

Université de Montréal

**RÔLE DU MÉTABOLISME HÉPATIQUE DANS LA MODULATION DE
RÉPONSES ENDOCRINIENNES.**

par

Raynald Bergeron
Département d'éducation physique

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en **Sciences de l'activité physique**

octobre 1997

© Raynald Bergeron, 1997.



6V
201
U54
1998
V.003

Université de Montréal

RÉSONANCES ÉLECTROCARDIOGRAPHIQUES
RÔLE DE NITRATÉ BOHMIEN RÉPÉTITIVE DANS LA MODULATION DE

PHD

Département d'éducation physique
Havard, Québec

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophie Doctor (Ph.D.)
en Sciences de l'activité physique

octobre 1997



© Université de Montréal, 1997

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**RÔLE DU MÉTABOLISME HÉPATIQUE DANS LA MODULATION DE
RÉPONSES ENDOCRINIENNES.**

présentée par

Raynald Bergeron

Département d'éducation physique

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Luc Léger: Président du jury

Jean-Marc Lavoie: Directeur de recherche

Phillip F. Gardiner: Membre du jury

Angélo Tremblay: Examineur externe

Gérald van de Werve: Représentant du doyen

Thèse acceptée le:

19. 12. 1997

SOMMAIRE

Certains auteurs ont démontré l'implication du foie dans la régulation de la prise alimentaire (Tordoff et coll., 1989; Langhans et Scharrer 1987b). Le foie a aussi la capacité d'influencer la sécrétion de l'insuline et des catécholamines. Par exemple, le rôle de l'innervation hépatique sur la sécrétion d'insuline a pu être démontré lors d'infusions intraportales de glucose et d'acides aminés (Sakaguchi et Hayashi, 1981; Tanaka et coll., 1990b) ainsi qu'à l'exercice (Lavoie et coll., 1989; Cardin et coll., 1994). La pleine expression de la réponse sympatho-surrénalienne lors d'une hypoglycémie induite par l'insuline nécessite la participation du foie (Donovan et coll., 1991; Hamilton-Wessler et coll., 1993; Lamarche et coll., 1996). Les résultats des études mentionnées dans ce paragraphe suggèrent l'existence d'arcs réflexes hépato-pancréatique et hépato-médullo-surrénalien pouvant moduler les réponses endocriniennes dans certaines situations. Très peu d'information est disponible afin d'expliquer comment un certain état métabolique hépatique peut influencer la sécrétion de l'insuline et des catécholamines. Les études faisant l'objet de cette thèse avaient pour objectif d'investiguer l'un des mécanismes hépatiques pouvant être à l'origine d'un signal provenant du foie et d'étudier deux des situations dans lesquelles le foie pourrait influencer une réponse endocrinienne.

Les pompes sodium-potassium hépatiques pourraient constituer un facteur reliant l'activité métabolique du foie à un signal afférent d'origine hépatique ayant la capacité de modifier une réponse physiologique tel que démontré par Langhans et Scharrer (Langhans et Scharrer, 1987b). La première étude de cette thèse consistait à vérifier, par l'injection d'un inhibiteur de l'activité des pompes sodium-potassium, si ces dernières pouvaient moduler la réponse sympatho-médullo-surrénalienne chez le Rat. Les résultats indiquent que l'altération de l'activité des pompes sodium-potassium au niveau hépatique peut modifier les concentrations plasmatiques de noradrénaline.

Il a été démontré récemment que l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline nécessitait une innervation pancréatique intacte suggérant donc une communication entre le pancréas et un ou plusieurs organes (Boden et coll., 1993; Luzi et coll., 1992). La deuxième étude examinait la possibilité que l'insuline puisse inhiber sa propre sécrétion via une action au niveau du foie. Il

est conclut que le foie ne semble pas impliqué dans l'autorégulation de l'insuline. D'autre part, l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline est plus efficace chez le Rat à jeun comparativement au Rat nourri.

Le troisième objectif de cette thèse était de vérifier si le foie pouvait contribuer à l'augmentation de la sécrétion d'insuline associée à une élévation des concentrations d'AGL (Boden et Chen, 1995; Hennes et Kissebah, 1997). D'autre part, le métabolisme du glucose est aussi altéré dans de telles conditions (Bonadonna et coll., 1989; Roden et coll., 1996). Il était donc intéressant d'examiner l'inter-relation entre la sécrétion de l'insuline et le métabolisme du glucose. Les présentes données indiquent que le foie n'est pas directement responsable de l'augmentation de la sécrétion de l'insuline induite par le glucose lorsque l'organisme est exposé à une élévation des concentrations d'AGL. Dans de telles conditions hyperlipacidémiques, la résistance périphérique à l'insuline apparaît rapidement et est compensée par l'augmentation de la sécrétion de l'insuline alors que la résistance hépatique se manifeste plus tardivement.

MOTS CLÉS: Pompes sodium-potassium, ouabaïne, nerf vague hépatique, sécrétion d'insuline, production hépatique de glucose, catécholamines, acides gras libres, émulsion de triglycérides, foie.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
DÉDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
2.1 Rôle afférent du foie et implications physiologiques	6
2.1.1 Fonctions hépatiques	8
2.1.2 Anatomie hépatique	10
2.1.2.1 Anatomie de l'innervation hépatique intrinsèque	11
2.1.2.2 Anatomie de l'innervation hépatique extrinsèque	12
2.1.3 Lien nerveux unissant le foie, le système nerveux central, le pancréas et la glande médullo-surrénale	13
2.1.4 Réponses hormonales	16
2.2 Rôle des pompes sodium-potassium du foie dans la modulation d'une réponse physiologique	19

2.2.1	Substrats et potentiel de membrane des cellules hépatiques: Effet de l'inhibition des pompes sodium-potassium	20
2.2.2	Potentiel de membrane et afférences hépatiques	21
2.2.3	Implication des pompes sodium-potassium des hépatocytes sur la prise alimentaire	23
2.2.4	Hypothèse que l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques module la réponse sympatho-médullo-surrénalienne	24
2.3	Innervation hépatique et altérations des réponses physiologiques associées à l'obésité et au diabète non-insulino-dépendant	25
2.3.1	Altération de la sécrétion de l'insuline	25
2.3.2	Altération du métabolisme hépatique du glucose	25
2.3.3	Altération de la sensibilité périphérique à l'insuline	27
2.3.4	Altération de l'autorégulation de la sécrétion d'insuline	28
2.3.4.1	Altération de l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline chez des personnes souffrant d'obésité et/ou de NIDDM	29
2.3.4.2	Mécanisme régulateur médié par voie nerveuse	30
2.3.4.3	Hypothèse que l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline est modulée par un réflexe hépato-pancréatique	30
2.4.	Rôle du foie et troubles métaboliques associés à une élévation des concentrations plasmatiques d'AGL.	31
2.4.1	Diminution de la clairance de l'insuline	33
2.4.2	Augmentation de la production de glucose hépatique	34
2.4.3	Augmentation de la résistance périphérique à l'insuline	36
2.4.4	Augmentation de la sécrétion de l'insuline	38
2.4.5	Hypothèse suggérant l'augmentation du flux portal comme responsable de ces altérations métaboliques.	39
2.4.5.1	Obésité abdominale-viscérale et complications métaboliques	39

2.4.5.2	Exposition du foie à une élévation des niveaux d'AGL et complications métaboliques	41
	CHAPITRE 3: PREMIER ARTICLE	46
	CHAPITRE 4: DEUXIÈME ARTICLE	68
	CHAPITRE 5: TROISIÈME ARTICLE	94
	CHAPITRE 6: DISCUSSION GÉNÉRALE	126
	CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE	151
	ANNEXE 1: C.V. SCIENTIFIQUE DE L'AUTEUR	177

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 5, Tableau I Effects of a 10% triglyceride emulsion infusion on tissue substrates, urinary glucose and urine volume.

Chapitre 5, Tableau II Effects of a 10% triglyceride emulsion infusion on glucose metabolism.

LISTE DES FIGURES

- Chapitre 3, Figure 1 Plasma glucose concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding basal values and from corresponding saline-injected groups: P < 0.01.
- Chapitre 3, Figure 2 Plasma norepinephrine concentrations in sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE. for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows.
- Chapitre 3, Figure 3 Plasma norepinephrine concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) into the portal (POR) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: P < 0.05.
- Chapitre 3, Figure 4 Plasma epinephrine concentrations in sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. + Significantly different from corresponding basal values: P < 0.01; * significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: P < 0.01.

- Chapitre 3, Figure 5 Plasma epinephrine concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) into the portal (POR) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: $P < 0.01$.
- Chapitre 4, Figure 1 Arterial insulin concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 6-7 rats in each group. + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values; * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Chapitre 4, Figure 2 Arterial C-peptide concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 6-7 rats in each group. * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Chapitre 4, Figure 3 Pooled arterial C-peptide concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. Basal values are pooled from -15 and 0 min values, low insulin infusion values are pooled from 60, 75, and 90 min values, and high insulin infusion values are pooled from 150, 165, and 180 min values; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values. * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Chapitre 4, Figure 4 Arterial concentrations of insulin in fasted rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused with saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group. * significantly ($P < 0.05$) different from POR-INS group, ** $P < 0.01$; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.

- Chapitre 4, Figure 5 Arterial concentrations of C-peptide in fasted rats infused with exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group. * significantly ($P < 0.05$) different from POR-INS group, ** $P < 0,01$; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.
- Chapitre 4, Figure 6 Arterial concentrations of free fatty acids in fasted rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.
- Chapitre 5, Figure 1 Arterial plasma glucose concentrations in rats infused for 48H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) 10% triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. ‡ Significantly different from NaCl and ACUTE values; $P < 0,01$. * Significantly different from corresponding Basal and pre-clamp values; $P < 0,01$. Basal measurements were determined from blood sampled 60 min before the beginning of the clamp in all but the ACUTE group. In the latter group, basal blood sampling was performed 120 min before the beginning of the hyperglycemic clamp.
- Chapitre 5, Figure 2 Arterial plasma free fatty acids concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. ‡ Significantly different from NaCl and Acute values; $P < 0.05$. ¶ Significantly different from corresponding Basal value; $P < 0,01$. ☒ Significantly different from other three groups; $P < 0,01$. See legend of Fig. 1 for additional details.

- Chapitre 5, Figure 3 Arterial plasma β -hydroxybutyrate concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. * Significantly different from corresponding Basal and 0 min values; $P < 0,01$. \square Significantly different from other three groups; $P < 0,01$. See legend of Fig. 1 for additional details.
- Chapitre 5, Figure 4 Arterial plasma insulin concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) 10% triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. * Significantly different from corresponding Basal and 0 min values; $P < 0,01$. \square Significantly different from other three groups; $P < 0,01$. See legend of Fig. 1 for additional details

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGL:	Acides gras libres
BHNV:	Branche hépatique du nerf vague.
DMN:	Noyau moteur dorsal
ÉT:	Émulsion de triglycérides
FAT:	Émulsion de triglycérides
FFA:	Acides gras libres
HGP:	Production hépatique de glucose
HL:	Aire latérale de l'hypothalamus
HV:	Rats ayant subi une vagotomie de la branche hépatique
HVM:	Hypothalamus ventro-medial
M/I:	Indice de sensibilité à l'insuline
M:	Taux métabolique du glucose
NIDDM:	Diabète non-insulino-dépendant
PDH:	Pyruvate déshydrogénase
R_a :	Taux d'apparition du glucose
R_d :	Taux de disparition du glucose
SA:	Activité spécifique du glucose tritié
SHM:	Rats ayant subi une opération simulant une vagotomie de la branche hépatique
VMH:	Hypothalamus ventro-médial
WHR:	Ratio tour de taille sur tour de hanche

DÉDICACE

à ma douce Mylène pour sa patience, sa compréhension,
ses encouragements, son argent et surtout son amour...

Le plus sûr est donc de n'être sûr de rien.

Voltaire (François Marie Arouet, dit)

REMERCIEMENTS

L'accomplissement d'une thèse de doctorat nécessite une forte dose de persévérance afin de poursuivre la lecture, les expérimentations, l'analyse et l'écriture. Ces tâches sont rendues plus faciles lorsque que l'on peut compter sur le dévouement et la compétence de nos collègues. Je tiens donc à remercier ceux qui ont généreusement contribué à la réalisation des travaux présentés dans le cadre de cette thèse.

Merci à Martin Latour avec qui j'ai passé de nombreuses heures à effectuer les manipulations expérimentales. J'ai aussi eu la chance d'être témoin de la transformation de Martin de jeune entraîneur d'athlétisme arrivant de McGill à jeune chercheur dynamique;

Merci à François Désy pour la révision attentive de ce manuscrit, pour son aide et son calme serein qui s'avère un atout lors d'expérimentations parfois houleuses;

Merci aussi à Claude Warren qui sait être sérieux quand le besoin est;

Merci à Abbas Ghanbari Niaki pour avoir veillé sur mon âme par ses prières;

Merci au professeur Nobuharu Yamaguchi pour avoir mis son laboratoire et ses équipements à ma disposition dans la réalisation de diverses parties de ces travaux et à Sanae Yamaguchi pour son aide technique;

Merci à Marlène Fortier pour nous avoir laissé utiliser le compteur gamma ainsi que pour les nombreuses heures passées à discuter des plaisirs de la RIA;

Merci à Pierre Corriveau pour ses bons services lors de la commande des produits nécessaires à l'analyse et au dosage de divers paramètres présentés dans ce document ainsi que pour ses précieux conseils techniques;

Merci à Mauricio Oyarzun, à Annie Sylvain et à tous ceux ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux: Gérard Ouellet, Paul Martin et Lucie Senneville ainsi que ceux que j'oublie.

Finalement, je désire remercier Jean-Marc Lavoie, le directeur de ces travaux. Sous sa supervision, j'ai appris les rudiments de la recherche scientifique. Le Dr. Lavoie m'a donné beaucoup de latitude, ce qui m'a permis d'explorer de nouvelles avenues de recherche. La porte

de son bureau était toujours ouverte pour discuter recherche. Sa disponibilité envers ses étudiants n'a pas d'égal. Je le remercie pour son écoute, pour avoir eu confiance en moi ainsi que pour son amitié. Jean-Marc, je te suis très reconnaissant et fier d'avoir été un de tes étudiants. Je poursuivrai ma formation et ma carrière de manière à ce que ce sentiment soit réciproque.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

Il existe de nombreuses évidences témoignant de la participation du foie dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques dont le contrôle de la prise de nourriture (Friedman et Tordoff, 1996; Tordoff et al, 1989; Tordoff et Friedman, 1986; Langhans et al, 1985b; Langhans et Scharrer, 1987a; Russek, 1963) et de l'homéostasie du glucose (Niiijima, 1986; 1989). Cette dernière fonction semble impliquer un système d'arcs réflexes reliant entre eux le foie, le système nerveux central, le pancréas endocrin et les glandes médullo-surrénales (Niiijima, 1983). Par ces liens nerveux, le foie afférent peut moduler la sécrétion de l'insuline en réponse à divers stimuli dont une infusion intra-portale de glucose (Lee et Miller, 1985; Sakaguchi et Hayashi, 1981; Yamazaki et Sakaguchi, 1989; Nagase et coll., 1993) ou une stimulation électrique de la branche hépatique du nerf vague (BHNV) (Lee et Miller, 1985; Sakaguchi et Yamaguchi, 1979). Récemment, il a été démontré que le foie, via ses afférences vagales, pouvait également influencer la réponse sympatho-surrénalienne lors d'hypoglycémies induites par l'insuline (Donovan et coll., 1991; Hamilton-Wessler et al., 1993; Lamarche et coll., 1995; Lamarche et coll. 1996). Les études mentionnées ci-haut sont toutes basées sur les nombreuses données électrophysiologiques rapportées par Niiijima décrivant la dynamique des voies nerveuses afférentes, originaires du foie, de même qu'efférentes, se dirigeant vers le pancréas et les médullo-surrénales. Il est rapporté que la concentration intraportale de glucose est inversement reliée à la fréquence de décharges dans les fibres nerveuses afférentes de la BHNV (Niiijima, 1983). Ultérieurement, cet auteur a rapporté l'existence de relations entre le taux d'activité nerveuse dans la BHNV et la fréquence de décharges efférentes vers les glandes surrénales (Niiijima, 1979; 1980; 1983b) et le pancréas (Niiijima, 1980; 1984a; Nagase, 1993) établissant ainsi un lien avec les membres effecteurs de ces arcs réflexes originaires du foie.

Les résultats mentionnés ci-haut appuient donc l'implication de récepteurs métaboliques hépatiques dans la fonction endocrine. Toutefois, il demeure encore difficile de faire le pont entre l'activité métabolique du foie et l'activité nerveuse afférente dans la BHNV. Le but des présents travaux était de documenter d'autres situations dans lesquelles le foie pouvait être impliqué dans la modulation des réponses endocrines et d'investiguer l'un des mécanismes proposés par lequel le foie peut exercer une fonction afférente.

Russek (1981) a émis l'hypothèse selon laquelle le taux de décharges dans la BHNV serait inversement proportionnel au potentiel de membrane des cellules hépatiques. D'une part, il fut démontré, lors d'une perfusion hépatique que certains métabolites et substrats dont le pyruvate, le lactate (Dambach et Friedman, 1974) et le palmitate (Dambach et Friedman, 1974; Rossi et coll., 1995) ont la capacité d'hyperpolariser les membranes des cellules hépatiques. L'hyperpolarisation des membranes hépatocytaires induite par le pyruvate (Dambach et Friedman, 1974) et le palmitate (Rossi et coll., 1995) est abolie par l'administration d'ouabaïne, un inhibiteur des pompes sodium-potassium (Skou, 1965). Ces données suggèrent que l'induction d'une hyperpolarisation par ces substrats implique une activation des pompes sodium-potassium des cellules hépatiques. D'autre part, la diminution de l'activité nerveuse afférente dans la BHNV résultant normalement d'une augmentation de la concentration intraportale de glucose est aussi abolie par une infusion antérieure d'ouabaïne (Niiijima, 1983). L'implication des pompes sodium-potassium dans la régulation de la prise alimentaire a été rapportée (Langhans et Scharrer, 1987b; Scharrer et coll., 1996). Compte tenu de ces résultats, nous avons postulé que l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques pouvait moduler la réponse sympatho-médullo-surrénalienne.

D'autre part, il a été démontré que la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline nécessitait une innervation intacte du pancréas (Boden et coll., 1993; Luzi et coll., 1992). Cette démonstration indique que la communication par voie nerveuse entre le pancréas et un ou plusieurs autres organes participe à la régulation de la sécrétion de l'insuline. Le foie peut moduler la sécrétion de cette hormone pancréatique (Lee et Miller, 1985; Yamasaki et Sakaguchi, 1989, Lavoie et coll., 1989; Cardin et coll., 1994). De plus, la présence de senseurs à insuline dans la région hépato-portale a récemment été démontrée (Stümpel et coll., 1996). À partir de ces observations, nous avons postulé que le foie pouvait être impliqué dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline. Cette hypothèse a fait l'objet de la deuxième étude.

L'obésité viscérale est associée à plusieurs problèmes de santé dont l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline (Kissebah, 1991). Des données suggèrent que l'hyperinsulinémie est le résultat d'une diminution de la clairance de l'insuline par le foie et/ou d'une augmentation de la sécrétion de l'insuline (Peiris et coll. 1986; Kautsky-Willer et coll., 1992). Il a été suggéré que l'augmentation du flux portal d'acides gras libres peut être la cause de ces problèmes (Bjorntorp, 1990). Or, comme certains acides gras influencent le potentiel membranaire des hépatocytes (Dambach et Friedman, 1974; Rossi et coll., 1995), nous avons élaboré un protocole expérimental ayant comme objectif principal d'examiner si le foie peut influencer la sécrétion d'insuline dans des conditions hyperlipacidémiques. Puisqu'une élévation des concentrations plasmatiques d'AGL a aussi été associée à une insensibilité hépatique (Boden et Chen, 1995) et périphérique à l'insuline (Bonnadonna et coll., 1989; Saloranta et coll., 1993; Boden et coll., 1991), nous avons profité de l'occasion pour examiner l'effet de l'augmentation du flux portal d'AGL sur l'évolution de ces paramètres à court (2H) et à plus long terme (48H).

CHAPITRE 2: REVUE DE LA LITTÉRATURE

La revue de la littérature de ce document est formée de quatre sections principales. D'abord, des situations physiologiques dans lesquelles un rôle afférent du foie a été démontré seront revues. Au cours de cette partie, de brèves notions d'anatomie seront revues afin de mieux saisir comment un événement hépatique peut influencer l'action d'un autre organe. Deuxièmement, des évidences reliant la présence de certains substrats au potentiel de membrane des cellules hépatiques et à l'activité nerveuse afférente dans la branche hépatique du nerf vague seront analysées et les fondements de l'hypothèse selon laquelle les pompes sodium-potassium hépatiques peuvent moduler la réponse sympatho-médullo-surrénalienne seront présentés. Troisièmement, des exemples d'association entre l'innervation hépatique et certaines défaillances physiologiques observées chez des personnes souffrant de diabète de type II ou d'obésité, dont l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline, seront exposées. L'implication du foie comme élément participant à ce mécanisme autorégulateur de la sécrétion de l'insuline a fait l'objet de la seconde étude. Finalement, la quatrième section de cette revue traite des effets de l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL, tels qu'observées chez des personnes souffrant de diabète non-insulino-dépendant et/ou d'obésité, sur la sécrétion de l'insuline, la production hépatique de glucose et la sensibilité périphérique à l'insuline. L'objectif principal de cette dernière étude était de vérifier si la sécrétion de l'insuline pouvait être augmentée par une action des acides gras au niveau du foie.

2.1 Rôle afférent du foie et implications physiologiques

Des études ont suggéré l'existence de divers types de récepteurs au niveau du foie et/ou de la région hépato-portale dont les barorécepteurs (Andrews et Palmer, 1967), les osmorécepteurs (Kobashi et Adachi, 1992) et les récepteurs métaboliques (Russek, 1963, Tanaka et coll., 1990a; Saitou et coll., 1993). Ces derniers pourraient être impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Friedman et Tordoff, 1996), la sécrétion d'acide gastrique (Grannemen et Friedman, 1980) et dans la modulation de réponses endocriniennes dans diverses situations telles que l'exercice (Cardin et al, 1994; Lavoie et coll., 1989) et l'hypoglycémie induite par l'insuline (Lamarche et coll., 1996; Hamilton-Wessler et coll., 1994).

Le contrôle de la prise alimentaire demeure un domaine qui a et qui continue de fournir beaucoup de réponses et de questions sur le fonctionnement et l'implication des récepteurs métaboliques. Dans son hypothèse originale, Russek a affirmé que des "glucorécepteurs" hépatiques avaient la capacité d'informer le système nerveux central à propos de changements métaboliques susceptibles d'influencer les comportements de prise alimentaire (Russek, 1963). Les fondements de cette hypothèse tenaient du fait qu'une infusion intrapéritonéale de glucose avait induit une inhibition marquée de la consommation de nourriture comparativement à une infusion intraveineuse. Cette observation a depuis été confirmée par plusieurs autres groupes de chercheurs par l'utilisation d'infusions intraportales de glucose (Tordoff et coll., 1989; Booth et Jarman, 1976; Rezek et Novin et coll., 1977; Novin et coll., 1974; Russek 1970) alors que d'autres n'ont pu reproduire ces résultats (Strubbe et Steffens, 1977). D'autre part, grâce aux inhibiteurs de l'oxydation des lipides, certaines études ont pu démontrer que l'oxydation des acides gras influence aussi les comportements de prise alimentaire (Scharrer et Langhans, 1986; Langhans et Scharrer, 1987a; Ritter et Taylor, 1990).

L'utilisation de composés antimétaboliques a également permis de mieux cerner les effets de modifications du métabolisme hépatique sur le contrôle de la faim. Ainsi, une vagotomie hépatique diminue l'hyperphagie induite par le 2-deoxy-D-glucose (2-DG) à la suite d'une infusion intraportale comparativement à une infusion intrajugulaire (Novin et coll., 1973; Del Prete et Scharrer, 1990). Plus récemment, il a été démontré qu'une augmentation de la prise alimentaire induite par une infusion intracérébroventriculaire de 2-DG est accrue à la suite d'une vagotomie hépatique démontrant que le foie exerce une inhibition sur la prise alimentaire en absence de glucopénie périphérique (Rossi et al, 1996). Dans un même ordre d'idée, une infusion intraportale de 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) augmente la prise alimentaire. En effet, les animaux commencent à manger plus tôt et en plus grande quantité en comparaison à une infusion de 2,5-AM effectuée en périphérie (Tordoff et et coll., 1991). Ce composé a l'avantage de ne pas pénétrer la barrière hémato-encéphalique ce qui supporte l'hypothèse concernant l'origine d'un message de satiété provenant du foie (Tordoff et coll., 1991). Le 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) est un analogue du fructose qui diminue la concentration d'ATP

(Rawson et coll., 1994). En utilisant le 2,5-AM, il a été suggéré qu'un stimulus d'origine hépatique pouvant stimuler la prise alimentaire soit généré au niveau des processus de phosphorylation oxydative, une voie commune au métabolisme des glucides et des lipides. Des variations des niveaux hépatiques d'ATP pourraient s'avérer un des stimulus altérant la prise de nourriture (Friedman et Tordoff, 1996). Parce que l'activité des pompes sodium-potassium des hépatocytes est dépendante du contenu en ATP, Langhans et Scharrer suggèrent que les changements de concentrations d'ATP modifient la prise de nourriture en affectant l'activité des pompes à sodium-potassium (Langhans et Scharrer, 1987b). Les implications d'une telle hypothèse seront discutées dans une section ultérieure.

La coordination du métabolisme des glucides et des lipides dans le contrôle de la prise de nourriture a été suggérée suite à la démonstration d'effets additifs de l'inhibition de l'utilisation du glucose et de l'oxydation des acides gras sur l'appétit (Friedman et Tordoff, 1986). Cette même proposition a été adoptée par Langhans et Scharrer (Langhans et coll., 1985a; Langhans et Scharrer, 1987a). Langhans a suggéré que la disponibilité du glucose et l'oxydation des acides gras pourraient conjointement activer un mécanisme métabolique hépatique de satiété (Langhans, 1991).

2.1.1 Fonctions hépatiques

Dans des conditions normales de repos, le foie contient environ 10% du volume sanguin total chez l'homme. Dans ces mêmes conditions, environ 1,45 litre de sang circule à travers les vaisseaux du foie à chaque minute, ce qui représente 30% du débit sanguin (Guyton, 1991). La situation centrale du foie dans le système vasculaire lui permet de réaliser ses multiples fonctions. Cet organe possède un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme par le maintien des concentrations des substrats énergétiques et par la régulation de la composition du sang via diverses fonctions d'élimination, d'inactivation d'hormones et d'emmagasinage de substrats. L'organisation structurale du parenchyme et des éléments vasculaires est adaptée à sa fonction particulière de gardien qui s'interpose entre le tube digestif et le reste de la circulation (Arias et coll., 1988).

Le foie a la capacité d'éliminer de la circulation sanguines diverses impuretés, déchets métaboliques, bactéries, drogues et autres. Ce processus s'effectue par le métabolisme ou par l'excrétion de ces substances via la voie biliaire. Cette dernière est une route essentielle au flux de plusieurs substances incluant les lipides, les pigments biliaires, les vitamines, les drogues et leurs métabolites (Arias et coll., 1988). Le foie a aussi un rôle à jouer dans la digestion des lipides par sa production et mise en circulation de sels biliaires excrétés via la bile dans le duodenum de l'intestin grêle. Les sels biliaires sont des molécules détergentes amphipathiques responsables de l'émulsification des lipides ainsi que de la formation subséquente de micelles permettant ainsi aux acides gras libres et aux monoacylglycérols de diffuser dans la lumière de l'intestin (Arias et coll., 1988; Vander et coll., 1990). Le foie possède aussi une fonction endocrine. Entre autre, le foie peut synthétiser et mettre en circulation l'IGF-1 (facteur de croissance de type insuline-1), hormone stimulant la synthèse des protéines, de même que l'angiotensinogène, qui sous l'action de la rénine deviendra l'angiotensine I, précurseur de l'angiotensine II, un puissant vasoconstricteur (Vander et coll., 1990). Certaines contributions du foie ne peuvent pas toujours être aussi facilement classifiées à l'intérieur d'une fonction bien précise, par exemple: la production de facteurs nécessaires à la coagulation du sang tels la prothrombine, la fibrinogène, le facteur VII et la proaccélérine (Vander et coll., 1990; Guyton, 1991). Soulignons de plus, la synthèse d'importantes protéines telles que l'albumine et les lipoprotéines, et pour terminer, le stockage de diverses vitamines formant des provisions parfois suffisantes pour plusieurs semaines ou mois (Guyton, 1991).

La fonction la mieux connue du foie concerne sans doute son rôle dans la régulation du métabolisme des substrats énergétiques. Grâce à sa localisation, le foie est idéalement situé pour témoigner de l'apport de nutriments en provenance du tube digestif ainsi que de l'arrivée de dérivés de combustibles endogènes (Tordoff et Friedman, 1986). Plusieurs réactions des trois grandes voies métaboliques (glucidique, lipidique et protéique) sont communes à différents types de tissu. Cependant, il y a au moins une fonction que l'on attribue principalement au foie à l'intérieur de chacune de ces voies métaboliques. Par exemple, la néoglucogénèse dans la voie glucidique, bien qu'une contribution rénale mineure soit envisagée (Stumvoll, et coll. 1997),

la synthèse du cholestérol dans la voie lipidique et la formation d'urée à l'intérieur de la voie protéique (Arias et coll., 1988; Guyton, 1991). L'une des principales fonctions métaboliques du foie est l'emmagasinage du glucose, source indispensable d'énergie pour le système nerveux central (Nijiima, 1986). La régulation de l'homéostasie du glucose nécessite la participation d'autres organes susceptibles d'influencer les concentrations plasmatiques de substrats énergétiques, en l'occurrence le pancréas et les glandes médullo-surrénales par la sécrétion d'hormones. Il apparaît donc important que ces organes puissent communiquer entre eux. Ceci est rendu possible par l'intermédiaire du système nerveux autonome, agissant comme instrument de communication entre le foie, le système nerveux central (SNC) et les glandes endocrines.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont montré que le foie, grâce à son innervation, possédait une fonction afférente lui permettant de modifier diverses réponses physiologiques en réponse à certaines variations de son milieu intérieur (Sakaguchi et Hayashi, 1981; Tanaka et coll., 1990a; Yamazaki et Sakaguchi, 1989; Lamarche et coll., 1995; Lamarche et coll., 1996; Doiron et coll., 1990, Cardin et coll., 1994). Cette fonction afférente du foie fera l'objet du présent ouvrage.

2.1.2 Anatomie hépatique

Une revue de l'anatomie fonctionnelle et de la neuroanatomie intrinsèque et extrinsèque du foie a déjà été présentée (Bergeron, 1993). Une version abrégée et mise à jour de cette revue sera présentée au cours des prochaines pages.

L'unité structurale et fonctionnelle du foie est le lobule hépatique possédant une forme rappelant celle d'un hexagone grossièrement cylindrique. Ces unités sont formées de différents types de cellules dont les principales sont les cellules hépatiques proprement dites (hépatocytes) comptant pour 80% du volume total du foie (Sasse, 1986). Les lobules hépatiques sont organisés structurellement autour de veinules centro-lobulaires. À l'opposé, les arêtes de l'hexagone sont formés d'espaces interlobulaires, parfois appelés triade, composés d'une veinule portale, d'une artériole hépatique et d'un conduit biliaire interlobulaire. Ces espaces sont reliés

à une veinule centro-lobulaire par des capillaires sanguins discontinus nommés sinusoides. Le sang mixte provenant d'une veinule portale et d'une artériole hépatique est acheminé vers une veine centro-lobulaire par les sinusoides.

2.1.2.1 Anatomie de l'innervation hépatique intrinsèque

Bien qu'il soit reconnu que les vaisseaux sanguins irriguant le foie sont abondamment innervés (Sasse, 1986; Friedman, 1988; Sawchenko et Friedman, 1979), l'existence d'une innervation intrinsèque des hépatocytes est une question controversée depuis de longues années. Cette controverse origine de la variété des techniques utilisées et la diversité des espèces observées. Des évidences scientifiques suggèrent que les hépatocytes sont innervés par des fibres de nature sympathique et parasympathique chez diverses espèces (Lautt, 1980; Friedman, 1988; Sawchenko et Friedman, 1979). Ainsi, les lobules hépatiques du Cochon d'Inde, de l'Humain, de la Musaringue, du Lapin et des Primates ont un lien direct avec des terminaisons du système nerveux autonome (Metz et Forssman, 1980; Nobin et coll., 1978; Forssman et Ito, 1977, Shimazu, 1996). Par contre, en ce qui concerne le Rat, l'état des connaissances actuelles indique que les cellules hépatiques ne contiennent que très peu de terminaisons nerveuses (Shimazu, 1996). Berthoud et coll. suggèrent que chez le Rat, le parenchyme est à peu près dépourvu de terminaisons nerveuses afférentes. Toutefois, de nombreuses terminaisons afférentes sont situées à proximité des canaux biliaires de même que dans les parois de la veine porte (Berthoud et coll., 1992).

Afin d'expliquer la grande variabilité inter-espèce décrite ci-haut, on suggère qu'il y ait une relation inverse entre la concentration des jonctions de type gap entre les hépatocytes et la fréquence d'apparition de terminaisons nerveuses dans les lobules du foie (Forssman et Ito, 1977). Selon cette hypothèse, la nécessité de contacts directs entre les fibres nerveuses et les cellules hépatiques semblerait moins importante. Une espèce telle que le Rat, possédant un grand nombre de jonctions de type gap (Sasse, 1986), pourrait possiblement compenser un manque de fibres nerveuses intralobulaires de cette façon (Sawchenko et Friedman, 1979; Friedman et coll., 1988). L'implication physiologique de cette théorie a été démontrée par Iwai

et coll. (Iwai et coll., 1991). Ainsi, l'augmentation normale de la production de glucose lors d'une stimulation électrique de fibres nerveuses sympathiques hépatiques est abolie dans un foie en période de régénération. Or, un foie récupérant d'une hépatectomie partielle possède un nombre fortement réduit de jonctions de type gap limitant de ce fait la communication intercellulaire. Donc, la propagation d'un signal nerveux par communication intercellulaire via les jonctions de type gap semble expliquer le contraste apparent entre certains effets neuraux importants sur le métabolisme hépatique et la pauvreté de l'innervation des hépatocytes chez le Rat (Shimazu, 1996).

2.1.2.2 Anatomie de l'innervation hépatique extrinsèque

Le foie des mammifères est innervé de fibres nerveuses efférentes et afférentes associées aux nerfs vagues splanchnique et phrénique (Sawchenko et Friedman, 1979; Friedman, 1988). Les différents nerfs pénètrent le foie en association avec les vaisseaux sanguins et les canaux biliaires (Friedman, 1988; Lutt, 1980). Le cadre de cette thèse porte sur l'innervation parasympathique spécifique, particulièrement le nerf vague (nerf crânien numéro X). Environ 75% de toutes les fibres parasympathiques sont contenues dans les nerfs vague et vague accessoire issus respectivement des nerfs crâniens numéro X et XI (Guyton, 1989). Le nerf vague projette à l'ensemble des régions thoracique et abdominale innervant le coeur, l'estomac, l'intestin grêle, le pancréas et le foie (Guyton, 1989). Chez l'Homme, le Chat et le Chien, les troncs postérieur et antérieur du nerf vague projettent vers le foie alors que chez le Rat, la ou les branches hépatiques ne proviennent que du tronc vagal antérieur (Sawchenko et Friedman, 1979). La branche hépatique du nerf vague chez le Rat est composée entre 75 à 90% de fibres nerveuses afférentes (Carobi et coll., 1985). Selon Prechtl et Powley, approximativement 40% des animaux ont un patron organisationnel commun (Prechtl et Powley, 1985; Prechtl et Powley, 1987). Le tronc antérieur parcourt l'oesophage longitudinalement sur sa partie ventrale. Du tronc antérieur se détachent successivement les branches hépatique, coeliaque accessoire ainsi que les faisceaux de la branche gastrique antérieure. Le tronc postérieur, associé à la partie dorsale de l'oesophage, se ramifie en une branche coeliaque et gastrique se décomposant chacune en plusieurs faisceaux (Prechtl et Powley, 1985). La branche hépatique du nerf vague

(BHNV) bifurque vers la droite de l'animal, pour se dégager de l'oesophage à une distance équivalente à environ 40% de la longueur entre le diaphragme (0%) et le cardia de l'estomac (100%) et suit, dans sa course vers le hile du foie, l'artère hépato-oesophagienne incluse dans le petit épiploon (Prechtel et Powley, 1985; Prechtel et Powley, 1987). Une, deux ou trois branches hépatiques sont issues du tronc vagal antérieur dans respectivement 47%, 37% et 16% des spécimens (Prechtel et Powley, 1987). Le segment proximal (péριοesophagien) est le plus homogène. Il contient entre une et trois ramifications qui, dans le dernier cas, sont séparées de 0.1 à 1.1 mm (Prechtel et Powley, 1987).

Lors de la localisation de fibres nerveuses afférentes par traçage antérograde, il a été démontré que certaines fibres situées dans la BHNV contournent le hile du foie pour se diriger vers l'artère gastro-duodénale (Berthoud et coll., 1992). De plus, environ 10% des fibres afférentes vagales qui projettent vers le plexus périartériel de l'artère hépatique commune passent par la branche coeliaque postérieure. Cette branche n'est pas sectionnée lors d'une vagotomie de la branche hépatique. Puisque toutes les fibres afférentes ne sont pas situées dans la BHNV, le sectionnement de cette dernière ne causera pas une désafférentation totale du foie. Conséquemment, l'absence d'un effet d'une vagotomie de la branche hépatique n'exclue pas complètement l'implication des afférences vagales du foie. Friedman et Tordoff suggèrent que la vagotomie de la branche hépatique est efficace lorsqu'elle est mise en opposition à un traitement ayant eu un effet direct sur le foie tel que démontré par des résultats positifs d'une infusion portale comparativement à des résultats négatifs suite à une infusion systémique (Friedman et Tordoff, 1996).

2.1.3 Lien nerveux unissant le foie, le système nerveux central, le pancréas et la glande médullo-surrénale

Nijima a mené plusieurs études électrophysiologiques portant sur l'implication de l'innervation afférente du foie sur le métabolisme des glucides. Il a été démontré *in vitro* qu'une injection de glucose dans la veine porte avait pour effet de diminuer le taux de décharges moyen des fibres afférentes dans la BHNV (Nijima, 1969b). Ensuite, Nijima a démontré *in vivo* que

le taux de décharges des fibres afférentes de la BHNV était inversement proportionnel à la concentration de glucose dans la veine porte (Nijijima, 1982). À l'opposé de l'effet du glucose, des infusions intraportales de composés antimétabolites réduisant la disponibilité du glucose (2-deoxy-D-glucose; 2-DG, et le 2,5-anhydro-D-mannitol; 2,5-AM) ont causé des augmentations de l'activité nerveuse afférente dans le NVH (Nijijima, 1983; Lutz et Scharrer, 1995). À la suite de ces nombreuses études, Nijijima a suggéré l'existence de fibres nerveuses afférentes sensibles à la concentration de glucose dans la zone hépato-portale (Nijijima, 1982). L'oxydation des lipides dans le foie pourrait aussi moduler l'activité afférente dans la BHNV (Scharrer, 1996). Ainsi, l'infusion dans la veine porte de mercaptoacetate, un inhibiteur de l'oxydation des acides gras, chez le Rat a causé une augmentation marquée de l'activité nerveuse afférente enregistrée dans la BHNV (Lutz ; rapporté dans Scharrer et coll., 1996).

L'existence de liens fonctionnels entre les fibres nerveuses glucose-sensibles de la région hépato-portale et les neurones glucose-sensibles de l'aire latérale de l'hypothalamus (HL) (Shimizu et coll., 1983) ainsi qu'avec le noyau du faisceau solitaire (Adachi et coll., 1984) a été démontré. L'effet inhibiteur d'une injection de glucose dans la veine porte hépatique sur l'activité nerveuse des neurones glucose-sensibles dans l'HL (Shimizu et coll., 1983) et le noyau du faisceau solitaire (Adachi et coll. 1984) du Rat témoigne de ce lien. L'hypothalamus est la composante du système nerveux central responsable de l'intégration des stimuli d'origine périphérique et centrale et de l'élaboration subséquente d'une réponse sous forme de signal nerveux destiné à des organes cibles dont les glandes endocrines. On appelle le noyau ventromédial de l'hypothalamus (HVM), le centre de la satiété et l'aire latérale de l'hypothalamus (HL), le centre de la faim (Anand et coll., 1955; Anand, 1961). Les axones des cellules glucoréceptrices de l'HVM cheminent vers la périphérie en passant par le mésencéphale, la protubérance, le bulbe rachidien et la moelle épinière pour atteindre la colonne de cellules intermédiolatérales qui communiquent avec les nerfs splanchniques au niveau des vertèbres thoraciques. Les neurones gluco-sensibles provenant de l'HL quant à elles entreraient en contact avec le nerf vague au niveau du noyau moteur dorsal (DMN) du vague localisé dans le bulbe rachidien pour ensuite constituer le circuit nerveux vagal (Shimazu, 1981). L'inhibition

de l'activité nerveuse dans la branche surrenalienne du nerf splanchnique suite à une injection de glucose pourrait avoir pour origine les cellules du HVM (Niiijima, 1989a). Cette hypothèse est corroborée par le fait que le sectionnement de la moelle épinière supprime l'effet inhibiteur causé par le glucose (Niiijima, 1975b). Les neurones de l'HL pourraient, quant à eux, influencer l'activité nerveuse du nerf vague pancréatique. Ainsi, une stimulation hyperglycémique de l'HL via une micro-injection d'une solution de glucose 5% provoque une augmentation de la décharge efférente dans la branche pancréatique du nerf vague alors que l'injection dans l'HVM n'a pas eu d'effet (Niiijima, 1988). Cette description concorde avec les résultats expérimentaux démontrant que l'effet facilitateur du glucose sur l'activité de la branche pancréatique du nerf vague provient des neurones gluco-sensibles de l'HL (Niiijima, 1989a). Les évidences présentées ci-haut font état de liens nerveux fonctionnels entre les récepteurs métaboliques de la région hépato-portale, le système nerveux central et les glandes endocriniennes.

D'autres études de Niiijima ont permis d'établir une relation entre l'activité nerveuse afférente dans le NVH et le taux de décharges efférent de nerfs projetant vers le pancréas et les glandes surrénales. Ainsi, une stimulation électrique de la BHNV provoque une inhibition et une activation réflexe de l'activité des fibres nerveuses efférentes respectivement dans la branche coeliaque (pancréatique) du nerf vague (Niiijima, 1980) et dans la branche surrenalienne du nerf splanchnique (Niiijima, 1984a). Ces résultats suggèrent donc que les changements des taux de décharges efférents dans les branches pancréatiques du nerf vague et surrenalienne du nerf splanchnique sont en partie dus aux modifications du rythme de décharges afférent dans la BHNV.

La glycémie systémique, tout comme une stimulation électrique des afférences hépatiques, peut aussi influencer l'activité nerveuse des fibres efférentes. Une injection intraportale de glucose entraîne une activation et une suppression réflexe des fibres efférentes respectivement dans les branches pancréatiques du nerf vague (Niiijima, 1980; Niiijima, 1984a; Nagase et coll., 1993) et du nerf splanchnique (Niiijima, 1984a). Une injection de la même solution de glucose dans la veine jugulaire n'a pas eu cet effet (Niiijima, 1979; Niiijima, 1980).

Le sectionnement ultérieur du NVH a aboli les effets d'une injection intraportale de glucose sur les efférences pancréatiques du nerf vague (Nijjima, 1980; Nagase et coll., 1993). Par ailleurs, des injections carotidiennes (Nijjima, 1975a; Nijjima, 1975b) et intraportales (Nijjima, 1979; Nijjima, 1980) de glucose ont eu un effet supprimeur sur l'activité nerveuse sympathique efférente vers la glande surrénale alors qu'une infusion intrajugulaire n'a pas eu cet effet (Nijjima, 1984a). Inversement, une diminution de la glycémie suite à une injection d'insuline accroît les signaux nerveux dans la branche surrénalienne du nerf splanchnique (Nijjima, 1989a). Il semble que les diminutions du rythme de décharges dans la branche surrénalienne du nerf splanchnique sont directement reliées à des augmentations de la glycémie portale (Nijjima, 1989b). Cette hypothèse est appuyée par la démonstration que la section ultérieure du NVH a aboli l'effet inhibiteur d'une injection de glucose sur l'activité nerveuse efférente en direction des glandes surrénales (Nijjima, 1980;1984a). Ces résultats plaident en faveur de l'existence de réflexes hépato-pancréatique et hépato-medullo-surrénalien pouvant influencer la sécrétion des hormones pancréatiques et des catécholamines. Une telle hypothèse se base sur la supposition qu'une activation sympathique produisant une augmentation de l'activité nerveuse efférente dans les branches surrénale et pancréatique du nerf splanchnique va causer une augmentation et une diminution respective de la sécrétion de catécholamines et d'insuline. À l'opposé, une activation du système nerveux parasympathique élevant l'activité efférente dans la branche pancréatique du nerf vague causera une augmentation de la sécrétion de l'insuline. Ces effets des systèmes nerveux sympathique et parasympathique sur la sécrétion des catécholamines et de l'insuline ont fait objet de bon nombre d'écrits (Havel et Taborsky, 1989; Bergeron, 1993) et ne seront pas plus amplement discuté dans la présente revue de littérature.

2.1.4 Réponses hormonales

Il ne reste qu'un pas à franchir à partir des études électrophysiologiques de Nijjima afin d'entrevoir toutes les pièces d'un mécanisme réflexe ayant comme origine une variation du métabolisme hépatique pouvant informer le système nerveux central par l'intermédiaire d'une activité nerveuse afférente et comme résultante une modification de la réponse endocrinienne.

Une stimulation électrique de la BHNV provoquant une inhibition réflexe de l'activité des fibres nerveuses efférentes dans la branche coeliaque (pancréatique) du nerf vague (Nijima, 1980), se traduit en une baisse des niveaux plasmatiques veineux (Sakaguchi et Yamaguchi, 1979; Lee et Miller, 1985) et portaux d'insuline (Lee et Miller, 1985). Outre sa réaction à une stimulation électrique, ce mécanisme nerveux est aussi apte à répondre à une élévation de la glycémie. On rapporte, dans certaines études qu'une injection intraportale de glucose provoque une moins grande augmentation des niveaux d'insuline plasmatiques chez les groupes vagotomisés comparativement aux groupes ayant une BHNV intacte (Lee et Miller, 1985; Sakaguchi et Hayashi, 1981; Yamazaki et Sakaguchi, 1989; Nagase et coll., 1993). D'autre part, une vagotomie hépatique aiguë a augmenté les niveaux portaux et périphériques d'insuline chez le Rat ayant subi un jeûne (Lee et Miller, 1985). Ces résultats obtenus dans des conditions de jeûne ou à la suite d'une injection de glucose démontrent l'implication de la BHNV dans la régulation de la sécrétion de l'insuline (Lee et Miller, 1985). Plus spécifiquement, il semble que l'activité nerveuse afférente dans la BHNV ait une action inhibitrice sur des éléments nerveux centraux responsables des signaux activateurs empruntant les fibres vagues efférentes dont la branche coeliaque. L'injection intraveineuse de glucose n'a pu quant à elle produire de différenciation des effets entre les groupes témoin et vagotomisé (Lee et Miller 1985; Nagase et coll, 1993). Il est donc probable que les glucorécepteurs hépatiques seraient à l'origine de la réponse lors de l'injection intraportale. Force est de souligner que la littérature scientifique n'est toutefois pas unanime sur le rôle des afférences hépatiques sur la réponse hormonale pancréatique. Des infusions intraveineuses de glucose versus des infusions intraportales de même que l'exécution d'une dénervation hépatique n'ont pu générer des différences significatives des niveaux d'insuline et de glucagon (Lautt, 1984). Une infusion de glucose étalée sur trois minutes au cours de cette expérience comparativement à l'injection d'un bolus dans le cadre des études précédemment citées (Nagase et coll., 1990; Nagase et coll, 1993; Lee et Miller, 1985) pourraient expliquer partiellement cette différence dans la réponse hormonale. De plus, le volume du bolus de glucose injecté doit être considéré car de faibles doses (0.1-0.3 g/kg) injecté par voie intra-péritonéale qui se sont avérées suffisantes afin de produire une inhibition de l'activité nerveuse afférente dans la BHNV n'ont pu mettre en évidence le rôle des afférences

hépatiques sur la sécrétion de l'insuline (Cardin et coll. 1992). Ces données indiquent qu'il y a une différence entre la dose de glucose requise pour modifier le taux de décharge des afférences hépatiques et la dose requise pour altérer la sécrétion de l'insuline.

