perfusé par la veine fémorale. Dans ces conditions, la clairance du glucose était légèrement augmentée (voir fig. 2). Un épisode hyperglycémique plus marqué est observé qui est probablement responsable de l'activation d'autres

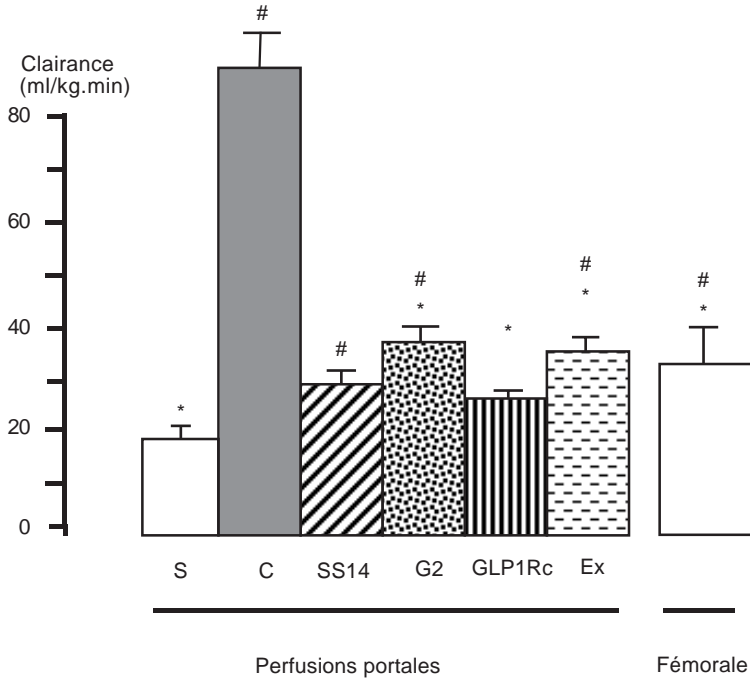


FIG. 2. — La perfusion de glucose dans la veine hépatoportale augmente la clairance du glucose. Des souris éveillées témoins (C) ou délétées du gène GLUT2 (G2), ou du gène du récepteur au GLP-1 (GLP1Rc), ont été perfusées avec du glucose seul (C), ou avec de la somatostatine 14 (SS14), ou avec de l'exendine 9-39 (Ex), ou avec du NaCl (S) par la veine hépatoportale ou fémorale. L'augmentation de la clairance du glucose en réponse à la perfusion hépatoportale du glucose est inhibée en présence de SS14, d'Ex, ou en absence du G2, ou du GLP1Rc. \* représente une différence significative  $< 0,05$  en comparaison avec les souris C. # représente une différence significative en comparaison avec les souris S  $< 0,05$ . Figure adaptée de [35, 71, 72].

détecteurs du glucose, notamment cérébraux. Les signaux émis par le détecteur hépatoportal en réponse à son activation par le glucose et responsables de l'augmentation de la clairance du glucose par les muscles sont encore inconnus mais probablement d'origine nerveuse. L'insuline ne semble pas responsable de cette activation. La concentration d'insuline double au cours de la perfusion de glucose dans la veine hépatoportale. Cette observation est probablement due à l'effet du glucose sur l'arc reflexe porto-pancréatique. Cependant, l'insulinémie est également doublée lors de la perfusion du glucose par la veine fémorale.

### Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de l'augmentation de la clairance du glucose lors de l'activation du détecteur hépatoportal du glucose ?

Nos résultats initiaux suggèrent que l'insuline n'est pas impliquée dans l'augmentation de la clairance du glucose ou ne l'est que partiellement. La preuve expérimentale a été obtenue en utilisant des souris génétiquement modifiées. Chez des