L'implication des récepteurs métaboliques sur la réponse hormonale pancréatique à l'exercice a été démontrée chez le Rat. Ainsi, une vagotomie de la BHNV atténue la baisse de la concentration de l'insuline ainsi que la hausse du glucagon normalement observée lors d'un exercice prolongé (Lavoie et coll. 1989). Les résultats d'études subséquentes suggèrent que la néoglucogénèse soit impliquée dans la modulation des afférences hépatiques produisant une modification de la réponse hormonale à l'exercice (Cardin et coll., 1991; Cardin et coll., 1994).

Les acides aminés sont de puissants sécrétagogues de l'insuline et du glucagon (Assan et coll., 1967; Floyd et coll., 1966). Tanaka et coll. (Tanaka et coll., 1986; Tanaka et coll., 1990a) ont observé des augmentations des niveaux d'insuline et de glucagon suite à une injection intrapéritonéale de L-arginine. Cette augmentation était significativement plus grande chez les animaux vagotomisés (Tanaka et coll., 1986; Tanaka et coll., 1990a; Nagase et coll., 1990). Toutefois des données récentes jettent un doute de l'implication des récepteurs hépatiques à arginine sur la sécrétion des hormones pancréatiques (Trabelsi et coll., 1995; Trabelsi et Lavoie, 1996). Ainsi notre groupe de recherche n'a pu mettre en lumière l'importance de la BHNV sur la sécrétion d'insuline induite par l'arginine autant au repos (Trabelsi et coll. 1995) qu'au cours de l'exercice (Trabelsi et Lavoie, 1996).

Niiijima a suggéré l'existence d'un axe hépato-médullo-surrénalien pouvant influencer la sécrétion des catécholamines (Niiijima, 1989b). Cependant, la sécrétion des hormones médullo-surrénaliennes n'ont pas été évaluée lors de ces études. Par contre, les groupes de Donovan et de Yamaguchi ont publié quelques études fournissant une démonstration de l'implication des glucorécepteurs hépatiques dans un réflexe hépato-médullo-surrénalien (Donovan et coll., 1991; Donovan et coll., 1994; Hamilton-Wessler et coll., 1994; Lamarche et coll., 1996). Un verrouillage (clamp) euglycémique spécifique au foie a permis de diminuer

de 32% et de 42% les augmentations respectives de noradrénaline et d'adrénaline normalement observées lors d'une hypoglycémie périphérique induite par l'insuline (Donovan et coll., 1991). La très bonne corrélation entre les niveaux de noradrénaline et d'adrénaline ($r=0.97$) dans les groupes expérimentaux et témoins représente un bon indice d'un réflexe hépato-médullo-surrénalien commun (Donovan et coll., 1991). Le même protocole effectué sous une hypoglycémie plus sévère a produit des suppressions encore plus marquées des niveaux de catécholamines (Hamilton-Wessler et coll., 1994). Réciproquement, on a observé des augmentations de sécrétion de catécholamines lors d'une hypoglycémie sélective du foie effectué par circulation croisée chez le chien (Lamarche et coll., 1996). Ces résultats démontrent qu'un réflexe hépato-médullo-surrénalien est fonctionnel lors d'une hypoglycémie induite par l'insuline. Par contre, l'implication de l'arc réflexe hépato-médullo-surrénalien dans la régulation des niveaux de catécholamines à l'exercice n'a pu être démontré (Latour et coll., 1995). Tel que suggéré par d'autres séries de données (Sotsky et coll., 1989; Trabelsi et coll., 1992), une régulation plus complexe de la réponse hormonale contre régulatrice durant une hypoglycémie induite par l'exercice comparativement à une induction par l'insuline pourrait avoir camouflé une contribution de cet axe.

2.2 Rôle des pompes sodium-potassium du foie dans la modulation d'une réponse physiologique

Comment l'activité métabolique hépatique se traduit-elle en un signal nerveux afférent impliqué dans un mécanisme de rétro-inhibition ? Cette question d'intérêt s'est avérée l'objet de la première étude de cette thèse. L'un des principaux mécanismes de codage de l'activité métabolique hépatique à avoir été proposé est l'activité des pompes sodium-potassium. Nous réviserons les évidences indiquant que l'activité des pompes sodium-potassium peut être impliquée dans les altérations du potentiel de membrane des cellules hépatiques et de l'activité nerveuse afférente dans la BHNV. Ensuite, des résultats d'études suggérant un rôle physiologique des pompes sodium-potassium dans la modulation de la prise alimentaire seront exposés. Les évidences présentés dans les prochaines sections ont servi de base dans

l'élaboration d'un protocole expérimental visant à démontrer l'implication des pompes sodium-potassium dans l'arc réflexe hépato-médullo-surrénalien.

2.2.1 Substrats et potentiel de membrane des cellules hépatiques: Effet de l'inhibition des pompes sodium-potassium

Russek a postulé que le potentiel de membrane des cellules hépatiques pouvait servir de lien entre le métabolisme cellulaire hépatique et un signal nerveux pouvant modifier la prise alimentaire (Russek, 1981). Certains substrats, en transit ou emmagasinés dans le foie, ont la capacité d'hyperpolariser les cellules hépatiques. Dambach et Friedman ont rapporté une hyperpolarisation soutenue des membranes cellulaires lorsqu'un échantillon de foie était perfusé avec du pyruvate, du fructose, du lactate et de l'alanine (Dambach et Friedman, 1974). Mentionnons que les trois derniers composés énumérés ci-haut sont tous reliés au métabolisme du pyruvate. L'hyperpolarisation du potentiel de membrane causée par la perfusion du foie en présence de pyruvate a été supprimée par l'ajout d'ouabaïne, un inhibiteur des pompes sodium-potassium, suggérant ainsi que l'activité des pompes sodium-potassium soit impliquée dans ce phénomène (Dambach et Friedman, 1974). Il pourrait donc y avoir un lien entre le contenu hépatique d'un ou des métabolites de la chaîne glycolytique et le potentiel membranaire des hépatocytes. Russek a postulé que le potentiel membranaire est significativement plus bas chez un Rat en état de jeûne que chez un Rat bien nourri (Russek, 1981). Il ajoute que les niveaux plus bas de pyruvate observés lors d'un jeûne (Phan et coll., 1974) pourraient être associés à une dépolarisation des membranes des cellules hépatiques (Russek, 1981).

L'étude de l'effet du glucose sur le potentiel de membrane des cellules hépatiques a fourni des résultats équivoques. Certains auteurs rapportent que le glucose hyperpolarise le potentiel membranaire des hépatocytes (Russek, 1975; Meyer et Scharrer, 1991) alors que d'autres auteurs n'ont pu observer un tel effet (Dambach et Friedman, 1974; Rossi et coll., 1995). Ce dernier groupe d'auteurs suggère que le métabolisme cellulaire du glucose ne soit pas nécessaire et est non responsable de la modification du potentiel de membrane des hépatocytes (Meyer et Scharrer, 1991). Il semble plutôt que le transport de ce substrat dans les

cellules est accompagné d'une entrée d'eau causant un gonflement cellulaire. Il s'ensuit une ouverture des canaux K^+ , d'où l'hyperpolarisation des membranes hépatocytaires (Meyer et Scharrer, 1991). Tout comme il avait déjà été démontré auparavant (Dambach et Friedman, 1974), le palmitate a la capacité d'hyperpolariser les cellules hépatiques de manière dose-dépendante (Rossi et coll., 1995). L'utilisation d'inhibiteurs de l'oxydation des lipides en présence de palmitate a provoqué une diminution du potentiel de membrane suggérant que l'oxydation des acides gras soit impliquée dans l'hyperpolarisation causée par le palmitate. L'hyperpolarisation des membranes hépatocytaires par le palmitate est supprimée en présence d'ouabaine suggérant que cet effet s'accomplisse via l'activation des pompes sodium-potassium. Il est aussi possible que l'activation des pompes sodium-potassium s'effectue en réponse à l'ouverture des canaux potassiques puisque l'utilisation d'inhibiteur à canaux K^+ a aboli l'effet du palmitate sur le potentiel de membrane hépatocytaire (Rossi et coll., 1995).

2.2.2 Potentiel de membrane et afférences hépatiques

Quel est le point commun pouvant expliquer qu'une variation du potentiel de membrane des cellules hépatiques se reflète par une variation de l'activité afférente dans la BHNV postulé par Russek ? Certaines évidences pointent vers l'activité des pompes sodium-potassium. D'une part, comme nous venons de le voir, certaines études ont démontré que l'activation des pompes sodium-potassium était impliquée dans l'hyperpolarisation des membranes hépatocytaires par le palmitate et le pyruvate (Rossi et coll. 1995; Dambach et Friedman, 1974). D'autre part, Nijijima a rapporté que la suppression normale de l'activité afférente dans la BHNV suite à une injection de glucose dans la veine porte était abolie en présence d'ouabaine (Nijijima, 1983). Par conséquent, l'effet inhibiteur du glucose sur le taux de décharges des afférences vagues hépatiques semble impliquer une activation des pompes sodium-potassium (Nijijima, 1983).

Faits à noter, l'hyperpolarisation des cellules hépatiques par le palmitate est dépendante de l'oxydation des lipides (Rossi et coll. 1995) et l'inhibition de ce processus métabolique est associée à une augmentation de la prise de nourriture (Langhans et Scharrer, 1987a). Les effets du palmitate et du pyruvate sur le taux de décharges des fibres nerveuses de la BHNV n'ont pas

été étudiés. Une étude de Niiijima peut toutefois aider à faire le lien entre l'effet stimulant de l'inhibition de l'oxydation des lipides sur la prise alimentaire et l'activité nerveuse afférente dans la BHNV. En effet, Niiijima a démontré que le glucose et le 2-DG avaient des effets opposés sur le taux de décharge des afférences hépatiques (Niiijima, 1984b). L'effet de facilitation qu'a le 2-DG sur le taux de décharge est expliqué par une diminution de l'activité des pompes sodium-potassium (Niiijima, 1996). Il a été démontré que la diminution de la disponibilité du glucose causé par le 2-DG peut aussi stimuler la prise de nourriture et que cette réponse est supprimée par une vagotomie hépatique (Del Prete et Scharrer, 1990). Dans un même ordre d'idée, il a été démontré que l'augmentation de la prise de nourriture suite à l'inhibition de l'oxydation des acides gras était atténuée chez les animaux ayant subi une vagotomie de la branche hépatique du nerf vague (Langhans et Scharrer, 1987a). Comme l'oxydation des acides gras et l'activation des pompes sodium-potassium sont étroitement liés à l'effet hyperpolarisant du palmitate sur les membranes hépatocytaires (Rossi et coll., 1995), on peut présumer que l'inhibition de l'oxydation des acides gras est associée à une baisse de l'activité des pompes sodium-potassium. Supportant cette affirmation est la récente démonstration que l'activité des pompes à sodium dans le foie était réduite lorsque le contenu en ATP du foie diminuait suite à une infusion de 2,5-anhydro-D-mannitol. Donc ces évidences suggèrent que le métabolisme cellulaire normal soit nécessaire à l'activation des pompes sodium-potassium (Friedman et Tordoff, 1996). L'argumentation présentée dans le paragraphe en cours permet de postuler que l'augmentation de la prise de nourriture stimulée par l'oxydation des acides gras et supprimée par une vagotomie hépatique (Langhans et Scharrer, 1987a) est transmise par une augmentation de l'activité nerveuse afférente dans la BHNV. Cette démonstration demeure à faire.

Les évidences accumulées au cours des dernières années semblent indiquer que d'une part, les fibres nerveuses afférentes situées dans la région hépato-portale constitueraient les gluco-senseurs percevant la disponibilité du glucose et que d'autre part, l'oxydation des acides gras dans les cellules hépatiques constitueraient à eux deux les principaux mécanismes modifiant le taux de décharges afférents dans la BHNV. Par contre, il ne peut être exclu que certains métabolites de la voie glycolytique, en particulier le pyruvate, pourraient participer à

l'élaboration d'un signal nerveux originaire du foie. En accord avec ce postulat, notre groupe a démontré que le pyruvate hépatique contribuait à la modulation de la réponse endocrinienne durant l'exercice (Cardin et coll, 1994).

2.2.3 Implication des pompes sodium-potassium des hépatocytes sur la prise alimentaire

Une seule étude conduite *in vivo* a démontré directement l'implication des pompes sodium-potassium hépatique dans le contrôle de la prise alimentaire (Langhans et Scharrer, 1987b). Ainsi, une infusion intra-péritonéale d'ouabaine a augmenté la consommation de nourriture alors qu'une vagotomie hépatique a supprimé cette réponse. D'autres évidences indirectes plaident en faveur du rôle des pompes sodium-potassium sur les comportements de prise de nourriture ont récemment été rapportées. En effet, une infusion portale de 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM), un analogue du fructose qui inhibe la glycogénolyse et la néoglucogénèse (Hanson et coll., 1984) et diminue la concentration d'ATP par le "trapping" du phosphate lié à la phosphorylation du 2,5-AM (Rawson et coll., 1994) stimule la prise de nourriture. Les animaux consomment leur nourriture plus tôt et en plus grande quantité en comparaison à lorsque l'infusion de 2,5-AM est effectuée en périphérie (Tordoff et coll., 1991). Or, lors d'une étude récente, Friedman et coll. ont démontré, grâce à la spectroscopie par RMN sur ^{31}P et ^{23}Na , que la baisse d'ATP dans les hépatocytes suite à une infusion intraportale de 2,5-AM correspondait à une accumulation de contenu sodique dans le foie. Ces observations constituaient les premières évidences démontrant que l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques était réduite lorsque le contenu en ATP du foie diminuait (Friedman et Tordoff, 1996). Les résultats combinés de ces deux dernières études suggèrent que l'action stimulante du 2,5-AM sur les comportements de prise de nourriture soit associée à une modification de l'activité des pompes sodium-potassium.

2.2.4 Hypothèse que l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques module la réponse sympatho-médullo-surrénalienne

Au cours des sections précédentes, des évidences ont été présentées dans le but de démontrer le rôle que semble exercer les pompes sodium-potassium dans le codage d'une activité cellulaire sous forme de signal nerveux afférent transmis par la BHNV. Jusqu'à maintenant, la problématique étudiée a porté seulement sur la régulation de la prise alimentaire. La première étude de cette thèse tentera de démontrer l'implication des pompes sodium-potassium dans l'arc réflexe hépato-médullo-surrénalien.

La problématique de cette première étude est fondée sur des évidences démontrant que la disponibilité et/ou le métabolisme de certains substrats énergétiques au niveau du foie influence le potentiel de membrane des cellules hépatiques. Une variation du potentiel de membrane pourrait être traduite en une modification du taux de décharges afférents dans la branche hépatique du nerf vague bien que ce phénomène n'ait pas encore été démontré directement. D'autre part, nous avons vu que certaines études suggèrent que le foie, via cette activité nerveuse afférente, soit impliqué dans le contrôle de la réponse sympatho-médullo-surrénalienne lors d'hypoglycémie induite par l'insuline. Or, l'activation des pompes à sodium des hépatocytes semble jouer un rôle dans l'hyperpolarisation des cellules ainsi que dans la diminution du taux de décharges dans la BHNV, deux phénomènes observés lorsque les cellules hépatiques sont mises en contact avec certains substrats.

L'ouabaïne, largement captée par le foie, diminuera le taux d'activité des pompes à sodium des cellules hépatiques. Selon notre hypothèse, l'inhibition des pompes aura pour conséquence de lever l'hyperpolarisation des cellules hépatiques associée à un état post-prandial mimant ainsi une déplétion relative des substrats énergétiques du foie. Cette situation devrait se traduire par une augmentation de l'activité nerveuse dans le BHNV. Selon la littérature revue précédemment, une modification de la réponse hormonale reflétée par des altérations des concentrations plasmatiques des catécholamines sera observée à la suite de ces manipulations. La démonstration de l'implication du foie s'effectuera en comparant une infusion intraportale

d'ouabaïne à une infusion systémique de même qu'en combinant une vagotomie sélective de la branche hépatique du nerf vague à l'infusion intraportale.

2.3 Innervation hépatique et altérations des réponses physiologiques associées à l'obésité et au diabète non-insulino-dépendant

Tel que rapporté précédemment, l'innervation hépatique est impliquée dans la régulation de certaines fonctions physiologiques, prise alimentaire, sécrétion d'acide gastrique, réponse hormonale contre régulatrice durant une hypoglycémie induite par l'insuline et durant l'exercice. Le mauvais fonctionnement de ce mécanisme de régulation peut être associé à des troubles métaboliques en altérant les fonctions décrites dans les lignes précédentes. Ainsi, une innervation hépatique déficiente pourrait jouer un rôle dans le développement de certaines pathologies tel que le diabète et l'obésité.

2.3.1 Altération de la sécrétion de l'insuline

Nagase et coll. ont examiné l'intégrité de la fonction afférente hépatique sur la sécrétion d'insuline chez le Rat rendu légèrement diabétique par une faible dose de streptozotocin (Nagase et coll., 1990). Ce modèle se distingue par une capacité réduite du pancréas à sécréter de l'insuline mimant ainsi les caractéristiques du diabète non-insulino-dépendant avancé. Ces auteurs ont observé que la réponse insulinémique stimulée par l'arginine était potentialisée chez les animaux diabétiques comparativement aux animaux contrôles. Ces données suggèrent qu'avec ce type de modèle, l'effet inhibiteur qu'exerce les senseurs hépatiques à arginine sur la sécrétion d'insuline sont hyperfonctionnels chez les animaux diabétiques. Toutefois, une réponse insulinémique normale observée chez des rats légèrement diabétiques à la suite d'une charge de glucose suggèrent que les fibres nerveuses gluco-sensibles fonctionnent correctement. Ces résultats ouvrent une voie sur la possibilité que l'innervation hépatique ait un rôle à jouer dans la régulation hormonale associé au diabète mellitus.

2.3.2 Altération du métabolisme hépatique du glucose

L'implication de l'innervation hépatique sur la disposition du glucose par le foie a été démontrée. On rapporte une diminution de la tolérance au glucose suite à l'injection d'une charge de glucose par voie entérale chez le Chien éveillé ayant subi une dénervation totale du foie comparativement aux animaux ayant un foie intact (Pagliassotti et coll. 1991b). Le même groupe a aussi démontré qu'un gradient de concentration de glucose positif entre la veine porte et l'artère hépatique, tel que l'on observe à la suite de l'ingestion d'hydrates de carbone, est nécessaire pour stimuler la prise de glucose par le foie (Pagliassotti et coll. 1991a). Ce mécanisme a été appelé "portal signal". Comme le suggère Adkins-Marshall et coll., l'implication des afférences hépatiques à ce phénomène est probable puisque cette technique suggère la comparaison de la concentration hépato-portale de glucose à une autre concentration de glucose perçue ailleurs soit dans l'artère hépatique, dans les artères cérébrales ou soit dans le liquide céphalo-rachidien (Adkins-Marshall et coll., 1992). Pertinemment, une absence d'augmentation de la prise nette de glucose par le foie en réponse à une augmentation de la charge portale de glucose a été rapportée en présence d'un foie totalement dénervé (Adkins-Marshall et coll., 1992). Une revue récente de Moore et coll. résume le modèle de régulation de la prise de glucose par le foie tel que proposé par le groupe de Cherrington (Moore et coll, 1996). L'arrivage de glucose dans la veine porte hépatique est perçu par les senseurs à glucose dans la région hépato-portale ce qui cause une diminution du taux de décharges afférent dans le nerf vague hépatique. Cette information est traitée dans l'hypothalamus puis servira à orchestrer une augmentation et une diminution respectives de l'activité nerveuse efférente parasympathique et sympathique vers le foie et le pancréas. Ces influx nerveux vont directement favoriser la prise de glucose et le dépôt de glycogène dans le foie en plus d'augmenter la sécrétion d'insuline par le pancréas. Finalement, bien qu'une détérioration de la prise de glucose par le foie en réponse à une charge de glucose portale n'ait pas encore été démontrée chez des animaux diabétiques, on ne peut exclure que cette réponse soit altérée.

Alors qu'une démonstration claire de l'implication de l'innervation du foie sur la production de glucose hépatique dans des conditions *in vivo* demeure inexistante, certains doutes subsistent. En effet, le groupe de Galbo a étudié la production de glucose hépatique chez

le Rat et le Cochon d'inde ayant subi une dénervation du foie pour finalement suggérer que cette entité ne soit pas nécessaire à la régulation de la production de glucose hépatique durant l'exercice (Sonne et coll., 1985; Wiersma et coll., 1995) de même que lors d'une hypoglycémie induite par l'insuline (Mikines et coll., 1985). Toutefois, ces chercheurs ont pratiqué une dénervation de la région portale du foie seulement conservant vraisemblablement l'innervation hépatique associée à l'artère hépato-oesophagienne, dont la branche hépatique du nerf vague contenant la majorité des fibres nerveuses afférentes du foie. De plus, le rôle du foie dans la régulation du métabolisme à l'exercice a été mis en évidence par notre groupe lorsque les animaux avaient préalablement été médullo-surrénalectomisés (Lavoie et coll., 1989) suggérant qu'autrement, l'élévation des catécholamines masque l'effet de la vagotomie hépatique. Or les études du groupe de Galbo citées ci-haut ont été réalisées chez des animaux ayant des glandes surrénales intactes (Mikines et coll., 1985; Sonne et coll., 1985). Une étude où l'on comparerait une dénervation totale du foie à une dénervation sélective de la branche hépatique du nerf vague chez des animaux médullo-surrénalectomisés serait souhaitable afin de tirer au clair si l'innervation afférente du foie peut influencer la production de glucose hépatique à l'exercice ou dans d'autres situations.

2.3.3 Altération de la sensibilité périphérique à l'insuline

Une série de d'études récentes menées par Xie et Lutt ont démontré que l'innervation parasymphatique hépatique (bon ou mauvais fonctionnement) pouvait induire une insensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline (Xie et Lutt, 1996a; Xie et Lutt, 1996b; Xie et Lutt, 1995). Ces auteurs ont proposé l'hypothèse selon laquelle le tonus parasymphatique dans le nerf vague hépatique puisse influencer l'efficacité de l'insuline à stimuler la prise de glucose en périphérie et qu'une déféctuosité de ce mécanisme puisse causer le diabète (Xie et Lutt, 1996). Le mécanisme suggéré est une libération d'un facteur hépatique stimulée par l'activité nerveuse parasymphatique du foie. Ces auteurs suggèrent que les afférences hépatiques ne soient pas impliquées dans ce mécanisme. Toutefois, il est intéressant d'apprendre que l'innervation hépatique peut influencer la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline.

2.3.4 Altération de l'autorégulation de la sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline des cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatique est régulée par les concentrations plasmatiques de glucose mais peut aussi être stimulée par des acides aminés (arginine) et acides gras et modulée par des peptides intestinaux tels que Gastro Intestinal Polypeptide et des neurotransmetteurs comme la CCK (Flatt et coll., 1991). L'influence du système nerveux autonome sur la sécrétion de l'insuline est aussi bien documentée (Havel et Taborsky, 1989). Comme nous l'avons vu précédemment, des fibres nerveuses gluco-sensibles localisées au niveau de la région hépato-portale ont aussi la capacité d'influencer la sécrétion d'insuline (Lee et Miller, 1985; Nagase et coll., 1993). Il existe encore un autre mécanisme pouvant moduler la fonction endocrine des cellules bêta du pancréas. Il s'agit du mécanisme de rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline ou autorégulation.

Ce concept a originalement été mis de l'avant à la fin des années soixante (Loubatières et coll., 1968) et a soulevé depuis beaucoup de controverse. Plusieurs études menées *in vitro* avec des îlots pancréatiques isolés ou avec une perfusion pancréatique n'ont pas réussi à reproduire ces résultats (Marincola et coll., 1983; Stagner, et coll., 1986; Schatz et Pfeiffer, 1977). L'utilisation du clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez l'homme a fourni des résultats contradictoires tantôt confirmant (DeFronzo et coll., 1981; Waldhausl et coll., 1982; Asplin et coll., 1981), tantôt infirmant (Kraegen et coll., 1983; Shima et coll., 1977) l'autorégulation comme mécanisme régulateur de la sécrétion de l'insuline. L'absence d'un effet inhibiteur de l'insuline sur sa propre sécrétion lors de ces études *in vivo* peut s'expliquer par des faiblesses des protocoles expérimentaux. La prise de sang veineux plutôt qu'artériel (Shima et coll., 1977; Kraegen et coll., 1983), l'absence de groupe contrôle et l'incapacité à maintenir la glycémie stable au cours du clamp (Shima et coll., 1977) sont des raisons pouvant expliquer l'absence de résultats positifs. En contre-partie, l'utilisation de forts niveaux d'insuline nécessaires à la démonstration de l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline étaient parfois non physiologiques, par conséquent matière à critique (Liljenquist et coll., 1978). En portant attention aux données plus récentes, on découvre que ce mécanisme régulateur est fonctionnel

chez des personnes saines (Baynes et coll., 1991; Elahi et coll., 1982; Garvey et coll., 1985; Luzi et coll., 1992). De plus, Argoud et coll. suggèrent que l'inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline soit dose-dépendante (Argoud et coll., 1987).

2.3.4.1 Altération de l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline chez des personnes souffrant d'obésité et/ou de NIDDM

La défaillance du mécanisme de rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline a été proposée comme l'un des facteurs pouvant contribuer à l'hyperinsulinémie observée chez des personnes souffrant d'obésité et de diabète (Elahi et coll., 1982; Cavallo-Perin et coll., 1993; Garvey et coll., 1985). Ainsi, lorsque des personnes souffrant de diabète non-insulino-dépendant sont infusées avec de l'insuline alors que la glycémie est maintenue aux concentrations basales hyperglycémiques caractéristiques de leur état, on observe que la capacité de l'insuline à moduler sa propre sécrétion est altérée (Garvey et coll., 1985). Toutefois, lorsque l'on laisse chuter la concentration de glucose des patients NIDDM jusqu'à des niveaux normaux de jeûne et que l'on maintient cette glycémie en présence d'une hyperinsulinémie, on s'aperçoit que la capacité des cellules bêta à répondre à une hyperinsulinémie par une inhibition de sa propre sécrétion est normale (Garvey et coll., 1985). Cela signifie que l'inhibition relative maximale des niveaux de peptide-C par rapport à leurs valeurs de base est similaire à la réponse rencontrée chez des sujets normaux. Par contre, les concentrations absolues de peptide-C demeurent encore significativement plus élevées chez les patients NIDDM. D'autre part, Baynes et coll. ont repris une étude similaire avec des patients NIDDM lors de clamps isoglycémique (9.3 mmol/L) ou euglycémique (5.2 mmol/L). Ces auteurs rapportent une suppression des concentrations de peptide-C jusqu'à des valeurs absolues équivalentes à celles observées chez des sujets sains lorsque l'expérimentation est effectuée dans des conditions euglycémiques (Baynes et coll., 1991). Ces données suggèrent qu'en présence d'une glycémie normale, la capacité de l'insuline à moduler sa propre sécrétion soit normale chez les patients NIDDM. Cette question a d'ailleurs été étudiée dans le cadre de la prochaine étude où des rats ont été testés dans des conditions de jeûne et des conditions post-

prandiales tout en maintenant leur glycémie au niveau basal associé à chacune des conditions nutritionnelles.

2.3.4.2 Mécanisme régulateur médié par voie nerveuse

Une question a fréquemment été soulevée lors de la démonstration d'un rôle modulateur de l'insuline sur sa propre sécrétion. Il s'agit de savoir si ce mécanisme autorégulateur s'exerce au niveau local ou s'il sollicite la participation d'un ou plusieurs autres organes. Au cours des dernières années, deux études, l'une par Boden et coll. et l'autre par Luzi et coll. ont fourni une partie de la réponse (Boden et coll. 1993; Luzi et coll. 1992). Ces auteurs ont étudié la possibilité que l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline relève d'un mécanisme nerveux. Pour ce faire, ils ont effectué des clamps euglycémique-hyperinsulinémiques chez des personnes ayant subi une transplantation pancréatique, d'où l'absence d'innervation du pancréas. Comparativement aux sujets normaux, l'absence d'innervation pancréatique résulte en une forte atténuation de la suppression de la sécrétion d'insuline endogène tel qu'estimée par les concentrations plasmatiques de peptide-C. Les résultats de ces deux études font ainsi un rapprochement avec les études réalisées sur du tissu pancréatique dans des conditions *in vitro*. L'incapacité à démontrer une rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline lors d'études menées *in vitro* peut tenir du fait que ces préparations pancréatiques étaient dépourvues d'innervation. Cette interprétation est supportée par une étude ayant utilisé un pancréas perfusé *in situ* où la circulation pancréatique de l'animal était isolée alors que son innervation était demeurée intacte (Stagner et coll., 1986). Dans de telles conditions, on a démontré pour la première fois que la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline était transmise par voie nerveuse impliquant ainsi un ou plusieurs autres organes.

2.3.4.3 Hypothèse que l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline est modulée par un réflexe hépato-pancréatique

Le foie est l'un des organes cibles de l'insuline et le principal régulateur des niveaux périphérique d'insuline. Cette dernière est extraite substantiellement par le foie à son premier passage (Harding et coll., 1975). Récemment, l'existence de senseurs à l'insuline situés dans la

région portale du foie et pouvant générer un signal nerveux modulant l'absorption intestinale de glucose a été proposé (Stümpel et coll., 1996). D'autre part, tel que nous l'avons vu dans une des sections précédentes, un lien nerveux entre le foie, le système nerveux central et le pancréas est bien documenté (Lee et Miller, 1985; Sakaguchi et Hayashi, 1981; Nagase et coll., 1993). Parce que l'insuline est une hormone qui exerce un contrôle important sur le métabolisme des glucides et parce qu'il est, par sa position anatomique, le premier organe susceptible de percevoir une variation de la sécrétion d'insuline, on présume que l'innervation afférente hépatique envoie de l'information au système nerveux central concernant les concentrations portales de cette hormone. C'est du moins ce qu'a postulé puis démontré Nijima (Nijima, 1988). Ainsi, dans des conditions *in vitro* et *in vivo*, l'augmentation des concentrations portales d'insuline provoque une augmentation dose-dépendante du taux de décharge afférent dans la branche hépatique du nerf vague. Or, Lee et Miller ont démontré qu'une stimulation électrique de la branche hépatique du nerf vague provoquait une diminution de la concentration artérielle d'insuline (Lee et Miller, 1985). Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation inverse entre le taux de décharge afférent dans le NVH et la sécrétion d'insuline.

À partir de cette information recueillie de la littérature scientifique nous avons conçu un protocole expérimental ayant pour objectif de démontrer qu'une infusion d'insuline exogène directement dans la veine porte provoquera une inhibition plus forte de la sécrétion d'insuline comparativement à une même dose infusée en périphérie démontrant ainsi un rôle du foie dans la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline. De plus, nous avons voulu investiguer si l'état nutritionnel des animaux au moment de l'expérimentation pouvait influencer ce mécanisme régulateur.

2.4. Rôle du foie et troubles métaboliques associés à une élévation des concentrations plasmatiques d'AGL.

L'obésité et particulièrement l'obésité de type androïde ainsi que le diabète non-insulino-dépendant (NIDDM) sont associés à de nombreux désordres liés au métabolisme des glucides

et à la dynamique de l'insuline. Parmi ces désordres, ceux ayant reçu le plus d'intérêt sont la diminution de la clairance de l'insuline par le foie ainsi que l'augmentation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, ces deux facteurs déterminant les concentrations plasmatiques d'insuline (Peiris et coll., 1986; Faber et coll., 1981; Kautsky-Willer et coll., 1992), une diminution de la suppression de la production hépatique de glucose par l'insuline (Groop et coll., 1991; Groop et coll., 1989; Saloranta et coll., 1991; Bonadonna et coll., 1990), une diminution de la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline (Groop et coll., 1991; Chen et coll., 1987; Kissebah et Hennes, 1995; Abate et coll., 1996; Bonadonna et coll., 1990) et finalement, une diminution de la suppression de la lipolyse par l'insuline (Groop et coll., 1991; Groop et coll., 1989; Chen et coll., 1987; Caprio et coll., 1995).

Bien qu'il soit reconnu que les concentrations plasmatiques d'acides gras libres (AGL) sont généralement élevées chez des personnes obèses et des patients atteints de NIDDM (Gorden, 1960; Groop et coll., 1991; Reaven et coll., 1988; Ferrannini, 1995), relativement peu d'auteurs rapportent des mesures directes de concentrations plasmatiques d'AGL en association avec les paramètres cités ci-haut. De ces quelques études on remarque une relation entre les concentrations plasmatiques d'AGL et la production de glucose hépatique ($r=0.58$; Golay et coll., 1987), ces deux paramètres étant plus élevés chez les patients NIDDM, et une corrélation inverse entre les niveaux d'AGL et la prise de glucose induite par l'insuline ($r=-0.67$; Chen et coll., 1987). Plusieurs chercheurs proposent qu'une augmentation des concentrations d'AGL puisse être la source de ces problèmes d'ordre métabolique (Abate et coll., 1995; Bevilacqua et coll., 1990; Boden et Chen, 1995; Boden, 1997; Hennes et al., 1997; Saloranta et coll., 1993; Boden et coll., 1991; Boden et coll., 1995; Bonadonna et coll., 1989; Roden et al., 1996). Une étude longitudinale échelonnée sur une période de quatre ans récemment menée auprès de sujets Pima nord-amérindiens présente à cet égard des données intéressantes (Paolisso et coll., 1995). En effet, chez ces sujets, reconnus pour leur prédisposition à développer le NIDDM, les concentrations plasmatiques d'AGL à jeun constituent un facteur de prédiction du développement de la maladie.

Ferrannini et coll. ont été parmi les premiers à utiliser des infusions d'émulsion de triglycérides combinées à des injections d'héparine dans le but de démontrer l'effet d'une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL sur l'homéostasie du métabolisme des glucides et des lipides chez l'homme (Ferrannini et coll, 1983). Dans cette étude, ces auteurs ont rapporté que la hausse des concentrations plasmatiques d'AGL provoquait une diminution importante de la prise de glucose périphérique induite par l'insuline dans des conditions eu- et hyperglycémiques. Au cours des prochaines sections, une analyse de la littérature traitant des effets de l'augmentation (ou par extension d'une diminution) des concentrations plasmatiques d'acides gras libres sur le métabolisme des hydrates de carbone et de la dynamique de l'insuline sera effectuée. Ensuite, l'implication du foie dans la régulation des fonctions décrites sera traitée.

2.4.1 Diminution de la clairance de l'insuline

Est-ce une diminution de l'extraction de l'insuline par le foie ou une augmentation de la sécrétion de l'insuline qui peut être tenu comme principal facteur responsable de l'hyperinsulinémie rencontrée chez les personnes atteintes d'obésité ou de NIDDM ? Cette question n'a toujours pas de réponse définitive malgré une quantité importante d'études ayant porté sur ce phénomène.

Le groupe de Kissebah, entre autres, ont démontré que la clairance de l'insuline par le foie durant des tests de tolérance au glucose et des clamps euglycémique-hyperinsulinémiques est diminuée chez des personnes souffrant d'obésité de type androïde ainsi que chez des patients atteints de NIDDM (Peiris et coll., 1986; Peiris et coll., 1987a; Peiris et coll., 1987b; Faber et coll., 1981). Ces études établissent des corrélations entre le degré d'obésité et la clairance de l'insuline sans toutefois démontrer de relation cause à effet. Le groupe de Kissebah a proposé que l'augmentation du flux d'AGL, qu'ils associent à l'obésité viscérale, serait possiblement responsable de la diminution de l'extraction de l'insuline par le foie (Kissebah et Hennes, 1995; Peiris et coll., 1987a). Ce n'est que tout récemment que ce groupe a pu démontrer que l'augmentation du flux sanguin d'AGL provoquée par une infusion d'intralipides/héparine durant

un clamp hyperglycémique a provoqué une diminution de la clairance de l'insuline (Hennes et coll., 1997). Tel que présenté par ces auteurs, une mesure précise de la clairance de l'insuline par le foie nécessite que la cinétique de disparition du peptide-C du plasma pour chacun des individus soit effectuée séparément lors d'un protocole supplémentaire. À partir des données sur la disparition du peptide-C, on calcule la sécrétion de l'insuline et sa clairance par le foie. Au meilleur de nos connaissances cette méthodologie n'a pas encore été appliquée au Rat. Une alternative à cette méthode est le rapport molaire peptide-C sur insuline. Ce rapport a souvent été utilisé pour donner un indice de la clairance de l'insuline (Baynes et coll., 1991). Toutefois, l'interprétation des données obtenues avec ce rapport molaire peptide-C/insuline doit se faire avec prudence (Polonsky et Rubenstein, 1984) car certaines assumptions n'ont pas été validées. Les effets des élévations aiguës ou chroniques des niveaux plasmatiques d'AGL sur la demi-vie, la distribution et la clairance du peptide-C demeure incertains.

2.4.2 Augmentation de la production de glucose hépatique

La suppression de la production hépatique de glucose induite par l'insuline est altérée chez des patients atteints de NIDDM (DeFronzo, 1992) et des personnes souffrant d'obésité (Bonnadonna et coll., 1990). Une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL chez une personne normale provoque une atténuation de la suppression de la HGP induite par l'insuline lors de clamps euglycémique-hyperinsulinémiques (Lee et coll., 1988; Saloranta et coll., 1993). Des résultats semblables ont aussi été rapportés chez des sujets obèses (Bevilacqua et coll., 1987), des patients souffrant de NIDDM (Boden et Chen, 1995) ainsi que chez des animaux (Rebrin et coll., 1996).

Toutefois, certaines études n'ont pu démontrer un tel effet d'une élévation des concentrations d'AGL sur la production hépatique de glucose (Ferrannini et coll., 1983; Bevilacqua et coll., 1990; Saloranta et coll., 1991). Les principaux facteurs expliquant l'absence de lien entre les niveaux d'AGL et le taux de HGP dans ces études sont la glycémie maintenue lors du clamp et la durée de l'infusion d'intralipides. Premièrement, lorsque des patients NIDDM ont été étudiés, leur glycémie était verrouillée au niveau de jeûne de ces sujets, ce qui

correspond à une hyperglycémie (Bevilacqua et coll., 1990; Saloranta et coll., 1991). Le fait que les verrouillages aient été effectués à des concentrations plus élevées comparativement à celles d'un sujet normal rend l'interprétation de ces études difficile. L'augmentation de la glycémie favorise une plus grande suppression de la HGP (Rossetti et coll., 1993). D'ailleurs, Boden rapporte aussi que les amplitudes de suppression du taux de HGP par l'insuline avec ou sans élévations des AGL sont semblables lorsque la glycémie est verrouillée aux concentrations de jeûne chez des patients NIDDM. Toutefois, ces auteurs font la démonstration qu'en abaissant la glycémie à des niveaux rencontrés chez des personnes normales, le degré de suppression de HGP par l'insuline devient subitement inférieur en présence de fortes concentrations d'AGL (Boden et Chen, 1995). Deuxièmement, il semble que les intralipides doivent être infusés pendant une durée minimale avant d'observer des effets sur le métabolisme du glucose. En effet, des clamps euglycémique-hyperinsulinémiques de 2H ou moins n'ont pu mettre en évidence un effet de l'élévation des AGL sur la capacité de l'insuline à supprimer la HGP (Bevilacqua et coll., 1990; Ferrannini et coll., 1983).

Les effets d'une augmentation des concentrations d'AGL sur le taux basal de HGP n'ont pas été étudiés en profondeur. Boden et coll. nous révèlent cependant qu'une infusion d'intralipides/héparine sur une période de 5H n'a pas modifié le taux basal de HGP (Boden et Jadali, 1991). Toutefois, cette observation a été recueillie lorsque le pancréas n'était pas verrouillé, c'est à dire qu'on laissait varier la sécrétion d'insuline en fonction des stimuli créés par les conditions ambiantes qui dans le cas présent ont provoqué une augmentation de la sécrétion de l'insuline. En infusant de la somatostatine et en remplaçant les niveaux basaux d'insuline, on trouve un taux de HGP plus élevé en présence de hauts niveaux d'AGL (Boden et Jadali, 1991). Boden et coll. ont donc démontré qu'une augmentation de la sécrétion d'insuline lorsque les concentrations d'AGL sont haussées compense pour l'insulino-résistance hépatique (Boden, 1997).

Il est intéressant de souligner que des agents pharmacologiques, inhibiteurs de la lipolyse adipocytaire (acipimox ou autre analogue de l'acide nicotinique) ou de l'oxydation des

lipides (etomoxir, mercaptoacetate), ont été utilisés afin d'étudier l'effet d'une diminution des concentrations plasmatiques d'AGL sur le taux de HGP. Sous de telles conditions expérimentales, on a pu démontrer une diminution de la HGP à l'état basal (Fulcher et coll., 1992) et une amélioration de la capacité de l'insuline à supprimer la HGP (Fulcher et coll., 1992; Lee et coll., 1996).

2.4.3 Augmentation de la résistance périphérique à l'insuline

L'augmentation de la résistance périphérique à l'insuline est fort probablement l'aspect du métabolisme du glucose le mieux documenté. La résistance périphérique à l'insuline est indissociable du NIDDM (Chen et coll., 1987; Groop et coll., 1989; Katz et coll., 1994) et est régulièrement observée chez des personnes obèses également (Bonadonna et coll., 1990; Berrish et coll., 1995; Ferrannini, 1995). Récemment, Caprio et coll. ont démontré une insulino-résistance chez des jeunes filles obèses avant que tout autre signe pouvant indiquer une prédisposition pour le NIDDM n'apparaisse (Caprio et coll., 1995).

L'élévation des concentrations plasmatiques d'AGL de façon expérimentale atténue l'augmentation de la prise de glucose par l'organisme lors de clamps euglycémiques-hyperinsulinémique. Cette altération de la sensibilité à l'insuline a été observée chez des patients souffrant de NIDDM (Bevilacqua et coll., 1990; Boden et coll., 1995) de même que chez des sujets normaux (Ferrannini et coll., 1983; Lee et coll., 1988; Bonnadonna et coll., 1989; Saloranta et coll., 1993; Boden et coll., 1991; Kelley et coll., 1993; Roden et coll., 1996). Deux heures d'infusion d'intralipides/héparine n'a pas causé de baisse de la prise de glucose stimulée par l'insuline lors d'études conduites soit chez des personnes obèses, soit chez des personnes normales (Bevilacqua et coll., 1987; Boden et coll., 1991). De plus, dans une autre étude, il a été rapporté que le taux métabolique du glucose par l'organisme n'était pas diminué dans les 3,5 premières heures suivant le début de l'infusion d'intralipides/héparine alors qu'après 6H d'infusion, la prise de glucose était diminuée de 46% comparativement à une infusion de salin (Roden et coll., 1996). Il semble donc que la durée de l'infusion de l'émulsion de triglycérides soit importante dans ce type de problématique. Par conséquent, Bonnadonna et coll. ont

suggéré que la compétition métabolique entre les lipides et les glucides, responsable de la diminution du métabolisme du glucose, s'exprime en fonction du temps (Bonnadonna et coll., 1989).

Les mécanismes par lesquels une élévation des AGL diminue le métabolisme du glucose sont complexes et controversés et ne fera pas l'objet d'une analyse approfondie dans le cadre de cet ouvrage. Brièvement, l'explication classique est celle décrite par le cycle de Randle ou autrement appelé le cycle glucose-acides gras. Cette théorie suggère que l'oxydation des acides gras inhibe l'oxydation des glucides par un mécanisme intracellulaire impliquant l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par les acétyl-CoA et les équivalents réduits tous deux produits par la β -oxydation et l'inhibition de la phosphofructokinase par le citrate (Randle et coll., 1994). Certaines études supportent ce mécanisme afin d'expliquer la résistance à l'insuline observée lors d'une augmentation des concentrations d'AGL (Bevilacqua et coll., 1990; Bonnadonna et coll., 1989). La littérature plus récente propose par contre des défaillances de la synthèse du glycogène (activité de la glycogène synthétase altérée: Boden et coll., 1991; Kelley et coll., 1993) et du transport/phosphorylation du glucose (Kelley et coll., 1996; Roden et coll., 1996). On suggère que la diminution du transport/phosphorylation serait la première étape affectée (Roden et coll., 1996).

Tel que démontré par Caprio et coll. chez des sujets possédant un fonctionnement intact des cellules bêta du pancréas, une diminution de la prise de glucose n'est pas toujours apparente car la sécrétion d'insuline peut compenser pour la diminution de la sensibilité à l'insuline en périphérie (Caprio et coll., 1995). D'ailleurs des données indiquent que la diminution de la prise de glucose stimulée par l'insuline observée après 24H d'infusion d'intralipides/héparine disparaît après 48H d'infusion alors que la sécrétion de l'insuline est augmentée compensant ainsi pour l'insensibilité à l'insuline (Boden et coll., 1995).

2.4.4 Augmentation de la sécrétion de l'insuline

Des études ont démontré que les AGL peuvent stimuler la sécrétion d'insuline soit directement ou soit en potentialisant l'action du glucose sur la sécrétion d'insuline aussi bien dans des conditions *in vitro* (Malaisse et Malaisse-Lagae, 1968; Vara et Tamarit-Rodriguez, 1986) qu'*in vivo* (Crespin et coll., 1973;). Chez l'Humain sain, l'infusion d'intralipides/héparine résulte en une augmentation de la réponse endocrine des cellules bêta du pancréas (Boden et Jadali, 1991; Boden et coll., 1995). La littérature scientifique fait foi d'une augmentation de la sécrétion de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose chez des personnes obèses (Faber et coll., 1981; Kautsky-Willer et coll., 1992; Caprio et coll., 1995; Bonadonna et coll., 1990) ainsi que chez des patients atteints de NIDDM (DeFronzo, 1992).