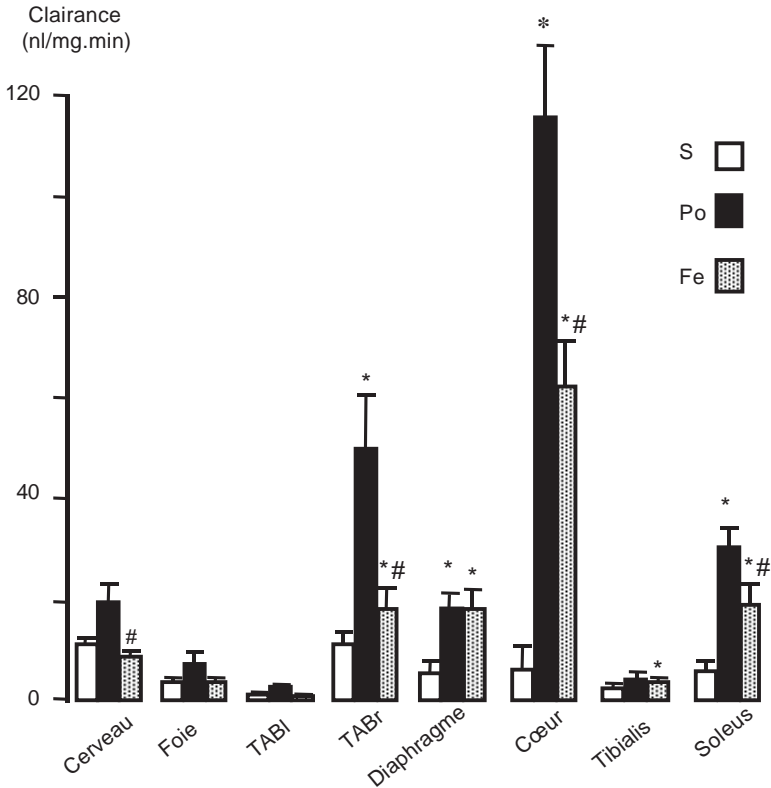


FIG. 3. — La perfusion de glucose dans la veine hépatoportale augmente la clairance du glucose par certains muscles et par le tissu adipeux brun. Des souris éveillées témoins ont été perfusées avec du glucose, à un débit équivalent à la production hépatique de glucose, ou avec du NaCl (S) par la veine hépatoportale (Po) ou fémorale (Fe). La clairance du glucose a été mesurée dans le cerveau, le foie, le tissu adipeux brun (TABr) et blanc (TABl), le cœur, le muscle squelettique glycolytique Tibialis et oxydatif Soleus. L'augmentation de la clairance du glucose en réponse à la perfusion de glucose par la veine hépatoportale est fortement marquée dans le tissu adipeux brun, le cœur, le diaphragme et le soleus. La perfusion de glucose par la veine fémorale induit également une augmentation de la clairance du glucose mais nettement moins marquée. \* représente une différence significative  $< 0,05$  en comparaison avec les souris S. # représente une différence significative en comparaison avec les souris Po  $< 0,05$ . Figure adaptée de [35].

souris dont le gène du récepteur de l'insuline a été délété spécifiquement du muscle par recombinaison homologue (souris MIRKO, [36]) la clairance du glucose en réponse à la perfusion du glucose par la veine hépatoportale est augmentée de manière similaire aux souris témoins (J Clin Invest 2003, sous presse). Ces résultats démontrent qu'un autre système d'activation que l'insuline est responsable. Il pourrait s'agir de neuromédiateurs libérés lors de l'activation du système nerveux autonome en réponse au glucose et qui activeraient le transport du glucose par les muscles et le tissu adipeux brun. Ces hypothèses restent cependant à démontrer.

Nous avons ensuite analysé les mécanismes intracellulaires qui pouvaient, dans le muscle, être responsables de l'augmentation du transport du glucose. Dans le muscle le transport du glucose est assuré par l'isoforme GLUT4 des transporteurs de glucose. Cette isoforme était jusqu'à récemment considérée comme l'unique système de transport du glucose dans le muscle [37]. L'augmentation du transport de glucose par GLUT4 nécessite sa translocation d'un pool de transporteurs d'un compartiment intracytoplasmique vers la membrane plasmique. Après fusion des vésicules contenant GLUT4 avec la membrane plasmique, le transport du glucose est alors réalisé dans le sens du gradient du glucose vers le cytoplasme. Cependant, des travaux récents ont démontré la présence d'une autre isoforme GLUT8 (GLUTX1) dans le muscle [38]. Afin de déterminer si GLUT4 est l'isoforme responsable du transport du glucose dans le muscle lors de l'activation du détecteur hépatoportal nous avons étudié des souris dont le transporteur de glucose GLUT4 a été génétiquement délété. Le transport du glucose était réduit de 60 à 80 % dans les muscles des souris GLUT4 mutantes par rapport aux souris témoins lors de la perfusion de glucose dans la veine hépatoportale (J Clin Invest 2003, sous presse) ce qui démontre que GLUT4 est principalement impliqué. Les mécanismes indépendants de l'insuline qui contribuent à la translocation de GLUT4 sont la contraction et l'hypoxie. Ces stimuli activent une enzyme, l'AMP-activated kinase (AMPK) [39, 40]. Nous avons étudié des souris dont l'activité de l'AMPK est abolie par l'expression d'un transgène mutant dominant (AMPKDN) [41]. Chez les souris AMPKDN l'activation du senseur hépatoportal du glucose n'augmentait pas le transport du glucose dans le muscle (J Clin Invest 2003, sous presse). L'activation du détecteur de glucose de la veine hépatoportale envoie un signal probablement d'origine nerveuse vers les muscles activant l'AMPK, ce qui pourrait induire la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et augmenter le transport de glucose. Ainsi, après un repas l'activation du détecteur de glucose hépatoportal représente une première étape importante permettant le maintien de l'équilibre glycémique en contrôlant de nombreuses fonctions dont l'utilisation du glucose par les muscles. D'un point de vue thérapeutique, la compréhension des mécanismes permettant d'augmenter le transport du glucose sans utiliser l'insuline représenterait une stratégie thérapeutique intéressante. En effet, ces thérapies pourraient alors être parfaitement fonctionnelles chez l'ensemble des diabétiques dont la résistance à l'insuline représente un problème thérapeutique important.

### **Quels sont les mécanismes moléculaires responsables de la détection du glucose par le senseur de la veine hépatoportale ?**

Les cellules possédant un glucostat qui ont été les plus largement étudiées sont les cellules  $\beta$  sécrétrices d'insuline [42]. Après l'absorption orale de glucose l'insuline est sécrétée dans le sang en fonction de la glycémie. Le mécanisme correspondant nécessite l'entrée du glucose dans la cellule par le transporteur de glucose GLUT2 pour y être phosphorylé par la glucokinase puis oxydé par la mitochondrie. Puis lors de l'oxydation du glucose, l'augmentation de la concentration d'ATP intracellulaire induit la fermeture des canaux potassiques Kir 6,2 sensibles à l'ATP. Ce dernier mécanisme déclenche une dépolarisation membranaire, l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage et la sécrétion d'insuline. De nombreuses autres molécules interviennent dans le contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. De nombreuses autres hormones, des neuromédiateurs et

certaines métabolites contrôlent cette fonction dont le mécanisme régulateur est en cours d'élucidation.