L'effet stimulant d'une élévation aiguë des concentrations plasmatiques d'AGL sur la sécrétion de l'insuline est donc bien documenté. Par contre, l'effet chronique d'une élévation des concentrations d'AGL sur la sécrétion d'insuline est controversé. Ainsi, certaines études effectuées soit sur des îlots pancréatiques humains ou animaux en culture ou sur des préparations de pancréas perfusé ont démontré qu'une élévation chronique des niveaux d'AGL (48H) inhibait la capacité du glucose à stimuler la sécrétion d'insuline (Sako et Grill., 1990; Zhou et coll., 1995; Zhou et coll., 1996; Zhou et coll., 1994). Ces auteurs attribuent cette baisse de l'action du glucose sur la sécrétion de l'insuline en présence d'AGL à une inhibition du métabolisme du glucose causé par l'oxydation des lipides. Le mécanisme suggéré est le cycle de Randle. Le rapprochement entre la signification physiologique de ces données dans un contexte *in vivo* et les connaissances actuelles peut trouver réponse dans un modèle de pathophysiologie du diabète non-insulino-dépendent récemment proposé. Ainsi, on suggère qu'une diminution de l'action antilipolytique de l'insuline provoque une hausse des concentrations d'AGL, qui elles, vont causer une résistance périphérique à l'insuline et une hypersécrétion de cette hormone. Donc, ce postulat représente en quelque sorte les AGL comme des messagers pouvant signaler au pancréas la présence d'une résistance périphérique à l'insuline. Cette théorie est supportée d'une part par la démonstration de l'effet de facilitation de l'augmentation des concentrations d'AGL sur la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose

(Boden et coll., 1995; Stein et coll., 1996). D'autre part, le groupe de Unger démontre qu'à un certain point dans le temps, les cellules bêta du pancréas de rat Zucker prédiabétiques ne répondent plus à l'augmentation de l'hyperlipacidémie par une augmentation de la sécrétion d'insuline (Lee et coll., 1994; Hirose et coll., 1996). Conséquemment, sans cette hypersécrétion compensatoire l'hyperglycémie s'installe. Les résultats opposés entre les études *in vivo* de Boden et coll menées chez l'Humain et les études du groupe de Grill avec des tissus pancréatiques peuvent partiellement s'expliquer par la différence relative que représente 48H chez l'Humain vs le Rat.

2.4.5 Hypothèse suggérant l'augmentation du flux portal comme responsable de ces altérations métaboliques.

Des évidences suggèrent que parmi les différents troubles métaboliques et hormonaux énoncés au cours des sections précédentes, l'extraction hépatique de l'insuline et la production hépatique de glucose principalement puissent être influencées par une augmentation du flux sanguin portal d'AGL. Indirectement, la sensibilité périphérique à l'insuline pourrait aussi être altérée. Finalement, nous proposons que la sécrétion de l'insuline puisse être modifiée par une action des AGL sur le foie provoquant une modification d'un signal nerveux afférent résultant en une modulation réflexe de l'activité nerveuse parasympathique qui résulte en un changement du taux de sécrétion. Voyons d'abord les données ayant servi de base au postulat suggérant une implication des AGL portaux sur le métabolisme du glucose et de la dynamique de l'insuline.

2.4.5.1 Obésité abdominale-viscérale et complications métaboliques

Dans certaines études déjà mentionnées dans les sections précédentes, il a été rapporté qu'un important dépôt de graisses au niveau abdominal plutôt qu'au niveau de la région glutéo-fémorale est associé avec de plus fortes diminutions de la capacité de l'insuline à supprimer la HGP, de la sensibilité des tissus périphériques à l'action de l'insuline et de la sécrétion de l'insuline (Caprio et coll., 1995; Krotkiewski et coll., 1983; Abate et coll., 1995). Bjorntorp a postulé que les individus possédant une plus grande masse adipeuse viscérale seraient plus à risque de développer le diabète et des problèmes cardio-vasculaires (Bjorntorp, 1990). Sans

toutefois effectuer une revue de littérature exhaustive de ce domaine, il est intéressant de souligner que certaines évidences suggèrent que l'accumulation de graisses au niveau des viscères (intrapéritonale: omentale, mésentérique) ait plus d'effets néfastes sur la santé qu'une accumulation sous-cutanée abdominale (Caprio et coll., 1995; Fujioka et coll., 1987). Cette position est toutefois questionnée (Abate et coll., 1995). Voici quelques évidences suggérant une association entre un patron de distribution des graisses de type androïde et les troubles métaboliques et hormonaux mentionnés précédemment dans la section 2.4. Une corrélation entre la quantité de graisse intrapéritonéale proportionnellement à la masse totale du corps et la production hépatique de glucose lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique a été démontrée chez des sujets normaux (Abate et coll., 1996). D'autre part, des femmes ayant un patron préférentiel de dépôt de graisses au niveau abdominal démontrent une forte intolérance au glucose (Kissebah et coll., 1982; Krotiewski et coll., 1983; Evans et coll., 1984). Dans un même ordre d'idées, on a aussi observé que le contenu en graisses viscérales était inversement corrélé avec la sensibilité à l'insuline mesurée lors de clamp euglycémique-hyperinsulinémique (Colberg et coll., 1995; Caprio et coll., 1995; Peiris et coll., 1987a). Kissebah et coll. ont proposé l'hypothèse selon laquelle, la résistance à l'insuline serait aggravée par une augmentation de l'apport en AGL (Kissebah et Hennes, 1995). La sécrétion d'insuline tel que mesurée lors d'un clamp hyperglycémique s'est avérée être corrélée au degré d'adiposité mais non au ratio taille-hanche (Peiris et coll., 1987a; Peiris et coll., 1986). Par contre, Caprio et coll. rapportent une corrélation similaire entre le ratio WHR et la sécrétion d'insuline. Une mesure plus précise obtenue par imagerie par résonance nucléaire magnétique démontre une corrélation significative entre la quantité viscérale de graisses et la sécrétion d'insuline, au niveau basal et lors d'un clamp hyperglycémique (Caprio et coll., 1995). Les études citées dans le paragraphe précédent sont principalement d'ordre descriptif et suggèrent qu'un des éléments clés conduisant à ces défaillances métaboliques et hormonales serait une plus grande affluence d'AGL dans la circulation portale due à une plus grande activité lipolytique des cellules adipeuses intra-abdominales (Peiris et coll., 1986, Caprio et coll., 1995).

Donc, le concept selon lequel l'obésité de type androïde est plus souvent associée à des troubles de la santé (Bjorntorp, 1992) semble supporté par des études *in vitro* menées sur des cellules adipeuses provenant de diverses régions anatomiques. D'un point de vue anatomique, les cellules adipeuses intrapéritonéales ont une localisation critique car le sang veineux provenant de ces cellules se déversent directement dans la veine porte hépatique. Toutefois, les données recueillies dans des conditions *in vitro* concernant les effets antilipolytiques de l'insuline sur ces cellules sont inconsistantes (Bolinder et coll., 1983; Ostman et coll., 1979). Récemment, une étude conduite chez l'Homme dans des conditions *in vivo* où l'on prélevait du sang veineux portal suggère que les tissus adipeux splanchniques possèdent une plus grande sensibilité à l'action antilipolytique de l'insuline que ceux de la périphérie (Blackard et coll., 1993). Par contre, une plus grande activité lipolytique induite par des agonistes adrénérgiques sur des cellules omentales et mésentériques (intrapéritonéales) comparativement à des cellules adipeuses des tissus sous-cutanés abdominaux (Efendic, 1970; Rebuffé-Scrive et coll., 1989) est bien documentée chez l'Homme. Une simplification d'un modèle actuel expliquant la régulation de la lipolyse intra-abdominale est résumée dans les lignes suivantes. À l'état post-prandial, les cellules adipeuses intrapéritonéales vont accumuler des graisses sous l'action antilipolytique de l'insuline. Réciproquement, à l'état de post-absorption alors que l'activité du système nerveux sympathique s'élève légèrement, le foie serait exposé à un plus grand flux d'AGL. Donc, le tissu adipeux viscéral serait plus sensible à l'action antilipolytique de l'insuline et à l'action lipolytique de l'adrénaline. Toutefois, il est important de souligner que ces relations peuvent varier en fonction du sexe et du degré d'obésité du sujet.

2.4.5.2 Exposition du foie à une élévation des niveaux d'AGL et complications métaboliques

Des évidences suggèrent que l'augmentation des concentrations d'AGL spécifiquement au niveau du foie aient des effets directs sur certains des paramètres présentés à la section 2.4. L'effet des acides gras libres sur la néoglucogénèse hépatique a été démontré il y a de cela plusieurs années (Friedman et coll., 1967; Williamson et coll., 1966). Le mécanisme traditionnel ayant été proposé suggèrent que les AGL favorisent la néoglucogénèse en augmentant la

production d'équivalents réduits (NADH) et d'ATP qui vont servir de source d'énergie aux réactions enzymatiques énergies dépendantes de la néoglucogénèse ainsi que des molécules d'acétyl-CoA qui vont activer la pyruvate carboxylase voir (Boden, 1997). Toutefois, la notion de l'augmentation des concentrations de substrats énergétiques et l'exactitude des inter relations entre les substrats et enzymes mentionnées ci-haut afin d'expliquer l'effet stimulant des AGL sur la néoglucogénèse sont remises en question (Blumenthal, 1983; Gonzalez-Manchon et coll., 1989). Ces auteurs suggèrent plutôt que l'effet des AGL se situe principalement au niveau de la stimulation de la pyruvate carboxylase possiblement par une diminution des concentrations d'ADP ou de l'augmentation du ratio ATP/ADP. Tel que déjà mentionné dans la section 4.2, l'utilisation d'inhibiteurs de l'oxydation des AGL se traduit par une diminution de la production hépatique de glucose. L'effet chronique du traitement avec une telle drogue peut avoir un impact important dans le traitement du diabète. En effet, après 3 semaines de traitement à l'etomoxir, on a observé, chez un rat dont le diabète était induit par la streptozotocin, une diminution significative de la production hépatique ainsi que des concentrations plasmatiques de glucose (Collier et coll., 1993). Toutefois, tel n'est pas toujours le cas car il peut y avoir une compensation par une variation du taux de glycolyse de sorte que le taux de HGP demeure inchangé (Lee et coll., 1996). Ces derniers auteurs suggèrent que ce phénomène implique des mécanismes autorégulateurs intrahépatiques. Dans des conditions *in vivo*, l'augmentation des concentrations d'AGL dans l'environnement des cellules hépatiques peut être associée à une production anormalement élevée de glucose pouvant mener à une hyperglycémie. Dans le cadre de la prochaine étude, l'un des objectifs était de déterminer si l'exposition spécifique du foie à une augmentation du flux d'AGL pouvait induire une augmentation de la production hépatique de glucose à l'état basal ainsi qu'une diminution de la capacité de l'insuline à supprimer cette activité hépatique.

Certaines études déjà mentionnées dans la section 2.4.3 font part d'une diminution de la sensibilité à l'insuline chez des personnes souffrant d'obésité abdominale chez qui on peut suspecter une augmentation du flux sanguin portal d'AGL. Toutefois, aucun mécanisme direct d'ordre hépatique ne semble impliqué dans le développement de ce désordre. La mesure de la

production de glucose hépatique par la méthodologie des traceurs nous fournit des données sur la disposition du glucose. Conséquemment, cette technique nous offre la possibilité d'étudier l'effet d'une augmentation chronique des AGL sur le métabolisme du glucose dans des conditions *in vivo*.

L'élévation des concentrations d'AGL peut, comme nous l'avons vu à la section 4.4, agir au niveau du pancréas et favoriser la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose ou encore stimuler la sécrétion d'insuline par action compensatrice en réponse à l'effet des AGL sur l'augmentation de la résistance à l'insuline. D'autre part, le palmitate, un acide gras, a aussi la capacité d'hyperpolariser les membranes des cellules hépatiques de manière dose-dépendante (Rossi et coll., 1995). Ces auteurs ont rapporté que l'utilisation d'inhibiteurs de l'oxydation des lipides en présence de palmitate a provoqué une diminution du potentiel de membrane suggérant que l'oxydation des acides gras soit impliquée dans l'hyperpolarisation causée par le palmitate. Dans le chapitre 1, nous avons présenté le postulat de Russek suggérant que le potentiel de membrane des hépatocytes détermine le taux de décharges afférent des fibres nerveuses gluco-sensibles (Russek, 1981). Selon ce postulat, il y aurait une relation inverse entre le potentiel membranaire des cellules hépatiques et le taux de décharges afférent dans la BHNV. Conséquemment, il a démontré que le taux de décharges afférent dans la BHNV est inversement relié à l'activité nerveuse efférente parasympathique, donc à la sécrétion d'insuline (Nagase et coll., 1993). À partir des liens qui viennent d'être établis, nous proposons que l'oxydation des lipides au niveau du foie hyperpolarise les membranes hépatocytaires et que par un mécanisme nerveux impliquant l'axe hépato-pancréatique il soit possible que l'hyperpolarisation des hépatocytes se traduise en une augmentation de la sécrétion de l'insuline. Ce mécanisme, s'il est fonctionnel, pourrait contribuer à l'hyperinsulinémie qui est caractéristique des personnes souffrant d'obésité viscérale et de diabète de type II.

La technique utilisée afin de mettre en évidence un rôle de l'oxydation des lipides au niveau du foie sur la modulation de la sécrétion de l'insuline dans des conditions *in vivo* à l'état basal et durant une stimulation induite par le glucose consiste à infuser les lipides par voie

intraportale et de comparer avec une infusion périphérique. Dans le passé l'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence le rôle du foie dans la régulation de la prise alimentaire par certains nutriments (Tordoff et coll., 1988; Tordoff et Friedman, 1986; Novin et coll., 1974), dans l'activation réflexe du taux de décharges efférent dans la branche pancréatique du nerf vague (Nijima, 1980; Nijima, 1984a) et dans la régulation hormonale et métabolique à l'exercice (Cardin et coll., 1994). D'autre part, l'infusion de l'émulsion de triglycérides directement dans la veine porte hépatique comparativement à une infusion en périphérie permettra une surcharge de lipides spécifique au foie. Par cette procédure, nous voulons reproduire un état semblable à ce qui se retrouve chez des personnes souffrant d'obésité viscérale. Nous pouvons de cette manière comparer les effets d'une surcharge lipidique au niveau du foie sur la production hépatique de glucose, la prise de glucose périphérique et finalement la sécrétion d'insuline chez le Rat *in vivo* et comparer avec les effets d'une dose similaire pénétrant la circulation sanguine par voie systémique. Notre montage expérimental nous offre la possibilité de poursuivre l'infusion de lipides sur une période de temps prolongée alors que l'animal continue ses activités avec un minimum de restrictions causées par l'équipement. La majorité des études ayant porté sur les paramètres physiologiques mentionnés au paragraphe précédent ont examiné l'effet aigu d'une hausse des concentrations d'AGL. D'une part, l'obésité viscérale est une situation pouvant, de toute évidence, affecter le métabolisme glucidique et la dynamique de l'insuline sur une longue période. D'autre part, la littérature scientifique comporte des divergences importantes concernant l'effet des AGL sur ces mêmes paramètres physiologiques qui peuvent apparemment s'expliquer par la durée de l'exposition à une élévation des concentrations d'AGL (Saloranta et coll., 1993; Bonnadonna et coll., 1989; Boden et coll., 1991). Pour ces raisons, nous avons étudié l'effet d'infusions aiguës (2H) et chronique (48H) d'intralipides sur le métabolisme du glucose et de la dynamique de l'insuline.

L'hypothèse proposée dans le cadre de la troisième étude de la présente thèse est que l'augmentation de l'apport portal en AGL tel que provoquée par l'infusion chronique d'une émulsion de triglycérides par voie intraportale devrait être associée à des augmentations de la production de glucose hépatique et de la sécrétion de l'insuline par activation réflexe de l'arc

hépatopancréatique. La mesure de ces paramètres s'effectuera à l'état basal, après une nuit de jeûne ainsi que durant un clamp hyperglycémique.

CHAPITRE 3: PREMIER ARTICLE

**EFFECT OF HEPATIC PORTAL INJECTION OF OUABAIN
ON THE HEPATO-SYMPATHOADRENAL REFLEX**

Raynald BERGERON, Jean-Marc LAVOIE, Sylvain CARDIN,
Martin G. LATOUR, François DÉSY, Richard HÉLIE and
Nobuharu YAMAGUCHI

Département d'éducation physique and Faculté de pharmacie,

Université de Montréal, Montréal, Québec, [REDACTED] Canada

Running head: OUABAIN INJECTION IN HEPATIC-VAGOTOMIZED RATS

Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département d'éducation physique
Université de Montréal

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

SUMMARY

BERGERON, R., J.-M. LAVOIE, S. CARDIN, M.G. LATOUR, F. DÉSY, R. HÉLIE, and N. YAMAGUCHI. Effect of hepatic portal injection of ouabain on the hepato-sympathoadrenal reflex. *Physiol. Behav.*

The purpose of the present investigation was to evaluate the effects of an intraportal injection of ouabain (2 mg/kg), an inhibitor of the sodium-potassium pump, on plasma catecholamine response in unrestrained normally fed rats with and without an intact hepatic vagus nerve. Three groups of rats were submitted to two injection conditions each. Hepatic vagotomized (HV) rats were randomly injected with ouabain or saline (0.9%) into the portal vein. Sham-operated rats (SHM) were either injected with ouabain or saline into the portal or a jugular vein. Ouabain or saline were injected at 0 min and again at 20 min. Plasma catecholamines were measured before the first injection and 15 min after each injection. Blood glucose concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased by the ouabain injection as compared to basal values and saline-injected groups. The hyperglycemic effect of ouabain was not affected by the hepatic vagotomy or the site of infusion. Injection of ouabain either into the portal or the jugular vein and either after HV or SHM operation resulted in a significant ($P < 0.01$) increase in epinephrine levels as compared to saline-infused rats. Plasma norepinephrine levels were significantly ($P < 0.05$) increased after the second intraportal injection of ouabain in both HV and SHM groups. Injection of ouabain into the jugular, however, vein did not change the plasma norepinephrine levels. The latter observation indicates a specific action of ouabain in the liver on the sympathetic activity.

Index terms: Liver; hepatic vagotomy; epinephrine; rat.

INTRODUCTION

There is a growing evidence that the liver, through its afferent innervation is involved in several regulatory functions such as food intake (30, 33, 38), gastric acid secretion (8), and metabolic regulation of metabolites such as free fatty acids (17). This view is strongly supported by electrophysiological data showing that the frequency of the afferent discharge rate of the hepatic vagus nerve decreased following intraportal administration of glucose (22). In addition, electrical stimulation (31) or hepatic nerve vagotomy (18) has shown that these hepatic afferent neurons are involved in pancreatic insulin (18, 31, 32) and glucagon (36) secretion. It is only recently, however, that the liver, through its afferent innervation, has been reported to influence the sympathoadrenal response. This effect has been characterized during situations such as insulin-induced hypoglycemia (6,12) and physical exercise (16). These findings are also supported by electrophysiological data showing that an increase in glucose concentration in the portal venous blood produces a reflex inhibition of the adrenal nerve activity (24).

From the above-mentioned studies, it can be observed that the reflex activity between some metabolic changes in the liver and the hormone secretion from the adrenal medulla and the pancreas is experimentally well substantiated. On the other hand, the hepatic mechanism responsible to link the metabolic activity in the liver to the neural signal in the hepatic vagus and from that to the hormone secretion remains speculative. Russek (30) suggested that the membrane potential of the hepatocytes determines the firing rate of afferent neurons. In perfused liver, administration of different metabolites (pyruvate, lactate, fructose, alanine, and palmitate; 5) and hormones (glucagon, epinephrine; 25) elicited a sustained hyperpolarization of the cell membrane. Interestingly, the liver cell membrane hyperpolarization was inhibited by administration of ouabain (5, 25), an inhibitor of the sodium-potassium pump (34). These data indicate that the induced membrane hyperpolarization might involve an activation of the energy-dependent sodium-potassium pump. That the activation of the hepatic sodium-potassium pump is in turn linked to the neural signal in the hepatic vagus is supported by the demonstration that after an infusion of ouabain into the portal vein, an injection of glucose did not change the firing

rate of hepatic afferents (23). Ouabain injection in vivo has also been reported to stimulate feeding in rats, which effect was blocked by selective hepatic vagotomy (14). In a preliminary study (15), we intraperitoneally infused ouabain in sham and hepatic vagotomized rats and found a response that suggested that ouabain-induced epinephrine response was inhibited by the hepatic vagotomy. This study was, however, limited by the specificity of the infusion and the number of observations.

In the present study, we investigated the effects of an intraportal infusion of ouabain on the sympatho-adrenal response in normally fed rats with and without an intact hepatic nerve.

METHODS

Animal care. Male Sprague-Dawley strain rats (Charles River, Canada, St-Constant, Québec) weighing 180-200 g, were housed in individual cages and allowed food and water ad libitum for 22 days after they were received in our laboratory. Lights were on from 6 A.M. until 6 P.M. and the room temperature was maintained at 20-23°C.

Six days before the experimentation, all animals underwent a selective hepatic vagotomy (HV) or sham operation (SHM), a chronic hepatic portal vein, a jugular vein, and a carotid artery cannulation under pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) anesthesia. Isotonic saline (5.0 mL) was injected subcutaneously in the back to provide extra fluids during surgery. General descriptions of the abdominal vagal system of the rat indicate that in most cases only a single hepatic branch of the anterior vagus is apparent (19, 26), although two or three hepatic branches have also been observed (27). Sectioning of the hepatic branch of the vagus was conducted according to the technique described by Tordoff and Novin (37). Briefly, a 4- to 5-cm ventral midline incision was made just caudal to the xyphoid process, and the stomach and lower esophagus were gently retracted from the abdominal cavity. The median and left lateral lobes of the liver were deflected, if necessary, to allow visualisation of the hepatic branch of the vagus nerve. In the HV rats, the hepatic vagus was transected distal to the point at which it

emerges from the anterior vagal trunk, and the hepatoesophageal omentum was severed so that no tissue connections between the esophagus and the liver remained anywhere along the length of the subdiaphragmatic esophagus. A binocular microscope (Bausch & Lomb, 10-30 x magnification) was used when necessary to localize the hepatic vagus. The hepatic vagus of SHM rats were exposed for approximately the time required to perform hepatic vagotomy, but the vagus was not interfered with. All animals were frequently irrigated with physiological saline throughout surgery to limit adhesion.

The hepatic portal catheter was inserted according to the technique described previously (4) with some minor modifications. The catheter consisted of a 20 cm-long Silastic tube (0,51 mm ID, 0,94 mmOD, Dow Corning no. 602-135) protected at the external end by a 7 cm-long Tygon microbore tubing sheath (1,02 mm ID, 1,18 mm OD, no S-54-HL) glued to the Silastic tubing with cyanocrylic cement and reinforced with a silk thread (4.0). A 1-cm square piece of tulle mesh was attached 4 cm from the external end of the catheter and anchored to the skin in the posterior area of the neck at the base of the skull. A cap, for the cannula, was made from the crushed shaft of a blunted 23-gauge needle. First, the catheter was tunneled under the skin between a two to three cm-long laparotomy and a ~ 7 mm-long skin incision between the shoulder blades. The internal end of the catheter was beveled at ~ 45°. Afterward, the cecum was lifted out of the peritoneum, the ileocolic vein was located, and an area around the junction of this vessel and one of its tributaries close to the cecum was cleared of fat. Blood flow in the chosen vein was interrupted by placing a 5.0 silk thread upstream and by applying tension on another thread positioned at the junction of the two veins. A small incision was made in the tributary vein of the isolated area, then the catheter was inserted and threaded toward the portal vein. The catheter was then tied in place with the previously placed sutures. A verification of the placement of the cannula was made after the rat was killed to ensure that the infusion was successful. All catheters were filled with a heparin solution (500 IU/mL). The animals were also injected once intramuscularly with antibiotics (Penicillin G procaine; 40 000 U/kg) and analgesics (Buprenorphine: 0.25 mg/kg) and allowed to recover for at least six days. During that period, animals had free access to food and water, were weighed on week days, and were

exposed once to the setting of the experimental conditions to minimize the stress. Only the rats that showed a significant increase in body weight during the last 24 h preceding the experiment were included in the study.

Verification of surgery. There is at the present no easy test for verifying on a case-by-case basis the completeness of the hepatic vagotomy used here (20, 37). At surgery, we used the most careful techniques to ensure complete destruction of the hepatic vagus. During surgery, great care was taken to ensure that no tissue remained between the liver and esophagus from the esophageal plexus to the cardia of the stomach. When there was any ambiguity concerning the identification of the vagal hepatic branch, the animal was discarded from the experiment. In addition, in a separate experiment, the increased insulin response to an acute hepatic vagotomy in adrenalectomized rats was used as a further assessment of the surgical technique (16, 18). Accordingly, an ~ 36% increase in peripheral venous insulin concentrations [160 ± 10 to 217 ± 18 ($X \pm SE$) pmol L⁻¹, $P < 0.01$, $n = 7$] and an ~ 58% increase in portal venous insulin concentrations [259 ± 26 to 410 ± 38 (SE) pmol L⁻¹; $P < 0.01$, $n = 7$] were found 30 min after section of the hepatic vagus nerve.

Groups and experimental protocol. On the day of the experiment, food was removed from cages 2.5 h before the experiment which was conducted between 9:30 a.m. and 12:00 p.m. All animals were submitted to two experiments. On the first test, unrestrained rats were randomly injected either with ouabain (2 mg/kg) dissolved in saline (1 mg/mL) or with saline (0.9%; 2 mL/kg). Forty-eight hours later the same protocol was repeated with the same rat using the other injection solution. The dose of ouabain injected (2 mg/kg) was chosen because it has been shown to stimulate feeding in rats (13). Overall, six conditions were studied. Hepatic vagotomized rats ($n = 8$) were injected into the portal vein with ouabain (POR-HV-OUA) or saline (POR-HV-SAL), while SHM rats were injected with ouabain or saline either into the portal vein ($n = 8$; POR-SHM-OUA and POR-SHM-SAL) or the jugular vein ($n = 6$; JUG-SHM-OUA and JUG-HV-SAL). The three catheters were connected to polyethylene tubing extensions 20 min before the beginning of the experiment. The tubing extension linked to the

carotid artery was filled with saline containing heparin (5 IU/mL). Arterial blood was first sampled for the determination of basal concentrations of glucose (-5 and 0 min) and catecholamines (0 min). Ouabain or saline was then injected at 0 min and again at 20 min. Blood was sampled 5, 10, and 15 min after both infusions. Blood from donor animals sacrificed in the same nutritional state was reinfused in equivalent volumes following major blood sampling (0, 15, and 35 min).

Ouabain is a cardiac glycoside which is efficiently eliminated by the liver in rat (29). It will initially accumulate in the liver and then be mostly eliminated by biliary excretion (3). The plasma clearance of the injected ouabain is rapid. More than 80% of a 0.4 g/100g iv dose has disappeared from the plasma within two min (11). According to Iga and Klaassen (9) all injected ouabain has disappeared from plasma after 15 min. These authors also showed that about 24% of an administered dose of ouabain is excreted in the bile by 15 min and about 30% by 20 min. The 15-min post-injection time used in the present study was therefore chosen to minimize the possibility of extrahepatic effects.

Analytical methods. Arterial blood was collected into a heparinized syringe and immediately separated into three fractions. A small portion of blood was used for hematocrit determination in duplicate using a microhaematocrit method. The second fraction of blood (600 μ L) to be used for catecholamine determinations was transferred in tubes containing glutathione 60 mg/ml and ethyleneglycol-bis (-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA; 90 mg/ml), kept in crushed ice, and centrifuged (4°C) within 30 min after collection. The remainder of the blood was similarly centrifuged, and the plasma was stored for subsequent glucose determination. Blood samples were stored at -80°C until analyses were performed. Plasma glucose concentrations were determined by means of a glucose analyzer (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Catecholamines were extracted from plasma according to the procedure described by Remie and Zaagsma (28) and quantified by means of an isocratic HPLC system (Gilson, Villiers-le-Bel, France). The recovery of norepinephrine, epinephrine, and dihydroxybenzylamine with the concentration of 2 ng/ml was $83.1 \pm 8.1\%$, $81.3 \pm 9.8\%$, and

96.9 ± 3.8%, respectively. All data are reported as means ± SE with 6-8 animals/group. Statistical comparisons of blood parameters were made using two different three-way analysis of variance (ANOVA). The first three-way ANOVA included comparisons of 2 (portal, jugular) x 2 (ouabain, saline) with repeated measures (time) and the second three-way ANOVA included comparisons of 2 (HV, SHM) x 2 (ouabain, saline) with repeated measures (time). Tukey post-hoc tests for unequal sample size were used to determine specific differences between groups. Body weights were compared using a one-way ANOVA. A 95% level of confidence was accepted for all comparisons. This study was conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the protocol was approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the University of Montreal.

RESULTS

Body weights of the animals were still significantly ($P < 0.01$) lower during the first session of tests as compared to pre-surgery values (274.1 ± 3.8 vs 293.4 ± 4.8 g). However, weights at the second session of testing (48 h later) were not significantly different from the pre-surgery weights (283.5 ± 4.0 g). These data are interpreted as a sign that the rats were recovering well from surgery. There were no significant differences in pre-injection plasma glucose concentrations between groups (Fig. 1). Glucose concentrations, from the 15th to the 35th min, were significantly ($P < 0.01$) higher in the ouabain-injected groups compared to basal values and compared to respective values in saline-injected groups. Neither the surgery (HV or SHM) nor the site of injection (portal or jugular) altered glycemia.

When comparisons were made for the site of infusion, ouabain, as well as saline, injected either into the portal or the jugular vein did not significantly alter plasma norepinephrine levels (Fig. 2). However, when comparisons were made between HV and SHM rats (Fig. 3), intra-portal injection of ouabain resulted in significant ($P < 0.05$) higher plasma norepinephrine levels at the 35 min time point compared to the 0 and 15 min time points and compared to corresponding saline-injected groups. Hepatic vagotomy did not suppress the ouabain-induced

increase in norepinephrine concentrations (Fig. 3). Plasma epinephrine concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased by the ouabain injection compared to basal values and compared to saline-injected groups (Figs 4 and 5). The ouabain-induced epinephrine response was not influenced by the site of injection (Fig. 4) or by the HV (Fig. 5).

DISCUSSION

Recently, the hepato-adrenal reflex in response to insulin-induced hypoglycemia has been investigated in dogs (6, 12). It was shown in these studies, that the increase in plasma epinephrine concentrations in response to hypoglycemia was markedly depressed by an acute surgical hepatic denervation (12) or by the maintenance of regional hepatic euglycemia (6, 9). Hepatic portal injection of ouabain in the present study resulted in an increase in epinephrine concentrations. Based on the above-mentioned studies (6, 9, 12), this response was expected, as explained in the following sequence. In a normally fed rat with an euglycemic liver, the rate of the afferent discharges in the hepatic vagus nerve is, most likely, reduced as a consequence of the hyperpolarized state of the hepatocyte membrane (30). Ouabain, by inhibiting the sodium-potassium pump activity, decreases the hepatocyte membrane potential (25), which should result in an increase in the afferent discharge rate of the hepatic vagus nerve (23). In this way, the injection of ouabain created the false information of a regional hypoglycemic liver which, even though blood glycemia was normal, resulted in a large increase in plasma epinephrine concentrations. If this sequence is correct, an hepatic vagotomy, by cutting the afferent pathway through which the false information of an hypoglycemic liver is conveyed, should attenuate the epinephrine response. However, the ouabain-induced epinephrine response was observed as much after the intraportal than after the jugular injection of ouabain. Although these results raise doubts on the specificity of hepatic action of ouabain on epinephrine response, they do not completely rule out such an action. In the present study, only one dose of ouabain was used and it is possible that with a difference dose of injected ouabain, a different epinephrine response might have been observed.

Several years ago, Langhans and Scharrer (14) showed that intraperitoneal injection of ouabain stimulates feeding in rats. The hyperphagic effect of ouabain was blocked by hepatic branch vagotomy. Langhans (13) also recently reported that hepatic portal infusion of ouabain during the light phase increased spontaneous food intake in rats, whereas equivalent infusions of ouabain into the inferior vena cava had no significant effect on feeding. It is difficult to reconcile the hyperphagic effect of ouabain with the present ouabain-induced epinephrine response, since epinephrine infusion has been reported to reduce or do not alter feeding behavior (1, 30). The results of the present study indicate that ouabain injection produces physiological changes in plasma epinephrine and glucose that are more inclined to induce satiety than stimulate feeding behavior.

Plasma norepinephrine concentrations were increased after the intraportal injection of ouabain in HV as well as in SHM rats (Fig. 3). This increase was not, however, observed when ouabain was injected into the jugular vein (Fig. 2). These results indicate a specific action of ouabain in the liver in the activation of the sympathetic activity. The fact that this effect was not inhibited by the hepatic vagotomy as it has been in other situations, such as physical exercise (16), is puzzling. However, one must take into account that an hepatic vagotomy does not necessarily take out all hepatic afferent information. It has been reported that approximately 10% of the vagal afferents projecting to the periarterial plexus of the common hepatic artery pass through the dorsal celiac branch (2). Therefore, the possibility of an incomplete hepatic afferent denervation makes that a role of the liver in the ouabain-induced increase in plasma norepinephrine concentrations cannot be ruled out. As discussed above, ouabain could specifically act in the liver by creating the false information of a regional hypoglycemic liver. An increased sympathetic activity in response to this stimuli would be part of the counterregulatory response to hypoglycemia. This interpretation is in agreement with recent reports showing that plasma norepinephrine response to peripheral hypoglycemia is reduced when euglycemia is maintained across the liver (6, 7).

Besides epinephrine and norepinephrine, blood glucose levels were increased following injection of ouabain. Norepinephrine efflux from sympathetic noradrenergic nerves has been reported to be increased *in vivo* by ouabain (35). The increased arterial plasma glucose concentrations could partially be explained by an increased norepinephrine release in the liver through ouabain-induced stimulation of adrenergic nerve endings found in the portal vein area (21). On the other hand, the jugular injection of ouabain also increased glycemia despite the absence of an elevation in norepinephrine and this suggests that this metabolic response was most likely secondary to the increase in plasma epinephrine concentrations.

In summary, intraportal injection of ouabain, an inhibitor of the sodium-potassium pump (34), resulted in a large increase in plasma epinephrine, norepinephrine, and glucose concentrations. The increase in epinephrine levels was also observed when ouabain was injected into a jugular vein whereas norepinephrine levels were not. The latter observation indicates a specific action of ouabain in the liver and suggests an implication of the sodium-potassium pumps in the sympathetic activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Government of Quebec). We express our appreciation to Sanae Yamaguchi for technical assistance.

REFERENCES

1. Bellinger, L.L. and Williams, F.E. The effect of portal infusions of epinephrine on ingestion, plasma glucose and insulin in dogs. *Physiol. Behav.* 48: 479-483; 1990.
2. Berthoud, H.-R., Kressel, M. and Neuhuber, W.L. An anterograde tracing study of the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. *Anat. Embryol.* 186: 431-442; 1992.
3. Bowner, C.J. and Yates, M.S. Pharmacokinetics and biliary excretion of brumosulphophtalein, (³H)-ouabain and (³H)-taurocholic acid in the rat with glycerol-induced acute renal failure. *Br. J. Pharmacol.* 83: 773-782; 1984.
4. Cardin, S., Helie, R., Bergeron, R., Comte, B., Van de Werve, G. and Lavoie, J.-M. Effect of hepatic portal infusion of pyruvate on pancreatic hormone response during exercise. *Am. J. Physiol.* 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 35): R1630-R1636; 1994.
5. Dambach, G. and Friedmann, N. Substrate-induced membrane potential changes in the perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* 367: 366-370; 1974.
6. Donovan, C.M., Halter, J.B. and Bergman, R.N. Importance of hepatic glucoreceptors in sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 40: 155-158; 1991.
7. Donovan, C.M., Hamilton-Wessler, M., Halter, J.B. and Bergman, R.N. Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2863-2867, 1994.
8. Granneman, J. and Friedman, M.I. Hepatic modulation of insulin-induced gastric acid secretion and EMG activity in rats. *Am. J. Physiol.* 238 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 7): R346-R352; 1980.
9. Hamilton-Wessler, M., Bergman, R.N., Halter, J.B., Watanabe, R.M. and Donovan, C.M. Role of liver glucosensors in the integrated sympathetic response induced by deep hypoglycemia in dogs. *Diabetes* 43: 1052-1060; 1994.
10. Iga, T. and Klassen, C.D. Age related pharmacokinetics of ouabain in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 170: 59-62; 1982.

11. Kitani, K., Kanai, S., Miura, R., Morita, Y. and Kasahara, M. The effect of ageing on the biliary excretion of ouabain in the rat. *Exp. Geront.* 13: 9-17; 1978.
12. Lamarche, L., Yamaguchi, N. and Péronnet, F. Hepatic denervation reduces adrenal catecholamine secretion during insulin-induced hypoglycemia. *Am. J. Physiol.* 268 (Regul. Integr. Comp. Physiol.37): R50-R57; 1995.
13. Langhans, W. Metabolic and glucostatic control of feeding. *Proc. Nutr. Soc.* 55: 497-515; 1996.
14. Langhans, W. and Scharrer, E. Evidence for a role of the sodium pump of hepatocytes in the control of food intake. *J. Auton. Nerv. Syst.* 20: 199-205; 1987.
15. Lavoie, J.-M., Bergeron, R., Cardin, S., Hélie, R. and Yamaguchi, N. Evidence for a role of the sodium pump of hepatocytes in the sympathoadrenal response. *The FASEB Journal* 7: 1-847, (abstract) 1993.
16. Lavoie, J.-M., Cardin, S. and Doiron, B. Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am. J. Physiol.* 257 (Endocrinol. Metab. 20): E855-E859; 1989.
17. Lavoie, J.-M., Lord, M. and Paulin, A. Effect of a selective hepatic vagotomy on plasma FFA levels in resting and exercising rats. *Am. J. Physiol.* 254 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 23): R602-R606; 1988.
18. Lee, K.C. and Miller, R.E. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 117: 307-314; 1985.
19. Legros, G. and Griffith, C.A. The abdominal vagal system in rats. *J. Surg. Res.* 9: 183-186; 1969.
20. Louis-Sylvestre, J. Validation of tests of completeness of vagotomy in rats. *J. Auton. Nerv. Syst.* 9: 301-314; 1983.
21. Metz, W. and Forssman, W.G. Innervation of the liver in guinea pig and rat. *Anat. Embryol.* 160: 239-252; 1980.
22. Nijjima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea pig. *J. Physiol.* 332: 315-323; 1982.

23. Nijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and their role in food intake and blood glucose regulation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 9: 207-220; 1983.
24. Nijima, A. Nervous regulation of metabolism. *Progress in Neurobiology* 33: 135-147; 1989.
25. Petersen, O.H. The effect of glucagon on the liver cell membrane potential. *J. Physiol. (London)* 239: 647-656; 1974.
26. Prechtel, J.C. and Powley, T.L. Organization and distribution of the rat subdiaphragmatic vagus and associated paraganglia. *J. Comp. Neurol.* 235: 182-195; 1985.
27. Prechtel, J.C. and Powley, T.L. A light and electron microscopic examination of the vagal hepatic branch of the rat. *Anat. Embryol.* 176: 115-126; 1987.
28. Remie, R. and Zaagsma, J. A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. *Am. J. Physiol.* 251 (Heart Circ. Physiol. 20): H463-H467; 1986.
29. Reuning, R.H. and Schanker, L.S. Effect of tetrachloride-induced liver damage on hepatic ouabain transport in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178: 589-594; 1971.
30. Russek, M. Current status of the hepatostatic theory of food intake control. *Appetite* 2: 137-143; 1981.
31. Sakaguchi, T. and Yamaguchi, K. Effects of electrical stimulation of the hepatic vagus nerve on the plasma insulin concentration in the rat. *Brain Res.* 164: 314-316; 1979.
32. Sakaguchi, T. and Hayashi, Y. Reflex secretion of insulin evoked by hepatic portal injection of D-glucose anomers in the rat. *Biomed. Res.* 2: 222-224; 1981.
33. Sawchenko, P.E. and Friedman, M.I. Sensory functions of the liver - a review. *Am. J. Physiol.* 236 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 5): R5-R20; 1979.
34. Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45: 596-617; 1965.
35. Tan, C.M. and Powis, D.A. Cardiac glycosides, calcium and the release of neurotransmitter from peripheral noradrenergic nerves. *Nauyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 329: 1-8; 1985.

36. Tanaka, K., Inoue, S, Fudjii, T. and Takamura, Y.M. Enhancement of insulin and glucagon secretion by arginine after hepatic vagotomy. *Neurosci. Lett.* 72: 74-78; 1986.
37. Tordoff, M.G. and Novin, D. Celiac vagotomy attenuates the ingestive responses to epinephrine and hypertonic saline but not insulin, 2-deoxy-D-glucose, or polyethylene glycol. *Physiol. Behav.* 29: 605-613; 1982.
38. Tordoff, M.G., Tluczek, J.P. and Friedman, M.I. Effect of hepatic portal glucose concentration on food intake and metabolism. *Am. J. Physiol.* 257 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 26): R1474-R11480; 1989.

LEGENDS

- Figure 1.** Plasma glucose concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding basal values and from corresponding saline-injected groups: P < 0.01.
- Figure 2.** Plasma norepinephrine concentrations in sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE. for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows.
- Figure 3.** Plasma norepinephrine concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) into the portal (POR) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: P < 0.05.
- Figure 4.** Plasma epinephrine concentrations in sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) either into the portal (POR) or the jugular (JUG) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. + Significantly different from corresponding basal values: P < 0.01; * significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: P < 0.01.
- Figure 5.** Plasma epinephrine concentrations in hepatic vagotomized (HV) or sham-operated (SHM) rats injected either with ouabain (OUA) or saline (SAL) into the portal (POR) vein. Values are means \pm SE for n = 6-8 rats in each group. The times of injection are indicated by the arrows. * Significantly different from corresponding 0 and 15 min time points and from corresponding saline-injected groups: P < 0.01.

Fig. 1

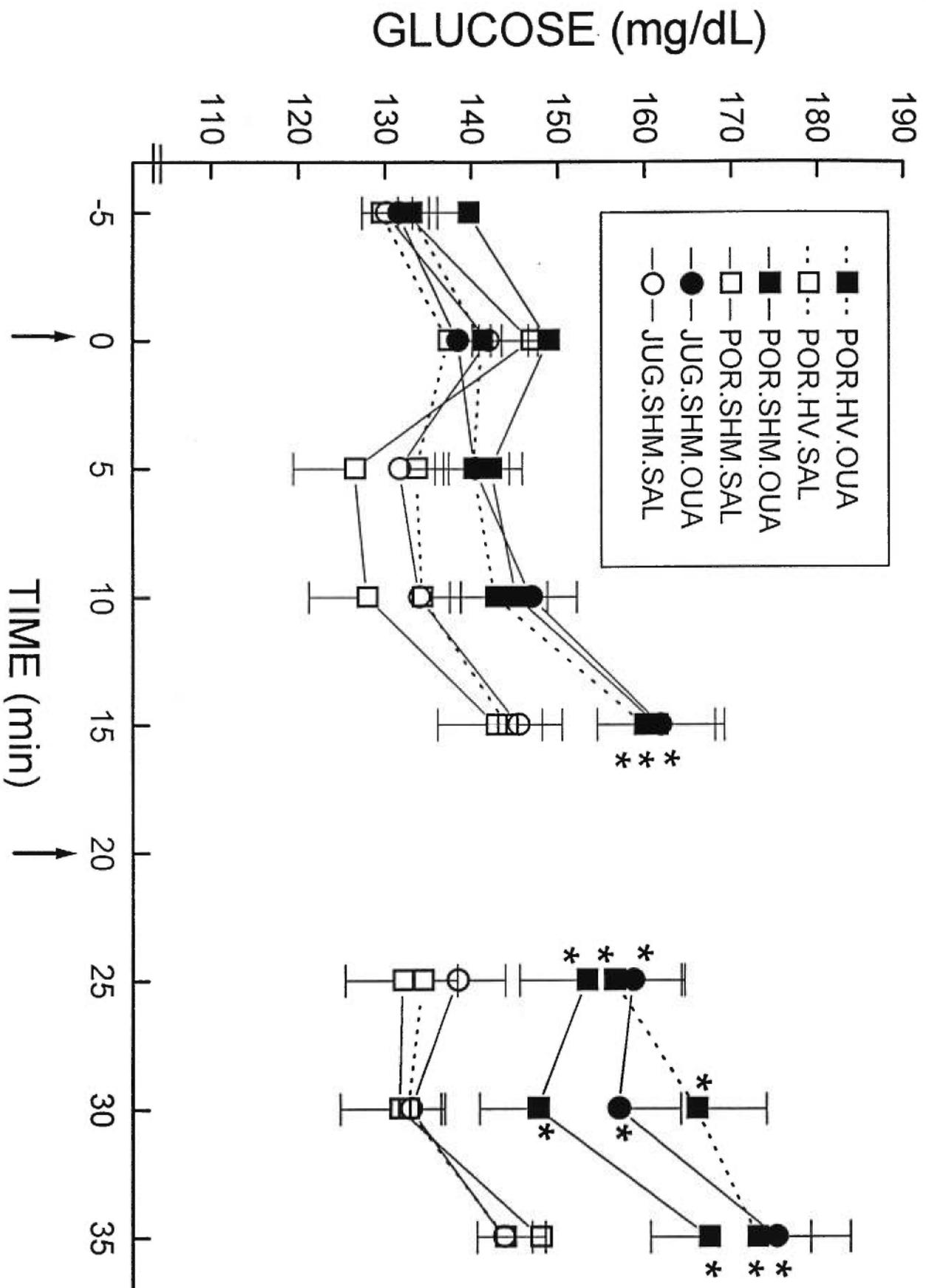


Fig. 2

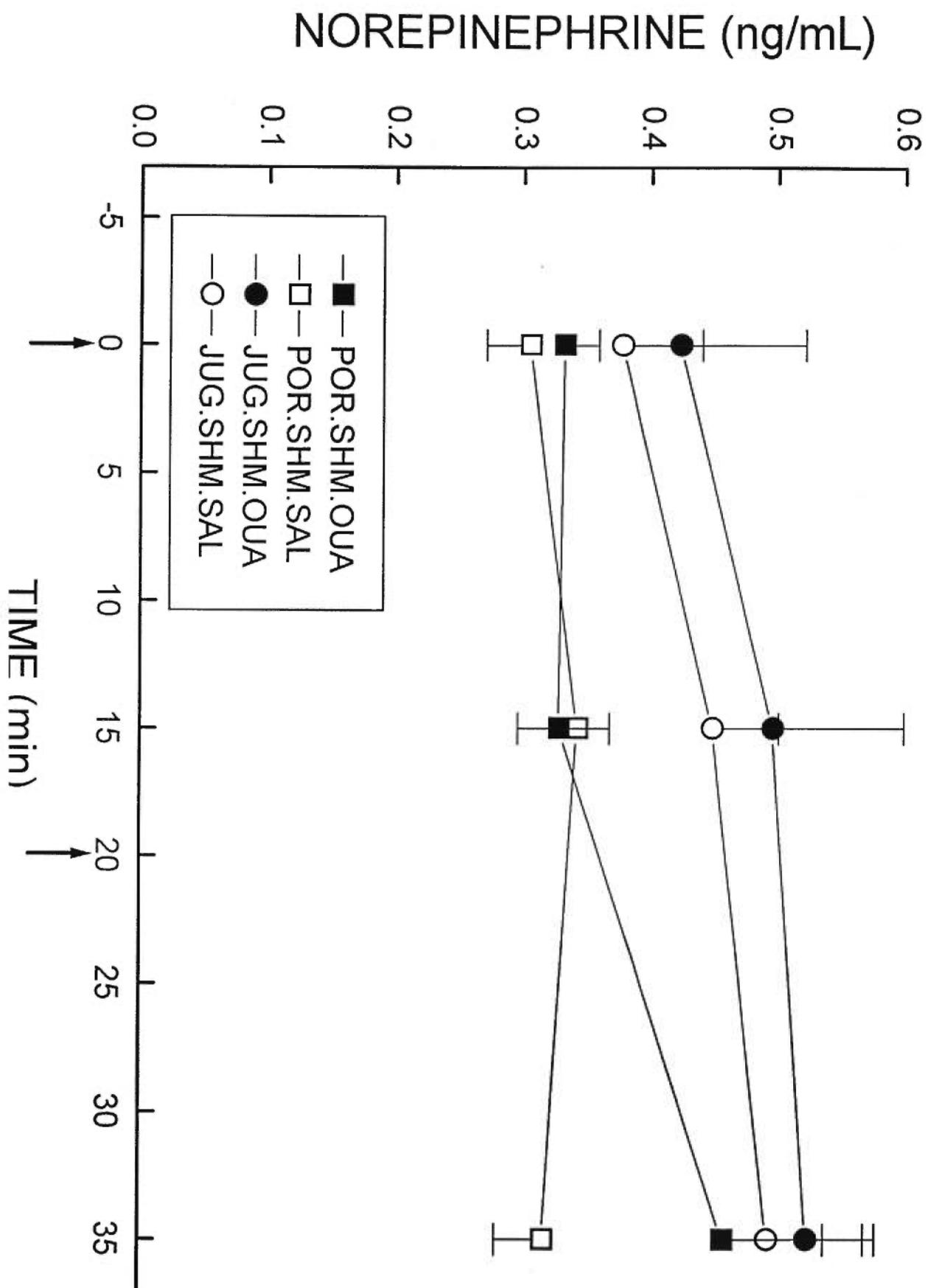


Fig. 3

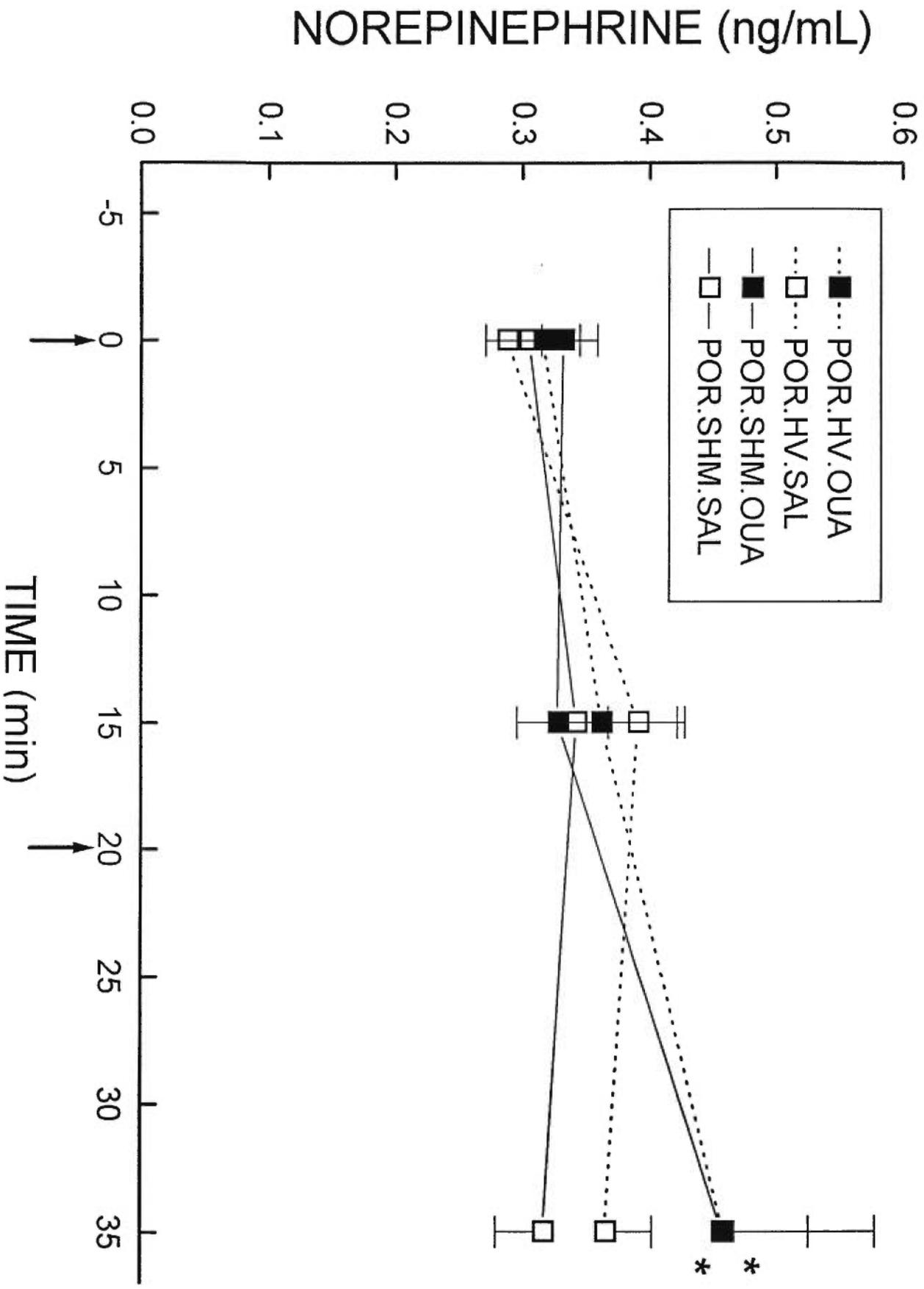


Fig. 4

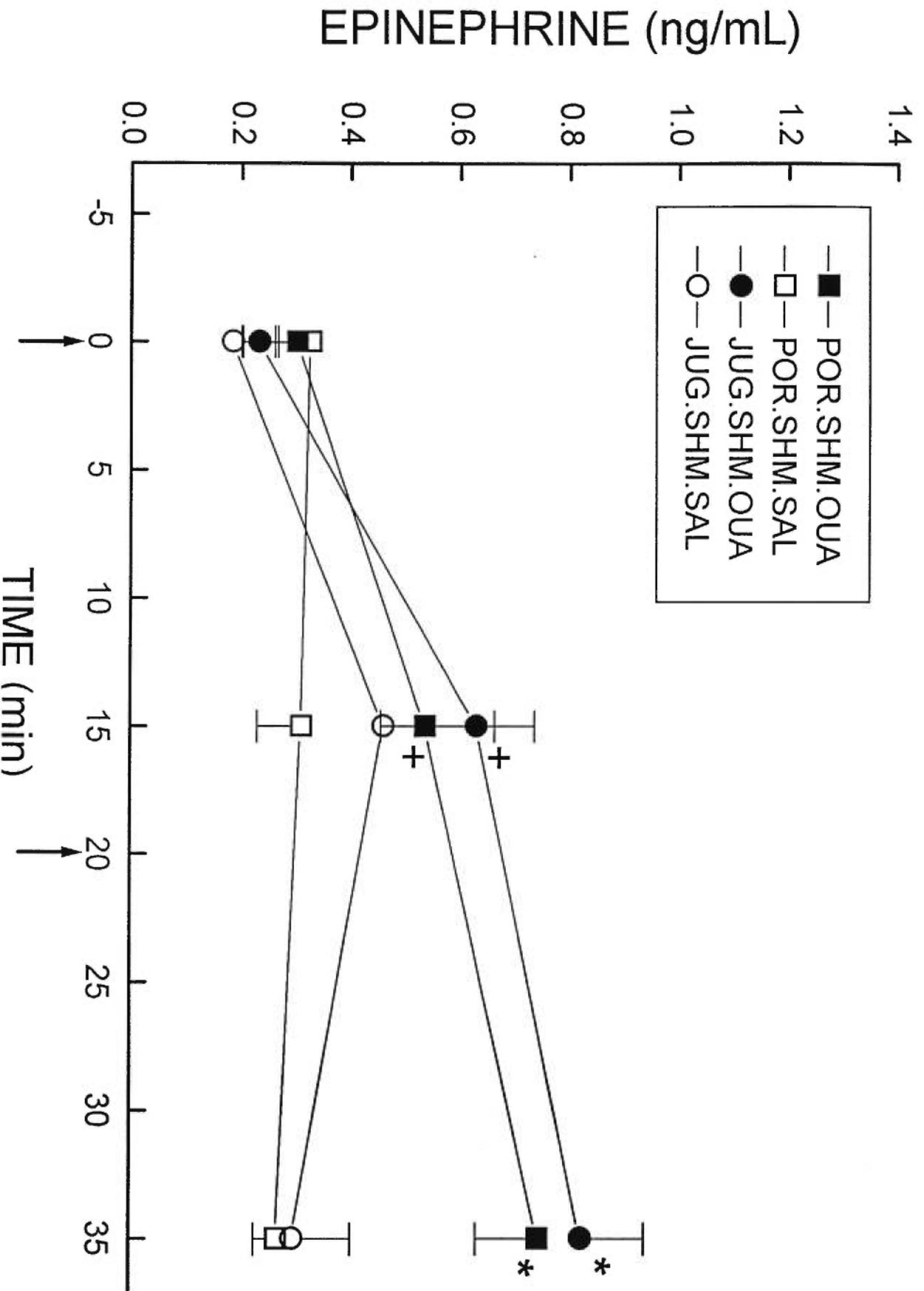
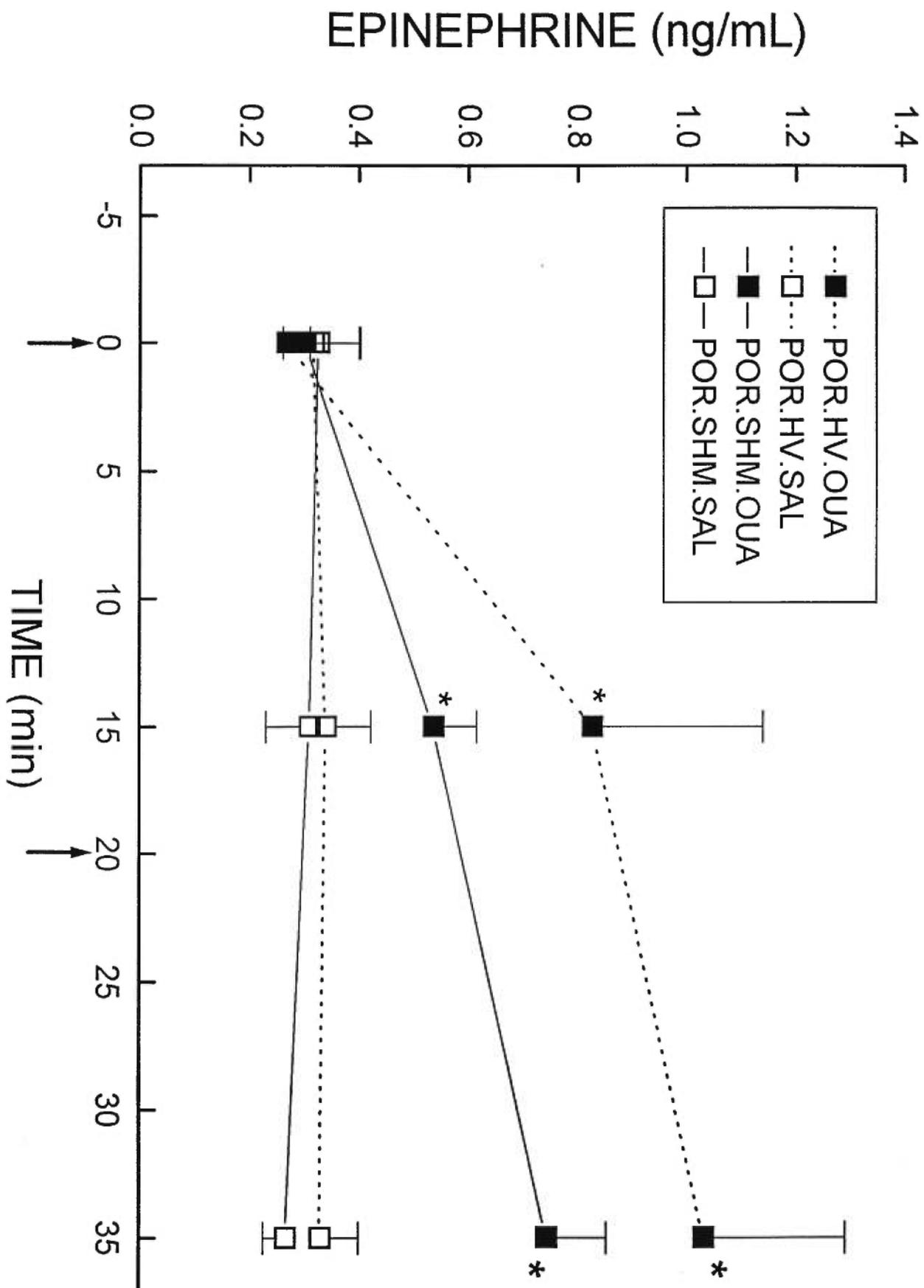


Fig. 5



CHAPITRE 4: DEUXIÈME ARTICLE

**HEPATIC PORTAL INFUSION OF INSULIN AND
FEEDBACK INHIBITION OF INSULIN SECRETION IN RATS**

R. BERGERON, M. G. LATOUR, F. DÉSY,
and J.-M. LAVOIE

Département d'éducation physique, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada [REDACTED]

Running head: R. Bergeron et al.: Feedback inhibition of insulin secretion

Mailing proofs:

Dr. Jean-Marc Lavoie
Département d'éducation physique
Université de Montréal

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Fax: (514) 343-2181

email: lavoije@ere.umontreal.ca

SUMMARY

The purpose of the present study was to investigate the phenomenon of feedback inhibition of insulin secretion by insulin in fasted and fed rats, by specifically evaluating the effects of an intraportal or a peripheral site of intravenous insulin infusion. Two experiments were conducted. In a first experiment, normally fed rats ($n = 20$) were submitted to an hyperinsulinemic-euglycemic clamp for a period of 180 min during which insulin was infused either through the hepatic portal (POR-INS) or the jugular (JUG-INS) vein (4 and 8 mU/kg/min, 90 min each). A third group of rats was infused with saline into the portal vein (POR-NaCl). Plasma insulin levels were increased ($P < 0.01$) similarly in POR-INS and JUG-INS as compared to POR-NaCl. Insulin infusions suppressed ($P < 0.01$) plasma C-peptide concentrations similarly in both POR-INS and JUG-INS groups. The second experiment was conducted using the same protocol as the first one with the exception that it was conducted in overnight fasted rats ($n = 29$) and a single step insulin infusion (8 mU/kg/min) was used throughout the duration of the clamp. In both experiments, glycemia was clamped at basal levels corresponding to approximately 140 and 120 mg/dL in the fed and fasted rats, respectively. As in the first experiment, insulin suppressed C-peptide concentrations similarly whether infused in the portal or the jugular vein. The greater magnitude of the decrease in C-peptide concentrations in the second study suggests that the mechanism of the autoregulation of insulin secretion is more sensitive in the fasted than in the fed state. It is concluded that exogenous insulin infusion does inhibit insulin secretion in rats and that this inhibition is not influenced by the portal or the jugular site of infusion.

Index terms: C-peptide, portal infusion, free fatty acids, hyperinsulinemic-euglycemic clamp

INTRODUCTION

It is well known that insulin secretion is mainly regulated by the direct pancreatic action of different nutrients, such as glucose (13) or arginine (14), and by the action of the autonomic nervous system. Although the feedback inhibition of insulin secretion by insulin itself has been suggested for the first time almost 30 years ago (23), it remains a subject of controversy. It has been reported in studies conducted *in vitro*, either on isolated pancreatic cells or in perfused pancreas, that raising the exogenous insulin levels in the medium had no effect on the secretion of insulin when stimulated either by glucose (25,31) or arginine (34). However, in most of the studies conducted *in vivo*, the autoregulation of insulin secretion has been observed in healthy subjects (2,10,40), whereas it might be partially blunted in obese (8,11,17) and type II diabetic patients (3,15).

In a *in situ* -perfused, yet innervated dog pancreas preparation, it has been shown that systemic exogenous insulin infusion suppressed the secretion of insulin, even though the pancreatic vasculature was isolated from the peripheral circulation (34). To our knowledge, these data were the first to support the contention that the mechanism of the autoregulation of insulin secretion is neurally mediated. More recently, it has been reported in humans recipient of a pancreatic transplantation, that the autoregulation of insulin secretion during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp depends on the integrity of the pancreatic innervation (5,24). The above results may explain, to some extent, the discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies, the pancreatic innervation being severed in the latter. A possible neural implication in the autoregulation of insulin secretion phenomenon suggests the inclusion of an indirect component in the mechanism.

Several lines of evidence suggest that the liver may have a role to play in the autoregulation of insulin secretion. The existence of a functional pathway between the liver, the central nervous system, and the pancreas is well established (21,30). It has been shown, using electrical stimulation of the hepatic branch of the vagus nerve and intraperitoneal or intraportal

injection of glucose in the rat, that the liver can modulate insulin secretion (21,30,29). This observation has also been made during physiological situations such as physical exercise (6,19). The liver is also the primary site of insulin action and its principal site of degradation (40). It is, therefore, possible that the liver, as a target organ for insulin, exerts a feedback inhibition on insulin secretion. This possibility is further supported by the recent suggestion of the existence of insulin sensor in the hepatoportal area (37) and the fact that feedback inhibition of insulin secretion is altered in cirrhosis (7). The present study was conducted with the objective to test the hypothesis that exogenous insulin infused directly into the portal vein will result in a greater inhibition of insulin secretion than the same dose infused into a peripheral vein. For this reason, the study of the autoregulation of insulin secretion was conducted using both a portal and a peripheral hyperinsulinemic clamp. In addition, it has been reported, in diabetic patients, that inhibition of insulin secretion by hyperinsulinemia seems to be linked to the level of glycemia (28,32). For this reason, two experiments were conducted in which different levels of glycemia (fed and fasting states) were maintained during the clamps.

MATERIALS AND METHODS

Animal care. Male Sprague-Dawley strain rats (Charles River, St-Constant, Canada) weighing 225-250 g were housed individually and fed pellet rat chow and tap water *ad libitum* for 14-15 days after they were received in our laboratory. The 12:12-h light-dark cycle started at 06:00 and the room temperature was maintained at 20-23 °C.

Surgery. Six to seven days before the experimentation, all animals underwent a chronic hepatic portal vein, a jugular vein and a carotid artery cannulation under pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) anesthesia. Isotonic saline (5,0 mL) was injected subcutaneously in the back, half the volume on each side of the vertebral column, to provide extra fluids in case of blood loss during surgery. The portal vein catheter was implanted according to a method described previously (39) with some minor modifications. The catheter consisted of a 20 cm-long Silastic tube (0,51 mm ID, 0,94 mm OD, Dow Corning no. 602-135) protected at the external end by a 7 cm-long

Tygon microbore tubing sheath (1,02 mm ID, 1,18 mm OD, no. S-54-HL) glued to the Silastic tubing with cyanoacrylic cement and reinforced with a silk thread (4.0). A 1-cm square piece of tulle mesh was attached 4 cm from the external end of the catheter and anchored to the skin in the posterior area of the neck at the base of the skull. A cap, for the cannula, was made from the crushed shaft of a blunted 23-gauge needle. First, the catheter was tunneled under the skin between a two to three cm-long laparotomy and a ~ 7 mm-long skin incision between the shoulder blades. The internal end of the catheter was beveled at ~ 45°. Afterwards, the cecum was lifted out of the peritoneum, the ileocolic vein was located, and an area around the junction of this vessel and one of its tributaries close to the cecum was cleared of fat. Blood flow in the chosen vein was interrupted by placing a 5.0 silk thread upstream and by applying tension on another thread positioned at the junction of the two veins. A small incision was made in the tributary vein of the isolated area, then the catheter was inserted and threaded towards the portal vein. The catheter was then tied with the previously placed sutures. A verification of the placement of the cannula was made after the rat was killed to ensure that the infusion was successful. The catheters were filled with a heparin solution (500 IU/mL). The animals were also injected once intramuscularly with antibiotics (Penicillin G procaine; 40 000 U/kg) and analgesics (Buprenorphine: 0.025 mg/kg) and allowed to recover for at least six days. During that time, animals had free access to food and water and were weighed on week days. Only the rats that showed a significant increase in body weight during the last 24 h preceding the experiment were included in the study.

EXPERIMENTAL PROTOCOL

Experiment 1. Food was withdrawn from the cages two hours before the beginning of the experiment. Experiments were run between 09:00 and 13:00. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp procedures were performed in unanesthetized animals based on the method previously described (20) with the following modifications. The day of the experiment, rats were divided in three experimental groups. In two groups, insulin was infused either in the hepatic portal vein (POR-INS; n = 7) or the jugular vein (JUG-INS; n = 7). A third group was infused

intraportally with isotonic saline (POR-NaCl; n = 6). Glucose infusion was always delivered through the jugular vein catheter. In the JUG-INS group, insulin and glucose were simultaneously infused through an 8-way Teflon valve for micro-tubing (Cole-Parmer, Niles, IL.) whereas in the intraportally infused groups (POR-INS and POR-NaCl), insulin and glucose ran separated lines of tubing. The three catheters were connected to polyethylene tubing extensions 20 min before the first blood sampling. The tubing extension linked to the carotid artery was filled with saline containing heparin (5 U/mL). The 250 mU/mL insulin (from porcine pancreas, Sigma) solution was infused with a micro-infusion pump (Harvard Apparatus Inc.) at two different rates: 4 mU/kg/min and 8 mU/kg/min, each lasting 87 min. Continuous insulin infusion were preceded by an insulin bolus of two times the final constant dose given during 3 min. Glucose (50% solution) infusion (New-England Med. Instr.) was started 3 min after the beginning of the insulin infusion and continued throughout the 180 min, with the rate of glucose administration being adjusted manually every 5 min to maintain glycemia at basal levels. Small amounts of glucose were infused in the POR-NaCl group towards the end of the experiment (last 30 min) to help to maintain glycemia. Arterial blood was sampled between -15 min and 0 min for the determination of basal concentrations, then sampled at regular time intervals during the duration of the clamp for the measurements of plasma glucose (every 5 or 10 min when stable), C-peptide and insulin concentrations. After centrifugation, erythrocytes were resuspended in saline containing 5 U/mL heparin and then reinfused following major blood samples. At the end of the clamp, the rats were anesthetized through the jugular vein catheter with sodium pentobarbital (20 mg/kg). The abdominal cavity was quickly opened to expose the liver. Immediately after, a liver biopsy was taken from the medial lobe with aluminium block tongs cooled to liquid nitrogen temperature. The syringe containing the glucose solution was weighed at the beginning and at the end of the clamp to determine the quantity of glucose infused.

Experiment 2. The procedures followed in the second experiment were the same as in experiment 1 with the following exceptions. Rats were implanted with two jugular vein catheters (PE-10, Becton-Dickinson: ID; 0,28 mm, OD; 0,61 mm, no. 427401) instead of just

one (PE-50) in order to avoid the utilisation of the 8-way Teflon valve for the simultaneous infusion of glucose and insulin, therefore, excluding the dead volume between the glucose-insulin mixing point and the blood circulation. Rats were overnight fasted and divided in 3 experimental groups: POR-INS; n = 9, JUG-INS; n = 10 and POR-NaCl; n = 10. As opposed to experiment 1, the clamp consisted of a single insulin infusion rate (8 mU/kg/min) lasting 180 min. A two-way swivel allowed the simultaneous infusions of glucose and insulin without disturbing the animal. Glucose was infused with a Harvard micro-infusion pump (Harvard Apparatus Inc.) which allows for easy determination of both the steady state glucose infusion and the total quantity of glucose infused. In addition to plasma glucose, C-peptide, and insulin, arterial blood was also sampled in this experiment for the determination of free fatty acids concentrations (FFA).

Analyses. Blood sampled (50 uL) for glucose measurements was free of heparin to avoid the effect of dilution. Otherwise, arterial blood was collected in heparinized syringes and separated in different aliquots. Apart from the fraction used for glucose determination, the other fractions were used for C-peptide, insulin, and FFA determinations. Blood and tissue samples were stored at -80°C until analyses were performed. During the clamp, plasma glucose concentrations were immediately determined by the use of a glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). C-peptide and insulin levels were determined by radioimmunoassay kits commercially available (C-peptide: Linco Research, St-Louis, MO; insulin: Immunocorp., from ICN Biomedicals, Carson, CA). Free fatty acids concentrations were determined spectrophotometrically with the use of reagent kits (Boeringher-Manheim, Manheim, Germany). Hepatic glycogen levels were measured with the phenol-sulfuric acid technique (22).

Since the two experiments were conducted at a different time and using a different rate of insulin infusion, the results were analysed separately. All data are reported as means \pm SE. Statistical comparisons of blood parameters were made with a two-way analysis of variance with repeated-measures design. Two types of comparisons were run: 1) the effects of the

portal vs jugular infusion of insulin (POR-INS vs JUG-INS), and 2) the effects of portal infusion of insulin vs saline (POR-INS vs POR-NaCl). Tukey post-hoc tests for unequal sample size were used to determine specific differences between groups. A one-way analysis of variance nonrepeated-measures design was used for comparisons of body weight, liver glycogen concentrations, and the quantity of glucose infused during the clamp. Fisher's post hoc test was used in the event of a significant ($P < 0.05$) F-ratio. This study was conducted according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the protocols were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the University of Montreal.

RESULTS

Experiment 1. The animals body weights were higher prior to surgery than on the day of the experiment (315 ± 3 vs 305 ± 4 g; $P < 0.05$). However, the mean increase in body weight was 5.3 ± 1.3 g during the last 24 h preceding the experimentation. There were no significant differences in body weight between the three groups on the day of the experiment. Approximately 7 mL of blood was sampled throughout the clamp study and approximately 6.5 mL was reinfused as erythrocytes resuspended in saline. The quantity of glucose infused throughout the experiment was: 1.37 ± 0.13 , 1.47 ± 0.14 , and 0.09 ± 0.01 g in POR-INS, JUG-INS, and POR-NaCl groups, respectively. There were no significant differences in the amount of glucose infused between the two insulin-infused groups. Hepatic glycogen levels measured at the end of the experiment corresponded to: 1.43 ± 0.3 , 1.65 ± 0.2 , and 0.87 ± 0.2 g/100g in POR-INS, JUG-INS, and POR-NaCl groups, respectively. There were no significant differences in hepatic glycogen levels between the three groups. However, when one low value in each of POR-INS and JUG-INS groups was taken out, significant ($P < 0.01$) differences were found between these two groups and the POR-NaCl group, with the corresponding values: 1.68 ± 0.3 and 1.85 ± 0.2 vs 0.87 ± 0.2 g/100g.

No significant ($P > 0.05$) differences in plasma glucose concentrations were found with the duration of the clamp and between the groups. Euglycemia was maintained at 7.9 ± 0.1 , 7.5

± 0.1 and 7.8 ± 0.1 mmol/L in POR-INS, JUG-INS, and POR-NaCl groups, respectively. The coefficients of variation of the glucose values for the three groups were 5, 8, and 6%, respectively. Plasma insulin levels were increased similarly in the two insulin infused groups, these increases reaching significance ($P < 0.01$) at the 90-min time point (Fig. 1). Plasma insulin levels were not changed in the POR-NaCl group throughout the clamp. The difference between POR-INS group and the NaCl infused group reached significance ($P < 0.01$) at the 150 min time interval (Fig. 1).

C-peptide responses are presented in Fig. 2. A significant ($P < 0.01$) decrease of approximately 50% in C-peptide levels was observed in both insulin infused groups during the 150-180 min time intervals (pooled values, Fig. 3), while no significant time differences were found in the POR-NaCl group throughout the clamp. Accordingly, C-peptide values for POR-INS group during the 150-180 time interval were significantly ($P < 0.01$) lower than values measured in the POR-NaCl group (Fig. 2 and 3). However, no significant differences in C-peptide concentrations were measured between the two insulin infused groups throughout the clamp.

Experiment 2. The animals body weights were still lower on the day of the experiment than before surgery (310 ± 3 vs 291 ± 3 g; $P < 0.01$), but all animals were gaining weight. No significant differences in body weight were measured between the three groups on the day of the experiment. Approximately 7.8 mL of blood was sampled throughout the clamp and approximately 7.3 mL was reinfused as erythrocytes resuspended in saline. The quantity of glucose infused throughout the experiment was: 1.20 ± 0.1 , 1.87 ± 0.3 , and 0.04 ± 0.01 g in POR-INS, JUG-INS, and POR-NaCl, respectively. The quantity of glucose infused tended to be was ($P = 0.059$) higher when insulin was infused into the jugular vein than when it was infused into the portal vein. Hepatic glycogen levels measured at the end of the experiment were significantly ($P < 0.01$) higher in the JUG-INS group (0.53 ± 0.08 g/100g) than in POR-INS (0.25 ± 0.03 g/100g) and POR-NaCl (0.25 ± 0.03 g/100g) groups.

Plasma glucose concentrations were maintained throughout the clamp in the three groups and no significant ($P > 0.05$) differences between groups were found (6.9 ± 0.1 , 6.3 ± 0.1 and 6.4 ± 0.4 mmol/L for POR-INS, JUG-INS, and POR-NaCl, respectively). The coefficients of variation of the glucose values for the three groups were 6, 5, and 4%, respectively. Plasma insulin concentrations increased significantly ($P < 0.01$) in the two insulin infused groups while no change in insulin levels was observed in NaCl infused group throughout the clamp (Fig. 4). Accordingly, insulin levels were higher ($P < 0.01$) in POR-INS group than in NaCl infused group during the clamp.

A significant ($P < 0.01$) decrease of approximately 75% in C-peptide levels was observed in both insulin infused groups while no significant differences were observed in NaCl infused group (Fig. 5). Accordingly, C-peptide values in POR-INS group during the 60-180 min time interval were significantly ($P < 0.01$) lower than values measured in the POR-NaCl group (Fig. 5). The decrease in C-peptide concentrations in the two insulin infused groups reached significant levels after 30 and 60 min in JUG-INS and POR-INS groups, respectively. The only difference in C-peptide levels between the two insulin infused groups was at the 30-min time point (188 ± 35 vs 350 ± 67 pmol/L for JUG-INS and POR-INS, respectively; $P < 0.05$). There was an overall significant ($P < 0.01$) effect of time on free fatty acids concentrations, meaning that a decrease was found in all three groups during the clamp (Fig. 6). There were, however, no significant differences between the two insulin infused groups and between the POR-INS and POR-NaCl groups.

DISCUSSION

The main objective of the present study was to test the hypothesis that an hyperinsulinemic clamp would result in lower C-peptide levels when insulin is infused into the portal as compared to a peripheral vein. This hypothesis was based on the premises that the liver, through its afferent innervation and possibly recently postulated hepato-portal insulin sensors (37), is able to influence the secretion of insulin. The results of the two experiments of the present study do

not support this hypothesis. The decrease in C-peptide concentrations during the hyperinsulinemic euglycemic clamp was similar either insulin was infused into the portal or jugular vein. Therefore, the present data do not support the possibility of a close loop regulation of insulin secretion between the liver and pancreas. It is interesting to draw a parallel between the results of the present study and those reported on hepatic glucose production (HGP). It has been reported that the degree of suppression of HGP during hyperinsulinemia is predominantly determined by systemic rather than portal insulin concentration (1). These findings give credence to the present observation that the liver, even though it is the primary target organ for insulin, does not seem to participate in the feedback inhibition of insulin secretion by insulin. Consequently, the origin of the neural component in the mechanism of autoregulation of insulin secretion (5,24) still remains to be elucidated. The rat model developed in the present experiment could, however, be used in combination with a denervation approach.

The suppressing effect of hyperinsulinemia on insulin secretion has been studied at different levels of glycemia in healthy (4,24) and diabetic patients (13,14,30). Overall, it seems that the mechanism by which insulin exerts its inhibition on the pancreatic β -cells is more sensitive at lower plasma glucose concentrations (14,30). Our data tend to support such a contention. In spite of basal C-peptide levels that were approximately 25% lower in fasted than in fed rats, C-peptides were decreased by approximately 75% by the infusion of insulin in the fasted rats, compared to approximately 50% in the fed rats. In both experiments, insulin levels were increased by approximately 600% relatively to their respective basal concentrations. In addition, the decrease in C-peptide levels was observed at the 60th min in the fasted rats and only at the 150th min in the fed rats. It thus seems that despite severe hyperinsulinemia the fasting state influences the feedback inhibition of insulin secretion by insulin. In type II diabetic subjects, it has been reported that the minimal ability of insulin to suppress its own secretion is due to hyperglycemia (14). The present results suggest that the same relation is found in normal subjects with the slight difference that the comparison was made in the direction of a decrease in blood glucose levels.

Based on the C-peptide response to insulin infusion (Figs 2 and 5), the present study clearly indicates that insulin has the ability to inhibit its own secretion. The fall in C-peptide concentrations in both experiments, when glycemia was virtually unchanged, is attributed to a progressive suppression of β -cell secretory activity. Recently, Conget et al. (9) addressed the debate of the possible feedback action of insulin upon its own secretion by suggesting that insulin-induced hypolipacidemia may interfere with the interpretation of the changes in plasma C-peptide recorded with the hyperinsulinemic euglycemic clamp technique. Free fatty acids levels measured in the second experiment were significantly decreased by $\sim 43\%$ in the last 30 min of the clamp in the insulin infused groups when compared to the basal values. The magnitude of this decrease is similar to what has been previously reported by our laboratory at corresponding exogenous insulin infusion rate (29). Since there is evidence suggesting that fatty acids can stimulate the secretion of insulin (13), it cannot be ruled out that the present hypolipacidemia might, in part, be responsible for the inhibition of insulin secretion during the clamp. The suggestion by Conget et al. (9) of the effects of hypolipacidemia on the inhibition of insulin secretion, however, was based on the observation that an infusion of intralipids, that raised FFA concentrations well above basal values, resulted only in a modest and transient ascension of C-peptide levels. Although a strong evidence that an interference of hypolipacidemia upon C-peptide secretion under the present experimental conditions does not exist, this possibility cannot be ruled out.

One observation of the present study that needs to be addressed is the fact that the arterial concentrations of insulin did not differ in both experiments in response to either the peripheral or the intraportal infusion of exogenous insulin. One would expect that systemic insulin concentrations would be lower during intraportal infusion due to significant first pass hepatic extraction (12). In the first experiment conducted in the fed state, it could be argued that the hepatic extraction of insulin is reduced compared to the fasted state (36). This could also provide an explanation for the observation that the insulin levels reached in the first experiment (fed state) were approximately two times higher than those reached in the second experiment (fasted state), despite a smaller quantity of insulin infused in the former. The similar arterial

concentrations of insulin found in the fasted rats (second experiment) in response to a similar peripheral or intraportal infusion of insulin is, however, intriguing. Ader and Bergman (1), in their study on hepatic glucose production in dogs, infused insulin systemically at half the intraportal rate and found similar peripheral insulin levels between the intraportal and systemic protocols. In a subsequent study (27), however, the same group of authors, using the same insulin infusion approach found peripheral insulin concentrations that were 21% lower in the portal infusion experiments than in the paired peripheral infusion experiments. There are also other reports (16,35) indicating some deviations from the expectations that during intraportal infusion, systemic insulin concentrations should be lower due to substantial hepatic insulin extraction. The possibility that the hepatic extraction of insulin was saturated in the present conditions of insulin infusion is doubtful based on studies showing that perfused rat livers take up insulin as a linear function of perfusate insulin concentration up to very high (3600 pmol/L) insulin levels (26). The possibility of a technical bias in the present study is very unlikely since the infusion protocol is quite simple, the values of insulin in the fed and the fasted state are exactly what one would expect, and the same observation was made in two experiments. It is, on the other hand, important to consider that it is the first time that comparisons of intraportal and peripheral infusions of insulin are conducted in rats and that the level of insulin infusion needed to cause an increase in insulin comparable to what has been observed in dog or human is much higher.

Total glucose infused in the second experiment (fasted rats) were higher ($P = 0.059$) when insulin was infused into the jugular than when it was infused into the portal vein. This observation suggests a greater glucose disposal when insulin is infused peripherally than intraportally. This potentially greater glucose disposal is difficult to explain, however, since peripheral insulin levels were similar whether insulin was infused into the portal or the jugular vein. Hepatic glycogen concentrations were also higher in fasted rats when insulin was infused into the jugular than into the portal vein. An increase in glycogen synthesis has been previously reported in a similar hyperinsulinemic-euglycemic clamp study (33). A higher rate of glycogen

synthesis during the peripheral insulin infusion would match with the higher amount of glucose infused under this condition.

In summary results of the present study first confirm the phenomenon of feedback inhibition of insulin secretion by insulin in unrestrained rats, secondly, indicate that this inhibition seems to be more sensitive in the fasting state, and finally, show that the feedback inhibition of insulin secretion by insulin is not influenced by the intraportal or peripheral site of insulin infusion.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marlène Fortier for her excellent technical assistance. This work was supported by National Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la Formation des chercheurs et l'aide à la recherche of the Government of Québec.

REFERENCES

1. Ader, M. and Bergman, R.N. Peripheral effects of insulin dominate suppression of fasting hepatic glucose production. *Am J Physiol* 258 (Endocrinol. Metab. 21): E1020-E1032, 1990.
2. Argoud, G.M., Schade, D.S. and Eaton, R.P. Insulin suppresses its own secretion in vivo. *Diabetes* 36: 959-962, 1987.
3. Baynes, C., Anyaoku, V., Johnston, D.G. and Elkeles, R.S. Feedback inhibition of insulin secretion in type II diabetes. *Clin Sci* 81: 685-690, 1991.
4. Beischer, W., Schmid, M., Kerner, W., Keller, L. and Pfeiffer, E.F. Does insulin play a role in the regulation of its own secretion? *Horm Metab Res* 10: 168-169, 1978.
5. Boden, G., Chen, X., DeSantis, R., Kolaczynski, J. and Morris, M. Evidence that suppression of insulin secretion by insulin itself is neurally mediated. *Metabolism* 42:786-789, 1993.
6. Cardin, S., Hélie, R., Bergeron, R., Comte, B., van de Werve, G. and Lavoie, J.M. Effect of hepatic portal infusion of pyruvate on pancreatic hormone response during exercise. *Am J Physiol* 266 (Regulatory Integrative Comp Physiol.35): R1630-R1636, 1994.
7. Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Nuccio, P., Gorla, M., Pagano, G. and Lenti, G. Feedback inhibition of insulin secretion is altered in cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 1023-1027, 1986.
8. Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Scaglione, L., Gruden, G., Cassader, M. and Pagano, G. Feedback inhibition of insulin and glucagon secretion by insulin is altered in abdominal obesity with normal or impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol* 30: 154-158, 1993.
9. Conget, I., Gonzalez-Clemente, J.M., Casals, E., Casamitjana, R., Gomis, R., and Malaisse, W.J. Effect of hyperlipacidemia on plasma C-peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp. *Diabetes Res* 22: 41-48, 1993.
10. DeFronzo, R.A., Binder, C., Wahren, J., Felig, P., Ferrannini, E., and Faber, O.K. Sensitivity of insulin secretion to feedback inhibition by hyperinsulinemia. *Acta Endocrinologica* 98: 81-86, 1981.

11. Elahi, D., Nagulesparan, M., Hershcopf, R.J., Muller, D.C., Tobin, J.D., Blix, P.M., Rubenstein, A.H., Unger, R.H. and Andres, R. Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: Relation to the hyperinsulinemia of obesity. *N Engl J Med* 306: 1196-1202, 1982.
12. Field, J.B. Insulin extraction by the liver. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology. Endocrine Pancreas*. Washington, DC: Am Physiol Soc, 1972, sect 7, vol I, chapt 32, pp 505-513, 1972.
13. Flatt, P.R., Barnett, C.R., Shieber, O. and Swanston-Flat, S.K. Direct and indirect actions of nutrients in the regulation of insulin secretion from the pancreatic β -cells. *Proc Nutri Soc* 50: 559-566, 1991.
14. Floyd, J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F.K. and Rull, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest* 45: 1487-1502, 1966.
15. Garvey, W.T., Revers, R.R., Kolterman, O.G., Rubenstein, A.H. and Olefsky, J.M. Modulation of insulin secretion by insulin and glucose in type II diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 60: 559-568, 1985.
16. Ishida, T., Chap, Z., Chou, J., Lewis, R.M., Hartley, C.J., Entman, M.L. and Field, J.B. Effect of portal and peripheral venous insulin infusion on glucose production and utilization in depancreatized conscious dogs. *Diabetes* 33: 984-990, 1984.
17. Klimes, I., Nagulesparan, M., Vaquez, B., Hikida, H. and Unger, R.H. Normal insulin sensitivity of the islets of Langerhans in obese subjects with resistance to its glucoregulatory action. *Diabetes* 33: 305-310, 1984.
18. Kraegen, E.W., Lazarus, L. and Campbell, L.V. Failure of insulin infusion during euglycemia to influence endogenous basal insulin secretion. *Metabolism* 32: 622-627, 1983.
19. Lavoie, J.M., Cardin, S. and Doiron, B. Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am J Physiol* 257 (Endocrinol Metab 20): E855-E859, 1989.

20. Lavoie, J.M., Bongbélé, J., Cardin, S., Bélisle, M., Terrettaz, J. and van de Werve, G. Increased insulin suppression of plasma free fatty acid concentration in exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 74: 293-296, 1993.
21. Lee, K.C. and Miller, R.E. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinology* 117: 307-314, 1985.
22. Lo, S., Russell, J.C. and Taylor, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol* 28: 234-236, 1970.
23. Loubatières, A., Mariani, M.M. and Chapal, J. Inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'élévation de la teneur en insuline du milieu irriguant les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. *Compte-rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences -D: Sciences naturelles* 266: 2245-2247, 1968.
24. Luzi, L., Battezzati, A., Perseghin, G., Bianchi, E., Vergani, S., Secchi, A.E., LA Rocca, Standacher, C., Spotti, D., Ferrarri, G., DiCarlo, V. and Pozza, G. Lack of feedback inhibition of insulin secretion in denervated human pancreas. *Diabetes* 41: 1632-1369, 1992.
25. Marincola, F., Frank, W., Clark, W., Douglas, M. and Merrell, R. The independence of insulin release and ambient insulin in vitro. *Diabetes* 32: 1162-1167, 1983.
26. Mondon, C.E., Dolkas, C.B., Reaven, G.M. Effects of acute uremia on insulin removal by the isolated perfused rat liver and muscle. *Metabolism* 27: 133-142, 1978.
27. Rebrin, K., Steil, G.M., Getty, L. and Bergman, R.N. Free fatty acids as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 44: 1038-1045, 1995.
28. Rubenstein, A.H., Pottenger, L.A., Mako, M., Getz, G.S. and Steiner, D.F. The metabolism of proinsulin and insulin by the liver. *J Clin Invest* 51: 912-921, 1972.
29. Sakaguchi, T. and Yamaguchi, K. Effects of electrical stimulation of the hepatic vagus nerve on the plasma insulin concentration in the rat. *Brain Res* 164: 314-316, 1979.
30. Sakaguchi, T. and Hayashi, Y. Reflex secretion of insulin evoked by hepatic portal injection of D-glucose anomers in the rat. *Biomed Res* 2: 222-224, 1981.

31. Schatz, H. and Pfeiffer, E.F. Release of immunoreactive and radioactively prelabelled endogenous (pro-) insulin from isolated islet of rat pancreas in the presence of exogenous insulin. *J Endocr* 74: 243-249, 1977.
32. Shima, K., Morishita, S., Sawazaki, N., Tanaka, R. and Tarui, S. Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man. *Horm Metab Res* 9: 441-443, 1977.
33. Shulman, G.I., DeFronzo, R.A. and Rossetti, L. Differential effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on pathways of hepatic glycogen repletion. *Am J Physiol* 260 (Endocrinol Metab 23): E731-E735, 1991.
34. Stagner, J., Samols, E., Polonsky, K. and Pugh, W. Lack of direct inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in the canine pancreas. *J Clin Invest* 78: 1193-1198, 1986.
35. Stevenson, R.W., Parsons, J.A. and Alberti, G.M.M. Effect of intraportal and peripheral insulin on glucose turnover and recycling in diabetic dogs. *Am J Physiol* 244 (Endocrinol Metab 7): E190-E195, 1983.
36. Striffler, J.S. and Curry, D.L. Effect of fasting on insulin removal by liver of perfused liver-pancreas. *Am J Physiol* 237: E349-E355, 1979.
37. Stümpel, F., Kucera, T., Gardemann, A. and Jungermann, K. Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption via hepatoenteral nerves in the rat. *Gastroenterology* 110: 1863-1869, 1996.
38. Terrettaz, J., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud, B. Inhibition of hepatic glucose production by insulin in vivo in rats: contribution of glycolysis. *Am J Physiol* 250 (Endocrinol Metab 13): E346-E351, 1986.
39. Tordoff, M.G., Schulkin, J. and Friedman, M.I. Hepatic contribution to satiation of salt appetite in rats. *Am J Physiol* 251 (Regulatory Integrative Comp Physiol 20): R1095-R1102, 1986.
40. Waldhausl, W., Gasic, S., Bratusch-Marrain, P., Korn, A. and Nowotny, P. Feedback inhibition by biosynthetic human insulin of insulin release in healthy human subjects. *Am J Physiol* 243 (Endocrinol Metab 6): E476-E482, 1982.

LEGENDS

- Figure 1** Arterial insulin concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 6-7 rats in each group. + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values; * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Figure 2** Arterial C-peptide concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 6-7 rats in each group. * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Figure 3** Pooled arterial C-peptide concentrations in fed rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. Basal values are pooled from -15 and 0 min values, low insulin infusion values are pooled from 60, 75, and 90 min values, and high insulin infusion values are pooled from 150, 165, and 180 min values; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values. * significantly ($P < 0.01$) different from POR-INS group.
- Figure 4** Arterial concentrations of insulin in fasted rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused with saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group. * significantly ($P < 0.05$) different from POR-INS group, ** $P < 0.01$; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.
- Figure 5** Arterial concentrations of C-peptide in fasted rats infused with exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group. * significantly ($P < 0.05$) different from POR-INS group, ** $P < 0.01$; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.
- Figure 6** Arterial concentrations of free fatty acids in fasted rats infused exogenous insulin into the portal (POR-INS) or the jugular vein (JUG-INS) and in rats infused saline (0.9%) into the portal vein (POR-NaCl). Values are means \pm SE. n = 9-10 rats in each group; + significantly ($P < 0.01$) different from corresponding basal values.