Par contre les mécanismes moléculaires responsables de la détection du glucose par la veine hépatoportale sont peu connus mais pourraient être similaires à ceux de la cellule  $\beta$ .

Nous avons entrepris l'analyse moléculaire des composants du système de détection de la veine hépatoportale en utilisant des souris génétiquement modifiées. Chez les souris délétées du transporteur de glucose GLUT2, du glucose a été perfusé par la veine hépatoportale et la clairance du glucose a été mesurée. Ce paramètre n'était que très légèrement augmenté par la perfusion de glucose par rapport à la valeur obtenue chez les souris témoins ce qui montre que GLUT2 est une composante nécessaire au glucostat de la veine hépatoportale (voir fig. 2). De manière similaire, la somatostatine, qui est un inhibiteur de la sécrétion d'insuline sécrétée dans la veine hépatoportale par le pancréas, est également un inhibiteur du glucostat hépatoportal car l'augmentation de la clairance du glucose est prévenue par la perfusion simultanée de somatostatine (voir fig. 2). Des récepteurs à la somatostatine ont d'ailleurs été observés dans des renflements cellulaires de l'endothélium de la veine hépatoportale [43-45].

Parmi les mécanismes moléculaires contrôlant la sécrétion d'insuline les gluco-incrétones sont des hormones importantes [46]. Le *Glucagon Like Peptide-1* (GLP-1) et le *Glucose Dependent Insulinotropic Polypeptide* (GIP) potentialisent la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras. Outre la sécrétion d'insuline ces hormones contrôlent de nombreuses fonctions telles que la prise alimentaire, la vidange gastrique, les sécrétions d'acide gastrique. Ces hormones sont libérées dans la veine hépatoportale par les cellules épithéliales de l'intestin en réponse à un repas riche en sucres et lipides. Le GLP-1 notamment, plutôt que le GIP, modifie l'activité électrique du nerf vague [47-49] qui est connecté au tronc cérébral [50]. Une des caractéristiques importantes de ces peptides est la demi-vie plasmatique très courte, inférieure à une à deux minutes [51]. Ainsi, pour le GLP-1, près de 80-90 % du peptide sécrété sont dégradés par les cellules adjacentes aux cellules endothéliales des capillaires mésentériques sanguins [51]. Ces résultats suggèrent que le site d'action des gluco-incrétones doit être proximal au site de production, la cellule  $\beta$  étant un site distal qui nécessite une distribution de l'hormone par l'artère pancréatique. Nous avons ainsi suggéré qu'une des cibles de l'action des gluco-incrétones est le glucostat de la veine hépatoportale. Cependant, le GLP-1 perfusé n'augmente pas la clairance du glucose de souris perfusées avec du glucose dans la veine hépatoportale. Par contre, une perfusion portale de l'antagoniste du récepteur, l'exendine 9-39, prévient l'augmentation de la clairance induite par perfusion portale du glucose (voir fig. 2). Ce mécanisme dépend des récepteurs au GLP-1 présents dans la veine hépatoportale car la perfusion de l'antagoniste par la veine fémorale ne produit pas cet effet inhibiteur. En effet, des souris dont le gène du récepteur a été génétiquement délété sont caractérisées par une absence de stimulation du glucostat hépatoportal par le glucose (voir fig. 2). Nos résultats montrent que l'activité intrinsèque du récepteur et/ou la concentration circulante basale de GLP-1 suffisent à maintenir un état de compétence du glucostat hépatoportal. Un des sites extrapancréatiques d'action glucorégulatrice du GLP-1 est donc le glucostat de la veine hépatoportale. Cependant, aucun effet du GIP n'a été observé en étudiant des souris délétées du récepteur au GIP (résultats personnels).

## SÉCRÉTION DU GLUCAGON

La sécrétion du glucagon est une réponse immédiate, en quelques minutes, à la survenue d'une hypoglycémie expérimentale par injection d'insuline. Ainsi, cette hormone de la contre-régulation est sécrétée dans toutes les situations physiologiques associées à une hypoglycémie [52, 53]. Une sécrétion excessive de glucagon est également présente dans l'ensemble des syndromes diabétiques [54, 55]. Cependant, la sécrétion du glucose bien qu'excessive est anormalement contrôlée [56] et n'est pas induite au cours d'hypoglycémies obtenues par surdosage de l'insulinothérapie chez les diabétiques de type 1 [57]. Ceci représente une limitation très importante de l'action thérapeutique de l'insuline due aux effets délétères de l'hypoglycémie. Les mécanismes moléculaires responsables de la régulation de la sécrétion de glucagon ne sont pas connus. Cependant, il existe un contrôle direct de la sécrétion qui a été mis en évidence en utilisant des pancréas perfusés *in vitro* [58]. L'effet direct du glucose est également retrouvé en utilisant des îlots de Langerhans isolés [59] et semble permissif pour la sécrétion de glucagon en réponse aux autres sécrétagogues tels les acides aminés et les lipides. Toutefois, la présence d'un glucostat directement dans les cellules alpha est encore contestée car les effets *in vitro* ne sont pas toujours retrouvés. Le glucostat serait alors présent dans le système nerveux du pancréas lui-même. Le glucostat pancréatique aurait des composantes moléculaires communes avec des molécules qui participent à la détection du glucose par les cellules  $\beta$  telles que la glucokinase et les canaux potassiques sensibles à l'ATP [60, 61]. Une des différences importantes avec les cellules  $\beta$  est que les cellules alpha n'expriment pas le transporteur GLUT2 [62]. La régulation de la sécrétion de glucagon au cours d'épisodes hypoglycémiques est également sous le contrôle des axes sympatho-adrénergique et parasympatho-adrénergique du système nerveux autonome [63, 64]. Sur la cellule alpha la plupart des molécules libérées par le système nerveux autonome stimulent la sécrétion de glucagon et activent des récepteurs muscariniques, adrénérergiques, ou peptidergiques. Les extrémités nerveuses parasympathiques libèrent de l'acétylcholine, de la cholécystokinine, du GRP et les extrémités sympathiques libèrent de l'adrénaline, du NPY et de la galanine [59, 64, 65]. L'activation du système nerveux autonome pour le contrôle de la sécrétion de glucagon dépend de glucostats présents dans différentes parties de l'organisme telles que dans la veine hépatoportale et certains noyaux hypothalamiques du cerveau. Une hypoglycémie induite par perfusion d'insuline chez des chiens stimule la sécrétion de catécholamines et de glucagon. Cet effet est totalement inhibé par l'activation du glucostat hépatoportal en réponse à une perfusion concomitante de glucose [20, 32]. Nous avons montré également que l'hypoglycémie induite par l'augmentation de la clairance du glucose en réponse à l'activation du glucostat hépatoportal ne stimule pas la sécrétion de glucagon [35]. Dans le cerveau la sécrétion du glucagon est essentiellement sous le contrôle des noyaux ventromédians et latéraux de l'hypothalamus [4, 6, 66, 67]. Le mécanisme moléculaire de détection du glucose n'est pas entièrement connu. Ces neurones augmentent la sécrétion de glucagon en activant ou inhibant leur activité électrique. Celle-ci est également sous le contrôle de neurones présents dans le noyau du tractus solitaire (NTS) et arc (Arc). Ces deux noyaux sont directement au contact des variations de la glycémie sanguine. Des projections axoniques vers les noyaux latéraux et paraventriculaires ont été observées [5, 6, 68, 69].

Parmi les mécanismes moléculaires responsables de la sensibilité au glucose des cellules  $\beta$  le transporteur de glucose GLUT2 a été démontré comme étant un des principaux régulateurs [70]. Nous avons alors analysé le rôle de GLUT2 dans le contrôle de la sécrétion de glucagon. Des souris témoins et délétées pour le gène correspondant ont été perfusées avec du glucose et de l'insuline pour maintenir la glycémie constante à une valeur choisie par l'expérimentateur pendant 3 heures (fig. 4). Dans ces conditions expérimentales la sécrétion du glucagon augmente chez les souris maintenues en hypoglycémie et diminue chez les souris maintenues en hyperglycémie (fig. 5). Cette régulation n'est pas observée chez les souris GLUT2 mutantes démontrant le rôle régulateur de GLUT2. La sécrétion de glucagon

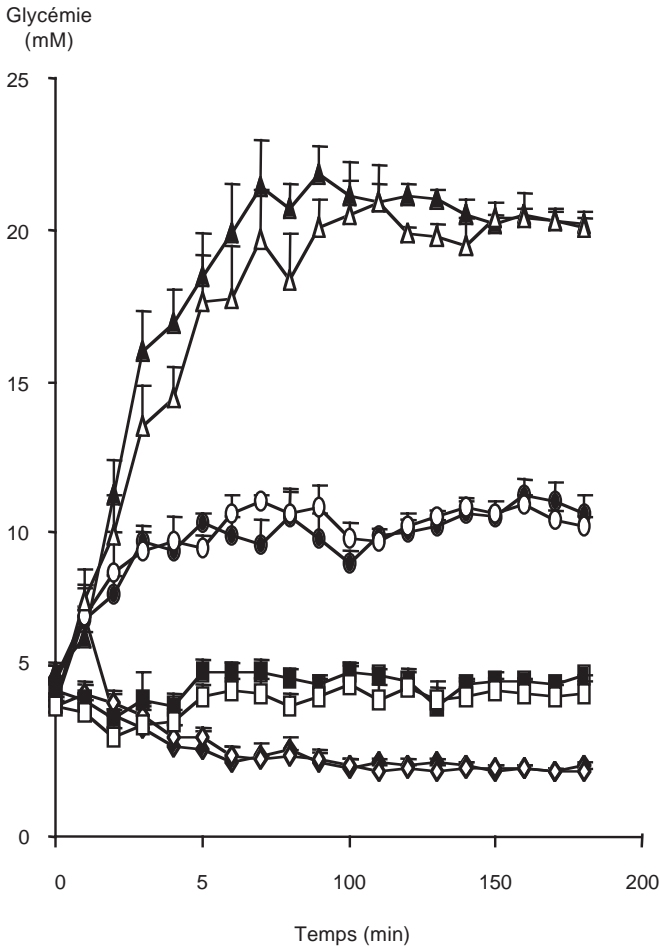


FIG. 4. — Plateaux glycémiques au cours de clamps hyperinsulinémiques et hyperglycémiques. Des souris éveillées Témoins (blanc) et délétés pour le gène GLUT2 (noir) sont perfusées avec du glucose par la veine fémorale pour maintenir dans le temps des plateaux glycémiques de valeur déterminée par l'expérimentateur. Les valeurs moyennes des glycémies obtenues sont 2,5 ; 5,5 ; 10 ; et 20 mM pour les deux groupes de souris. Figure adaptée de [73].