Fig. 2

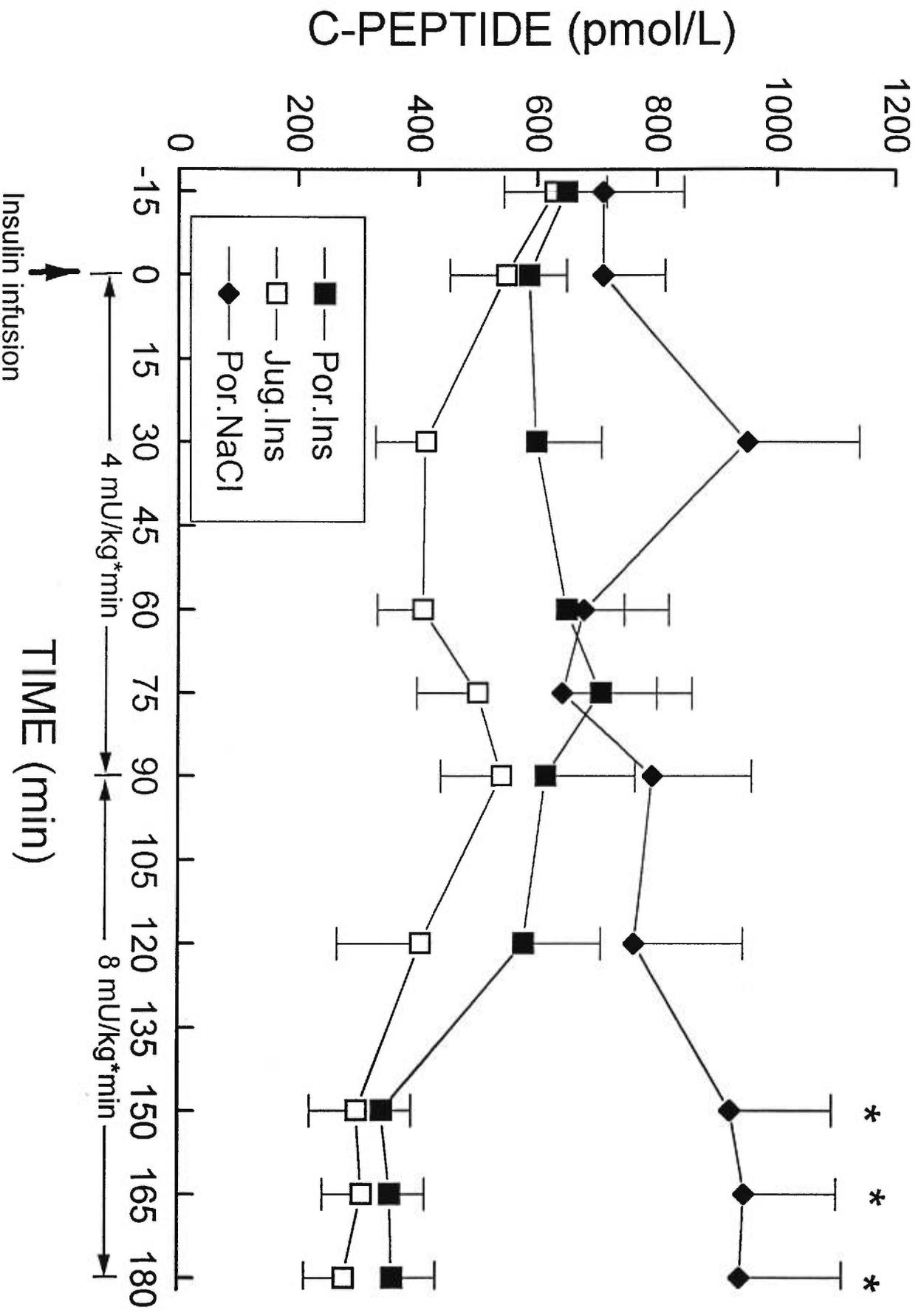


Fig. 3

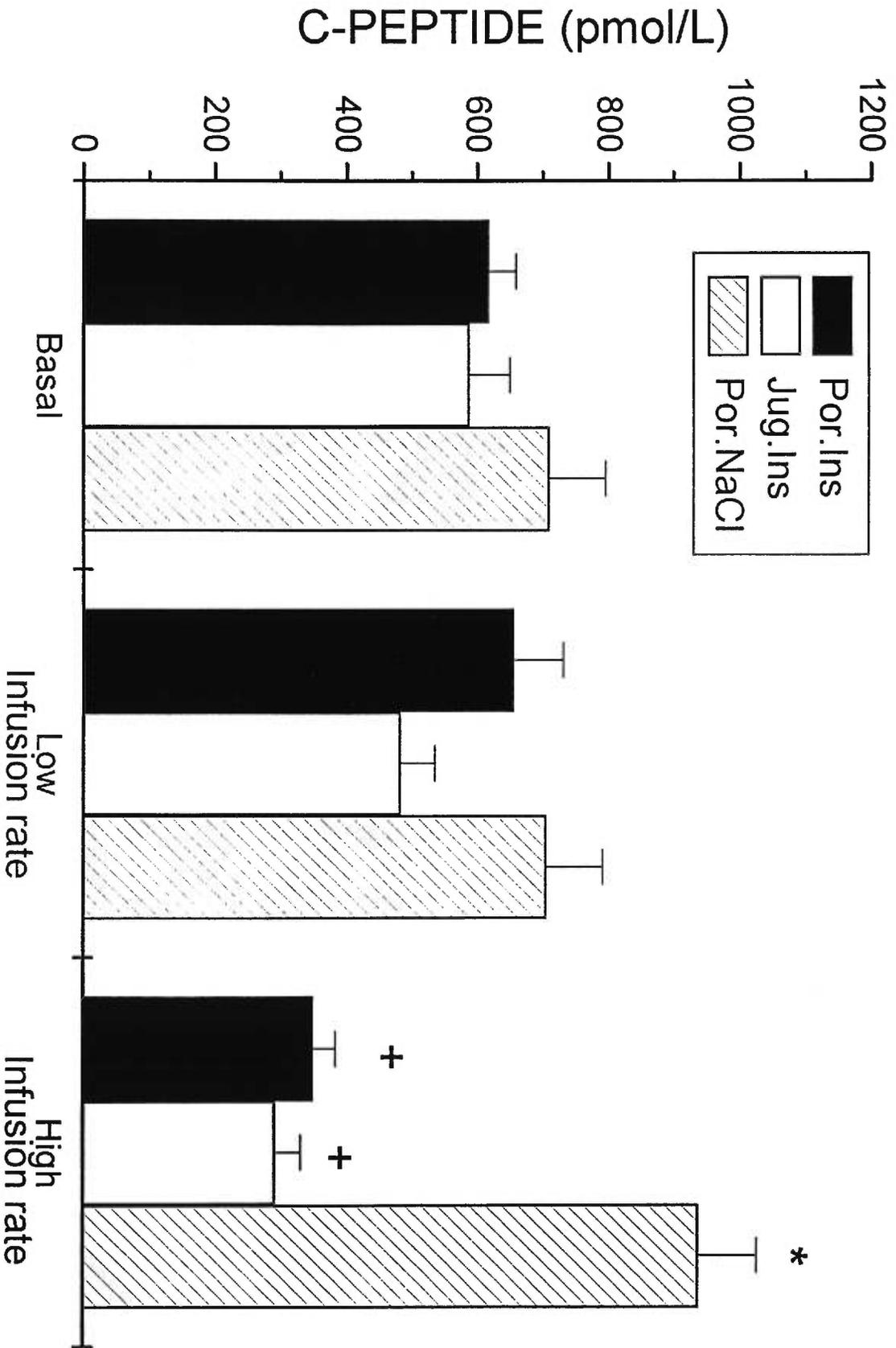


Fig. 4

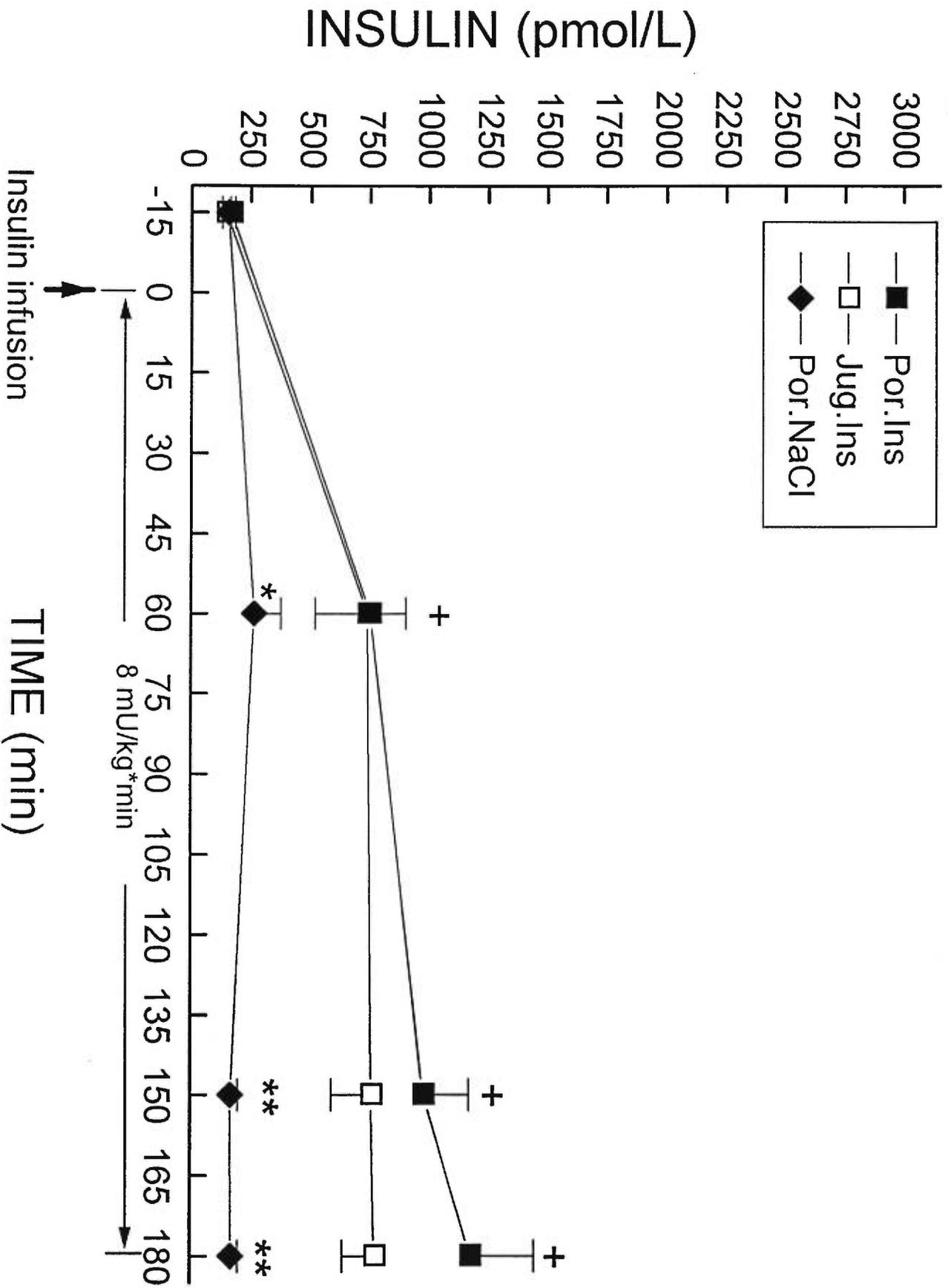


Fig. 5

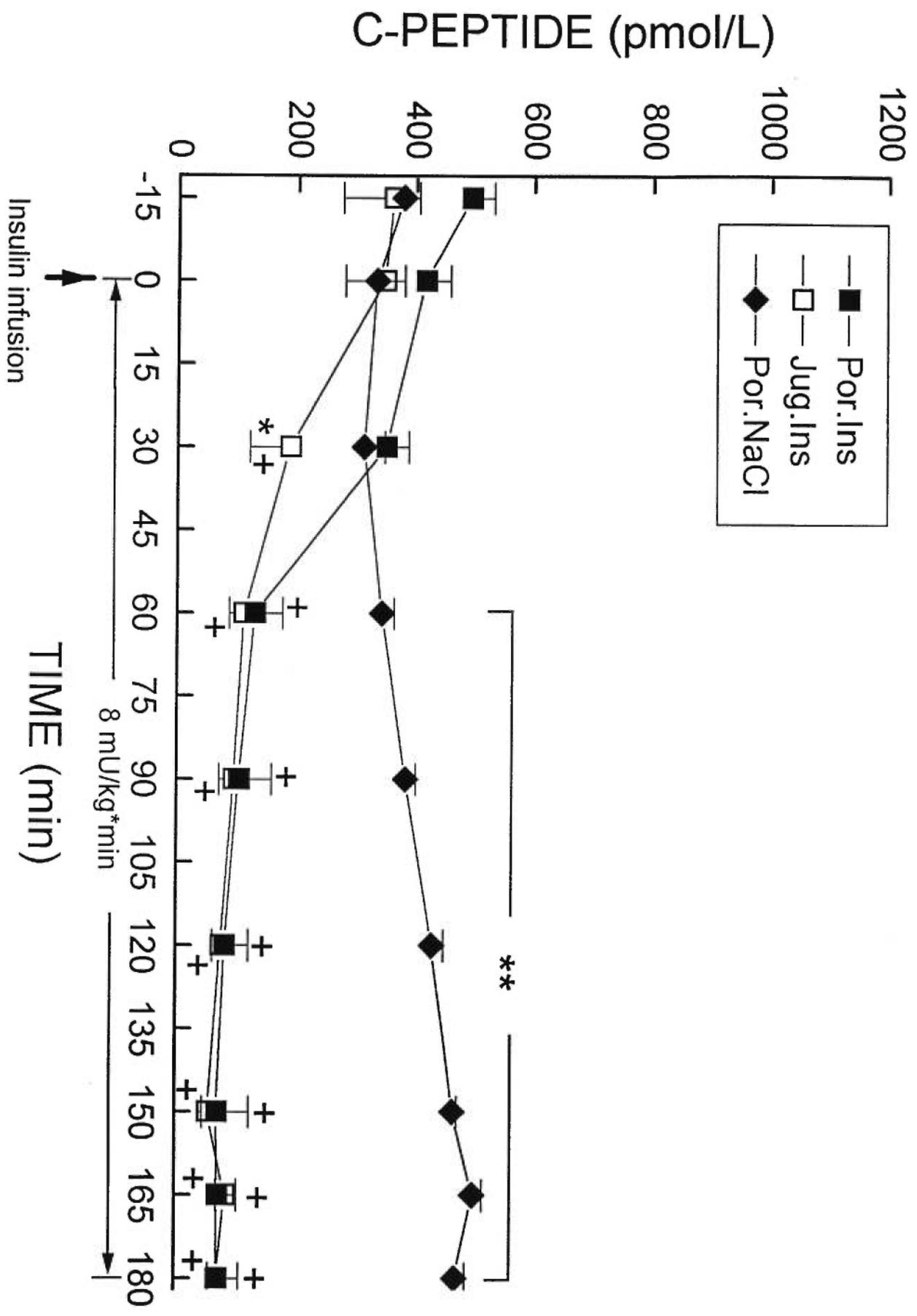
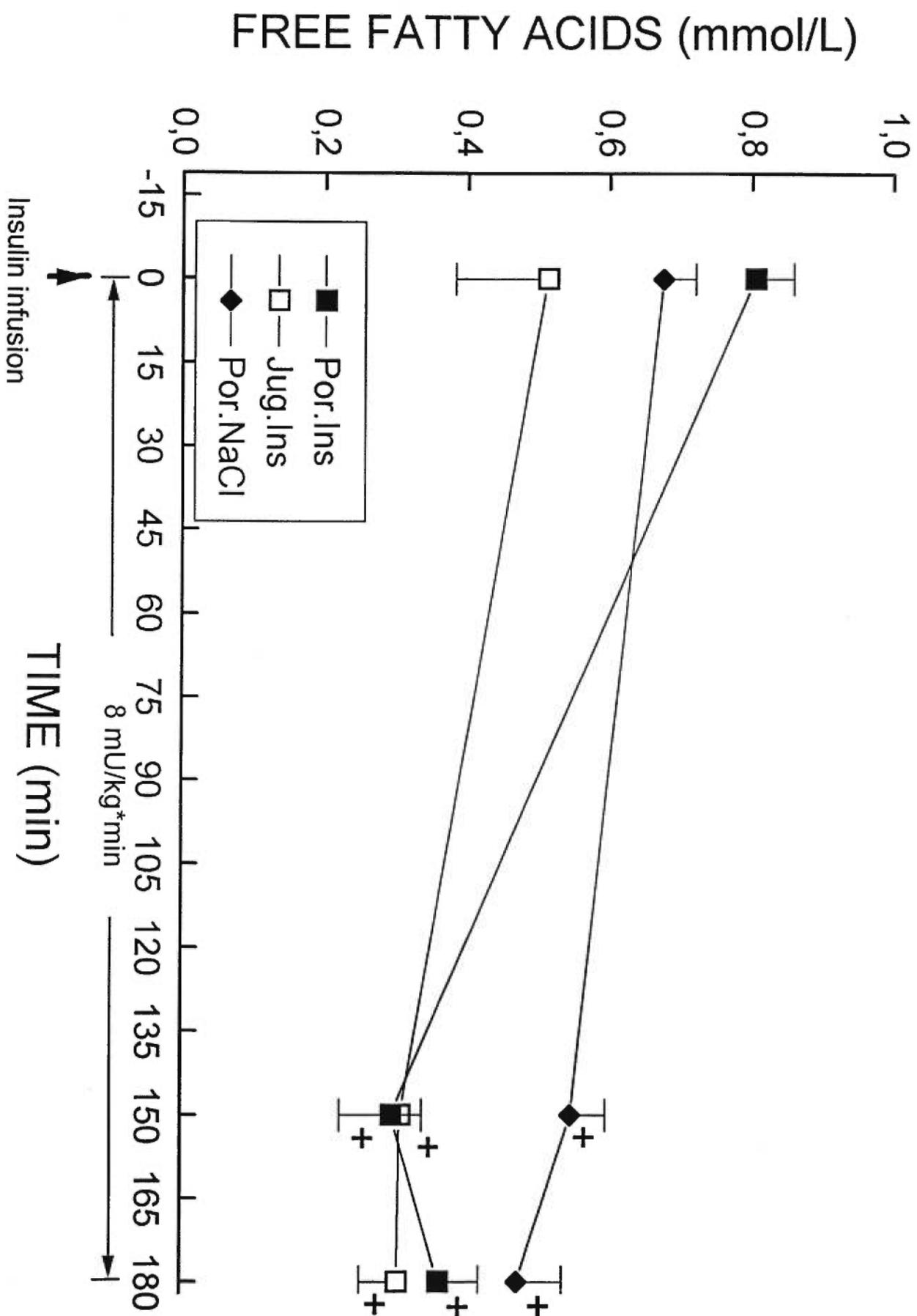


Fig. 6



CHAPITRE 5: TROISIÈME ARTICLE

**EFFECT OF CHRONIC AND ACUTE HEPATIC PORTAL VEIN INFUSION OF
FAT ON INSULIN SECRETION AND GLUCOSE METABOLISM IN RATS.**

Raynald Bergeron, Mauricio Oyarzun and Jean-Marc Lavoie.

Département d'Éducation Physique, Université de Montréal,
Montréal, Québec, CANADA. [REDACTED]

Running head: HEPATIC PORTAL FAT INFUSION AND INSULIN SECRETION

Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département d'éducation physique
Université de Montréal

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

SUMMARY

Increased hepatic portal venous flux of free fatty acids (FFA) has been proposed as one of the factors responsible for various metabolic abnormalities such as increased insulin secretion observed in visceral obesity. The purpose of the present study was to test the hypothesis that a hepato-pancreatic neural reflex is involved in this defect. To this end, a 10% triglyceride emulsion (FAT) was infused in rats either into the hepatic portal (POR) or a jugular vein (JUG) for 48H and insulin secretion and its relationship with glucose metabolism under basal and hyperglycemic states was followed. Basal glucose turnover was determined by infusing [^3H]-glucose. Chronic (48H) infusion of FAT in POR and JUG, raising FFA levels by approximately 2.5 fold compared to control isotonic saline (NaCl) infused animals, was associated with basal hyperglycemia ($P < 0.01$), whereas insulin levels were not altered. A 2H intraportal FAT infusion (ACUTE) that raised FFA levels to those observed in 48H FAT-infused groups did not affect insulin concentrations either. None of the above listed plasma parameters differed whether FAT was infused POR or JUG. Under basal steady state conditions, hepatic glucose production (HGP) was slightly higher in JUG compared to controls ($P < 0.05$). Basal peripheral glucose uptake was similar in the four groups. During the hyperglycemic clamp, glucose-induced increase in insulin concentrations were amplified by the exposure to the high plasma FFA levels when compared to NaCl-infused animals ($P < 0.01$). An ACUTE infusion of FAT was sufficient to reproduce the glucose-induced insulin secretion response observed after 48H of FAT infusion. Expressing peripheral glucose uptake over the insulin concentrations (M/I) revealed an impaired insulin sensitivity in all FAT-infused animals compared to controls during the hyperglycemic clamp. In contrast, insulin induced suppression of hepatic glucose production was markedly attenuated in both POR and JUG groups compared to ACUTE and NaCl. These data suggest that during a hyperglycemic clamp, peripheral insulin resistance is rapidly and similarly induced by either hepatic portal or systemic infusion of FAT and increased insulin secretion compensates for that defect. On the other hand increased hepatic insulin resistance is developed only after more prolonged ($> 2\text{H}$) exposure to high plasma FFA levels. The liver

is not a major determinant of the increased glucose-induced insulin secretion under hyperlipacidemia.

Index terms: Liver, hepatic glucose production, insulin sensitivity, free fatty acids, hyperglycemic clamp.

INTRODUCTION

Elevated plasma FFA concentrations are associated with various metabolic abnormalities related to carbohydrate metabolism. Experimentally increasing plasma FFA levels is generally associated with increased basal and decreased insulin-suppression of hepatic glucose production (7,9,45), decreased peripheral glucose utilization (8,39), increased (23,26,48) glucose-stimulated insulin secretion and decreased hepatic insulin clearance (23,49). The above-mentioned metabolic abnormalities have been associated with particular patterns of regional fat deposition. Women characterized by a high waist-to-hip ratio, will have increased plasma glucose and insulin concentrations both in the fasting state and following a glucose tolerance test (25). Recently, it was found that visceral fat volume is highly correlated with basal and glucose-stimulated insulin secretion as well as peripheral insulin resistance (10). The proposed link between abdominal obesity and glucose metabolism disturbances is an increased lipolytic activity of the intraabdominal adipose tissue. Rebuffé-Scrive et al. found an increased *in vitro* lipolysis of intraperitoneal compared to abdominal subcutaneous adipose tissue in response to β -adrenergic agonists in men (38). It is thought that this situation might expose the liver to a higher portal FFA flux in the post-absorptive state. Specifically increasing the exposure of hepatocytes to FFA has been reported to increase gluconeogenesis (21,22).

The existence of a functional nervous pathway between the liver, the central nervous system, and the pancreas is well established (29,42). It has been shown using electrical

stimulation of the hepatic branch of the vagus nerve or intraperitoneal and intraportal injections of glucose in the rat, that the liver can modulate insulin secretion (29,42,43). Liver mediated regulation of insulin secretion has also been demonstrated during exercise (11,27). Studies have shown that some metabolites and substrates hyperpolarize the hepatic cells (16). Russek postulated that there was an inverse relationship between the membrane potential of hepatocytes and the discharge rate of afferent nerve fibers from the liver (41). Thereby, from an alteration of the liver metabolism, insulin secretion can be modulated via a hepato-pancreatic reflex. Interestingly, palmitate has an hyperpolarizing effect on hepatocytes (16,40). These last authors further demonstrated that FFA oxidation is involved in this process. Consequently, the main objective of the present study was to examine the effects of specifically overexposing the liver to FFA on glucose-stimulated insulin secretion in relationship to glucose metabolism. Accordingly, our animals were infused with a 10% triglyceride emulsion (FAT) for 48H either into the hepatic portal or the jugular vein and submitted to a hyperglycemic clamp.

Additionally, increased (7,23,48) and decreased (28,44,51,52) glucose-stimulated insulin secretion in the presence of increased FFA concentrations have been reported. Species and experimental conditions might partly explain the discrepant results but the duration of the exposure to high FFA concentrations also seems to be a major concern. The data available about the acute stimulating effect of FFA on glucose-induced insulin secretion seem equivocal. However, longer term exposure to high FFA have generated contradictory results (6,44,52). FFA-induced alteration of glucose metabolism seem also to be time dependent. Accordingly, infusing intralipids/heparin for a period of 2H or less have failed to highlight the detrimental effects of elevated FFA levels on glucose uptake (3,9) and hepatic glucose production (18). The second objective of the present study was therefore to examine the effects of the duration of the exposure to high FFA on simultaneous insulin secretion and glucose metabolism. To this end, animals were infused intraportally with FAT for a period of either 2H or 48H and thereafter submitted to a hyperglycemic clamp.

METHODS

Animal Care. Male Sprague-Dawley strain rats (Charles River, St-Constant, Québec) weighing 225-250 g were housed individually and fed pellet rat chow and tap water *ad libitum* for 13-14 days after they were received in our laboratory. The 12:12-h light-dark cycle started at 6 A.M. and the room temperature was maintained at 20- 23°C.

Surgery. Six or seven days before the experimentation, all animals underwent chronic hepatic portal vein and jugular vein catheterization under pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) anesthesia. Isotonic saline (3.0 mL) was injected subcutaneously in the back, half the volume on each side, to provide extra fluids in case of blood loss during surgery. The portal vein catheter was implanted according to a method described previously (12). A verification of the placement of the cannula was made after the rat was killed to ensure that the infusion was successful. The right jugular vein (3 x PE-10) was also catheterized and further utilized for infusion of solutions. The catheters were filled with a solution of heparin (500 IU/mL). The animals were injected intramuscularly with antibiotics (Penicillin G procaine; 40 000 U/kg) and analgesics (Buprenorphine: 0.01-0.05 mg/kg). Before they were returned to their cage, animals were put in a size adjustable rodent jacket.

During the post-surgery period, animals were weighed daily. After four or five days allowed for recovery and habituation to the jacket, rats were lightly anesthetized with ketamine (55 mg/kg). Either the hepatic portal (for POR, NaCl, and ACUTE groups) or the jugular vein (JUG group) catheter was connected to a polyethylene line used for either FAT or isotonic saline infusion. The line was inserted into a tether connected to a freely moving swivel. Rats were divided in four experimental groups. Two groups were chronically infused with FAT (1.2 mL/hr; Travamulsion 10%, Baxter Corp., Mississauga, ON) either by the hepatic portal (POR; n=7) or the jugular vein (JUG; n=8) during two days (47-49 hours) with a micro-infusion pump (Harvard Apparatus Inc.; mod. 2400-004). The other two groups were infused into the hepatic portal vein with sterile isotonic saline (0.9% NaCl) for two days. Saline infusion was either

continued until the end of the experiment (NaCl; n=7) or switched to FAT two hours before the beginning of the clamp (ACUTE; n=8).

Experimental protocol. All rats were overnight fasted and all experiments were conducted between 8H00 and 13H00. The body temperature of the animals during the entire experiment was maintained by using a heating blanket. After anesthesia with pentobarbital sodium (20 mg/kg i.v.), the left carotid artery was catheterized (PE-50) for arterial blood sampling. Then, extensions were connected to separate jugular vein catheters for infusion of glucose and tritiated glucose. Basal blood sampling for plasma hormone and metabolite measurements was performed 30 min post-surgery. Then a 45 min resting period was allowed for tracer stabilization which is sufficient to allow for equilibration of plasma glucose specific activity (50). That period was followed by minor blood sampling (175uL) taken every 5 min from -15 to 0 min for the determination of the basal rate of glucose turnover. The Basal arterial blood sample in the ACUTE group was withdrawn 60 min before the tracer infusion began. Therefore, 120 min and 60 min had elapsed between the Basal blood sampling and the beginning of the hyperglycemic clamp respectively in the ACUTE and the other three groups. However, for the sake of simplification, the first blood sampling will be referred to as Basal.

Hyperglycemic clamp. The hyperglycemic clamp was adapted from the protocol of Stein et al. (48). Briefly, the clamp was started immediately after the second major blood sampling (0 min). Glucose was first infused (Harvard Apparatus Inc.; mod. 55-2222) to the rats as a bolus of 250 mg/kg*min over a 1 min interval and subsequently as a 25% solution at a variable rate adjusted to keep glycemia constant at 100 mg/dL over the basal fasting values, as determined from blood sampled every 5 min. Major blood samples for insulin measurements were obtained at -60, 0, 45 and 60 min time intervals. Hematocrit, free fatty acids and β -hydroxybutyrate were also determined at the same time intervals with the exception of the 45th min time interval. Blood was collected in heparinized syringes and separated in different aliquots into ice chilled tubes and immediately centrifuged. However, minor blood samplings (175uL) for the determination of glucose concentration and specific activity were free of heparin to avoid the effect of

dilution. The overall volume of blood sampled throughout the 135 min of experimentation was 5.3 mL. Patency of the arterial catheter was kept by flushing with heparinized-isotonic saline solution (5 units/mL). Donor animals were sacrificed in the fasting state and blood transfusion was performed following the major blood samplings. To minimize the effect of donor blood transfusion on glucose turnover measurements, [$3\text{-}^3\text{H}$]-Glucose was added to the donor blood to raise its plasma concentration to levels found in the recipient rats under basal conditions (50). The tritiated blood was reinjected after the 0 min blood sampling only.

Glucose turnover. Glucose appearance rate (R_a) was determined by a primed (74 KBq) continuous infusion of [$3\text{-}^3\text{H}$]-Glucose (dissolved in ultra-pure water, 1480 KBq/mL : New England Nuclear, Boston, MA: >97% pure). The infusion rate of the tracer during the stabilization period (2.457 KBq/min; -60 to 0 min) was doubled (4.914 KBq/min) at the beginning of the hyperglycemic clamp. R_a was calculated using the formula for non-steady-state conditions developed by Steele (47) and validated by Radziuk (36). Basal and hyperglycemic glucose turnover rates were calculated from measurements of plasma glucose concentration and specific activity of the radiolabeled glucose obtained every 5 min during, respectively, the last 15 min of the resting period and the 30th to 45th min of the hyperglycemic clamp. Specific activity has previously been found to be stabilized within 30 min during a hyperinsulinemic-euglycemic clamp (46). The volume of distribution in which rapid changes in plasma glucose concentration and specific activity takes place was set to 188 mL/kg body weight (35). A sliding fit technique employing three consecutive glucose or specific activity values was used within basal and hyperglycemic periods to minimize the fluctuations caused by random errors in the determination of these variables (12). Fitted values were pooled into single mean basal and hyperglycemic data for each group.

After an overnight fast, it was assumed that the basal rate of glucose of appearance is equal to the hepatic glucose production. In the basal condition when a steady state prevailed R_a equals R_d . However, during the clamp R_a was smaller than R_d while mean glycemia averaged from all groups slowly decreased from 233.0 ± 6.0 to 205.4 ± 5.54 mg/dL between the 30th to

the 45th min. In that condition, the difference between R_a and the exogenous glucose infusion rate represented the residual hepatic glucose production. The rate of glucose metabolism (M) was estimated from R_a and corrected for urinary loss of glucose during the clamp. Peripheral glucose disposal was also expressed as M over the insulin concentration (M/I) in order to provide an index of insulin-stimulated glucose utilization (17).

At the end of the hyperglycemic clamp, the abdominal cavity was quickly opened to expose the liver. Immediately after, a liver biopsy was taken from the medial lobe with aluminum block tongs cooled to liquid nitrogen. The left medial gastrocnemius and soleus muscles were sampled for glycogen determination and frozen in liquid nitrogen as well. Urine was withdrawn from the bladder for volume and glucose concentration determination. Tissue samples were stored at -80°C along with plasma until analyses were performed. The proper placement of all the catheters was verified upon autopsy. Any sign of tissue necrosis particularly in the hepatic portal vein area led to the elimination of the animal from the study. The protocol of study was reviewed and approved by the Deontological Committee on Animal Experimentation of the University of Montreal.

Analytical methods. Glucose concentrations were measured with an automatic glucose analyser (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH) using the glucose oxydase method. For the assay of $[3\text{-}^3\text{H}]\text{-glucose}$ radioactivity, 70 μL of plasma samples were deproteinized with 35 μL of 1 N perchloric acid and centrifuged (24). Duplicate aliquots (30 μL) of the supernatant were evaporated overnight under a stream of air to remove tritiated water. The dry residue was redissolved in 200 μL of water and counted in 3 mL scintillation liquid (Sigma-Fluor, Sigma, St-Louis, MO) in a liquid scintillation spectrophotometer. Correction for counting efficiency was always carried out by means of dilutions of the infusate with plasma run in parallel with plasma samples (24). Insulin levels were determined by radioimmunoassay kits commercially available (Insulin: Immunocorp, Montréal, Canada, from ICN Biomedicals, Carson, CA). Free fatty acids and $\beta\text{-hydroxybutyrate}$ concentrations were determined spectrophotometrically with the use of reagent kits (Boeringher-Manheim, Manheim, Germany). Liver triglycerides were

extracted with the Folch's method (chloroform-methanol; 2:1 vol/vol) (24). Triglycerides in the extract were spectrophotometrically determined by the use of a test kit (SIGMA, St-Louis, MO). Hepatic glycogen concentrations were measured with the phenol-sulfuric acid technique (30).

STATISTICAL ANALYSIS

All data are reported as means \pm SE. A two-way ANOVA with repeated measures design was used to analyse glucose, insulin concentrations. Data from the basal state and the hyperglycemic clamp (5 to 60 min) were treated independently. Metabolites measured at only three time intervals (free fatty acids, β -hydroxybutyrate and hematocrit ; -60, 0 and 60 min) as well as fitted values of glucose turnover (R_a , R_d) and M/I in the basal and the hyperglycemic state were all analysed with a two-way ANOVA with repeated measures design. Muscle and liver glycogen, triglyceride concentrations, urinary volume and glucose concentrations were analyzed with a one-way ANOVA to reveal group differences. Newman-Keul's post-hoc test was used in the event of a significant F ratio. A 95% level of confidence was accepted for all comparisons.

RESULTS

The weight of the animals infused chronically with FAT (JUG: 234.9 \pm 7.0 and POR: 236.6 \pm 3.0g) were not significantly different from both ACUTE and NaCl groups (respectively, 228.4 \pm 4.8 and 233.9 \pm 5.1g) on the day of the experiment. Plasma hematocrit values were not significantly different between the different experimental groups at any time.

Metabolic and hormonal profiles. Basal fasting plasma glucose concentrations (Fig. 1) were significantly higher in both JUG and POR FAT- infused rats (respectively, 117.5 \pm 2.8 and 115.9 \pm 4.5 mg/dL; $P < 0.01$) compared to both ACUTE and NaCl-infused animals (respectively, 100.1 \pm 2.8 and 94.7 \pm 1.8 mg/dL). However this difference vanished during the last 15 min

before the beginning of the hyperglycemic clamp where glycemia was stable and similar across all the groups. Glycemia of the ACUTE and NaCl-infused groups increased from Basal to the -15 to 0 min interval most likely as a result of the transfusion of blood from the donor animals in which glucose concentration was 128.1 ± 4.3 mg/dL. Glucose concentrations observed during the hyperglycemic clamp were not significantly different among the different groups. Glycemia during the 30-45 min interval when glucose turnover was measured decreased from 235.6 ± 6.0 to 206.9 ± 5.3 mg/dL ($P < 0.01$)

Basal FFA levels (Fig. 2) were higher in both POR and JUG compared to NaCl and ACUTE (respectively, 1.06 ± 0.22 and 0.88 ± 0.12 vs 0.42 ± 0.04 and 0.31 ± 0.03 mmol/L; $P < 0.05$). At 0 min, FFA concentrations were significantly higher in all the groups infused with FAT when compared to NaCl ($P < 0.05$). Accordingly, there was a rise in arterial FFA concentrations ($P < 0.01$) following ACUTE FAT infusion from 0.31 ± 0.03 to 1.56 ± 0.31 mmol/L. FFA concentrations in the three groups infused with FAT kept increasing during the clamp resulting in significant differences ($P < 0.01$) at 60 min compared to NaCl. FFA concentrations did not change significantly throughout the course of the experiment in NaCl-infused animals. There was no significant difference among the various groups in Basal plasma β -hydroxybutyrate concentrations (Fig. 3). Plasma β -hydroxybutyrate levels were increased from Basal (0.22 ± 0.01) to pre-clamp (0.44 ± 0.08 mmol/L; $P = 0.051$) in the ACUTE group. During the hyperglycemic clamp state was associated with a diminution of β -hydroxybutyrate levels in the NaCl group ($P < 0.01$) compared to Basal and pre-clamp values. Consequently, β -hydroxybutyrate concentrations in the NaCl group were significantly lower compared to the other three groups at 60 min ($P < 0.01$).

Basal insulin concentrations were not significantly altered by 48H FAT infusion either into the hepatic portal vein or a jugular vein (Fig. 4). ACUTE infusion of FAT slightly raised Basal insulinemia from 75.0 ± 9.17 to 106.2 ± 17.6 pmol/L at the start of the clamp but not to a significant level. During the clamp, plasma insulin levels were significantly increased in the three groups infused with fat compared to both corresponding basal levels ($P < 0.01$) and NaCl clamp

values ($P < 0.01$). Furthermore, ACUTE infusion of FAT resulted in similar plasma insulin concentrations during the hyperglycemic clamp when compared to 48H infused animals. POR and JUG FAT infusion were associated with similar insulin responses to glucose.

Tissue and urinary parameters. FAT infusion raised liver triglyceride concentrations. Hence, mean POR liver triglyceride concentration was higher than control NaCl group ($P < 0.05$; Table 1). There was a tendency for JUG and ACUTE liver triglyceride concentrations to be intermediate between POR and NaCl but the variability of our assay was high and was likely responsible for the non-significant differences. Liver and muscle (soleus and medial gastrocnemius) glycogen concentrations measured from biopsies taken at the end of the experiment showed no significant differences between the various groups (Table 1). Urine volume and urinary glucose concentrations was not altered by the different experimental procedures.

Glucose turnover data. In the basal state, HGP was significantly greater in JUG compared to NaCl (Table 2). During the hyperglycemic clamp, HGP was reduced in all groups compared to corresponding basal rates ($P < 0.05$). However, the degree of suppression of HGP during the clamp was lower in both chronically FAT- infused groups causing HGP rates to be greater in JUG and POR than in ACUTE and NaCl groups ($P < 0.01$) (Table 2). Basal rate of glucose metabolism (M) was not altered by the different infusion protocols. During the hyperglycemic clamp, M was increased in all experimental groups compared to their respective rates in the basal state ($P < 0.01$). M did not differ significantly among the various groups during the hyperglycemic clamp (Table 2). In the basal state M/I was reduced by chronic portal FAT infusion when compared to the other three groups ($P < 0.05$). During the clamp, M/I ratio was raised compared to corresponding basal value only in the NaCl-infused group. Therefore, lower M/I ratios were found in all FAT- infused groups compared to NaCl ($P < 0.01$).

DISCUSSION

In the present experiment, liver triglyceride levels were increased to a greater extent compared to the NaCl-infused group when the triglyceride emulsion was infused chronically and directly into the portal vein (Table 1). Such an elevation indicates that the chronic FAT infusion was successful. The elevation in liver triglyceride concentration occurs rapidly as witnessed by a tendency toward an increase in the acute portally infused rats compared to saline infused animals. Plasma FFA concentrations were more elevated in the basal state in both chronically FAT-infused groups than in the other two groups (Fig. 2). Following the 2H acute FAT infusion, plasma FFA concentrations were also raised significantly. By infusing FAT during 2H at the same infusion rate as in the present study combined to bolus infusion of heparin, Kruszynska et al. (26) found that FFA levels increased to approximately 1.5 mmol/L which is similar to the data reported here. FFA concentrations further increased in all the groups infused with FAT during the hyperglycemic clamp compared to basal levels. Similar findings have been reported recently from human studies during which a hyperglycemic glucose clamp was performed simultaneously with an intralipid/heparin infusion (23). As observed in the present study, the lack of a decrease or an increase in plasma β -hydroxybutyrate concentrations as a result of FAT infusion during either hyperinsulinemic-euglycemic (8,3) or hyperglycemic (48) clamp studies have already been reported and is most likely generated by an enhanced liver lipid oxidation (Fig. 3). In the NaCl-infused group, plasma β -hydroxybutyrate and FFA concentrations decreased from the basal to the hyperglycemic condition suggesting normal insulin-stimulated inhibition of lipid metabolism (45).

Associations between the degree of visceral obesity and basal and glucose-stimulated insulin secretion have been reported (10). Additionally, visceral obesity is associated with disturbances of the regulation of hepatic production (1) and peripheral disposal of glucose (10,15). It has been suggested that increased portal FFA flux might be the cause of these metabolic abnormalities (10,34). An hepato-pancreatic neural pathway modulating insulin secretion, has been demonstrated (11,27,29,42,43). Based on results from feeding and

electrophysiological studies, it was postulated that the hepatic metabolism of different substrates will affect the membrane potential of hepatocytes and possibly modify the afferent discharge rate in the hepatic branch of the vagus nerve (16,32,33,41). Since hepatic metabolism of FFA can increase the membrane potential of hepatocytes (40), we have proposed that it might, in part, be responsible for increased insulin secretion observed in visceral obesity. In the present experiment, plasma insulin concentrations observed in the basal conditions were not significantly influenced by the different infusion protocols (Fig 4). However, plasma insulin levels during the hyperglycemic clamp were clearly higher in all FAT-infused groups as compared to the NaCl-infused group. These data suggest that animals infused with FAT were insulin-resistant. Overexposing the liver to FAT by infusing the triglyceride emulsion intraportally, as compared to peripherally, did not produce different insulin concentrations during both basal and glucose-induced insulin secretion. Therefore, under the present conditions, data do not support the contention that the liver is involved in FFA-induced increase in insulin secretion. Interestingly, the potentiated glucose-stimulated insulin secretion following 48H of elevated plasma FFA levels compared to control animals was reproduced after only two hours of FAT infusion. This observation suggests that elevating plasma FFA levels rapidly potentiates the glucose-stimulated insulin secretion and that this effect is similar to what is found after 48 H of elevated FFA levels. As reported in the present study, increased glucose-stimulated insulin secretion as a result of short-term exposure to high FFA levels has been observed (7,23,48). However, the chronic effect of FFA on insulin secretion is still debated. Some workers have reported a reduced glucose-stimulated insulin secretion following a 48H exposure to elevated FFA concentrations during *in vitro* studies (44,52). On the other hand, Boden et al. recently demonstrated that a 48H intralipid/heparin infusion led to an increase glucose-stimulated insulin secretion during a study conducted *in vivo* on normal humans (6). As observed in that last reported study, the glucose-stimulated insulin secretion was still higher than in the control study after 48H of FAT infusion and is most likely secondary to increased insulin resistance. It has been reported that obesity and increased FFA exposure are associated with a decrease in hepatic insulin clearance (23,34). Hepatic insulin clearance was not determined in the present study. A decreased hepatic insulin extraction leading to increased

insulin concentrations in the presence of high FFA concentrations can not be totally excluded. However, plasma insulin concentrations were approximately similar in all the groups under basal conditions. The large insulin concentrations differences observed during the clamp between the three FAT-infused and the NaCl-infused animals can hardly be explained solely on the basis of decreased hepatic insulin clearance.

The basal rate of glucose metabolism (M) was not altered in the present experiment in any of the FAT-infused groups when compared to the control saline treated animals (Table 2). Past reports are in agreement with this demonstration as neither in normal subjects nor in NIDDM patients did elevating FFA levels for respectively 2H or 4H changes basal glucose disposal (7,5). On the other hand, M was markedly increased in all four groups during the hyperglycemic clamp, but no significant differences were observed between the various groups. Our data related to peripheral glucose metabolism during the hyperglycemic clamp rely on the expression of the rate of glucose metabolism in relation to the plasma insulin concentrations (M/I), an index of insulin sensitivity (17). Accordingly, M/I during the hyperglycemic clamp was increased only in the NaCl-infused group whereas it decreased in the 3 groups infused with FAT. Therefore, these data strongly suggest that the elevation of plasma FFA concentrations is associated with peripheral insulin sensitivity. The findings reported here are supported by the data from recent studies conducted either in Rats or on humans (6,48). Reporting the glucose infusion rate data observed during the hyperglycemic clamp studies over the insulin concentrations reveal that insulin sensitivity was decreased when FAT was infused compared to a saline infusion (6,48). Furthermore, as it was observed with glucose-stimulated insulin secretion, peripheral insulin resistance was rapidly induced by a 2H FAT infusion and was still observed when the infusion lasted for 48H. Some human studies have failed to report an impairment of peripheral glucose metabolism after 2H of exposure to high FFA plasma concentrations (3,9). Boden et al. (8) proposed that ~3H or more were necessary to mediate the FFA-induced inhibition of glucose disposal in humans. However, data from a recent rat study indicate that insulin sensitivity is observed as soon as one hour after the beginning of a FAT infusion (48) and is likely explained by the higher rate of metabolism compared to humans.

The mechanisms underlying the altered insulin-stimulated glucose disposal as a result of high FFA exposure can not be resolved with the present data. However, a partial answer is provided by a recent study (39). Authors have suggested that the initial major defect is at the level of muscle glucose transport/phosphorylation whereas a reduction in glycogen synthase activity and glucose oxydation will appear later. In the present study, only hepatic and muscle glycogen data might provide an insight on the fate of the glucose that was infused during the hyperglycemic clamp. However, compared to the control condition, neither the site nor the duration of the FAT infusion have affected glycogen concentrations in the liver and the gastrocnemius and soleus muscles. Taken together, the data of the present study obtained during the hyperglycemic clamp are compatible with the idea of rapid impairment of peripheral glucose metabolism induced by FFA that is compensated by increased insulin secretion.

Augmented rates of fasting basal hepatic glucose production in NIDDM patients compared to controls have been observed (5). Increased gluconeogenesis has been suggested to explain higher basal HGP in NIDDM patients (31). Recently, Rebrin et al. (37) have reported that there is a strong correlation between plasma FFA concentrations and the rates of HGP. The stimulating effect of FFA on gluconeogenesis has been demonstrated years ago (21). In the present study, a slight increase in HGP when FAT was infused in a jugular vein for 48H was found when compared to the control group (Table 2). A tendency toward an increase in HGP with the intraportal infusion of FAT was also observed ($P < 0.1$ vs NaCl-infused animals). Therefore raising FFA concentrations with a 48H FAT infusion was associated with slight increases of basal HGP. Correspondingly, Basal plasma glucose concentrations were higher in both chronically infused rats compared to both control and acutely infused animals (Fig. 1). On the other hand, a 2H infusion of FAT did not increase basal HGP under the present experimental conditions. This finding is supported by the data of Saloranta et al. (45) indicating normal basal HGP after ~2H of FAT infusion in humans. During the hyperglycemic clamp, insulin-induced suppression of HGP was only partially blunted when animals had been subjected to FAT infusion for 48H while it was abolished in the other 2 groups. These findings correspond with a tendency ($P < 0.1$) towards higher plasma glucose concentrations during the

clamp in both groups infused for 48H with FAT compared to the ACUTE and NaCL groups (Fig.1). Similar uncomplete attenuations of insulin-induced HGP suppression during the clamp were observed in both POR and JUG 48H FAT infused groups. These data indicate that, under the present experimental conditions, insulin-induced HGP suppression was not altered differently when FAT was infused into the hepatic portal vein as compared with a systemic infusion. Hepatic portal FFA and insulin concentrations were not measured in this experimental protocol. It can be assumed that hepatic portal concentrations of FFA were higher when FAT was infused in POR. According to this hypothesis, it seem surprising that insulin-induced HGP suppression was not further attenuated in POR. The lack of an effect of intralipids/heparin infusion on HGP in humans has been reported despite the stimulation of gluconeogenesis (14). These authors have suggested that increased gluconeogenesis was compensated by a decrease in glycogenolysis. A similar compensation preventing further alteration of HGP when FAT was infused intraportally can not be excluded.

In contrast to a 48H infusion, 2H infusion of FAT almost completely suppressed HGP during the clamp. Normal insulin-induced suppression of HGP following acute (2H) FAT infusion raising FFA concentrations to 1.5 mmol/L has been previously reported and support the present findings (26). However, these results have to be put in perspective with contrasting data from studies performed in normal human subjects (45,9). When a 4H intralipids/heparin infusion was started simultaneously with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp, HGP was normally suppressed (9). On the other hand, starting the intralipids/heparin infusion 2H before the start of the hyperinsulinemic clamp and measuring HGP 6H later resulted in an attenuation of the insulin-stimulated suppression of HGP (45). Based on these results (9,45) Saloranta et al. have postulated a time-dependent effect of FFA on HGP (45). The present data strongly support this hypothesis as insulin-induced suppression of HGP was normal and altered, respectively, in 2H and 48H infused animals. The current finding that a 2H FAT infusion in the present study is associated with normal insulin-induced suppression of HGP is interesting considering that peripheral insulin resistance was induced in the same amount of time. Therefore, it is suggested that the increase in FFA concentrations is first characterized by with

an alteration of the peripheral glucose disposal whereas the defect in the regulation of hepatic glucose production develops later. This interpretation is in continuity with the observation that insulin-stimulated glucose disposal was defective but that HGP regulation was normal in adolescent girls in an early stage of obesity (10).

Hyperinsulinemia and hyperglycemia are both important factors regulating the suppression of HGP (2,4). Higher rates of HGP in both 48H FAT-infused animals compared to the 2H fat infused group during the hyperglycemic clamp can not be explained on the basis of plasma insulin concentrations. If anything, insulin levels were slightly higher (N.S.) in these two 48H infused groups during the glucose clamp compared to the 2H FAT-infused groups. The same argument holds true for glucose concentrations during the clamp since mean glycemia was slightly (N.S.) higher in 48H FAT-infused animals compared to the other two groups. Interestingly, the impairment of insulin-stimulated suppression of HGP during the hyperglycemic clamp after 48H of FAT infusion occurs despite plasma FFA concentrations approximately equal to those encountered in 2H FAT-infused animals. This suggests that factors other than circulating plasma FFA as such, are involved in the regulation of hepatic glucose production under the present experimental conditions.