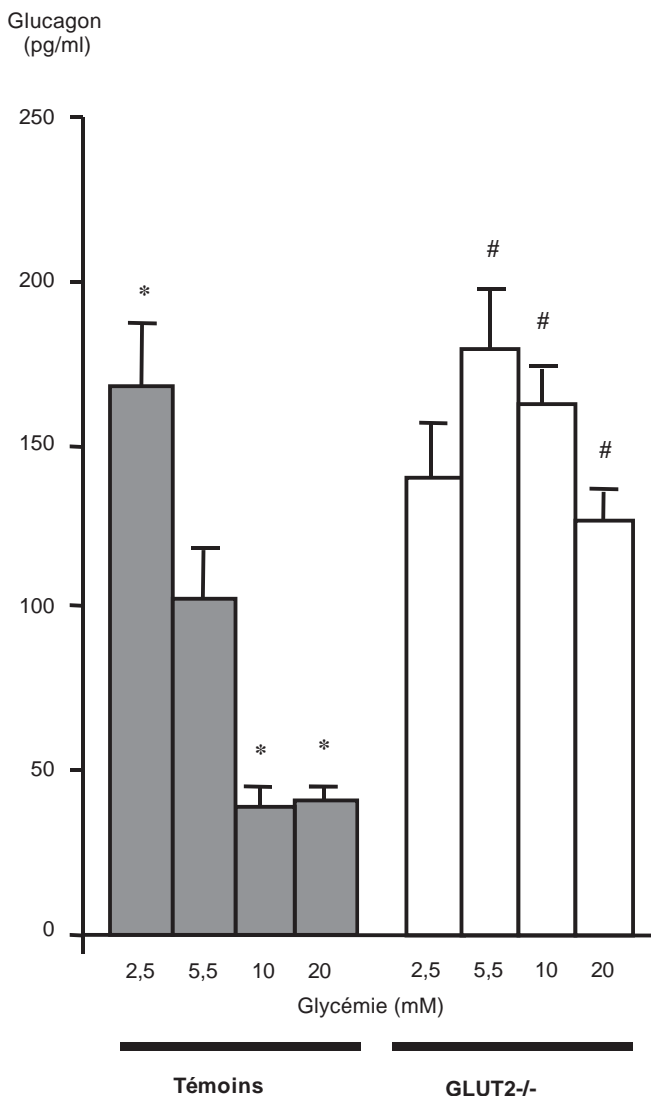


FIG. 5. — La glucagonémie des souris GLUT2 n'est plus contrôlée par les variations de la glycémie. La glycémie de souris éveillées Témoins et délétés pour le gène GLUT2 ( $-/-$ ) est maintenue à une valeur moyenne de 2,5 ; 5,5 ; 10 ; ou 20 mM. La glucagonémie est mesurée après 180 de perfusion. Dans ces conditions expérimentales et en absence de GLUT2 la sécrétion de glucagon n'est plus une fonction de la glycémie. \* représente une différence significative  $< 0,05$  en comparaison avec les souris Témoins à 5,5 mM. # représente une différence significative  $< 0,05$  en comparaison avec les souris Témoins de glycémie correspondante. Figure adaptée de [73].

pouvait être cependant induite si la glycémie était inférieure à 2,5 mM, suggérant que d'autres mécanismes de détection du glucose sont mis en jeu. Une des caractéristiques importantes de ces souris mutantes est que la glucagonémie à jeun est

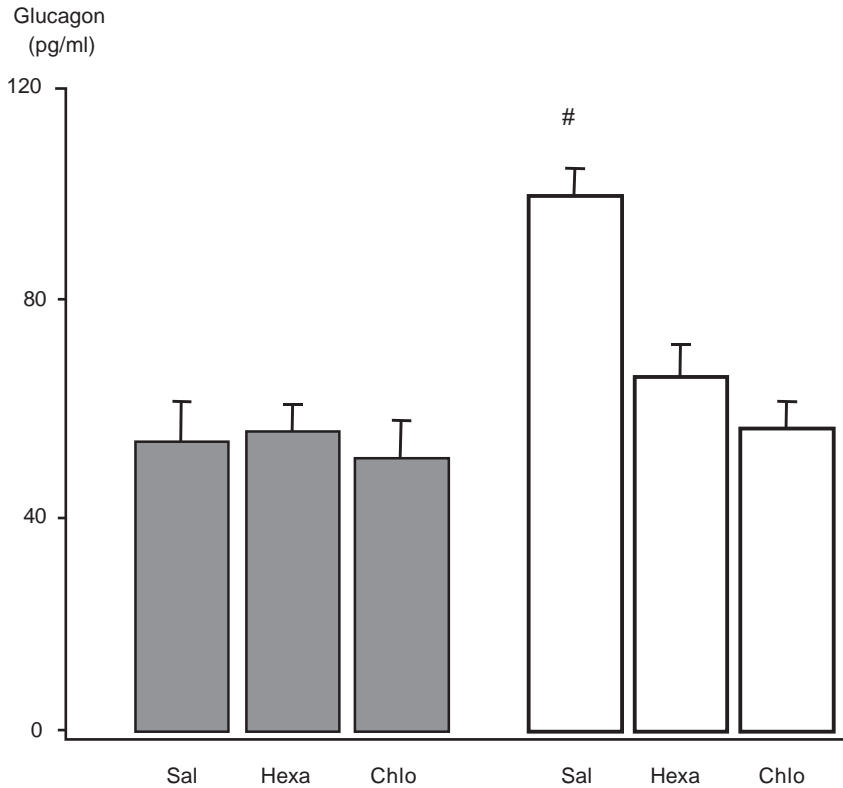


FIG. 6. — Une activité excessive du système nerveux autonome contrôle l'hyperglucagonémie des souris GLUT2. La glucagonémie des souris témoins (gris) et délétés pour le gène GLUT2 (blanc) a été mesurée à l'état nourri 30 minutes après l'injection de NaCl (Sal) ou de bloqueur ganglionnaires (Hexa : hexaméthonium, ou Chlorisondamine : Chlo). \* représente une différence significative  $< 0,05$  en comparaison avec les souris Témoins correspondantes. Figure adaptée de [73].

supérieure à celles des souris témoins, suggérant qu'en absence de GLUT2 une stimulation permanente des cellules alpha existe. Celle-ci pourrait être reliée à l'effet stimulant du système nerveux autonome. Nous avons alors bloqué le système nerveux autonome avec un agent pharmacologique agissant sur les ganglions nerveux afin d'inhiber le tonus adrénergique et cholinergique. Dans ces conditions l'hyper-sécrétion de glucagon est normalisée chez les souris mutantes (fig. 6). Nos résultats montrent donc qu'un influx nerveux inhibiteur de la sécrétion de glucagon nécessite la présence de GLUT2.

## CONCLUSION

L'étude des mécanismes moléculaires responsables de la détection des variations glycémiques a été rendue possible grâce à la mise au point, chez la souris génétiquement modifiée, de techniques d'exploration fonctionnelle appropriées.

Nous avons largement utilisé ces techniques pour démontrer le rôle de GLUT2 chez le rongeur et définir partiellement les composantes moléculaires du glucostat de la veine hépatoportale et de celui responsable de la sécrétion de glucagon. Des études similaires sont en cours pour démontrer le rôle d'autres molécules. L'agueusie des diabétiques pour le glucose sanguin est un problème thérapeutique important car la cascade des mécanismes physiologiques initiée par les glucostats n'est plus réalisée. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la détection du glucose permettra de définir des stratégies thérapeutiques plus appropriées pour contrôler la glycémie des diabétiques.

*Remerciements* : Je tiens à remercier le Professeur Bernard Thorens de l'université de Lausanne qui m'a permis d'initier ces travaux et de discuter largement les résultats. Ce travail a également été réalisé avec la précieuse aide technique de Wanda Dolci et Anabela DaCosta. La réalisation de ces travaux a été rendue possible grâce à des subsides financiers pour la recherche provenant de la Juvenile Diabetes Foundation, du Fonds National de la Recherche Scientifique Suisse, et de l'AFEDIAM-Smithkline Beecham.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BERNARD C. Chiens rendus diabétiques. CR Soc Biol, 1849, 1 : 60.
2. MAYER J. Regulation of energy intake and the body weight : the glucostatic and lipostatic hypothesis. Ann NY Acad Sci, 1955, 63 : 15-24.
3. OOMURA Y, ONO T, OYAMA H et al. Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. Nature, 1969, 222 : 282-284.
4. OOMURA Y, OYAMA H, SUGIMORI M et al. Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. Nature, 1974, 247 : 284-286.
5. ORSINI JC, HIMMI T, WISER AK et al. Local versus indirect action of glucose on the lateral hypothalamic neurons sensitive to glycemic level. Brain Res Bull, 1990, 25 : 49-53.
6. HIMMI T, BOYER A, ORSINI JC. Changes in lateral hypothalamic neuronal activity accompanying hyper and hypoglycemia. Physiology & Behavior, 1998, 44 : 347-354.
7. DALLAPORTA M, HIMMI T, PERRIN J et al. Solitary tract nucleus sensitivity to moderate changes in glucose level. Neuroreport, 1999, 10 : 2657-2660.
8. DALLAPORTA M, PERRIN J, ORSINI JC. Involvement of adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in glucose-sensing in the rat solitary tract nucleus. Neurosci Letters, 2000, 278 : 77-80.
9. YETTEFTI K, ORSINI JC, EL OUZZANI T. Sensitivity of nucleus tractus solitarius neurons to induced moderate hyperglycemia, with special reference to catecholaminergic region. J Auton Nerv Syst, 1995, 51 : 191-197.
10. MIZUNO Y, OOMURA Y. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat : in vitro study. Brain Res, 1984, 307 : 109-116.
11. SAKAGUCHI T, SATO Y. D-glucose anomers in the nucleus of the tractus solitarius can reduce gastric acid secretion of rats. Exp Neurol, 1987, 95 : 525-529.
12. KOYAMA Y, COKER RH, STONE EE et al. Evidence that carotid bodies play an important role in glucoregulation in vivo. Diabetes, 2000, 49 : 1434-1442.
13. NIJIMA A. Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. Ann NY Acad Sci USA, 1969, 157 : 690-700.
14. NIJIMA A. Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea-pig. J Physiol, 1982, 332 : 315-323.
15. CIUDAD CJ, CARABAZA A, BOSCH F et al. Glycogen synthase activation by sugars in isolated hepatocytes. Arch Biochem Biophys, 1988, 264 : 30-39.