In conclusion, the infusion of a triglyceride emulsion in rats caused a rapid decrease in peripheral insulin sensitivity (2H) compensated by an increased insulin secretion under hyperglycemic conditions, whereas hepatic insulin resistance only appears later. Under the present experimental conditions characterized by high plasma FFA concentrations, hepatic portal vein delivery of FAT failed to highlight a specific role of the liver on the increased insulin secretion.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (Government of Quebec). The authors would like to thank Annie Sylvain and Marlène Fortier for their excellent technical assistance and Lucie Senneville for her secretarial support.

REFERENCES

1. Abate, N., Garg, A., Peshock, R.M., Stray-Gundersen, J. and Grundy, S.M. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J.Clin.Invest.* 96:88-98, 1995.
2. Bell, P.M., Firth, R.G. and Rizza, R.A. Effects of hyperglycemia on glucose production and utilization in humans. *Diabetes* 35:642-648, 1986.
3. Bevilacqua, S., Bonnadonna, R.C., Buzzigoli, G., Boni, C., Ciociaro, D., Maccari, F., Giorico, M.A. and Ferrannini, E. Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism* 36:502-506, 1987.
4. Bishop, J.S., Steele, R., Altszuler, N., Dunn, A., Bjerknes, C. and De Bodo, R.C. Effects of insulin on liver glycogen synthesis and breakdown in the dog. *Am.J.Physiol.* 208:307-316, 1965.
5. Boden, G. and Chen, X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent-diabetes-mellitus. *J.Clin.Invest.* 96:1261-1268, 1995.
6. Boden, G., Chen, X., Rosner, J. and Barton, M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 44:1239-1242, 1995.
7. Boden, G. and Jadali, F. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. *Diabetes* 40:686-692, 1991.
8. Boden, G., White, J.J., Liang, Y., Mozzoli, M., Chen, X., Coleman, E. and Smith, C. Effects of fat in insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J.Clin.Invest.* 88:960-966, 1991.
9. Bonnadonna, R.C., Zych, K., Boni, C., Ferrannini, E. and DeFronzo, R.A. Time dependence of the interaction between lipid and glucose in humans. *Am.J.Physiol.* (Endocrinol. Metab.) 257:E49-E56, 1989.

10. Caprio, S., Hyman, L.D., Limb, C., McCarty, S., Lange, R., Sherwin, R.S., Shulman, G.I. and Tamborlane, W.V. Central adiposity and its metabolic correlates in obese adolescent girls. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 269:E118-E126, 1995.
11. Cardin, S., Hélie, R., Compte, B., Bergeron, R., Van de Werve, G. and Lavoie, J.-M. Effect of hepatic portal pyruvate infusion on hormonal response in exercising rats. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 266:R1630-R1636, 1994.
12. Cherrington, A.D. and Vranic, M. Effects of arginine on glucose turnover and plasma free fatty acids in normal dogs. *Diabetes* 22:537-543, 1973.
13. Clark, P.W., Jenkins, A.B. and Kraegen, E.W. Pentobarbital reduces basal liver glucose output and its insulin suppression in rats. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 258:E701-E707, 1990.
14. Clore, J.N., Glickman, P.S., NESTLER, J.E., and Blackard, W.G. In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal men. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 261:E425-E429, 1991.
15. Colberg, S.R., Simoneau, J.A., Thaete, F.L. and Kelley, D.E. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J.Clin.Invest.* 95:1846-1853, 1995.
16. Dambach, G. and Friedman, N. Substrate-induced membrane potential changes in the perfused rat liver. *Biochim.Biophys.Acta* 367: 366-370, 1974.
17. DeFronzo, R., Tobin, J.D. and Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 237:E214-E223, 1979.
18. Ferrannini, E., Barrett, E.J., Bevilacqua, S. and DeFronzo, R.A. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J.Clin.Invest.* 72:1737-1747, 1983.

19. Fisher, S.J. Shi, Z.Q., Lavina, H., Lickley, A. Efendic, S. Vranic, M. and Giacca, A. A moderate decline in specific activity does not lead to an underestimation of hepatic glucose production during a glucose clamp. *Metabolism* 45:587-593, 1996.
20. Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226:497-506, 1957.
21. Friedmann, B., Goodman, E.H. and Weinhouse, S. Effect of insulin and fatty acids on gluconeogenesis in the rat. *J.Biol.Chem.* 242:3620-3627, 1967.
22. Gonzalez-Manchon, C., Ayuso, M.S. and Parilla, R. Control of hepatic gluconeogenesis: Role of fatty acid oxydation. *Arch.Biochem.Biophys.* 271:1-9, 1989.
23. Hennes, M.M.I., Dua, A. and Kissebah, A.H. Effects of free fatty acids and glucose on splanchnic insulin dynamics. *Diabetes* 46:57-62, 1997.
24. Kjaer, M., Kiens, B., Hargreaves, M. and Richter, E.A. Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J.Appl.Physiol.* 71:552-557, 1991.
25. Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L. and Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J.Clin.Invest.* 72:1150-1162, 1983.
26. Kruszynska, Y.T., McCormack, J.G. and McIntyre, N. Effects of glycogen stores and non-esterified fatty acid availability on insulin-stimulated glucose metabolism and tissue pyruvate dehydrogenase activity in the rat. *Diabetologia* 34:205-211, 1991.
27. Lavoie, J.M., Cardin, S. and Doiron, B. Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 257:E855-E859, 1989.
28. Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D. and Unger, R.H. B-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats:

- Impairment on adipocyte - B-cell relationship. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 91:10878-10882, 1994.
29. Lee, K.C. and Miller, R.E. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinol.* 117:307-314, 1985.
 30. Lo, S., Russell, J.C. and Taylor, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J.Appl.Physiol.* 28:234-236, 1970.
 31. Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G. and Shulman, G.I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes; A nuclear magnetic resonance study. *J.Clin.Invest.* 90:1323-1327, 1992.
 32. Nijijima, A. Reflex control of the autonomic nervous system activity from the glucose sensors in the liver in normal and mid-pontine transected animals. *J.Autonom.Nerv.Syst.* 10: 279-285, 1984.
 33. Nijijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and regulation of blood glucose. *Br.Res.Bull.* 5(suppl.4): 175-179, 1980.
 34. Peiris, A.N., Mueller, R.A., Smith, G.A., Struve, M.F. and Kissebah, A.H. Splanchnic insulin metabolism in obesity: Influence of body fat distribution. *J.Clin.Invest.* 78:1648-1657, 1986.
 35. Proietto, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Ionescu, E., Terretaz, J., Sauter, J.F. and Jeanrenaud, B. Non-steady state measurement of glucose turnover in rats by using a one-compartment model. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 252:E77-E84, 1987.
 36. Radziuk, J., Norwich, K.H. and Vranic, M. Experimental validation of measurements of glucose turnover in nonsteady state. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 234:E84-E93, 1978.

37. Rebrin, K., Steil, G.M., Getty, L. and Bergman, R.N. Free fatty acids as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 44:1038-1045, 1995.
38. Rebuffé-Scrive, M., Andersson, B. and Bjorntorp, P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of non-obese men and women. *Metabolism* 38:453-458, 1989.
39. Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W. and Shulman, G.I. Mechanism of free fatty acid induced insulin resistance in humans. *J.Clin.Invest.* 97:2859-2865, 1996.
40. Rossi, R., Geromini, M., Gloor, P., Seebacher, C. and Scharrer, E. Hyperpolarisation of the cell membrane of mouse hepatocytes by fatty acid oxydation. *Physiol.Behav.* 57:509-514, 1995.
41. Russek, M. Current status of the hepatostatic theory of food intake. *Appetite* 2:137-143, 1981.
42. Sakaguchi, T. and Hayashi, Y. Reflex secretion of insulin evoked by intraportal injection of D-glucose anomers in the rats. *Biomed.Res.* 2:222-224, 1981.
43. Sakaguchi, T. and Yamaguchi, K. Effects of electrical stimulation of the hepatic vagus nerve on the plasma insulin secretion in the rat. *Brain Res.* 164:314-316, 1979.
44. Sako, Y. and Grill, V.E. A 48-hour infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinol.*127:1580-1589, 1990.
45. Saloranta, C., Koivisto, V., Widen, E., Falholt, K., DeFronzo, R.A., Harkonen, M. and Groop, L. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 264:E599-E605, 1993.

46. Smith, D., Rossetti, L., Ferrannini, E., Johnson, C.M., Cobelli, C., Toffolo, G., Katz, L.D. and DeFronzo, R.A. In vivo glucose metabolism in the awake rat: Tracer and insulin clamp studies. *Metabolism* 36:1167-1174, 1987.
47. Steele, R. Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82:420-430, 1959.
48. Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S. and McGarry, J.D. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J.Clin.Invest.* 97:2728-2735, 1996.
49. Svedberg, J., Stromblad, G., Wirth, A., Smith, U. and Bjorntorp, P. Fatty acids in the portal vein of the rat regulate hepatic insulin clearance. *J.Clin.Invest.* 88:2054-2058, 1991.
50. Wiersma, M.M.L., Vissing, J., Steffens, A.B. and Galbo, H. Effects of glucose infusion on hormone secretion and hepatic glucose production during heavy exercise. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 265:R1333-R1338, 1993.
51. Zhou, Y.-P., Ling, Z.C. and Grill, V.E. Inhibitory effects of fatty acids on glucose regulated B-cell function: Association with decreased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxydation on glucose metabolism. *Metabolism* 45:981-986, 1996.
52. Zhou, Y.-P. and Grill, V.E. Long-tem exposure to fatty acids and ketone inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langherhans. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80:1584-1590, 1995.

TABLE I Effects of a 10% triglyceride emulsion infusion on tissue substrates, urinary glucose and urine volume.

	FAT INFUSION			
	48H JUGULAR	48H PORTAL	48H NaCl	2H ACUTE
n	8	7	8	7
Liver triglycerides (mg/g tissue)	1.64±0.59	2.32±0.59 †	0.41±0.08	1.92±0.28
Liver glycogen (g/100 g tissue)	1.52±0.26	1.77±0.22	1.20±0.10	1.46±0.11
Muscle glycogen (g/100 g)				
Soleus	0.54±0.04	0.53±0.03	0.50±0.03	0.49±0.02
Medial gastrocnemius	0.65±0.09	0.49±0.07	0.48±0.08	0.50±0.04
Urinary glucose (mg/dL)	23.9±3.0	27.4±5.0	26.0±9.3	15.8±5.8
Urine volume (mL)	1.45±0.23	1.82±0.26	2.00±0.30	2.34±0.47

† Significantly different from NaCl (P<0,05); X±SE

TABLE II. Effects of a 10% triglyceride emulsion infusion on glucose metabolism.

	FAT INFUSION			
	48H JUGULAR	48H PORTAL	48H NaCl	2H ACUTE
n	8	7	8	7
HGP (mg/kg*min)				
Basal	9.32±0.42 †	8.34±0.53	6.74±0.37	7.70±0.61
Clamp	4.93±0.94 *‡	5.61±0.71 *‡	1.64±0.72 *	0.93±1.01*
Glucose metabolism (mg/kg*min)				
Basal	9.46±0.57	7.88±0.54	7.02±0.47	7.83±0.60
Clamp	25.87±1.18 *	24.98±0.83 *	22.93±0.89*	25.56±1.52 *
M / I [(mg/kg*min)/pmol/L]				
Basal	14.29±1.46	11.13±1.19 ☐	16.64±1.64	14.80±1.41
Clamp	8.19±0.67 *	8.02±0.81	21.65±1.93*☐	9.64±1.37 *

All data are from fitted values obtained from two 15 min periods; one in the basal state and the other during a hyperglycemic clamp (30 to 45 min). Hepatic glucose production (HGP) under basal steady state conditions is equivalent to R_a . During the hyperglycemic clamp, HGP is calculated from the difference between R_a and the glucose infusion rate. Glucose metabolism (M) was estimated from R_d and corrected for glucose urinary loss. M/I is obtained by dividing M by the insulin concentration (I). * Significantly different from corresponding basal value (P<0,05). † Significantly different from NaCl (P<0,05). ‡ Significantly different from ACUTE and NaCl groups (P<0,01). ☐ Significantly different from the other three groups (P<0,05); X±SE

LEGENDS

Figure 1 Arterial plasma glucose concentrations in rats infused for 48H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) 10% triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. ‡ Significantly different from NaCl and ACUTE values; P<0,01. * Significantly different from corresponding Basal and pre-clamp values; P<0,01. Basal measurements were determined from blood sampled 60 min before the beginning of the clamp in all but the ACUTE group. In the latter group, basal blood sampling was performed 120 min before the beginning of the hyperglycemic clamp.

Figure 2 Arterial plasma free fatty acids concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. ‡ Significantly different from NaCl and Acute values; P<0.05. ¶ Significantly different from corresponding Basal value; P<0,01. ☒ Significantly different from other three groups; P<0,01. See legend of Fig. 1 for additional details.

Figure 3 Arterial plasma β -hydroxybutyrate concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. * Significantly different from corresponding Basal and 0 min values; P<0,01. ☒ Significantly different from other three groups; P<0,01. See legend of Fig. 1 for additional details.

Figure 4 Arterial plasma insulin concentrations in rats infused 48 H with a 10% triglyceride emulsion either into a jugular (JUGULAR) or the hepatic portal vein (PORTAL). Other intraportal infusions included a 48H isotonic saline (NaCl) and a 2H (ACUTE) 10% triglyceride emulsion. Values are means \pm SE with n = 7-8 in each group. * Significantly different from corresponding Basal and 0 min values; P<0,01. ☒ Significantly different from other three groups; P<0,01. See legend of Fig. 1 for additional details.

Fig. 1

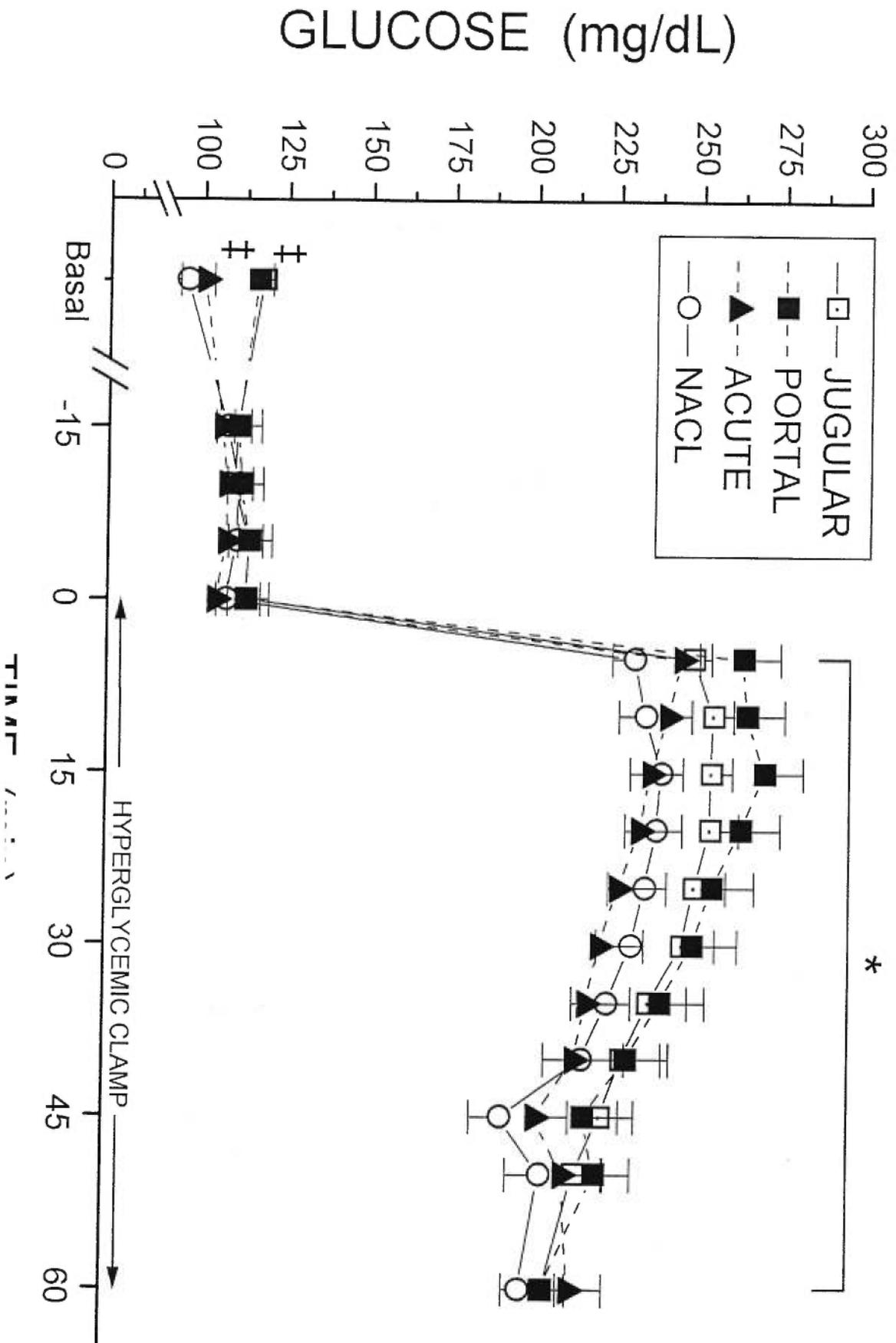


Fig. 2

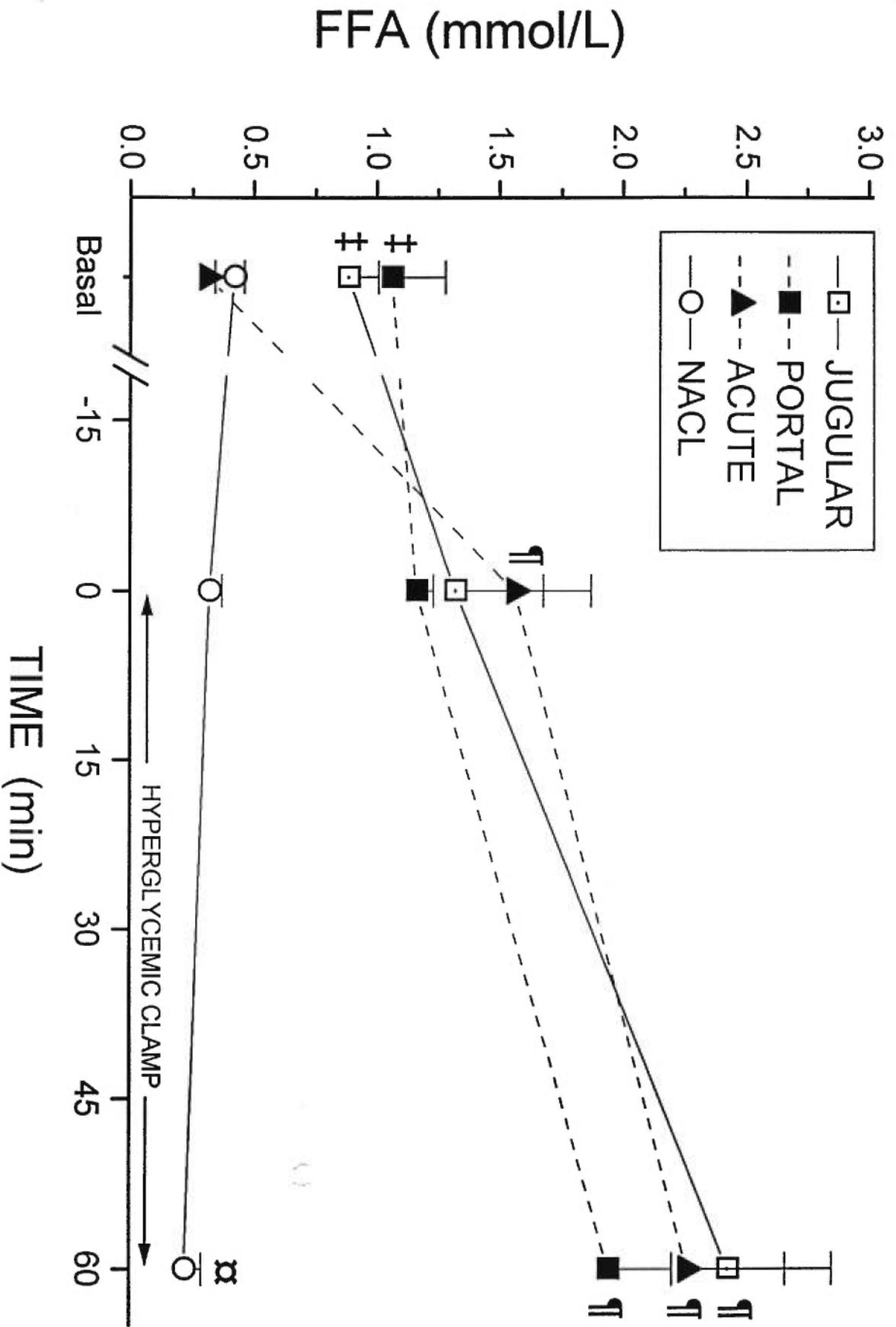


Fig. 3

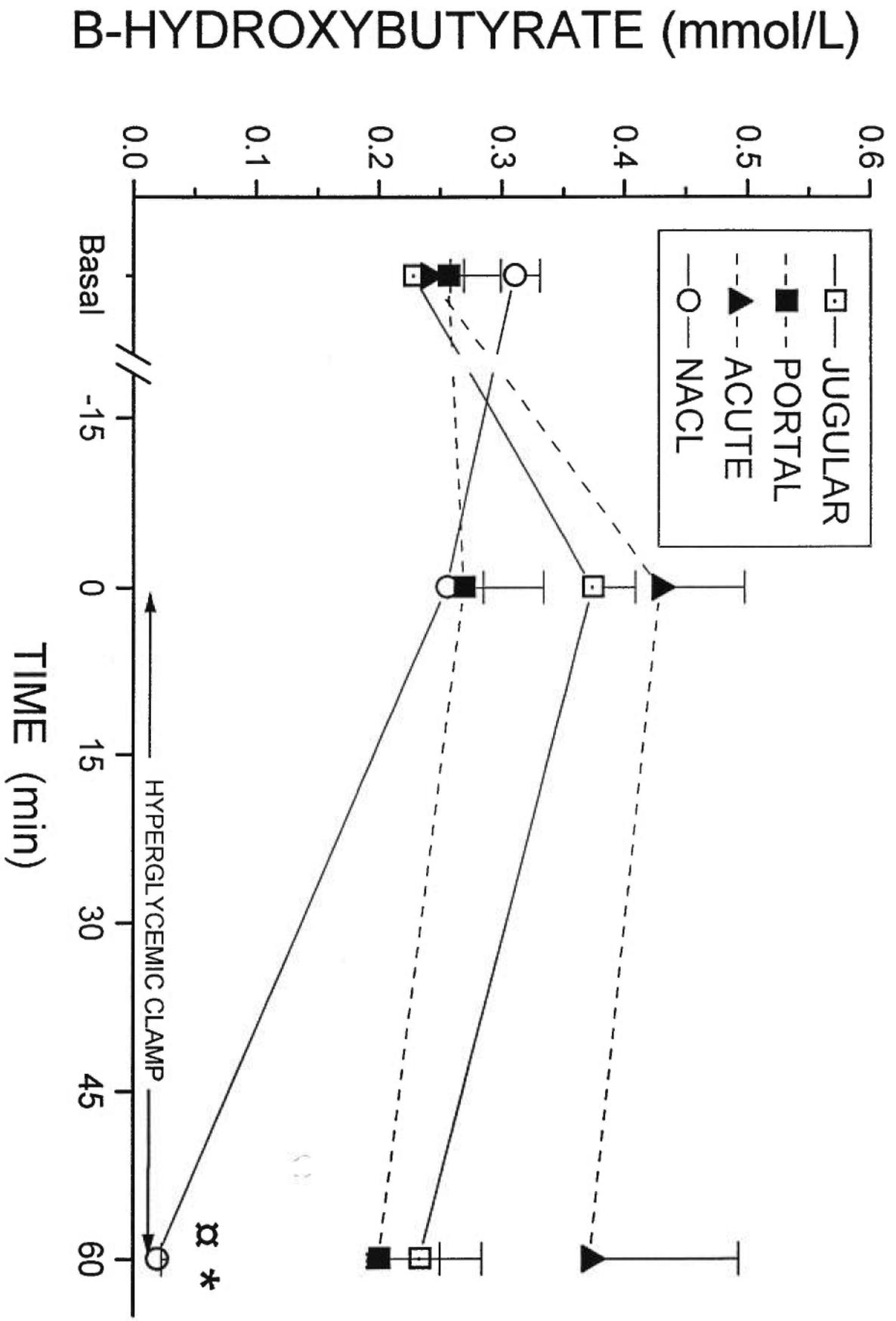
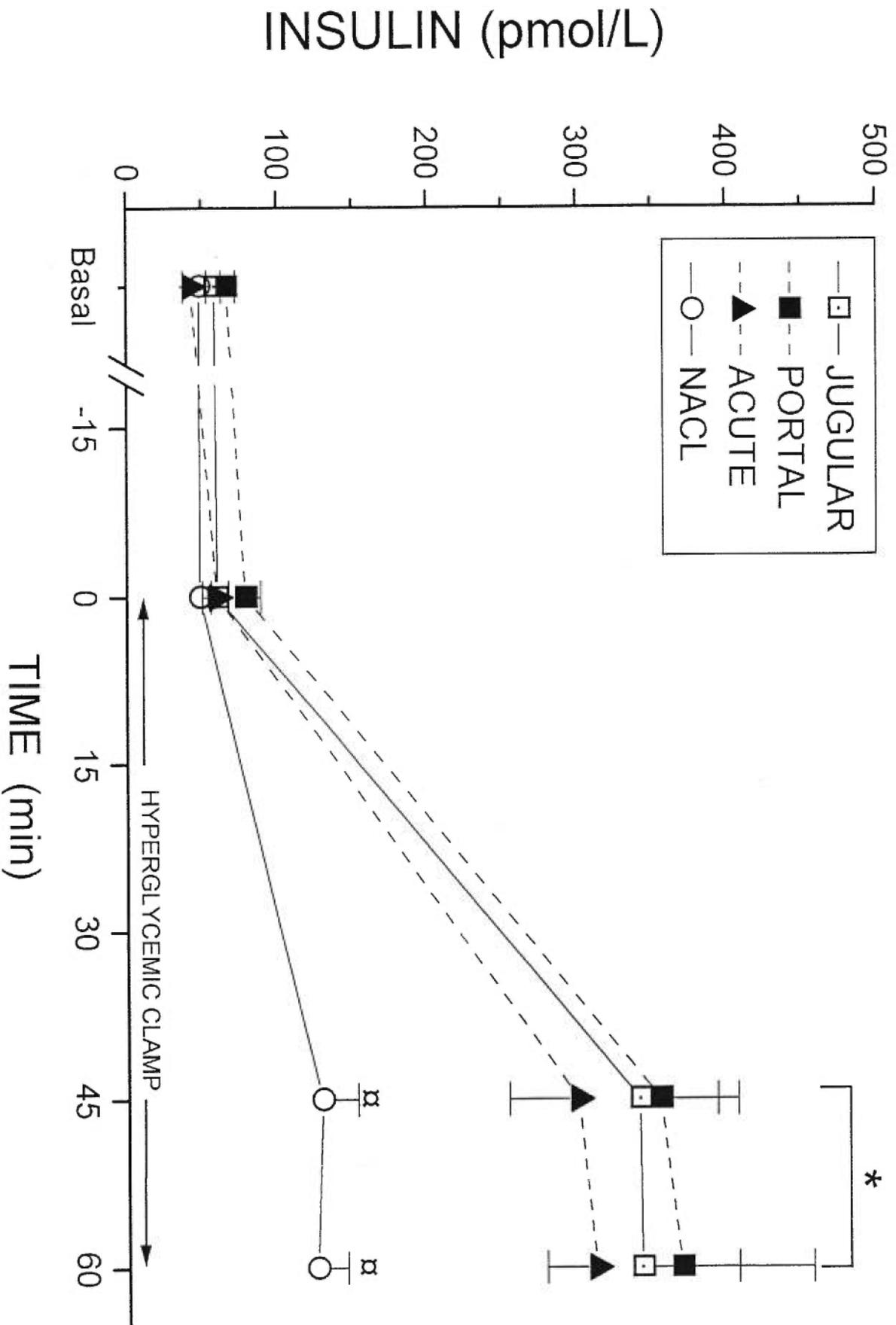


Fig. 4



CHAPITRE 6: DISCUSSION GÉNÉRALE

Implication des pompes sodium-potassium hépatiques sur la réponse hormonale hépato-médullo-surrénalienne

La première étude présentée au chapitre 3 visait à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques participe à la modulation de la réponse hépato-médullo-surrénalienne. Afin de vérifier cette hypothèse des infusions intraportale ou jugulaire d'ouabaïne, un inhibiteur des pompes sodium-potassium, ont été effectuées chez le Rat en combinaison avec une vagotomie sélective de la branche hépatique.

Des études récentes ont examiné l'implication d'un réflexe hépato-médullo-surrénalien dans la réponse contre régulatrice à une hypoglycémie induite par l'insuline chez le chien anesthésié (Donovan et coll., 1991; Donovan et coll., 1994; Hamilton-Wessler et coll., 1994). Ainsi on a démontré que l'augmentation des concentrations artérielles d'adrénaline en réponse à l'hypoglycémie était diminuée considérablement lorsque le foie était sélectivement maintenu dans un état euglycémique. Également, la sécrétion d'adrénaline était atténuée lors d'une hypoglycémie induite par l'insuline chez un animal ayant subi une dénervation aiguë du foie comparativement à la réponse d'un animal ayant un foie intact (Lamarche et coll., 1995).

Dans le cadre de la présente étude, l'injection d'ouabaïne, un inhibiteur de l'activité des pompes sodium-potassium, dans la veine porte hépatique a produit une augmentation des concentrations artérielles d'adrénaline (Chapitre 3, figures 4 et 5). Selon la théorie sur laquelle sont fondées les études citées au paragraphe précédent, cette réponse hormonale était prévisible. Lors de la présente expérimentation nous avons utilisé des rats bien nourris. Dans un tel état nutritionnel, les cellules hépatiques seraient hyperpolarisées correspondant fort probablement à des niveaux d'activité nerveuse afférente peu élevés (Russek, 1981). Or, l'ouabaïne, en bloquant l'activité des pompes sodium-potassium diminue le potentiel de membrane des cellules hépatiques (Petersen, 1974) ou dans ce cas ci, lève l'hyperpolarisation ce qui devrait concorder avec une augmentation de l'activité nerveuse afférente dans le nerf vague hépatique (Russek, 1981; Nijima, 1983). De cette manière, l'ouabaïne peut créer la

fausse information d'un épuisement des réserves de substrats énergétiques intrahépatiques engendrant ainsi une augmentation des niveaux plasmatiques d'adrénaline et ce même si la glycémie reste normale. Si ce raisonnement est valide, la section de la branche hépatique du nerf vague, voie nerveuse afférente par laquelle la fausse information d'un foie hypoglycémique est véhiculée, devrait annuler cette augmentation. Or tel n'est pas le cas. Une élévation similaire des concentrations d'adrénaline s'est produite chez les animaux vagotomisés ainsi qu'à la suite d'une injection de la même dose en périphérie (Chapitre 3, figures 4 et 5). Bien que ces résultats soulèvent des doutes quant à la spécificité de l'action de l'ouabaïne sur la réponse de l'adrénaline transmise par le foie à la suite d'une injection par voie intraportale, ils ne peuvent exclure totalement une telle action. Au cours de l'expérience rapportée ici, une seule dose d'ouabaïne a été utilisée. Il n'est donc pas impossible qu'une autre dose ait pu avoir une action plus spécifique au niveau du foie.

Plusieurs des travaux entrepris dans notre laboratoire au cours des dernières années ont été inspirés d'études suggérant l'implication du foie afférent dans la régulation de la prise de nourriture. La présente étude fut précisément inspirée de données suggérant la stimulation de la prise de nourriture suite à une injection de 2 mg/kg de poids d'ouabaïne intrapéritonéale (Langhans et Scharrer, 1987b). La même dose a été utilisée dans la présente étude parce qu'elle s'est avérée efficace à stimuler une réponse physiologique qui est basée sur la même théorie impliquant des récepteurs métaboliques situés au niveau du foie et leur relation avec l'activité nerveuse afférente d'origine hépatique.

L'ouabaïne est un composé pharmacologique membre de la famille des hétérosides cardiotoniques, produits reconnus pour leur effet inhibiteur sur l'activité des pompes sodium-potassium (Schatzmann, 1953). D'études pharmacocinétiques sur l'élimination de l'ouabaïne par le foie (Iga et Klassen, 1982; Kitani et coll., 1978; Reuning et Schanker, 1971), il a été rapporté que cette drogue est rapidement éliminée du plasma par le foie du Rat. Ainsi, après 2 min, il ne reste plus que 20% de la dose injectée par voie intraveineuse (4 mg/kg, donc 2 fois la dose utilisée dans la présente étude) dans le plasma (Kitani et coll., 1978) alors qu'il ne restait plus

que des traces 15 min après une injection de 5 mg/kg de poids (Iga et Klassen, 1982). Indépendamment de la dose injectée, il est probable qu'une certaine quantité de drogue réussisse à outrepasser le foie et ait une action sur des tissus extrahépatiques. Toutefois, ceci n'invalide pas pour autant les présentes données. Suite à une injection intraportale d'ouabaïne, comparativement à une injection jugulaire, le foie sera l'organe le plus exposé à la drogue chronologiquement et quantitativement.

Tel que brièvement mentionné dans un paragraphe précédent, Langhans et Scharrer ont démontré qu'une injection intrapéritonéale de la même dose d'ouabaïne utilisée dans la présente étude stimulait les comportements de prise de nourriture (Langhans et Scharrer, 1987b). La réponse hyperphagique associée à l'injection d'ouabaïne a été supprimée par une vagotomie hépatique. Plus récemment, Langhans a rapporté qu'une injection d'ouabaïne dans la veine porte hépatique augmente la prise de nourriture alors qu'une injection de la même dose en périphérie n'a pas modifié cette réponse comportementale (Langhans, 1996). Cet effet hyperphagique de l'ouabaïne est difficile à réconcilier avec les présentes données démontrant une augmentation des concentrations plasmatiques d'adrénaline indépendamment du site d'injection alors que des évidences suggèrent que l'adrénaline provoque soit la satiété ou aucun changement sur la prise de nourriture (Bellinger et Williams, 1986, Bellinger et Williams, 1990). Les résultats de la présente étude démontrent que l'ouabaïne induit une augmentation des concentrations artérielles d'adrénaline créant ainsi une situation physiologique plus encline à produire la satiété qu'à stimuler la prise de nourriture.

Les niveaux plasmatiques de noradrénaline étaient élevés à la suite d'une injection intraportale d'ouabaïne autant chez le groupe ayant subi une vagotomie hépatique (HV) que chez le groupe ayant une innervation hépatique intacte (SHM) (Chapitre 3, figure 3). Cependant cette augmentation n'a pas été observée quand l'injection d'ouabaïne était effectuée dans la veine jugulaire. Des résultats semblables ont été observés dans notre laboratoire suite à des injections intrapéritonéales d'ouabaïne, c'est à dire une augmentation des concentrations de noradrénaline chez les animaux HV et SHM et l'absence de cet effet lorsque la drogue était injectée par la

veine jugulaire (données non publiées). Ces données suggèrent une action spécifique de l'ouabaine au niveau du foie qui résulte en une activation du système nerveux sympathique. Étonnamment, une vagotomie hépatique n'a pas supprimé cette activation sympathique comme ce fut le cas dans d'autres situations tel que l'exercice (Lavoie et coll., 1989). Toutefois nous devons prendre en considération que toutes les fibres nerveuses afférentes innervant le foie ne sont peut-être pas éliminées par une vagotomie sélective de la branche hépatique. En effet, il semble qu'environ 10% des fibres nerveuses afférentes projettent vers le plexus périartériel de l'artère hépatique commune et passent par la branche coeliaque dorsale (Berthoud et coll., 1992). Cette branche n'a pas été sectionnée au cours de la présente expérimentation. Conséquemment, une vagotomie sélective de la branche hépatique, n'incluant pas la totalité des fibres nerveuses afférentes du foie, ne produit pas une désafférentation totale du foie. Donc, le fait que l'activation sympathique causée par une injection intraportale d'ouabaine n'ait pas été supprimée chez le groupe HV n'exclut pas complètement une contribution du foie dans cette réponse. Tel que discuté précédemment, l'ouabaine pourrait avoir agi directement au niveau du foie en dépolarisant les cellules hépatiques créant ainsi une fausse information signalant une hypoglycémie locale. L'activation sympathique résultant en une augmentation des niveaux de noradrénaline constituerait la réponse contre régulatrice associée à ce stimulus. Cette interprétation s'accorde avec une étude récente démontrant une activation sympatho-surrénalienne en réponse à une hypoglycémie locale au foie alors que le reste de l'organisme était dans un état euglycémique (Lamarche et coll., 1996).

Une alternative à une vagotomie de la branche hépatique consiste en une dénervation totale du foie. Ce type de chirurgie aurait pu apporter plus d'information sur la contribution de l'innervation hépatique dans l'activation sympathique causée par l'ouabaine. Toutefois, si une dénervation totale avait effectivement provoqué une suppression de la réponse de la noradrénaline lors d'une injection intraportale d'ouabaine, l'interprétation de ce résultat aurait été rendue difficile par le fait que cette chirurgie élimine également les efférences sympathiques responsables de la libération de noradrénaline des terminaisons noradrénergiques hépatiques. Toutefois, l'objectif de l'étude actuelle était d'examiner le rôle afférent du foie dans la réponse

hormonale. Une vagotomie sélective de la branche hépatique a été choisie parce que la majorité des fibres nerveuses afférentes innervant le foie passent par ce faisceau nerveux.

La pression sanguine des animaux n'a pas été enregistrée au cours des expérimentations. Bien qu'il semble y avoir une controverse à ce sujet, plusieurs études récentes suggèrent que l'administration chronique d'ouabaine chez diverses espèces, dont le Rat Sprague-Dawley, ne modifie pas la pression sanguine (Li et coll., 1995). De plus, des injections aiguës chez l'humain ne provoquent pas d'augmentation consistante de pression sanguine (Pidgeon et coll., 1994). Ces données suggèrent que l'effet de l'ouabaine sur la réponse des catécholamines au cours de la présente étude n'était probablement pas causée par une altération de la pression sanguine.

Mis à part l'adrénaline et la noradrénaline, les concentrations plasmatiques de glucose ont aussi été augmentées par l'injection d'ouabaine (Chapitre 3, figure 1). Il est documenté que la libération de noradrénaline des terminaisons noradrénergiques est augmentée par l'ouabaine *in vitro* (Tan et Powis, 1985). Ainsi, une augmentation des concentrations artérielles plasmatiques de glucose pourrait partiellement être expliquée par une libération accrue de noradrénaline des terminaisons nerveuses noradrénergiques situées dans la région portale du foie (Metz et Forssman, 1980) sous l'influence de l'ouabaine. D'autre part, l'injection jugulaire d'ouabaine a aussi provoqué une hausse des concentrations plasmatiques de glucose en dépit de l'absence d'une augmentation des concentrations de noradrénaline. Ces données suggèrent que cette réponse métabolique est probablement secondaire à l'élévation des concentrations plasmatiques d'adrénaline sachant que cette hormone stimule la glycolyse hépatique en se liant aux récepteurs adrénergiques du foie (Winder, 1988).

Dans une autre étude effectuée précédemment dans notre laboratoire nous avons observé que les concentrations de glucose mesurées dans la veine porte hépatique n'ont pas été augmentées à la suite d'une infusion d'ouabaine par voie intrapéritonéale (données non publiées) que ce soit chez les animaux HV ou SHM. Des résultats similaires ont été rapportés par Langhans et Scharrer (Langhans et Scharrer, 1987b). Suite à ces résultats ces auteurs ont

suggéré que l'injection d'ouabaine n'avait pas beaucoup d'effet systémique. Cette affirmation s'avère erronée dans la mesure où les concentrations artérielles de glucose ont été augmentées quel que soit le site d'infusion de l'ouabaine (portal et jugulaire: présente étude; intrapéritonéale: données non publiées).

En résumé, une injection intraportale d'ouabaine, un inhibiteur de l'activité des pompes sodium-potassium (Skou, 1965) résulte en d'importantes augmentations des concentrations artérielles d'adrénaline, de noradrénaline et de glucose. L'augmentation des concentrations d'adrénaline a aussi été observée lorsque l'ouabaine était injectée dans une veine jugulaire alors que les niveaux de noradrénaline ne l'ont pas été. Cette dernière observation démontre que l'ouabaine exerce une action spécifique au foie et suggère que l'activité des pompes sodium-potassium soit impliquée dans l'activation sympathique médiant la libération de noradrénaline.

Rôle du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline

La deuxième question faisant l'objet de cette thèse était d'examiner la possibilité selon laquelle le foie puisse être impliqué dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline. Plus concrètement, l'objectif consistait à vérifier si la diminution des concentrations artérielles de peptide-C lors d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique chez le Rat allait être différente selon que l'insuline était infusée dans la veine porte hépatique ou en périphérie.

La rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline est un phénomène bien documenté chez l'humain sain (Waldhausl et coll., 1982; DeFronzo et coll., 1981; Argoud et coll., 1987; Asplin et coll., 1981) ainsi que chez des patients atteints de NIDDM (Garvey, et coll., 1985; Baynes et coll., 1991) et des personnes obèses (Klimes et coll., 1984; Elahi et coll., 1982). L'hypothèse de la présente étude cherchant à démontrer l'implication du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline possiblement via son innervation était basée sur des études démontrant que ce mécanisme régulateur nécessite une innervation intacte du pancréas (Luzi et coll., 1992; Boden et coll., 1993). Il était donc suggéré qu'un ou des organes

interagissent avec le pancréas par voie nerveuse afin de remplir cette fonction. Or, comme décrit précédemment dans la revue de la littérature, un lien nerveux entre le foie et le pancréas est bien documenté (Nijima, 1986; Shimazu 1981). L'innervation vagale hépatique, est impliquée dans la régulation de la sécrétion de l'insuline (Sakaguchi et Hayashi, 1981; Lee et Miller, 1985; Nagase et coll., 1993). D'autre part, le foie est l'un des organes cibles de l'insuline ayant des effets importants sur le métabolisme des glucides (synthèse de glycogène, suppression de la HGP) et le métabolisme des lipides hépatiques (lipogénèse, inhibition de la β -oxydation). Le foie est aussi le site privilégié de la clairance et de la dégradation de l'insuline (Duckworth, 1988). Finalement, une étude récente suggère l'existence de senseurs à l'insuline situés dans la région hépato-portale et impliqués dans un réflexe hépato-entéral agissant sur la régulation de l'absorption intestinale de glucose (Stümpel et coll., 1996). Les résultats de cette dernière étude ouvre une avenue sur la possibilité que ces senseurs à insuline puissent aussi participer à un réflexe hépato-pancréatique pouvant moduler la sécrétion de l'insuline.

Au cours de clamps euglycémique-hyperinsulinémiques effectués soit à l'état post-prandial soit après une nuit de jeûne, on observe des diminutions des concentrations plasmatiques de peptide-C similaires lorsque l'insuline est infusée dans la veine porte ou dans une veine jugulaire (Chapitre 4, figures 2,3 et 5). Ces données confirment l'existence de la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline chez le Rat. Toutefois, il est suggéré que, dans les conditions expérimentales qui prévalaient au cours de ces expérimentations, le foie ne constitue pas l'organe principal par lequel l'inhibition de la sécrétion de l'insuline s'exerce. Conséquemment, l'origine du signal nerveux responsable de cette rétro-inhibition reste à découvrir. Le modèle expérimental utilisé dans le cadre des expériences actuelles peut s'avérer un bon outil d'investigation de ce mécanisme régulateur. L'utilisation de dénervations hépatiques pourrait s'avérer un complément à la présente étude.

L'effet supprimeur d'une hyperinsulinémie sur la sécrétion d'insuline endogène a été étudié à divers niveaux de glycémie chez des sujets normaux (Luzi et coll., 1992) et des sujets diabétiques (Garvey et coll., 1985; Baynes et coll., 1991). Dans l'ensemble, les études suggèrent

que le mécanisme par lequel l'insuline inhibe la sécrétion des cellules bêta du pancréas est plus sensible à des concentrations plasmatiques de glucose plus basses (Luzi et coll., 1992; Garvey et coll., 1985; Baynes et coll., 1991). Dans le cadre de la présente étude, les amplitudes des baisses de concentrations de peptide-C étaient plus grandes chez les rats à jeun (portal: 80% et jugulaire: 77%) comparativement à celles observées chez les rats nourris (portal: 43% et jugulaire: 50%) malgré une glycémie 25% plus faible chez ces premiers (~117 vs ~136 mg/dL). Dans les deux conditions expérimentales (à jeun et nourris), les amplitudes d'augmentation des niveaux d'insuline par rapport aux concentrations basales étaient approximativement les mêmes (600% d'augmentation) (Chapitre 4, figures 1 et 4). En comparaison avec les données obtenues chez l'humain dans un même état nutritionnel, il semble que chez le Rat à jeun, la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline soit plus prononcée lors d'augmentations proportionnellement similaires de l'insulinémie (Waldhausl et coll., 1982; Argoud et coll., 1987; Asplin et coll., 1981; Klimes et coll., 1984). Chez des patients souffrant de diabète mellitus non-insulino-dépendant, on rapporte qu'une hyperinsulinémie n'a que peu d'effet sur la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline lorsque les verrouillages glycémiques sont effectués en maintenant la concentration de glucose observée à l'état de jeûne, c'est à dire, une hyperglycémie caractéristique de leur condition diabétique. Toutefois, en laissant descendre leur glycémie à des concentrations normalement observées chez des personnes saines, ces auteurs ont rétabli la fonction de ce mécanisme régulateur (Garvey et coll., 1985; Baynes et coll., 1991). Donc, les données de notre étude confirment que la glycémie maintenue lors du verrouillage a un effet déterminant sur l'amplitude de la suppression de la sécrétion de l'insuline par l'insuline.

Conget et coll ont soulevé le point selon lequel l'utilisation du verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique afin de démontrer l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline n'est pas une technique adéquate car elle produit une hypolipacidémie qui pourrait expliquer la baisse de la sécrétion de l'insuline (Conget et coll., 1993). Ainsi, l'insuline exerce un effet antilipolytique sur les cellules adipeuses (Coppack et coll., 1994). Cette action de l'insuline se traduit généralement par une diminution des concentrations d'acides gras libres lors d'un

verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique (Chen et coll., 1987; Saloranta et coll., 1993; Roden et coll., 1996). Par ailleurs, il existe certaines évidences *in vitro* suggérant que les AGL puissent stimuler la sécrétion de l'insuline induite par le glucose (Malaisse et Malaisse-Lagae, 1968; Crespin et coll., 1973). Conséquemment, les concentrations d'AGL ont été mesurées au cours de l'expérience (condition de jeûne) afin de s'assurer que la suppression des concentrations de peptide-C durant le verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique n'était pas due à une hypolipacidémie (Chapitre 4, figure 6). Pour tenter de pallier à ce problème, les érythrocytes ont été remis en suspension dans du salin contenant 5 U.I./mL et réinfusés à la suite des prélèvements sanguins lors des deux expériences. Cette manipulation visait deux objectifs. Premièrement, nous voulions aider à conserver le cathéter artériel perméable et deuxièmement, minimiser la baisse des concentrations d'AGL. Ce dernier objectif n'a été rempli que partiellement alors que les concentrations d'AGL chez les deux groupes infusés avec de l'insuline étaient diminuées d'environ 43% lors des 30 dernières minutes du verrouillage comparativement aux valeurs basales. L'ampleur de cette baisse est similaire à ce qui a déjà été rapporté par notre laboratoire au cours d'un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique utilisant le même taux d'infusion d'insuline (Lavoie et coll., 1993). Fait à noter, les concentrations d'AGL ont aussi diminué chez le groupe contrôle. On ne peut écarter complètement la possibilité que les valeurs de base d'AGL aient toutes été légèrement élevées dû au stress initial associé aux branchements d'extensions aux cathéters de l'animal. La démonstration de Conget et coll. sur l'effet d'une hypolipacidémie sur l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline était basée sur l'observation qu'une infusion d'intralipides/héparine élevant les concentrations d'AGL bien au-delà des concentrations de base résulte en une augmentation faible et transitoire des concentrations de peptide-C (Conget et coll., 1993). Récemment, une diminution de la sécrétion d'insuline par approximativement 50% lors d'un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique a été rapporté alors que les concentrations d'AGL étaient maintenues par infusion d'héparine (Piatti et coll., 1994). En dépit de l'absence d'évidences solides suggérant que la baisse des concentrations d'AGL puisse être responsable de la suppression des niveaux de peptide-C dans les conditions expérimentales actuelles, cette hypothèse ne peut être totalement exclue.