16. GIRARD J, FERRÉ P, FOUFELLE F. Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes. *Annu Rev Nutr*, 1997, 17 : 325-352.
17. BIGGERS DW, MYERS SR, NEAL D et al. Role of brain in counterregulation of insulin-induced hypoglycemia in dogs. *Diabetes*, 1989, 38 : 7-16.
18. MISELIS R, EPSTEIN A. Feeding induced by intracerebroventricular 2-deoxyglucose in the rat. *Am J Physiol*, 1975, 229 : 1438-1447.
19. OOMURA Y, OOYAMA H, YAMAMOTO T et al. Neuronal mechanism of feeding. *Prog Brain Res*, 1967, 27 : 1-33.
20. HEVENER AL, BERGMAN RN, DONOVAN CM. Novel glucosensor for hypoglycemic detection localized to the portal vein. *Diabetes*, 1997, 46 : 1521-1525.
21. MARTIN JR, NOVIN D, VANDERWEELE DA. Loss of glucagon suppression of feeding after vagotomy in rats. *Am J Physiol*, 1978, 234 : 314-318.
22. SHIMIZU N, OOMURA Y, NOVIN D et al. Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in rat. *Brain Res*, 1983, 265 : 49-54.
23. SCHMITT M. Influence of hepatic portal receptors on hypothalamic feeding and satiety centers. *Am J Physiol*, 1973, 225 : 1089-1095.
24. NIJIMA A. The effect of D-glucose on the firing rate of glucose-sensitive vagal afferents in the liver in comparison with the effect of 2-deoxy-D-glucose. *J Auton Nerv Syst*, 1984, 10 : 255-260.
25. JUNGERMANN K. Control of liver function by the autonomic liver nerves. *Biochem Soc Transactions*, 1987, 15 : 365-368.
26. JUNGERMANN K, GARDEMANN A, BEUERS U et al. Regulation of liver metabolism by the hepatic nerves. *Adv Enzyme Regulation*, 1987, 26 : 63-88.
27. GARDEMANN A, STRULIK H, JUNGERMANN K. A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver. *FEBS*, 1986, 202 : 255-259.
28. STUMPEL F, JUNGERMANN K. Sensing by intrahepatic muscarinic nerves of a portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for insulin-dependent glucose uptake in the perfused rat liver. *FEBS Letters*, 1997, 406 : 119-122.
29. MYERS SR, BIGGERS DW, NEAL DW et al. Intraportal glucose delivery enhances the effects of hepatic glucose load on net hepatic glucose uptake in vivo. *J Clin Invest*, 1991, 88 : 158-167.
30. PAGLIASSOTTI MJ, MYERS SR, MOORE MC et al. Magnitude of negative arterial-portal glucose gradient alters net hepatic glucose balance in conscious dogs. *Diabetes*, 1991, 40 : 1659-1668.
31. DONOVAN CM, HALTER JB, BERGMAN RN. Importance of hepatic glucoreceptors in sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes*, 1991, 40 : 155-158.
32. HEVENER A, BERGMAN R, DONOVAN C. Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes*, 2000, 49 : 8-12.
33. RUSSEK M. Participation of hepatic glucoreceptors in the control of intake of food. *Nature*, 1963, 197 : 79-80.
34. RUSSEK M. Demonstration of the influence of an hepatic glucosensitive mechanism on food-intake. *Physiol Behav*, 1970, 10 : 1207-1209.
35. BURCELIN R, DOLCI W, THORENS B. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia. Evidence that the hepatportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes*, 2000, 49 : 1635-1642.
36. BRUNING J, DODSON M, WINNAY J et al. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 1998, 2 : 559-569.
37. KAHN BB. Lilly lecture 1995. Glucose transport : pivotal step in insulin action. *Diabetes*, 1996, 45 : 1644-1654.
38. IBBERSON M, ULDRY M, THORENS M. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem*, 2000, 275 : 4607-4612.
39. FUJII N, HAYASHI T, HIRSHMAN MF et al. Exercise induces isoform-specific increase in 5' AMP-activated protein kinase activity in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273 : 1150-1155.
40. KURTH-KRACZEK EJ, HIRSHMAN MF, GOODYEAR LJ et al. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 1999, 48 : 1667-1671.