La validité de l'utilisation des concentrations artérielles de peptide-C comme indice de la sécrétion de l'insuline est basée sur deux prépositions principales. Premièrement, il faut que le peptide-C soit sécrété de façon équimolaire avec l'insuline et qu'il ne soit pas extrait de la circulation par le foie. De nombreuses évidences plaident en faveur de ces affirmations alors que le peptide-C est principalement excrété par les reins (Polonsky et Rubenstein, 1984). Finalement, il faut présumer que la variation des concentrations des niveaux de peptide-C est due à une diminution de son apparition en circulation plutôt que d'une augmentation de son taux de clairance. Or, il n'y a pas d'évidence suggérant que le taux de clairance métabolique du peptide-C soit modifié selon la concentration d'insuline (Baynes et coll., 1991).

Les protocoles expérimentaux des expériences 1 et 2 différaient légèrement du fait que respectivement deux (4 et 8 mU/kg*min) et un seul taux (4 mU/kg*min) d'infusion d'insuline exogène ont été utilisés lors du verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique de 180 min chacun. Malgré une plus faible quantité totale d'insuline exogène infusée lors de l'expérience 1, on retrouve de plus grandes concentrations plasmatiques d'insuline comparativement à l'expérience 2. Ces données apparemment paradoxales peuvent être expliquées par le fait que l'extraction de l'insuline par le foie varie selon l'état nutritionnel de l'animal. En effet, Striffler et Curry ont démontré que l'extraction de l'insuline, lors d'une perfusion pancréatico-hépatique combinée chez le Rat nourri, était à peu près nulle alors qu'elle frôlait 50% lors du premier passage après 24H de jeûne (Striffler et Curry, 1979). Les concentrations d'insuline observées chez les rats nourris (expérience 1) sont similaires à ce qui a été rapporté précédemment (Lavoie et coll., 1993). Il existe une relation inverse entre la concentration de récepteurs membranaires à l'insuline des cellules hépatiques et les concentrations d'insuline (Goldfine et coll., 1973). Ainsi, on peut spéculer qu'après une nuit de jeûne il y a une "up-regulation" de la concentration des récepteurs à insuline pouvant expliquer les variations d'extraction de l'insuline. De plus l'effet des concentrations portales d'insuline sur la fraction d'extraction par le foie est un autre facteur pouvant contribuer à la régulation des concentrations périphériques d'insuline. Cependant les données actuelles à ce sujet ne sont pas claires. Certaines études rapportent une diminution (Tranberg et coll., 1979) ou aucun changement (Ader et Bergman,

1990; Rebrin et coll., 1995) de la fraction d'extraction de l'insuline par le foie en fonction des concentrations portales.

Au cours des deux expériences actuelles, soit dans un état nourri ou de jeûne, des infusions d'insuline exogène dans la veine porte hépatique et dans une veine jugulaire résultèrent en des concentrations plasmatiques d'insuline similaires. Or, dans la littérature on rapporte que le foie extrait environ 50% de l'insuline au premier passage (Field et coll., 1972). Donc en infusant l'insuline à des taux identiques on aurait pu s'attendre à obtenir des concentrations artérielles d'insuline plasmatique inférieures suite à une infusion portale d'insuline exogène comparativement à une infusion dans une veine jugulaire. Au cours de la première expérience conduite dans un état nourri, l'extraction de l'insuline par le foie était considérablement réduite (Striffler et Curry, 1979). Donc, ce même argument expliquant les plus grands niveaux d'insuline à l'état nourri malgré une plus petite quantité d'insuline infusée peut aussi servir à expliquer l'absence de différence de concentration artérielle d'insuline suite à une infusion par la veine porte hépatique ou une veine jugulaire lorsque les animaux étaient nourris. Toutefois, il existe plusieurs évidences suggérant qu'à l'état de jeûne, des concentrations périphériques d'insuline similaires ont été observées lorsque le taux d'insuline durant un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique étaient deux fois plus grand chez les animaux infusés dans la veine porte comparativement à ceux infusés en périphérie (Ader et Bergman, 1990; Rebrin et coll., 1995). Lors d'infusion d'insuline à de faibles taux chez le chien, Ishida et coll n'ont pu démontrer une différence de niveaux d'insuline lors d'infusion d'insuline exogène à des taux identiques dans la veine porte hépatique ou en périphérie (Ishida et coll., 1984). Stevenson et coll. ont aussi observé une différence de concentrations d'insuline périphérique à la suite d'infusions soit portale, soit jugulaire seulement à de forts taux d'infusion d'insuline exogène (Stevenson et coll., 1983; Stevenson et coll., 1981). Ces études suggèrent qu'il y a des écarts parmi les observations recueillies à propos des concentrations périphériques d'insuline observées selon que l'insuline était infusée dans la veine porte hépatique ou en périphérie. Contrairement à ce qui est généralement perçu, la fonction d'extraction de l'insuline est très dynamique et peut varier considérablement selon les états métaboliques (Striffler et Curry, 1979).

La quantité de glucose infusée au cours de la deuxième expérimentation était légèrement plus grande ($P < 0.059$) chez le groupe infusé en périphérie comparativement au groupe infusé avec de l'insuline dans la veine porte suggérant ainsi une plus grande prise de glucose quand l'insuline est infusée en périphérie. À l'opposé, d'autres chercheurs ont rapporté qu'une infusion d'insuline en périphérie comparativement à une infusion portale est accompagnée d'une diminution de la sensibilité à l'insuline (Williamson et coll., 1996). Toutefois, des données allant dans la même direction que les résultats de la présente étude existent aussi. Ainsi, il a été observé que les taux de clairance métabolique du glucose étaient plus bas lors d'une infusion dans la veine porte comparativement à une infusion en périphérie alors que les concentrations périphériques d'insuline étaient sensiblement les mêmes (Stevenson et coll., 1983). D'autres ont aussi observé qu'à des concentrations périphériques d'insuline équivalentes, les taux d'utilisation du glucose étaient semblables peu importe le site d'infusion de l'insuline exogène (Ader et Bergman, 1990; Rebrin et coll., 1995; Kruszynska et coll., 1985). Les concentrations de glycogène hépatique étaient aussi plus élevées chez le groupe de rats nourris infusés en périphérie. Une augmentation de la synthèse de glycogène hépatique a déjà été rapportée durant un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique similaire au nôtre (Shulman et coll., 1991). Donc, un plus fort taux de synthèse de glycogène hépatique lors de l'infusion d'insuline en périphérie correspondrait à une plus grande quantité de glucose infusée dans cette condition.

À notre connaissance, la présente étude est la première à démontrer l'existence de l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline dans des conditions *in vivo* chez le Rat éveillé. Ce modèle peut permettre d'étudier plus en profondeur les voies nerveuses impliquées dans ce mécanisme régulateur grâce à des stimulations électriques, à des dénervations sélectives de certains organes en combinaison avec des composés pharmacologiques agissant sur le système nerveux autonome. Cette étude confirme aussi l'importance de la glycémie ambiante afin d'observer l'expression de ce mécanisme régulateur. Finalement, dans les conditions expérimentales actuelles, le foie ne semble pas être impliqué dans la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline.

Rôle du foie dans l'hypersécrétion de l'insuline en relation avec le métabolisme du glucose dans un milieu hyperlipacidémique

La troisième étude présentée dans le cadre de cette thèse avait pour objectif principal de vérifier l'hypothèse selon laquelle le foie participe à l'augmentation de la sécrétion de l'insuline associée à une élévation des concentrations plasmatiques d'AGL. Le protocole expérimental a été élaboré afin de déterminer l'influence d'une élévation des AGL sur l'interrelation entre la sécrétion de l'insuline et le métabolisme du glucose. Pour ce faire, des rats ont été soumis à une infusion d'une émulsion de triglycérides pendant 48H soit par la veine porte hépatique, soit dans une veine jugulaire. De plus, un autre groupe était infusé par voie intraportale pendant 2H seulement.

Au cours de la présente expérimentation, les concentrations de triglycérides hépatiques ont été augmentées seulement lorsque l'émulsion de triglycérides (ÉT) était infusée pendant 48H par voie intraportale (Chapitre 5, tableau 1). Les données recueillies chez le groupe infusé de manière aiguë (2H) suggèrent que l'augmentation des concentrations hépatiques de triglycérides s'effectue rapidement car il y avait une tendance vers une augmentation comparativement au groupe contrôle. Dans une étude précédente similaire à la nôtre, une infusion de lipides pendant 2H a augmenté les concentrations plasmatiques d'AGL significativement comparativement aux valeurs de base (Kruszynska et coll., 1991). Les niveaux plasmatiques d'AGL durant le présent verrouillage hyperglycémique ont continué d'augmenter par rapport aux valeurs de base correspondantes (Chapitre 5, figure 2). Des résultats similaires ont récemment été démontrés au cours d'une étude chez l'humain lors d'un verrouillage hyperglycémique couplé à une infusion simultanée d'intralipides/héparine (Hennes et coll., 1997). Les concentrations de β -hydroxybutyrate n'ont pas diminué lors du verrouillage hyperglycémique chez les 3 groupes infusés avec l'ÉT indépendamment de la durée et du site d'infusion (Chapitre 5, figure 3). Par ailleurs, une absence de baisse ou même une élévation des concentrations de β -hydroxybutyrate lors de l'infusion d'une ÉT durant un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique (Bevilacqua et coll., 1987; Boden et coll., 1991) ou

hyperglycémique (Stein et coll., 1996) ont été rapportées. Les concentrations plasmatiques d'AGL et de β -hydroxybutyrate chez le groupe contrôle infusé avec du salin ont toutes deux diminué au cours du verrouillage hyperglycémique et suggèrent que l'élévation des niveaux d'insuline dans ces conditions inhibe efficacement le métabolisme des lipides tel que déjà démontré (Saloranta et coll., 1993).

Des corrélations entre le degré d'obésité viscérale et les taux de sécrétion basale et de sécrétion induite par le glucose ont été rapportées (Caprio et coll., 1995). De plus, l'obésité viscérale est associée à un contrôle défectueux de la production de glucose hépatique (Abate et coll., 1995) et de l'utilisation du glucose en périphérie (Caprio et coll., 1995; Colberg et col., 1995). Il a été proposé que l'augmentation du flux portal d'AGL soit à l'origine de ces troubles métaboliques (Caprio et coll., 1995; Peiris et coll., 1986). L'existence d'un arc réflexe hépatopancréatique pouvant moduler la sécrétion de l'insuline (Cardin et coll., 1994; Lavoie et coll., 1989a; Lee et Miller, 1985; Sakaguchi et Hayashi, 1981; Sakaguchi et Yamazaki, 1979b) a déjà fait l'objet d'une analyse à la section 2.1.4. Rappelons seulement que d'après certaines études sur le contrôle de la prise alimentaire ainsi que des études électrophysiologiques, il est proposé que la concentration ou le métabolisme de certains substrats hépatiques puissent modifier le potentiel de membrane des cellules hépatiques et selon l'hypothèse de Russek (Russek, 1981) affecter le taux de décharges afférent dans la BHNV (Dambach et Friedmann, 1974; Niiijima, 1984a; Niiijima, 1980; Russek, 1981). Puisque le métabolisme des AGL peut augmenter le potentiel de membrane des hépatocytes (Rossi et coll., 1995), nous avons postulé qu'un mécanisme d'origine hépatique pourrait contribuer à l'augmentation de la sécrétion de l'insuline dans des conditions hyperlipacidémiques selon le raisonnement suivant. Les acides gras hyperpolarisent les cellules hépatiques ce qui serait associé à une diminution du taux de décharges afférent dans la BHNV et à une augmentation réciproque des efférences dans la branche pancréatique du nerf vague résultant en une augmentation de la sécrétion de l'insuline. Afin de vérifier l'hypothèse de l'implication du foie dans la modulation de la sécrétion de l'insuline induite par le glucose chez le Rat hyperlipacidémique, des rats ont été infusés pendant

soit 48H ou 2H avec une émulsion de triglycérides (ÉT) dans la veine porte hépatique comparativement à une infusion de 48H par voie périphérique.

Les concentrations artérielles d'insuline chez les trois groupes ayant reçu l'infusion de l'ÉT étaient considérablement plus élevées lors du verrouillage hyperglycémique comparativement aux niveaux observés chez le groupe contrôle (Chapitre 5, figure 4). Les présentes données suggèrent que les animaux infusés avec l'ÉT étaient insulino-résistant. Une surexposition du foie à de fortes concentrations en AGL suite à l'infusion de l'ÉT par voie intraportale n'a pas provoqué de réponse différente de l'insuline tant à l'état basal que durant le verrouillage hyperglycémique. Donc, dans les présentes conditions expérimentales, il est proposé que l'augmentation de la sécrétion d'insuline observée lors d'une élévation des concentrations plasmatiques d'AGL par infusion d'une émulsion de triglycérides ne semble pas être influencée par une action directe au niveau du foie.

La forte réponse de l'insuline induite par le glucose conséquemment à l'infusion d'une ET pendant 48H est reproduite avec une infusion de lipides de seulement 2H. Ces résultats indiquent que l'effet de potentialisation qu'a une infusion de l'ÉT sur la sécrétion de l'insuline s'exerce rapidement. D'une part, l'effet aiguë des AGL sur la sécrétion de l'insuline induite par le glucose est bien documenté autant *in vitro* (Crespin et coll., 1973; Malaisse et Malaisse-Lagae, 1968) qu'*in vivo* (Boden et Jadali, 1995; Hennes et coll., 1997; Stein et coll., 1996). D'autre part, l'effet d'une exposition chronique à une augmentation des concentrations d'AGL sur la sécrétion d'insuline est plus controversé. Lors d'études *in vitro*, il a été observé que la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose était diminuée après une exposition prolongée (plus de 48H) à de fortes concentrations d'AGL (Lee et coll., 1994; Zhou et coll., 1996; Zhou et coll., 1995). Sako et coll. ont démontré que des infusions préalables d'ÉT de 3H ou 6H augmentent la sécrétion d'insuline induite par le glucose, alors que des infusions de 48H et plus ont diminué les taux de sécrétion d'insuline (Sako et coll., 1990). Les résultats des études mentionnées ci-haut ont été obtenus à partir d'expérimentations effectuées soit sur des îlots pancréatiques humain ou animal incubés (Lee et coll., 1994; Zhou et coll., 1996; Zhou et coll.,

1995) ou soit sur un pancréas de Rat préalablement perfusé avec des intralipides (Sako et coll., 1990). Contrairement à ces résultats, Boden et coll. ont récemment démontré qu'une infusion d'intralipides/héparine pendant 48H provoque une hausse de la sécrétion de l'insuline lors d'une étude *in vivo* chez l'humain. Conséquemment, les résultats de la présente étude confirment ce qui a été démontré dans des conditions *in vivo* chez l'humain, c'est à dire que l'élévation aiguë ou chronique des AGL augmente la sécrétion de l'insuline. Ces données sont compatibles avec les évidences scientifiques suggérant que les AGL puissent représenter le lien entre la résistance à l'insuline et l'augmentation compensatoire de la sécrétion de l'insuline chez des sujets ou des animaux normaux (Boden, 1997).

Il existe des données suggérant que l'obésité et/ou une augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL soit reliée à une diminution de la clairance hépatique de l'insuline (Bjorntorp, 1990; Peiris et coll., 1986; Stromblad et Bjorntorp, 1986; Svedberg et coll., 1991). La possibilité que la clairance hépatique de l'insuline dans la présente étude ait été diminuée et puisse contribuer à l'augmentation des concentrations d'insuline observées chez les groupes infusés avec des lipides ne peut être totalement exclue. Les concentrations d'insuline étaient approximativement semblables au repos entre les trois groupes infusés avec l'ÉT comparativement au groupe contrôle. Il serait ainsi étonnant que les différences observées entre ces groupes au cours du verrouillage hyperglycémique ne soient le résultat que d'une baisse de l'extraction de l'insuline par le foie.

Les taux basaux du métabolisme du glucose (M; Chapitre 5, Tableau 2) n'ont pas été significativement modifiés par les protocoles d'infusion de lipides par rapport au groupe contrôle. Ces résultats sont en accord avec les rapports précédents alors que des infusions d'intralipides/héparine de 2-4H n'ont pu démontrer une baisse des taux de prise de glucose malgré l'augmentation des concentrations d'AGL chez des sujets normaux ou diabétiques (Boden et Chen, 1995; Boden et Jadhali, 1991). Au cours du verrouillage hyperglycémique, M a augmenté considérablement chez tous les groupes alors qu'aucune différence significative de taux métabolique n'a été observée entre les différents groupes expérimentaux. Toutefois, nos

données de métabolisme du glucose (M) sont dépendantes des concentrations d'insuline à cause des variations de celles-ci lors d'un verrouillage hyperglycémique. L'utilisation du rapport du taux métabolique du glucose (M) sur la concentration plasmatique d'insuline (I) constitue un indice de sensibilité à l'insuline (DeFronzo et coll., 1979). Le rapport M/I est préférablement rapporté puisque l'objectif principal de l'étude consistait à examiner la sécrétion de l'insuline. Le ratio M/I n'a augmenté au cours du verrouillage hyperglycémique que chez le groupe contrôle alors qu'il était diminué chez les groupes infusés avec l'ÉT (Chapitre 5, tableau II). Ces données suggèrent que l'augmentation des concentrations d'AGL associée aux infusions d'ÉT provoque une insensibilité périphérique à l'action de l'insuline. Les résultats de l'étude actuelle sont appuyés par des données obtenues chez le Rat et chez l'Homme (Stein et coll., 1996, Boden et coll., 1995). De plus, comme pour la sécrétion de l'insuline, l'altération de la sensibilité périphérique à l'insuline suite à l'élévation des AGL associée à l'infusion d'une ET se manifeste tôt et est toujours présente après 48H d'infusion. Lors de certaines études conduites chez l'humain, deux heures d'infusion d'intralipides/héparine n'ont pas été suffisantes afin de mettre en évidence une altération du métabolisme du glucose (Bevilacqua et coll., 1987; Bonadonna et coll., 1989). Boden et coll. ont proposé qu'approximativement 3H ou plus était nécessaire afin d'induire une inhibition AGL-dépendante du métabolisme du glucose (Boden et coll., 1991). Des données récentes indiquent qu'une heure seulement peut suffire à mettre en relief l'effet inhibiteur de l'élévation des concentrations d'AGL sur la prise de glucose chez le Rat. (Stein et coll., 1996). Les données de l'étude actuelle n'apportent pas d'information sur le ou les mécanismes cellulaires responsables de la diminution du métabolisme du glucose lorsque les concentrations d'AGL sont augmentées. Par contre, il a été rapporté qu'une des premières défaillances importantes du métabolisme du glucose se produit au niveau des étapes transport/phosphorylation et qu'ultérieurement apparaissaient des diminutions de l'activité de la glycogène synthétase et de l'oxydation du glucose (Roden et coll., 1996). Seules les données de glycogène hépatique et musculaire de la présente étude pourrait fournir de l'information quant au devenir du glucose infusé lors du verrouillage hyperglycémique. Cependant, les divers traitements expérimentaux n'ont pas eu d'effets différentiels sur les concentrations de glycogènes tissulaires. Dans l'ensemble, les données recueillies au cours du verrouillage

hyperglycémique sont compatibles avec l'hypothèse que l'augmentation des concentrations d'AGL induit rapidement une insensibilité périphérique à l'action de l'insuline et que l'organisme compense par une sécrétion accrue d'insuline.

Des élévations du taux de base de HGP chez des personnes souffrants d'obésité ou de diabète de type II ont été rapportées (Bjorntorp, 1990; Boden et Chen, 1995; Golay et coll., 1990; Katz et coll., 1994). On explique ce phénomène par une augmentation de la néoglucogénèse chez des sujets atteints de NIDDM (Magnusson et coll., 1992). Récemment, Rebrin et coll. ont démontré une forte corrélation inverse entre les concentrations plasmatiques d'AGL et le taux de HGP (Rebrin et coll., 1995). D'ailleurs l'effet des AGL sur la néoglucogénèse hépatique a été démontré *in vitro* il y a plusieurs années (Friedmann et coll., 1967; Williamson et coll., 1966). Au cours de l'étude actuelle nous avons trouvé une légère augmentation de la HGP chez les animaux infusés avec l'ÉT pendant 48H par voie systémique comparativement à une infusion de salin (Chapitre 5, tableau II). L'infusion intraportale d'ÉT de 48H a eu un effet plus modeste ($P < 0.1$ vs NaCl). Ainsi, les infusions chroniques (48h) d'ÉT ont semblé provoquer une légère hausse de la HGP à l'état basal. Ces résultats coïncident avec des concentrations de glucose plus élevées chez les deux groupes infusés avec l'ÉT pendant 48H (Chapitre 5, figure 1). Par contre une infusion de 2H n'a pas eu cet effet. Les présentes données sont en accord avec celles de Saloranta et coll. indiquant que la HGP basal n'était pas augmentée significativement malgré l'élévation des concentrations d'AGL après 2H d'infusion d'intralipides/héparine (Saloranta et coll., 1993). Durant le verrouillage hyperglycémique les taux de HGP étaient partiellement supprimés chez les groupes infusés avec l'ÉT pendant 48H alors qu'ils étaient complètement supprimés chez le groupe infusé avec l'ÉT pendant 2H ainsi que le groupe contrôle. Ces données correspondent avec une tendance à ce que les concentrations de glucose chez les groupes infusé chroniquement soient légèrement plus élevées ($P < 0.$ vs NaCl). Des atténuations semblables de la capacité de l'insuline à supprimer la HGP ont été observées chez les deux groupes infusés pendant 48H. Ces données suggèrent que sous les conditions expérimentales actuelles, l'infusion de l'ÉT par voie portale hépatique n'ait pas altéré la suppression de la HGP par l'insuline de façon additionnelle comparativement à une infusion

systemique. Les concentrations plasmatiques portales d'insuline et d'AGL n'ont pas été mesurés. Par contre, on peut assumer que les concentrations portales d'AGL étaient plus élevées dans le groupe ayant subi une infusion d'ÉT directement dans la veine porte hépatique. Si cette assumption est véridique, il est alors surprenant que la suppression de la HGP induite par l'insuline n'ait pas été altérée de façon additionnelle chez le groupe infusé avec l'ÉT par voie portale. Alors que la néoglucogénèse était augmentée, la HGP est demeurée normale chez des personnes soumises à une infusion d'intralipides à l'état basal (Clare et coll., 1991). Ces auteurs ont invoqué un mécanisme intrahépatique autorégulateur par lequel la stimulation de la néoglucogénèse induite par les lipides n'induit pas une augmentation de la HGP en compensant par une diminution de la glycolyse hépatique.

Contrairement à l'effet des d'infusions de l'ÉT pendant 48H, une infusion aiguë de 2H se caractérise par une suppression similaire de la HGP comparativement à la réponse observé chez le groupe contrôle. Tel que démontré dans la présente étude, Kruszynska et coll. ont rapporté une suppression normale de la HGP induite par l'insuline après 2H d'infusion d'une ÉT ayant haussé les niveaux d'AGL jusqu'à 1.5 mmol/L (Kruszynska et coll., 1991). Cependant, nos résultats doivent être mis en perspective par rapport à des données contradictoires obtenues lors d'études effectuées chez des sujets humains normaux (Bonadonna et coll., 1989; Saloranta et coll., 1993). La capacité de l'insuline à supprimer la HGP était normale lorsque l'infusion d'intralipides/héparine était amorcée en même temps que le verrouillage et se prolongeait sur une période de 4H (Bonadonna, 1989). Par contre, il a été rapporté que si on débutait l'infusion lipidique 2H avant le début du clamp et que la détermination de la HGP s'effectuait 6H après le début de l'infusion lipidique, on apercevait que l'inhibition de la HGP par l'insuline était atténuée. À la lumière des résultats de ces deux études (Bonadonna et coll., 1989; Saloranta et coll., 1993), il a été proposé que l'effet des AGL sur la HGP puisse être influencé par le facteur temps (Saloranta et coll., 1993). Les données ici présentées supportent fortement cette hypothèse alors que les suppressions de la HGP durant le verrouillage hyperglycémique étaient normale et inhibée par des infusions d'ÉT de respectivement 2H et 48H. Que la suppression de la HGP induite par l'insuline soit intacte chez

les animaux infusés pendant 2H avec l'ÉT est surprenant compte tenu du fait que la résistance périphérique à l'insuline était déjà apparente à ce moment. Conséquemment, les données de la présente étude indiquent que l'insensibilité à l'insuline apparaît rapidement en périphérie alors que la régulation de la HGP n'est affectée que plus tardivement. Cette interprétation est en accord avec l'observation selon laquelle de jeunes adolescentes obèses sont caractérisées par une diminution de la prise de glucose stimulée par l'insuline alors que la production hépatique de glucose est supprimée normalement (Caprio et coll., 1995).

L'hyperinsulinémie et l'hyperglycémie sont deux importants facteurs régulant la suppression de la HGP (Bell et coll., 1986; Bishop et coll., 1965). Les taux plus élevés de HGP chez les deux groupes infusés pendant 48H ne peuvent être expliqués ni par les concentrations d'insuline, ni par les concentrations de glucose plasmatiques, car celles-ci étaient similaires sinon légèrement plus grandes chez ces deux groupes comparativement aux groupes aigu et contrôle. Fait à noter, l'altération de la suppression de la HGP par l'insuline durant le verrouillage hyperglycémique suite à des infusions de 48H d'ÉT se produit alors que les concentrations plasmatiques d'AGL sont similaires à celles mesurées chez le groupe ayant subi une infusion aiguë d'ÉT. Ceci suggère que des facteurs autres que la concentration plasmatique d'AGL soit impliqués dans la régulation de la HGP.

Au cours du verrouillage hyperglycémique, l'activité spécifique (SA) du glucose des quatre groupes a diminué en moyenne de 34% comparativement aux valeurs basales malgré que le taux d'infusion du traceur ait été doublé au début du verrouillage hyperglycémique. Sur ce point, Fisher et coll. ont récemment rapporté qu'en dépit d'une telle baisse de la SA, il est encore possible d'éviter les erreurs de modélisation lors du calcul de la HGP lorsque les variations du taux de renouvellement de glucose sont modérées (Fisher et coll., 1996). Ces auteurs soulignent aussi que l'ampleur de la baisse exprimée en pourcentage n'est pas le seul facteur important. La période au cours de laquelle la diminution de la SA survient doit aussi être considérée. La baisse de la SA observée ici au cours du verrouillage hyperglycémique était de 0.74% par minute. Donc, dans la présente étude, à l'état basal et lors du verrouillage

hyperglycémique, la SA était dans un état relatif d'équilibre lorsque les mesures de taux de renouvellement de glucose ont été effectuées. Clark et al. ont démontré que la HGP basale était diminuée de 21% lorsque le taux de renouvellement du glucose était déterminé à l'état d'anesthésie sous pentobarbital (Clark et coll., 1990). Les taux de HGP mesurés à l'état basal au cours de la présente étude étaient légèrement plus faibles que ceux rapportés dans la littérature pour des rats à jeun depuis la veille (6.6 vs 7.8 mg/kg/min: moyenne calculée de Burnol et coll., 1983; Leturque et coll., 1984; Proietto et coll., 1987; Smith et coll., 1987). Durant le verrouillage hyperglycémique, les taux de HGP ont été diminués de 47% et 38% respectivement chez les groupes infusés pendant 48H par voie systémique et intraportale alors qu'ils étaient diminués de 75% et 88% respectivement chez les groupes contrôle et aigu. Une diminution de la sensibilité hépatique à l'insuline sous l'influence du pentobarbital (Clark et coll., 1990) peut expliquer la suppression incomplète des taux de HGP malgré la présence d'une hyperinsulinémie et d'une hyperglycémie. Finalement une augmentation des concentrations plasmatiques de glycérol lors de l'infusion d'une ÉT est bien documentée (Bevilacqua et coll., 1987; Bonadonna et coll., 1989). Dû au fait que ce métabolite est un précurseur néoglucogénique (Consoli et coll., 1989), on ne peut ignorer son effet sur la HGP. Au cours d'une étude récente, il a été démontré qu'une élévation des concentrations de glycérol sans augmentation concomitante des AGL plasmatiques tel qu'il se produit normalement lors d'une infusion d'intralipides/héparine n'a pas empêché la suppression normale de la HGP lors d'un verrouillage euglycémique-hyperinsulinémique (Rebrin et coll., 1995). Ces données suggèrent donc que le glycérol joue un rôle mineur sur la HGP lors de l'infusion d'une ÉT. Par contre le glycérol n'a pas été mesuré au cours de la présente étude et une participation de ce métabolite à la modulation de la HGP observée lors de l'infusion d'une ÉT ne peut par surcroît être totalement exclue.

En conclusion, deux heures d'infusion d'une émulsion de triglycérides par voie intraportale ou systémique augmentant significativement les concentrations plasmatiques d'AGL chez le Rat provoquent une diminution rapide de la sensibilité périphérique à l'insuline qui est compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline lors d'un verrouillage

hyperglycémique. Toutefois, la résistance hépatique à l'insuline induite par l'infusion de l'émulsion de triglycérides apparaît seulement plus tard. Dans les conditions expérimentales actuelles caractérisées par de fortes concentrations plasmatiques en AGL, une infusion intraportale d'une émulsion de triglycérides n'a pu mettre en évidence un rôle du foie dans la modulation de la sécrétion de l'insuline.

CONCLUSION

Le but des études de la présente thèse était d'investiguer des conditions physiologiques ainsi que les mécanismes par lesquels le foie pourrait être impliqué dans la modulation de certaines réponses hormonales et métaboliques.

Au cours de la première étude, nous avons démontré que l'activité des pompes sodium-potassium hépatiques était impliquée dans un arc réflexe hépato-sympathique modifiant les niveaux plasmatiques de noradrénaline. Les résultats de cette première étude mettent donc en lumière un mécanisme de "codage" par lequel l'état métabolique du foie (le flux d'une certaine voie ou les concentrations de certains métabolites ou substrats) peut provoquer une modification de la réponse endocrinienne, en l'occurrence l'activation sympathique.

Par ailleurs les travaux de cette thèse ont permis de démontrer que la glycémie ambiante était un facteur déterminant de l'amplitude de la rétro-inhibition de la sécrétion de l'insuline par l'insuline. Dans les conditions expérimentales qui prévalaient, un rôle potentiel du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline n'a pu être démontré. La question à savoir ce qui constitue l'origine du signal nerveux provoquant l'inhibition de la sécrétion de cette hormone pancréatique demeure intacte. Le Rat semble constituer un modèle viable pouvant servir à étudier les voies nerveuses impliquées dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline

Finalement, nos travaux ont démontré que l'augmentation des concentrations plasmatiques d'AGL par l'infusion d'une émulsion de triglycérides chez le Rat induit, en deux heures seulement, une insensibilité périphérique à l'insuline qui est compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline. Par contre, la résistance hépatique à l'insuline se manifeste plus tardivement. Une implication du foie dans la sécrétion de l'insuline n'a pu être mise en évidence dans les présentes conditions expérimentales.

CHAPITRE 7: BIBLIOGRAPHIE

- Abate, N., Garg, A., Peshock, R.M., Stray-Gundersen, J., Adams-Huet, B., and Grundy, S.M. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes* 45:1684-1693, 1996.
- Abate, N., Garg, A., Peshock, R.M., Stray-Gundersen, J. and Grundy, S.M. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J.Clin.Invest.* 96:88-98, 1995.
- Adachi, A., Shimizu, T., Oomura, Y. and Kobashi, M. Convergence of hepatoportal glucose-sensitive afferent signals to glucose sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci. Lett.* 46: 215-218, 1984.
- Ader, M., Bergman, R.N. Peripheral effects of insulin dominate suppression of fasting hepatic glucose production. *Am J Physiol (Endocrinol. Metab.)* 258:E1020-E1032, 1990.
- Adkins-Marshall, B., Pagliassotti, M.J., Asher, J.R., Connolly, C.C., Neal, D.W., Williams, P.E., Myers, S.R., Hendrick, G.K., Adkins, R.B., and Cherrington, A.D. Role of hepatic nerves in response of liver to intraportal glucose delivery in dogs. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 260:E679-E686, 1992.
- Anand, B. Nervous regulation of food intake. *Physiol. Behav.* 41: 677-708, 1961.
- Anand, B.K., Dua, S. and Shoenberg, K. Hypothalamic control of food intake in cats and monkeys. *J. Physiol. (London)* 127: 143-152, 1955.
- Andrews, W.h.h. and Palmer, J.F. Afferent nervous discharge from the canine liver. *Q. J. Exp. Physiol.* 52: 269-276, 1967.
- Argoud, G.M., Schade, D.S. and Eaton, R.P. Insulin suppression its own secretion in vivo. *Diabetes* 36:959-962, 1987.
- Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D.A. (Eds). *The liver: Biology and Pathobiology* 2nd ed. p.949-959, 1988.
- Asplin, C.M., Paquette, T.L. and Palmer, J.P. In vivo inhibition of glucagon secretion by paracrine beta cell activity in man. *J Clin Invest* 68:314-318,1981.
- Assan, R., Rosselin, G. and Dolais, J. Effets sur la glucagonémie des perfusions et ingestions d'acides aminés. *J. Ann. Diabet. Hôtel-Dieu* 7: 25-41, 1967.

- Baynes, C., Anyaoku, V., Johnston, D.G. and Elkeles, R.S. Feedback inhibition of insulin secretion in type II diabetes. *Clin Sci* 81:685-690, 1991.
- Beischer, W., Schmid, M., Keller, L. and Pfeiffer, E.F. Does insulin play a role in the regulation of its own secretion? *Horm Metab Res*; 10:168-169, 1978.
- Bell, P.M., Firth, R.G. and Rizza, R.A. Effects of hyperglycemia on glucose production and utilization in humans. *Diabetes* 35:642-648, 1986.
- Bellinger, L.L. and Williams, F.E. The effect of portal infusions of epinephrine on ingestion, plasma glucose and insulin in dogs. *Physiol. Behav.* 48: 479-483, 1990.
- Bellinger, L.L. and Williams, F.E. Glucagon and epinephrine suppression of food intake in liver-denervated rats. *Am.J.Physiol. (Regulatory Interative and Comp. Physiol.)* 251: R349-R358, 1986.
- Bergeron, R. "Implication des pompes à sodium hépatiques dans la réponse de l'axe hépato-médullo-surrénalien". Mémoire de maîtrise, Université de Montréal p.109, 1993.
- Berrish, T.S., Hetherington, C.S., Alberti, K.G.M.M., and Waler, M. Peripheral and hepatic insulin sensitivity in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 38:699-704, 1995.
- Berthoud, H.R., Kressel, M., and Neuhuber, W.L. An anterograde tracing study of the vagal innervation of rat liver, portal vein and biliary system. *Anat.Embryol.* 186:431-442, 1992.
- Bevilacqua, S., Buzzigoli, G., Bonnadonna, R.C., Brandi, L.S., Oleggini, M., Boni, C., Geloni, M. and Ferrannini, E. Operation of Randle's cycle in patients with NIDDM. *Diabetes* 39:383-389, 1990.
- Bevilacqua, S., Bonnadonna, R.C., Buzzigoli, G., Boni, C., Ciociaro, D., Maccari, F., Giorico, M.A. and Ferrannini, E. Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism* 36:502-506, 1987.
- Bishop, J.S., Steele, R., Altszuler, N., Dunn, A., Bjerknes, C. and De Bodo, R.C. Effects of insulin on liver glycogen synthesis and breakdown in the dog. *Am. J. Physiol.* 208:307-316, 1965.
- Bjorntorp, P. Abdominal fat distribution and disease: An overview of epidemiological data. *Ann.Med.* 24:15-18, 1992.

- Bjorntorp, P. Portal adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10:493-496, 1990.
- Blackard, W.G., Clore, J.N., Glickman, P.S., Nestler, J.E., and Kellum, J.M. Insulin sensitivity of splanchnic and peripheral adipose tissue in vivo in morbidly obese man. *Metabolism* 42:1195-1200, 1993.
- Blumenthal, S.A. Stimulation of gluconeogenesis by palmitic acid in rat hepatocytes: evidence that this effect can be dissociated from the provision of reducing equivalents. *Metabolism* 32:971-976, 1983.
- Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46:3-10, 1997.
- Boden, G., White, J.J., Liang, Y., Mozzoli, M., Chen, X., Coleman, E. and Smith, C. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J.Clin.Invest.* 88:960-966, 1991.
- Boden, G. and Chen, X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent-diabetes-mellitus. *J. Clin. Invest.* 96:1261-1268, 1995.
- Boden, G., Chen, X., DeSantis, R., Kolaczynski, J. and Morris, M. Evidence that suppression of insulin secretion by insulin itself is neurally mediated. *Metabolism* 42:786-789, 1993.
- Boden, G., Chen, X., Rosner, J. and Barton, M. Effects of a 48-h fat infusion on insulin secretion and glucose utilization. *Diabetes* 44:1239-1242, 1995.
- Boden, G. and Jadali, F. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. *Diabetes* 40:686-692, 1991.
- Bolinder, J., Kager, L., Ostman, J., and Arner, P. Differences at the post receptor levels between human omental and subcutaneous adipose tissue in the action of insulin on lipolysis. *Diabetes* 32:117-123, 1983.
- Bonadonna, R.C., Groop, L.C., Kraemer, N., Ferrannini, E., Del Prato, S., and DeFronzo, R.A. Obesity and insulin resistance in humans: A dose response study. *Metabolism* 39:452-459, 1990.

- Bonnadonna, R.C., Zych, K., Boni, C., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. Time dependence of the interaction between lipid and glucose in humans. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 257:E49-E56, 1989.
- Booth, D.A. and Jarman, S.P. Inhibition of food intake in the rat following complete absorption of glucose delivered into the stomach. *J. Physiol. (London)* 259: 501-522, 1976.
- Bowner, C.J., Yates, M.S. Pharmacokinetics and biliary excretion of bromosulphophtalein, (³H)-ouabain and (³H)-taurocholic acid in the rat with glycerol-induced acute renal failure. *Br. J. Pharmacol.* 83: 773-782; 1984.
- Burnol, A.F., Leturque, A., Ferré, P., and Girard, J. A method for quantifying insulin sensitivity in vivo in the anesthetized rat: the euglycemic insulin clamp technique coupled with isotopic measurement of glucose turnover. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 23:429-435, 1983.
- Caprio, S., Hyman, L.D., Limb, C., McCarty, S., Lange, R., Sherwin, R.S., Shulman, G.I., and Tamborlane, W.V. Central adiposity and its metabolic correlates in obese adolescent girls. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 269:E118-E126, 1995.
- Cardin, S., Hélie, R., Compte, B., Bergeron, R., Van de Werve, G. and Lavoie, J.-M, Effect of hepatic portal pyruvate infusion on hormonal response in exercising rats. *Am. J. Physiol* 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.): R1630-R1636, 1994.
- Cardin, S., Lavoie, J.-M. and Trabelsi, F. Effect of hepatic vagotomy on hormonal response to exercise in gluconeogenesis-inhibited rats. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 29: R67-R72, 1991.
- Cardin, S., Lavoie, L., Gutierrez, A. and Lavoie, J.-M. Hepatic vagotomy does not alter plasma insulin response to a low dose injection of glucose. *Physiol.Behav.* 52:237-240, 1992.
- Carobi, C., Della Tore, G. and Magni, F. Differential distribution of vagal afferent neurons from the rat liver. *Neurosci. Lett.* 62: 255-260, 1985.
- Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Scaglione, L., Gruden, G., Cassader, M. and Pagano, G. Feedback inhibition of insulin and glucagon secretion by insulin is altered in abdominal obesity with normal or impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol.* 30:154-158, 1993.

- Bonnadonna, R.C., Zych, K., Boni, C., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. Time dependence of the interaction between lipid and glucose in humans. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 257:E49-E56, 1989.
- Booth, D.A. and Jarman, S.P. . Inhibition of food intake in the rat following complete absorption of glucose delivered into the stomach. *J. Physiol. (London)* 259: 501-522, 1976.
- Bowner, C.J., Yates, M.S. Pharmacokinetics and biliary excretion of bromosulphophtalein, (³H)-ouabain and (³H)-taurocholic acid in the rat with glycerol-induced acute renal failure. *Br. J. Pharmacol.* 83: 773-782; 1984.
- Burnol, A.F., Leturque, A., Ferré, P., and Girard, J. A method for quantifying insulin sensitivity in vivo in the anesthetized rat: the euglycemic insulin clamp technique coupled with isotopic measurement of glucose turnover. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 23:429-435, 1983.
- Caprio, S., Hyman, L.D., Limb, C., McCarty, S., Lange, R., Sherwin, R.S., Shulman, G.I., and Tamborlane, W.V. Central adiposity and its metabolic correlates in obese adolescent girls. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 269:E118-E126, 1995.
- Cardin, S., Hélie, R., Compte, B., Bergeron, R., Van de Werve, G. and Lavoie, J.-M, Effect of hepatic portal pyruvate infusion on hormonal response in exercising rats. *Am. J. Physiol* 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.): R1630-R1636, 1994.
- Cardin, S., Lavoie, J.-M. and Trabelsi, F. Effect of hepatic vagotomy on hormonal response to exercise in gluconeogenesis-inhibited rats. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 29: R67-R72, 1991.
- Cardin, S., Lavoie, L., Gutierrez, A. and Lavoie, J.-M. Hepatic vagotomy does not alter plasma insulin response to a low dose injection of glucose. *Physiol.Behav.* 52:237-240, 1992.
- Carobi, C., Della Tore, G. and Magni, F. Differential distribution of vagal afferent neurons from the rat liver. *Neurosci. Lett.* 62: 255-260, 1985.
- Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Scaglione, L., Gruden, G., Cassader, M. and Pagano, G. Feedback inhibition of insulin and glucagon secretion by insulin is altered in abdominal obesity with normal or impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol.* 30:154-158, 1993.

- Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Nuccio, P., Gorla, M., Pagano, G. and Lenti G. Feedback inhibition of insulin secretion is altered in cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 1023-1027, 1986.
- Chen, Y.D.I., Golay, A., Swislocki, A.L.M. and Reaven, G.M. Resistance to insulin suppression of plasma free fatty acid concentrations and insulin stimulation of glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Endo.Metab.* 64:17-21, 1987.
- Cherrington, A.D. and Vranic, M. Effects of arginine on glucose turnover and plasma free fatty acids in normal dogs. *Diabetes* 22:537-543, 1973.
- Clark, P.W., Jenkins, A.B. and Kraegen, E.W. Pentobarbital reduces basal liver glucose output and its insulin suppression in rats. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 258:E701-E707, 1990.
- Clore, J.N., Glickman, P.S., Nestler, J.E. and Blackard, W.G. In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal men. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 261:E425-E429, 1991.
- Colberg, S.R., Simoneau, J.A., Thaete, F.L. and Kelley, D.E. Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J. Clin. Invest.* 95:1846-1853, 1995.
- Collier, G.R., Traianedes, Macauley, S.L., and O'Dea, K. Effect of fatty acid oxidation inhibition on glucose metabolism in diabetic rats. *Horm. Metabol. Res.* 25:9-12, 1993.
- Conget, I., Gonzalez-Clemente, J.M., Casals, E., Casamitjana, R., Gomis, R. and Malaisse, W.J. Effect of hyperlipidemia on plasma C-Peptide concentration during euglycemic hyperinsulinemic clamp. *Diab. Res.* 22:41-48, 1993.
- Consoli, A., Nurjahn, N., Capani, F. and Gerich, J.E. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 38:550-556, 1989.
- Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res.* 35:177-193, 1994.
- Crespin, S.R. Greenough, W.B. III and Steinberg, D. Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids. *J.Clin.Invest.* 52:1979-1984, 1973.
- Dambach, G. and Friedman, N. Substrate-induced membrane potential changes in the perfused rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 367: 366-370, 1974.

- DeFronzo, R.A. Pathogenesis of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia* 35:389-397, 1992.
- DeFronzo, R.A., Binder, C., Wahren, J., Felig, P., Ferrannini, E. and Faber, O.K. Sensitivity of insulin secretion to feedback inhibition by hyperinsulinemia. *Acta Endocrinol.* 98:81-86, 1981.
- DeFronzo, R., Tobin, J.D. and Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 237:E214-E223, 1979.
- Delprete, E and Scharrer, E. Hepatic branch vagotomy attenuates the feeding response to 2-deoxy-D-glucose in rats. *Exp. Physiol.* 75: 259-261, 1990.
- Doiron, B., Cardin, S., Brisson, G.R. and Lavoie, J.-M. Effects of selective hepatic vagotomy on running endurance in rats. *J. Appl. Physiol.* 69: 2197-2201, 1990.
- Donovan, C.M., Hamilton-Wessler, M., Halter, J.B., and Bergman, R.N. Primacy of liver glucosensors in the sympathetic response to progressive hypoglycemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:2863-2867, 1994.
- Donovan, C., Halter, J.B. and Bergman, R.N. Importance of hepatic glucoreceptors in sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 40: 155-158, 1991.
- Duckworth, W.C. Insulin degradation: mechanisms, products, and significance. *Endo. Rev.* 9:319-344, 1988.
- Efendic, S. Catecholamines and metabolism of human adipose tissue. III. Comparison between the regulation of lipolysis in omental and subcutaneous adipose tissue. *Acta Med. Scand.* 187:477-483, 1970.
- Elahi, D., Nagulesparan, M., Hersheoff, R.J., Muller, D.C., Tobin, J.D., Blix, P.M., Rubenstein, A.H. Unger, R.H. and Andres, R. Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: Relation to the hyperinsulinemia of obesity. *N. Engl. J. Med.* 306:1196, 1982.
- Evans, D.J., Hoffmann, R.G., Kalkhoff, R.K., and Kissebah, A.H. Relationship of body fat topography to insulin sensitivity and metabolic profiles in premenopausal women. *Metabolism* 33:68-75, 1984.

- Faber, O.K., Christensen, K., Kehlet, H., Madsbad, S., and Binder, C. Decreased insulin removal contributes to hyperinsulinemia in obesity. *J.Clin.Endo.Metab.* 53:618, 1981.
- Ferrannini, E. Physiological and metabolic consequences of obesity. *Metabolism* 44:15-17, 1995.
- Ferrannini, E., Barrett, E.J., Bevilacqua, S., and DeFronzo, R.A. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J.Clin.Invest.* 72:1737-1747, 1983.
- Field JB (1972) Insulin extraction by the liver. In: *Handbook of Physiology. Endocrinology. Endocrine Pancreas.* Washington, DC: Am Physiol Soc, 1972, sect 7, vol I, chapt 32, pp 505-513.
- Finegood, D.T. Vranic, M. and Bergman, R.N. Modelling error and apparent isotope discrimination counfound estimation of endogenous glucose production during euglycemic glucose clamp. *Diabetes* 37:1025-1034, 1988.
- Fisher, S.J. Shi, Z.Q., Lavina, H., Lickley, A. Efendic, S. Vranic, M. and Giacca, A. A moderate decline in specific activity does not lead to an underestimation of hepatic glucose production during a glucose clamp. *Metabolism* 45:587-593, 1996
- Flatt, P.R., Barnett, C.R., Shibier, O., and Swanston-Flatt, S.K. Direct and indirect actions of nutrients in the regulation of insulin secretion from pancreatic B cells. *Proc Nutri. Soc.* 50:559-566, 1991.
- Floyd, J.C. Jr., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F. and Rull, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J. Clin. Invest.* 45:1487-1502, 1966.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226:497-506, 1957.
- Forssmann, W.G. and Ito, S. Hepatocyte innervation in primates. *J. Cell Biol.* 74: 299-313, 1977.
- Friedman, M.I. And Tordoff, M.G. Fatty acid oxydation and glucose utilization interact to control food intake in rats. *Am J. Physiol. (Reg. Int. Comp. Physiol.)* 251: R840-R845, 1986.

- Friedman, M.I. Hepatic nerve function. *The liver: Biology and Pathobiology* 2nd ed. Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz, D.A. Editors. Raven Press, N.Y. p. 949-959, 1988.
- Friedman, M.I. and Tordoff, M.G. Hepatic metabolic signal for control of food intake: Stimulus generation, signal transduction and neural transmission. Chapter 44 In: *Liver Innervation*. edited by Shimazu, T. John Libbey & Company Ltd. p. 31-42, 1996
- Friedmann, B., Goodman, E.H. and Weinhouse, S. Effect of insulin and fatty acids on gluconeogenesis in the rat. *J. Biol. Chem.* 242:3620-3627, 1967.
- Fujioka, S., Matsuzawa, Y. and Tokunaga, K. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 36:54-59, 1987.
- Fulcher, G.R., Walker, M., Catalano, C., Agius, L., and Alberti, K.G.M.M. Metabolic effects of suppression of non-esterified fatty acid level with acipimox on obese NIDDM subjects. *Diabetes* 41:1400-1408, 1992.
- Garvey, W.T., Revers, R.R., Kolterman, O.G., Rubenstein, A.H., Olefsky, J.M. Modulation of insulin secretion by insulin and glucose in type II diabetic patients. *J Clin. Endo. Metab.* 60:559-568 1985.
- Golay, A., Chen, N., Chen, Y.D.I., Hollenbeck, C.B., and Reaven, G.M. Effect of central obesity on regulation of carbohydrate metabolism in obese patients with varying degrees of glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:1299-1304, 1990.
- Golay, A., Swislocki, A.L.M., Chen, Y.D.I., and Reaven, G.M. Relationship between plasma free fatty acid concentration, endogenous glucose production, and fasting hyperglycemia in normal and non-insulin-dependent diabetic individuals. *Metabolism* 36:692-696, 1987.
- Goldfine, I.D., Kahn, C.R. and Neville, D.J. Decreased binding of insulin to its receptors in rats with hormone induced insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53:852-857, 1973.
- Gonzalez-Manchon, C., Ayuso, M.S., and Parilla, R. Control of hepatic gluconeogenesis: Role of fatty acid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:1-9, 1989.

- Goodman, M.N. and Ruderman, N.B. Insulin sensitivity of rat skeletal muscle: effects of starvation and aging. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 236:E519-E523, 1979.
- Gorden, E.S. Non-esterified fatty acids in blood of obese and lean subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* 8:740-747, 1960
- Granneman, J. and Friedman, M.I. Hepatic modulation of insulin-induced gastric acid secretion and EMG activity in rats. *Am. J. Physiol. (Regulatory. Integrative. Comp. Physiol.)* 7: R346-R352, 1980.
- Groop, L.C., Saloranta, C., Shank, M., Bonadonna, R.C., Ferrannini, E. and DeFronzo, R.A. The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and non-insulin-dependent diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 72:96-107, 1991.
- Groop, L.C., Bonadonna, R.C., Del Prato, S., Ratheiser, K., Zyck, K., Ferrannini, E., and DeFronzo, R.A. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 84:205-213, 1989.
- Guyton, A.C. Textbook of medical physiology. 8th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991, p.1014.
- Guyton, A.C. Anatomie et physiologie du système nerveux. Décarie éditeur inc. Ville Mont-Royal, Québec, 1989, p.423.
- Hamilton-Wessler, M., Bergman, R.N., Halter, J.B., Watanabe, R.M., and Donovan, C.M. The role of liver glucosensors in the integrated sympathetic response induced by deep hypoglycemia in dogs. *Diabetes* 43:1052-1060, 1994.
- Hanson, R.I., Ho, R.S., Wisenberg, J.J., Simpson, R., Younathan, E.S. and Blair, J.B. Inhibition of gluconeogenesis and glycogenolysis by 2,5-anhydro-D-mannitol. *J.Biol.Chem.* 259:218-233, 1984.
- Harding, P.E., Bloom, G., and Field, J.B. Effect of infusion of insulin into portal vein on hepatic extraction of insulin in anesthetized dogs. *Am. J. Physiol.* 228:1580-1588, 1969.
- Havel, P.J. and Taborsky, G.J. The contribution of the autonomic nervous system to changes of glucagon and insulin secretion during hypoglycemic stress. *Endocrinol. Rev.* 10: 332-350, 1989.

- Hennes, M.M.I., Dua, A. and Kissebah, A.H. Effects of free fatty acids and glucose on splanchnic insulin dynamics. *Diabetes* 46:57-62, 1997.
- Hirose, H., Lee, Y.H., Inman, L.R., Nagasawa, Y., Johnson, J.H., and Unger, R.H. Defective fatty acid-mediated B-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. *J. Biol. Chem.* 271:5633-5637, 1996.
- Iga, T.; Klassen, C.D. Age related pharmacokinetics of ouabain in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 170: 59-62; 1982.
- Ishida, T. Chap, Z., Chou, J., Lewis, R.M., Hartley, C.J., Entman, M.L. Effect of portal and peripheral venous insulin infusion on glucose production and utilization in depancreatized conscious dogs. *Diabetes* 33:984-990, 1984.
- Iwai, M., Miyashita, T., and Shimazu, T. Inhibition of glucose production during hepatic nerve stimulation in regenerating rat liver perfused in situ. Possible involvement of gap junctions in the action of sympathetic nerves. *Eur. J. Biochem.* 200:69-74, 1991.
- Katz, H., Homan, M., Jensen, M., Caumo, A., Cobelli, C., and Rizza, R. Assessment of insulin action in NIDDM in the presence of dynamic changes in insulin and glucose concentration. *Diabetes* 43:289-296, 1994.
- Kautsky-Willer, A., Pacini, G., Ludvik, B., Schernthaner, G., and Prager, R. B-cell hypersecretion and not reduced hepatic insulin extraction is the main cause of hyperinsulinemia in obese nondiabetic subjects. *Metabolism* 41:1304-1312, 1992.
- Kelley, D.E., Mokan, M., Simoneau, J.A., and Mandarino, L.J. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 92:91-98, 1993.
- Kelley, D.E., Mintun, M.A., Watkins, S.C., Simoneau, J.A., Jadall, F., Frederickson, A., Beattie, J., and Thériault, R. The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 12:2705-2713, 1996.
- Kissebah, A.H. Insulin resistance in visceral obesity. *Int. J. Obesity.* 15:109-115, 1991.
- Kissebah, A.H., Vydellingum, N., Murray, R., Evans, D.J., Hartz, A.J., Kalkhoff, R.K., and Adams, P.W. Relation of body fat distribution to metabolic complications to obesity. *J. Clin. Endo. Metab.* 54:254-260, 1982.

- Kissebah, A.H. and Hennes, M.I. Central obesity and free fatty acid metabolism. Prostaglandins Leuko. Essentials Fatty Acids 52:209-211, 1995.
- Kitani, K. Kanai, S. Miura, R. Morita, Y. and Kasahara, M. The effect of ageing on the biliary excretion of ouabain in the rat. *Exp. Geront.* 13: 9-17; 1978.
- Kjaer, M., Kiens, B., Hargreaves, M., and Richter, E.A. Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 71(2):552-557, 1991.
- Klimes, I., Nagulesparan, M., Vasquez, B., Hikida, H. and Unger, R.H. Normal insulin sensitivity of the islets of Langerhans in obese subjects with resistance to its glucoregulatory action. *Diabetes* 33:305-310, 1984.
- Kobashi, M. and Adachi, A. Effect of hepatic portal infusion of water on water intake by water-deprived rats. *Physiol. Behav.* 52:885-888, 1992.
- Kraegen, E.W., Lazarus, L. and Campbell, L.V. Failure of insulin infusion during euglycemia to influence endogenous basal insulin secretion. *Metabolism* 32:622-627, 1983.
- Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J. Clin. Invest.* 72:1150-1162, 1983.
- Kruszynska, Y.T., McCormack, J.G., and McIntyre, N. Effects of glycogen stores and non-esterified fatty acid availability on insulin-stimulated glucose metabolism and tissue pyruvate dehydrogenase activity in the rat. *Diabetologia* 34:205-211, 1991.
- Kruszynska, Y.T., Home, P.D., and Alberti, G.M.M. Comparison of portal and peripheral insulin delivery on carbohydrate metabolism in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 28:167-171, 1985.
- Lamarche, L., Yamaguchi, K., and Péronnet, F. Selective hypoglycemia in the liver induces adrenomedullary counterregulatory response. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 270:R1307-R1316, 1996.
- Lamarche, L. Hepatic denervation reduces adrenal catecholamine secretion during insulin-induced hypoglycemia. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 268:R50-R57, 1995.

- Langhans, W. Metabolic and glucostatic control of feeding. *Proc. Nutr. Soc.* 55:497-515; 1996.
- Langhans, W. Hepatic and intestinal handling of metabolites during feeding in rats. *Physiol. Behav.* 49: 1203-1209, 1991.
- Langhans, W. and Scharrer, E. Evidence for a vagally mediated satiety signal derived from hepatic fatty acid oxydation. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 18: 13-18, 1987a.
- Langhans, W. and Scharrer, E. The evidence for a role of the sodium-pump in the control of food intake. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 20: 199-205, 1987b.
- Langhans, W., Egli, E. and Scharrer, E. Regulation of food intake by hepatic oxydative metabolism. *Brain Res. Bull.* 15: 425-428, 1985a.
- Langhans, W., Egli, E. and Scharrer, E. Selective hepatic vagotomy eliminates hypophagic effect of different metabolites. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 13: 255-262, 1985b.
- Latour, M.G., Cardin, S., Hélie, R., Yamaguchi, N. and Lavoie, J.M. Effect of hepatic vagotomy on plasma catecholamines during exercise-induced hypoglycemia. *J. Appl. Physiol.* 78:1629-1634 1995.
- Lautt, W.W. Hepatic nerves: a review of their functions and effects. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58: 105-123, 1980.
- Lautt, W.W. The effect of intraportal and intravenous glucose infusion and an intravenous glucose tolerance test on insulin and glucagon levels in conscious cats with normal and chronically phenol-denervated livers. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 10: 135-143, 1984.
- Lavoie, J.M., Bergeron, R., Cardin, S., Hélie, R. and Yamaguchi, N. Evidence for a role of the sodium pump of hepatocytes in the sympathoadrenal response. *The FASEB Journal* 7: 1-847 (abstract), 1993.
- Lavoie, J.M., Bongbélé, J., Cardin, S., Bélisle, M., Terretaz, J. and Van de Werve, G. Increased insulin suppression of plasma free fatty acid concentration in exercised-trained rats. *J. Appl. Physiol.* 74:293-296, 1993.
- Lavoie, J.M., Cardin, S. and Doiron, B. Influence of hepatic vagus nerve on pancreatic hormone secretion during exercise. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 257:E855-E859, 1989.

- Lavoie, J.-M., Lord, M. and Paulin, A. Effect of selective hepatic vagotomy on plasma FFA levels in resting and exercising rats. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 23: R602-R606, 1988.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., and Unger, R.H. B-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: Impairment on adipocyte - B-cell relationship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:10878-10882, 1994.
- Lee, K.U.L., Park, J.Y., Kim, C.H., Hong, S.K., Suh, K.I., Park, K.S., and Park, S.W. Effect of decreasing plasma free fatty acids by acipimox on hepatic glucose metabolism in normal rats. *Metabolism* 45:1408-1414, 1996.
- Lee, K.C. and Miller, R.E. The hepatic vagus nerve and the neural regulation of insulin secretion. *Endocrinol.* 117: 307-314, 1985.
- Lee, K.U., Lee, H.K., Koh, C.S., and Min, H.K. Artificial induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin leads to insulin resistance in man. *Diabetologia* 31:285-290, 1988.
- Leturque, A., Burnol, A.F., and Girard, J. Pregnancy-induced insulin resistance in the rat: assesment by glucose clamp technique. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 246:E25-E31, 1984.
- Li, M., Martin, A., Wen, C., Turner, S.W., Lewis, L.K., and Whitworth, J.A. Long-term ouabain administration does not alter blood pressure in conscious Spague-Dawlet rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22:919-923, 1995.
- Liljenquist, J.E., Horwitz, D., Jennings, A.S., Chiasson, J.L., Keller, U. and Rubenstein, A.H. Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in normal man as demonstrated by C-peptide assay. *Diabetes* 27:563-570, 1978.
- Lo, S., Russell, J.C., and Taylor, A.W. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28:234-236, 1970.
- Loubatières, A., Mariani, M.M. and Chapal J. Inhibition de la sécrétion de l'insulin par l'élévation de la teneur en insuline du milieu irriguant les cellules B des îlots de Langerhans du pancréas. *CR Acad.Sci.* 266: 2295-, 1968.

- Lutz, T.A. and Scharrer, E. Intraportal 2,5-anhydro-D-mannitol infusion increases afferent activity in the common hepatic vagus branch. *Obesity Res.* 3:(Suppl.)375S, 1995.
- Luzi L, Battezzati A, Perseghin G, Bianchi E, Vergani S, Secchi A, La Rocca, E., Staudacher, C., Spotti, D., Ferrari, G., Di Carlo, V. and Pozza, G. Lack of feedback inhibition of insulin secretion in denervated human pancreas. *Diabetes* 41:1632-1639, 1992.
- Magnusson, I., Rothman, D.L., Katz, L.D., Shulman, R.G. and Shulman, G.I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes; A nuclear magnetic resonance study. *J. Clin. Invest.* 90:1323-1327, 1992.
- Malaisse, W.J. and Malaisse-Lagae, F. Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites. *J.Lab.Clin.Med.* 72:438-448, 1968.
- Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Wright, P.H. and Ashmore, J. Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion in vitro. *Endocrinol.* 80: 975-978, 1967.
- Marincola, F., Frank, W., Clark, W., Douglas, M., and Merrell, R. The independence of insulin release and ambient insulin in vitro. *Diabetes* 32:1162-1167, 1983.
- Metz, W. and Forssman, W.G. Innervation of the liver in guinea pig and rat. *Anat. Embryol.* 160: 239-252, 1980.
- Meyer, A.H. and Scharrer, E. Hyperpolarisation of cell membrane of mouse hepatocytes by metabolizable and nonmetabolizable monosaccharides. *Physiol. Behav.* 50: 351-355, 1991.
- Mikines, K.J., Sonne, B., Richter, E.A., Christensen, N.J., and Galbo, H. Glucose turnover during insulin induced hypoglycemia in liver-denervated rats. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 248:E327-E332, 1985.
- Mondon, C.E., Dolkas, C.B. and Reaven, G.M. Effects of acute uremia on insulin removal by the isolated perfused rat liver and muscle. *Metabolism* 27: 133-142, 1978.
- Moore, M.C. and Cherrington, A.D. Regulation of net hepatic glucose uptake: Interaction of neural and pancreatic mechanisms. *Reprod. Nutr. Develop.* 36:399-406, 1996.
- Nagase, H., Inoue, S., Tanaka, K., Takamura, Y. and Nijijima, A. Hepatic glucose-sensitive unit regulation of glucose-induced insulin secretion in rats. *Physiol. Behav.* 53: 139-143, 1993.

- Nagase, H., Inoue, S., Tanaka, K., Saitoh, T. and Takamura, Y. Hyper-response of insulin release to arginine in streptozotocin-induced diabetic rats with hepatic vagotomy. *Endocrinol. Japon* 37: 545-553, 1990.
- Niijima, A. Role played by vagal hepatic afferents from chemical sensors in the hepato-portal region: An electrophysiological study. Chapter 38 In: *Liver Innervation*. edited by Shimazu, T. John Libbey & Company Ltd., p. 323-331, 1996.
- Niijima, A. Electrophysiological study on the vagal innervation of the adrenal gland in the rat. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 41: 87-92, 1992.
- Niijima, A. Nervous regulation of metabolism. *Progress in Neurobiology* 33: 135-147, 1989.
- Niijima, A. The effect of gastro-entero-pancreatic hormones on the activity of vagal afferent fibers. *Prog. Brain.Res.* 74:155-160, 1988.
- Niijima, A. Glucose sensors in the hypothalamus and brainstem, and their role in the regulation of autonomic function. In: *Emotions* ed. OOMURA, Y., Jpn Sci. Soc. Press, Tokyo, p.27-33, 1986.
- Niijima, A. Reflex control of the autonomic nervous system activity from the glucose sensors in the liver in normal and mid-pontine transected animals. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 10: 279-285, 1984a.
- Niijima, A. The effects of D-glucose on the firing rate of glucose-sensitive vagal afferent in comparison with the effect of 2-deoxy-D-glucose. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 10: 255-260, 1984b.
- Niijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and their role in food intake and blood glucose regulation. *J. Auton. Nerv. Syst.* 9: 207-220, 1983.
- Niijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibres in the hepatic branch of the vagus nerve in the guinea pig. *J. Physiol.* 332: 315-323, 1982.
- Niijima, A. Glucose-sensitive afferent nerve fibers in the liver and regulation of blood glucose. *Br. Res. Bull.* 5(s.4): 175-179, 1980.
- Niijima, A. Control of liver function and neuroendocrine regulation of blood glucose levels. In: *Integrative functions of the autonomic nervous system*. Brooks, C. McC., Koizumi, K.

- and Sato, A. University of Tokyo press, Tokyo and Elsevier/North Holland, Biomedical press, Amsterdam, p.68-83, 1979.
- Nijjima, A. The effect of 2-deoxy-D-glucose and D-glucose on the efferent discharge rate of sympathetic nerves. *J. Physiol.* 251: 231-243, 1975a.
- Nijjima, A. The effect of glucose on the activity of the adrenal nerve and pancreatic branch of the vagus nerve in the rabbit. *Neurosci. Lett.* 1: 159-162, 1975b.
- Nijjima, A. Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Ann. N.Y. Acad. Sciences* 157: 690-700, 1969
- Nobin, A., Baumgarten, H.G., Falck, B., Ingemansson, S., Moghimzadeh, E. and Rosengren, E. Organization of the sympathetic innervation in the liver tissue from monkey and man. *Cell Tissue Res.* 195: 371-380, 1978.
- Novin, D., Sanderson, J.D. and Vanderweele, D.A. The effect of isotonic glucose on eating as a function of feeding condition and infusion site. *Physiol. Behav.* 13: 3-7, 1974.
- Ostman, J., Arner, P., Engfeldt, P. and Kager, L. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metabolism* 28:1198-1205, 1979.
- Pagliassotti, M.J., Myers, S.R., Moore, M.C., Neal, D.W. and Cherrington, A.D. Magnitude of negative arterial-portal glucose gradient alters net hepatic glucose balance in conscious dogs. *Diabetes* 40:1659-1668, 1991a.
- Pagliassotti, M.J., Tarumi, C., Neal, D.W. and Cherrington, A.D. Hepatic denervation alters the disposition of an enteral glucose load in conscious dogs. *J. Nutr.* 121:1255-1261, 1991b.
- Paolisso, G., Tataranni, P.A., Foley, J.E., Bogardus, C., Howard, B.V. and Ravussin, E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia* 38:1213-1217, 1995.
- Peiris, A.N., Struve, M.F. and Kissebah, A.H. Relationship of body fat distribution to the metabolic clearance of insulin in premenopausal women. *Int. J. Obesity.* 11:581-589, 1987b.

- Peiris, A.N., Mueller, R.A., Struve, M.F., Smith, G.A. and Kissebah, A.H. Relationship of androgenic activity to splanchnic insulin metabolism and peripheral glucose utilization in premenopausal women. *J. Clin. Endo. Metab.* 64:162-169, 1987a.
- Peiris, A.N., Mueller, R.A., Smith, G.A., Struve, M.F. and Kissebah, A.H. Splanchnic insulin metabolism in obesity: Influence of body fat distribution. *J. Clin. Invest.* 78:1648-1657, 1986.
- Petersen, O.H. The effect of glucagon on the liver cell membrane potential. *J. Physiol.* 239: 647-656, 1974.
- Phan, T., Bach, A. and Metais, P. Effects of fasting on intermediate hepatic metabolism of the rat. *Arch. Intern. Biochim. Physiol.* 82: 603-609, 1974.
- Piatti, P.M., Pontirolli, A.E., Caumo, A., Santambrogio, G., Monti, L.D., Costa, S., Garbetta, F. Baruffaldi, L., Cobelli, C. and Pozza, G. Hyperinsulinemia decreases second phase but not first phase arginine induced insulin release. *Diabetes* 43:1157-1163, 1994.
- Pidgeon, G.B., Richards, A.M., Nicholls, M.G., Lewis, L.K. and Yandle, T.G. Acute effects of intravenous ouabain in healthy volunteers. *Clin. Sci. Lond.* 86:391-397, 1994.
- Polonsky, K.S. and Rubenstein, A.H. C-Peptide as a measure of the secretion and hepatic extraction of insulin. *Diabetes* 33:486-494, 1984.
- Prechtel, J.C. and Powley, T.L. Organization and distribution of the rat subdiaphragmatic vagus and associated paraganglia. *J. Comp. Neurol.* 235: 182-195; 1985.
- Prechtel, J.C. and Powley, T.L. A light and electron microscopic examination of the vagal hepatic branch of the rat. *Anat. Embryol.* 176: 115-126; 1987.
- Proietto, J., Rohner-Jeanrenaud, F., Ionescu, E., Terretaz, J., Sauter, J.F. and Jeanrenaud, B. Non-steady state measurement of glucose turnover in rats by using a one-compartment model. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 252:E77-E84, 1987.
- Radziuk, J., Norwich, K.H., and Vranic, M. Experimental validation of measurements of glucose turnover in nonsteady state. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 234:E84-E93, 1978.
- Randle, P.J., Priestman, D.A., Mistry, S.C., and Halsall, A. Glucose fatty acid interactions and the regulation of glucose disposal. *J. Cell. Biochem.* 55S:1-11, 1994.

- Rawson, N.E., Blum, H., Osbakken, M.D. and Friedman, M.I. Hepatic phosphate trapping, decreased ATP and increased feeding after 2,5-anhydro-D-mannitol in rat liver. *Am.J.Physiol (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 266:R112-R117, 1994.
- Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S. and Chen, Y.D. Measurement of plasma glucose, free fatty acid lactate and insulin for 24H in patients with NIDDM. *Diabetes* 37:1020-1024, 1988.
- Rebrin, K., Steil, G.M., Mittelman, S.D., and Bergman, R.N. Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs. *J. Clin. Invest.* 98:741-749, 1996.
- Rebrin, K., Steil, G.M., Getty, L., and Bergman, R.N. Free fatty acids as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin. *Diabetes* 44:1038-1045, 1995.
- Rebuffé-Scrive, M., Andersson, B., and Bjorntorp, P. Metabolism of adipose tissue in intraabdominal depots of nonobese men and women. *Metabolism* 38:453-458, 1989.
- Remie, R. and Zaagsma, J. A new technique for the study of vascular presynaptic receptors in freely moving rats. *Am. J. Physiol.* 251 (Heart Circ. Physiol. 20): H463-H467, 1986.
- Reuning, R.H. and Schanker, L.S. Effect of tetrachloride-induced liver damage on hepatic ouabain transport in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 178: 589-594; 1971.
- Ritter, S. and Taylor, J.S. Vagal sensory neurons are required for lipoprivic but not glucoprivic feeding in rats. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 258:R1395-R1401, 1990.
- Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W., and Shulman, G.I. Mechanism of free fatty acid induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.* 97:2859-2865, 1996.
- Rossetti, L., Giaccari, A., Barzilai, N., Howard, K., Sebel, G., and Hu, M. Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats: Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *J. Clin. Invest.* 92:1126-1134, 1993.

- Rossi, R., Geromini, M., Gloor, P., Seebacher, C., and Scharrer, E. Hyperpolarisation of the cell membrane of mouse hepatocytes by fatty acid oxydation. *Physiol. Behav.* 57:509-514, 1995.
- Rubenstein, A.H., Pottenger, L.A., Mako, M., Getz, G.S., Steiner, D.F. The metabolism of proinsulin and insulin by the liver. *J. Clin. Invest.* 51: 912-921, 1972.
- Russek, M. Participation of the hepatic glucoreceptors in the control of intake of food. *Nature* 197: 79-80, 1963.
- Russek, M. Current hypothesis in the control of feeding behaviour. Neural integration of physiological mechanisms and behaviour. MOGENSEN G.J. and CALARESU F.R. (Eds.) p.128-147 University of Toronto press, Toronto, 1975.
- Russek, M. Current status of the hepatostatic theory of food intake. *Appetite* 2: 137-143, 1981.
- Saitou, S., Tanaka, K., Inoue, S., Takamura, Y. and Nijijima, A. Glycine sensors in the hepato-portal system and their reflex effects on pancreatic efferents in the rat. *Neurosc. Lett.* 149: 12-14, 1993.
- Sakaguchi, T., and Hayashi, Y. Reflex secretion of insulin evoked by intraportal injection of D-glucose anomers in the rats. *Biomed. Res.* 2: 222-224, 1981.
- Sakaguchi, T. and Yamaguchi, K. Effects of electrical stimulation of the hepatic vagus nerve on the plasma insulin secretion in the rat. *Brain Res.* 164: 314-316, 1979.
- Sako, Y. and Grill, V.E. A 48-hour infusion in the rat time-dependantly inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinol.* 127:1580-1589, 1990.
- Saloranta, C., Koivisto, V., Widen, E., Falholt, K., DeFronzo, R.A., Harkonen, M. and Groop, L. Contribution of muscle and liver to glucose-fatty acid cycle in humans. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 264:E599-E605, 1993.
- Saloranta, C., Franssila-Kallunki, A., Ekstrand, A., Taskinen, M.R., and Groop, L. Modulation of hepatic glucose production by non-esterified fatty acids in type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34:409-415, 1991.

- Sasse, D. Liver structure and innervation. In: Regulation of hepatic metabolism: Intra- and intercellular compartmentation. Thurman, R.G., Kauffman, F.C. and Jungermann, K. (Eds.) Plenum Press, N.Y., 1986, p.3-25.
- Sawchenko, P.E. and Friedman, M.I. Sensory functions of the liver - a review. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 236: R5-R20; 1979.
- Scharrer, E., Lutz, T.A. and Rossi, R. Coding of metabolic information by hepatic sensors controlling food intake. Chapter 45 In: Liver Innervation. edited by Shimazu, T. John Libbey & Company Ltd. p. 381-388, 1996.
- Scharrer, E. and Langhans, W. Control of food intake by fatty acid oxydation. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 250: R1003-R1006, 1986.
- Schatz, H. and Pfeiffer, E.F. Release of immunoreactive and radioactively prelabelled endogenous (pro-)insulin from isolated islet of rat pancreas in the presence of exogenous insulin. *J. Endocrinol.* 74:243-249, 1977.
- Schatzmann, H.J. Herzglykoside als hemmstoffe für der aktiven Kalium und Natrium transport durch die erythrocyten membran. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* 11: 346-354, 1953.
- Shima, K., Morishita, S., Sawazaki, N., Tanaka, R. and Tarui S. Failure of exogenous insulin to inhibit insulin secretion in man. *Horm. Metab. Res.* 9:441-443, 1977.
- Shimazu, T. Progress and perspective of neuro-hepatology. Chapter 1 In: Liver Innervation. edited by Shimazu, T. John Libbey & Company Ltd., p. 3-13, 1996.
- Shimazu, T. Central nervous regulation of liver and adipose tissue metabolism. *Diabetologia* 20: 343-356, 1981.
- Shimizu, N., Oomura, Y., Novin, D., Grijalva, C.V. and Cooper, P.H. Functional correlations between lateral hypothalamic glucose-sensitive neurons and hepatic portal glucose-sensitive units in the rat. *Brain Res.* 265: 49-54, 1983.
- Shulman, G.I., DeFronzo, R.A. and Rossetti, L. Differential effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on pathways of hepatic glycogen repletion. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 260:E731-E735, 1991.

- Skou, J.C. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45: 596-617, 1965.
- Smith, D., Rossetti, L., Ferrannini, E., Johnson, C.M., Cobelli, C., Toffolo, G., Katz, L.D. and DeFronzo, R.A. In vivo glucose metabolism in the awake rat: Tracer and insulin clamp studies. *Metabolism* 36:1167-1174, 1987.
- Sonne, B. Mikines, K.J., Richter, E.A., Christensen, N.J. and Galbo, H. Role of liver nerves and adrenal medulla in glucose turnover of running rats. *J. Appl. Physiol.* 59(5):1640-1646, 1985.
- Sotsky, M.J., Shilo, S., and Shamon, H. Regulation of counterregulatory hormone secretion in man during exercise and hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:9-16, 1989.
- Stagner, J., Samols, E., Polonsky, K.S. and Pugh, W. Lack of direct inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in the canine pancreas. *J Clin. Invest.* 78:1193-1198, 1986.
- Steele, R. Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 82:420-430, 1959.
- Stein, D.T., Esser, V., Stevenson, B.E., Lane, K.E., Whiteside, J.H., Daniels, M.B., Chen, S. and McGarry, J.D. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J. Clin. Invest.* 97:2728-2735, 1996.
- Stevenson, R.W., Parsons, J.A. and Alberti, G.M.M. Effect of intraportal and peripheral insulin on glucose turnover and recycling in diabetic dogs. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 244: E190-E195, 1983.
- Stevenson, R.W., Parsons, J.A., and Alberti, G.M.M. Comparison of the metabolic response to portal and peripheral infusions of insulin in diabetic dogs. *Metabolism* 60:745-752, 1981.
- Striffler, J.S. and Curry DL. Effect of fasting on insulin removal by liver of perfused liver-pancreas. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 237:E349-E355, 1979.
- Stromblad, G. and Bjorntorp, P. Reduced insulin clearance in rats with dietary-induced obesity. *Metabolism* 35:323-327, 1986.
- Strubbe, J.H. And Steffens, A.B. Blood glucose level in portal and peripheral circulation and their relation to food intake in the rat. *Physiol. Behav.* 19: 303-307. 1977.

- Stumvoll, M., Meyer, A., Nadkarni, V., Gerich, J.E. Renal glucose production and utilization: new aspects in humans. *Diabetologia* 40:749-757, 1997.
- Stümpel, F., Kucera, T., Gardemann, A., and Jungermann, K. Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption via hepatoenteral nerves in the rat. *Gastroent.* 110:1863-1869, 1996.
- Svedberg, J., Stromblad, G., Wirth, A., Smith, U., and Bjorntorp, P. Fatty acids in the portal vein of the rat regulate hepatic insulin clearance. *J. Clin. Invest.* 88:2054-2058, 1991b.
- Tan, C.M. and Powis, D.A. Cardiac glycosides, calcium and the release of neurotransmitter from peripheral noradrenergic nerves. *Nauyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 329:1-8; 1985.
- Tanaka, K., Inoue, S., Nagase, H., Takamura, Y. and Nijiima, A. Amino acid sensors sensitive to alanine and leucine exist in the hepato-portal system in the rat. *J. Autom. Nerv. Syst.* 31:41-46, 1990b.
- Tanaka, K., Inoue, S., Nagase, H. and Takamura, Y. Modulation of arginine-induced insulin and glucagon secretion by the hepatic vagus nerve in the rat: Effects of celiac vagotomy and administration of atropine. *Endocrinol.* 127:2017-2023, 1990a.
- Tanaka, K., Inoue, S., Fudjii, T. and Takamura, Y.M. Enhancement of insulin and glucagon secretion by arginine after hepatic vagotomy. *Neurosci. Lett.* 72:74-78; 1986.
- Terretaz, J., Assimacopoulos-Jeannet, F. and Jeanrenaud B. Inhibition of hepatic glucose production in vivo in rats: contribution of glycolysis. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 250:E346-E351, 1986.
- Tordoff, M.G. and Friedman, M.I. Hepatic control of feeding: Effect of glucose, fructose, and mannitol infusion. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 254:R969-R976, 1988.
- Tordoff, M.G. and Friedman, M.I. Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 251: R192-R196, 1986.

- Tordoff, M.G., Rawson, N. and Friedman, M.I. 2,5-Anhydro-D-mannitol acts in liver to initiate feeding. *Am.J.Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 261: R283-R288, 1991.
- Tordoff, M.G. and Novin, D. Celiac vagotomy attenuates the ingestive responses to epinephrine and hypertonic saline but not insulin, 2-deoxy-D-glucose, or polyethylene glycol. *Physiol. Behav.* 29: 605-613; 1982.
- Tordoff, M.G., Schulkin, J. and M.I. Friedman. Hepatic contribution to satiation of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 251:R1095-R1102.1986.
- Tordoff, M.G., Tluczek, J.P. and Friedman, M.I. Effect of hepatic portal glucose concentration on food intake and metabolism. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 26)* 257:R1474-R11480, 1989.
- Trabelsi, F., Hélie, R., Bergeron, R. and Lavoie, J.M. Effect of inhibition of gluconeogenesis on arginine-induced insulin secretion. *Physiol. Behav.* 57:797-802, 1995.
- Trabelsi, F. and Lavoie, J.M. Arginine-induced pancreatic hormone secretion during exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 81:2528-2533, 1996.
- Trabelsi, F., Cardin, S., Hélie, R., Brisson, G.R. and Lavoie, J.M. Combined effect of 2-deoxy-D-glucose and exercise on plasma catecholamine response. *J. Appl. Physiol.* 72:361-365, 1992.
- Tranberg, K.G. Hepatic uptake of insulin in man. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 237:E509-E518, 1979.
- Vander, A.J., Sherman, J.H. and Luciano, D.S. *Human physiology: the mechanism of body function.* 5th. ed. McGraw-Hill publ. company. N.Y. p.724, 1990.
- Vara, E. and Tamarit-Rodriguez, J. Glucose stimulation of insulin secretion in islets of fed and starved rats and its dependence on lipid metabolism. *Metabolism* 35:266-271, 1986.
- Waldhausl, W., Gasic, S., Bratusch-Marrain, P., Korn, A. and Nowotny P. Feedback inhibition by biosynthetic human insulin of insulin release in healthy human subjects. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 243:E476-E482, 1982.

- Wiersma, M.M.L., Vissing, J., Steffens, A.B. and Galbo, H. Effects of glucose infusion on hormone secretion and hepatic glucose production during heavy exercise. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 265:R1333-R1338, 1993.
- Wiersma, M.M.L., Vissing, J., Mikines, K.J., Steffens, A.B., and Galbo, H. Effect of liver denervation on glucose production during running in guinea pigs. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol.)* 268:R72-R77, 1995.
- Williamson, J.R., Kreisberg, R.A., and Felts, P.W. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 56:247-251, 1966.
- Williamson, M.P., Behme, M.T., Dupré, J., Grant, D.R., Guan, J., and Zhong, R. Rats with portal-caval vein transposition show hyperinsulinemia and insulin resistance. *Metabolism* 45:120-125, 1996.
- Winder, W.W. Role of cyclic AMP in regulation of hepatic glucose production during exercise. *Med.Sci.Sports Exerc.* 20:551-559, 1988.
- Xie, H. and Lutt, W.W. Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J.Auton.Pharmacol.* 15:361-369, 1995.
- Xie, H. and Lutt, W.W. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 271:E587-E592, 1996a.
- Xie, H. and Lutt, W.W. Insulin resistance of skeletal muscle produced by hepatic parasympathetic interruption. *Am.J.Physiol. (Endocrinol. Metab.)* 270:E858-E863, 1996b.
- Yamazaki, M. and Sakaguchi, T. Pancreatic vagal functional distribution in the secretion of insulin evoked by portal infusion of D-glucose. *Brain Res.* 484: 357-360, 1989.
- Zhou, Y.-P. and Grill, V.E. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose-fatty acid cycle. *J. Clin. Invest.* 93:870-876, 1994.
- Zhou, Y.-P. and Grill, V.E. Long-term exposure to fatty acids and ketone inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:1584-1590, 1995.

Zhou, Y.-P., Ling, Z.C. and Grill, V.E. Inhibitory effects of fatty acids on glucose regulated B-cell function: Association with decreased islet triglyceride stores and altered effect of fatty acid oxydation on glucose metabolism. *Metabolism* 45:981-986, 1996.

ANNEXE 1: C.V. SCIENTIFIQUE DE L'AUTEUR

RAYNALD BERGERON**Occupation actuelle:**

Stagiaire post-doctoral
 Yale University School of Medicine
 Department of Internal Medicine

**Prix et distinctions**

1989 A.S. Lamb Scholarship (600.00\$),
 Université McGill (excellence académique)

Bourses

1997-1998 Bourse post-doctorale - Juvenile Diabetes Foundation International; Yale University, Department of Internal Medicine/Endocrinology
 1996-1997 Bourse d'excellence - Université de Montréal
 1996 Bourse pour stage d'étude - Fonds pour la Formation de Chercheurs et de l'Aide à la Recherche (FCAR) ; Université de Copenhague, Danemark
 1996 Bourse de voyage - American Association of Anatomists, "Experimental Biology 1996"
 1994-1996 Bourse doctorale - Conseil de la Recherche en Sciences Naturelles et Génie (NSERC) ; Université de Montréal
 1994-1996 Bourse doctorale - Fonds pour la Formation de Chercheurs et de l'Aide à la Recherche (FCAR) ; Université de Montréal
 1993-1994 Bourse d'excellence - Université de Montréal

Affiliations professionnelles

- American Diabetes Association
 - American Physiological Society
 - Association Canadienne Française pour l'Avancement des Sciences
 - Association Québécoise des Sciences de l'Activité Physique
 - Société Canadienne de Physiologie de l'Exercice / Canadian Society for Exercise Physiology

PUBLICATIONS**(a) Articles publiés**

- 1- Lavoie, J.-M., Bolduc, L., Hélie, R., Bergeron, R., Lafond, S., Cardin, S., Trabelsi, F. and Yamaguchi, N. "Effect of inhibition of hepatic fatty acid oxydation on metabolic and hormonal responses to exercise in rats." Int. J. Sports Med. 15 (2):64-69, 1994.
- 2- Cardin, S., Hélie, R., Compte, B., Bergeron, R., Van de Werve, G. and Lavoie, J.-M. "Effect of hepatic portal pyruvate infusion on hormonal response in exercising rats." Am. J. Physiol 266 (Regulatory Integrative Comp. Physiol.): 266: R1630-R1636, 1994.
- 3- Trabelsi, F., Hélie, R., Bergeron, R. and Lavoie, J.-M. "Effects of the inhibition of gluconeogenesis on the arginine-induced insulin secretion." Physiol. Behav. 57 (4):797-802, 1994.
- 4- Tadjore, M., Trabelsi, F., Hélie, R., Bergeron, R. and Lavoie, J.M. "Effet d'une médullo-surrénalectomie sur la réponse hormonale induite par une vagotomie aiguë." Arch. Physiol. Biochem. 104 (1):1-6, 1996.
- 5- Tadjore, M., Bergeron, R., Latour, M.G., Désy, F., Warren, C. and Lavoie, J.M. "Effets of dietary manipulations and glucose infusion on glucagon response during exercise in rats." J.Appl.Physiol. 83:148-152, 1997

(b) Article accepté

- 1- Bergeron, R., Lavoie, J.-M., Cardin, S., Latour, M.G., Désy, F., Hélie, R. and Yamaguchi, N. "Effect of hepatic portal injection of ouabain on the hepato-adrenal reflex." Physiol. Behav. (nov. 1997)

(c) Articles soumis

- 1- Tadjore, M., Hélie, R., Bergeron, R., Trabelsi, F., Cardin, S., and Lavoie, J.M. "Effect of an acute hepatic vagotomy on hormonal responses in the rat following exercise." Int. J. Sports Med.
- 2- Bergeron, R., Latour, M.G., Désy, F. and Lavoie, J.M. "Hepatic portal infusion of insulin and feedback inhibition of insulin secretion in rats." Diabetologia
- 3- Bergeron, R., Oyarzun, M. and Lavoie, J.M. "Effect of chronic and acute hepatic portal vein fat infusion on insulin secretion and glucose metabolism in the rat." Metabolism.

(d) Articles en préparation

- 1- Bergeron, R. Kjær, M., Bülow, J., Rørdam, L., Skovgaard, D., Howlett, K. and Galbo, H. "Comparaison between the arterio-venous and the tracer dilution techniques for the measurement of hepatic glucose production during exercise in humans."

(e) Résumés publiés

- 1- Lavoie, J.-M., Bergeron, R., Cardin, S., Hélie, R. and Yamaguchi, N. "Evidence for a role of the sodium pump of hepatocytes in the sympatho-adrenal reflex". FASEB Journal, Abstracts part II, p. A616, 1993.
- 2- Lavoie, J.-M., Trabelsi, F., Hélie, R., et Bergeron, R. "Effet de l'inhibition de la néoglucogénèse sur la sécrétion de l'insuline induite par une injection d'arginine". Médecine Sciences, vol. 9 (suppl. 1): 114, 1993.
- 3- Bergeron, R., Latour, M.G., Van de Werve, G., Yamaguchi, N. and Lavoie, J.M. "Role of the liver in the autoregulation of insulin secretion in rats". FASEB Journal, Abstracts part I, p A152, 1995.
- 4- Bergeron, R., Latour, M.G., Van de Werve, G., Yamaguchi, N. and Lavoie, J.M. "Rôle du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline chez le rat." ACFAS, 63ième congrès, Annales de l'ACFAS, 63:132, 1995.
- 5- Tadjore, M., Latour, M., Warren, C., Bergeron, R. Désy, F. and Lavoie, J.M. "Effect of maintaining euglycemia on hormonal response during prolonged exercise in rats" Canadian Journal of Applied Physiology 20:S50, 1995.
- 6- Bergeron, R., Latour, M.G., Désy, F. and Lavoie, J.M. "Role of the liver in the autoregulation of insulin secretion in fasting rats". FASEB Journal, Abstracts, p. A460, 1996.
- 7- Latour, M.G. Bergeron, R. and Lavoie, J.M. "Effect of hepatic portal infusion of hypertonic saline on metabolic and hormonal responses during exercise". The Physiologist 39(5):A52, 1996.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**(a) Conférencier, communications libres**

- "Implication des pompes à sodium dans l'axe hépato-médullosurrénalien". Rencontre annuelle de l'Association Québécoise des Sciences de l'Activité Physique, (A.Q.S.A.P.), Sherbrooke, mars 1993.
- "Evidence for a role of the sodium pump of hepatocytes in the sympatho-adrenal response". Experimental Biology 93', FASEB, Nouvelle-Orléans, mars 1993.
- "Role of the liver in the autoregulation of insulin secretion in rats". Experimental Biology 95', FASEB, Atlanta, avril 1995.
- "Rôle du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline chez le rat". ACFAS 1995, Chicoutimi, mai 1995.
- "Rôle du foie dans l'autorégulation de la sécrétion de l'insuline chez le rat à jeun". AQSAP 1996, Trois-Rivières, mars 1996.
- "Role of the liver in the autoregulation of insulin secretion in fasting rats". Experimental Biology 96', FASEB, Washington, avril 1996.
- "Production de glucose et flux sanguin splanchnique durant l'exercice: le système rénine-angiotensine". A.Q.S.A.P., UQAM, Montréal, mars 1997.

(b) Co-conférencier, communications libres

- Lavoie, J.-M., Bolduc, L., Hélie, R., Bergeron, R., Lafond, S., Cardin, S., Trabelsi, F. and Yamaguchi, N. "Effect of inhibition of hepatic fatty acid oxydation on metabolic and hormonal responses to exercise in rats". A.C.A.P.S., Caen, octobre 1993.
- Lavoie, J.-M., Trabelsi, F., Hélie, R. et Bergeron, R. "Effet de l'inhibition de la néoglucogénèse sur la sécrétion de l'insuline induite par une injection d'arginine". Club de Recherches Cliniques du Québec (C.R.C.Q.), Pointe-au-pic, octobre 1993.
- Tadjore, M., Trabelsi, F., Hélie, R., Bergeron, R. et Lavoie, J.M. "Rôle afférent du foie dans la régulation des hormones pancréatiques: effets d'une médullo-surrénalectomie". A.Q.S.A.P., Ottawa, mars 1994.
- Lavoie, J.M., Tadjore, M., Hélie, R., Bergeron, R. et Trabelsi, F. "Effet combiné d'une vagotomie hépatique et de l'entraînement sur la tolérance au glucose". XIVème Congrès scientifique de la S.F.M.S. Lille, juin 1994.
- Tadjore, M., Latour, M., Warren, C., Bergeron, R., Désy, F. and Lavoie, J.M. "Effect of maintaining euglycemia on the hormonal responses during prolonged exercise in rats." CSEP annual scientific meeting, Québec, octobre 1995.
- Tadjore, M., Latour, M., Warren, C., Bergeron, R., Désy, F. and Lavoie, J.M. "Effet du maintien de la glycémie sur la réponse hormonale au cours d'un exercice prolongé chez le rat". Congrès ACAPS, Guadeloupe, novembre 1995.
- Latour, M.G., Bergeron, R. and Lavoie, J.M. "Effect of hepatic portal infusion of hypertonic saline on metabolic and hormonal responses during exercise". 1996 Intersociety conference: The integrative biology of exercise, Vancouver, octobre 1996.
- Kjaer, M., Bergeron, R., Bülow, J., Rørdam, L., Skovgaard, D., Howlett, K. and Galbo, H. "Splanchnic glucose production and blood flow during exercise: The renin-angiotensin system." ACSM annual meeting Denver CO, mai 1997.
- Ghanbari-Niaki, A., Bergeron, R., Latour, M.G. and Lavoie, J.M. "Effects of phosphate injection on liver ATP at rest and after exercise in rats. A.Q.S.A.P., UQAM, Montréal, mars 1997.
- Lavoie, J.M., Ghanbari-Niaki, A., Bergeron, R. and M.G. Latour. "Liver ATP at rest and after exercise: Effects of phosphate injection" Liver Innervation Symposium, Freiburg, Allemagne, octobre 1997.

Expériences pertinentes

- 1996 Stage de formation (4 mois) - Panum Institute, Copenhagen University, Directeur de travaux/Supervisor: Dr. Michaël Kjaer
- 1994-1997 Traducteur français - Société Canadienne de Physiologie de l'Exercice / Canadian Society for Exercise Physiology
- 1995 Visite de formation - Laboratoire du Dr. Larry L. Bellinger, Baylor College of Dentistry, Dallas TX
- 1994-95 Président - Association des Étudiants aux Cycles Supérieurs du Département d'Éducation Physique de l'Université de Montréal
- 1994-95 Organisateur des séminaires scientifiques: Vingt et un séminaires par des conférenciers locaux et internationaux
- 1994-95 Fondateur - "Fonds de Dépannage" du Fonds d'Investissement des Cycles Supérieurs de l'Université de Montréal
- 1994 Chargé de cours - Physiologie de l'exercice I - Département d'Éducation physique, Université de Montréal
- 1993-94 Vice-président - Association des Étudiants aux Cycles Supérieurs du Département d'Éducation Physique de l'Université de Montréal.