41. MU J, BROZINICK JT JR, VALLADARES O et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*, 2001, 7 : 1085-1094.
42. MATSCHINSKY FM. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase paradigm. *Diabetes*, 1996, 45 : 223-241.
43. NAKABAYASHI H, NIJIMA A, KURATA Y et al. Pancreatic vagal nerve is receptive to somatostatin in rats. *Am J Physiol*, 1987, 253 : R200-R203.
44. NAKABAYASHI H, KOBAYASHI K, NAKABAYASHI I et al. Somatostatin receptor on the afferent nerve terminals in the rat hepatoportal area. *Neurosci Lett*, 1995, 183 : 46-49.
45. NAKABAYASHI H. Neural monitoring system for circulating somatostatin in the hepatoportal area. *Nutrition*, 1997, 13 : 225-229.
46. HOLST JJ. Enteroglucagon. *Ann Rev Physiol*, 1997, 59 : 257-271.
47. NAKABAYASHI H, NISHIZAWA M, NAKAGAWA A et al. Vagal hepatopancreatic reflex effect evoked by intraportal appearance of tGLP-1. *Am J Physiol*, 1996, 271 : E808-E813.
48. NISHIZAWA M, NAKABAYASHI H, KAWAI K et al. The hepatic vagal reception of intraportal GLP-1 is via receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor. *J Auton Nerv Syst*, 2000, 80 : 14-21.
49. NISHIZAWA M, NAKABAYASHI H, UCHIDA K et al. The hepatic vagal nerve is receptive to incretin hormone glucagon-like peptide-1, but not to glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in the portal vein. *J Auton Nerv Syst*, 1996, 61 : 149-154.
50. ADACHI A, SHIMIZU N, OOMURA Y et al. Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci Letters*, 1984, 46 : 215-218.
51. HANSEN L, DEACON C, ORSKOV C et al. Glucagon like peptide-1- (7-36) amide is transformed to glucagon like peptide -1- (9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*, 1999, 140 : 5356-5363.
52. UNGER RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia*, 1985, 28 : 574-578.
53. UNGER RH, ORCI L. Physiology and pathophysiology of glucagon. *Physiol Rev*, 1976, 56 : 778-826.
54. UNGER RH, ORCI L. The role of glucagon in the endogenous hyperglycemia of diabetes mellitus. *Ann Rev Med*, 28 : 119-130.
55. UNGER RH, ORCI L. The role of glucagon in diabetes. *Comprehensive Therapy*, 1982, 8 : 53-59.
56. TABORSKY GJ, AHREN B, HAVEL PJ. Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia : implications for impaired alpha-cell responses in type I diabetes. *Diabetes*, 1998, 47 : 995-1005.
57. BOLLI G, FDE FEO P, COMPAGNUCCI P et al. Abnormal glucose counterregulation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 1983, 32 : 134-141.
58. WEIR G, KNOWLTON S, MARTIN D. Glucagon secretion from the perfused rat pancreas. Studies with glucose and catecholamines. *J Clin Invest*, 1974, 54 : 1403-1412.
59. PIPELEERS DG, SCHUIT FC, VAN SCHRAVENDIJK CF et al. Interplay of nutrients and hormones in the regulation of glucagon release. *Endocrinology*, 1985, 117 : 817-823.
60. HEIMBERG H, DE VOS A, MOENS K et al. The glucose sensor protein glucokinase is expressed in glucagon-producing a cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 : 7036-7041.
61. SUZUKI M, FUJIKURA K, KOTAKE K et al. Immuno-localization of sulphonylurea receptor I in rat pancreas. *Diabetologia*, 1999, 42 : 1204-1211.
62. HEIMBERG H, DE VOS A, PIPELEERS D et al. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic alpha- and beta-cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem*, 1995, 270 : 8971-8975.
63. AHREN B, TABORSKY G, PORTE D. Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia*, 1986, 29 : 827-836.
64. HAVEL P, TABORSKY G. The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress. *Endocrine Rev*, 1989, 10 : 332-350.
65. SCHUIT FC, PIPELEERS DG. Differences in adrenergic recognition by pancreatic A and B cells. *Science*, 1986, 232 : 875-877.
66. OOMURA Y, YOSHIMATSU H. Neural network of glucose monitoring system. *J Auton Nerv Syst*, 1984, 10 : 359-372.

67. MINAMI T, OOMURA Y, SUGIMORI M. Electrophysiological properties and glucose responsiveness of guinea-pig ventromedial hypothalamic neurones in vitro. *J Physiol*, 1986, 380 : 127-143.
68. PIERRET P, HADDJERI N, BOYER A et al. Alpha 2-adrenoceptors are involved in lateral hypothalamic unit responses to hyperglycemia. *J Physiol*, 1994, 88 : 89-90.
69. ORSINI JC, WISER A, HIMMI T et al. Sensitivity of lateral hypothalamic neurons to glycemic level : possible involvement of an indirect adrenergic mechanism. *Brain Res Bull*, 1991, 26 : 473-478.
70. GUILLAM M, HUMMLER E, SCHAERER E et al. Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking *Glut2*. *Nat Genet*, 1997, 17 : 327-330.
71. BURCELIN R, DOLCI W, THORENS B. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT-2 dependent. In vivo analysis in GLUT-2null mice. *Diabetes*, 2000, 49 pages.
72. BURCELIN R, DACOSTA A, DRUCKER D et al. Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated GLP1 receptor. *Diabetes*, 2001, 50 : 1720-1728.
73. BURCELIN R, THORENS B. Glucagon secretion is predominantly controlled by extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors. *Diabetes*, 2001, 50 : 1282-1289.