

Université de Montréal

**Étude de la production de glucose hépatique induite par une
hyperglucagonémie : effet de l'exercice chez le rat.**

Par

Victoria Matas Bonjorn

Département de Kinésiologie

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science en Sciences de l'Activité Physique (M.Sc.)**

Octobre de 2000

© Victoria Matas Bonjorn, 2000



Étude de la production de glucose hépatique induite par une
l'hyperglycémie : effet de l'exercice chez le rat.

Par

Victor N. B. B. B.

Département de Médecine

201

1154

2001

N. 011

13 Octobre 2001

© Victor N. B. B. B. 2001



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :
Étude de la production de glucose hépatique induite par une
hyperglucagonémie : effet de l'exercice chez le rat.

Présenté par
Victoria Matas Bonjorn

Département de kinésiologie
a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Phillip Gardiner, Ph.D.

Directeur de recherche : Jean-Marc Lavoie, Ph.D.

Membre du jury : François Péronnet, Ph.D.

Mémoire accepté le : _____

Sommaire

La production de glucose par le foie varie en fonction de différents facteurs. Si au fil des années plusieurs auteurs ont étudié différemment cette question, les niveaux supra-normaux de la réserve de glycogène hépatique et la sensibilisation de l'exercice n'ont jamais été abordés. Dans ce travail nous avons manipulé trois variables : la diète, l'exercice et le taux de glucagon plasmatique.

Le but de notre étude était d'évaluer la réponse du foie à une infusion prolongée de glucagon à la suite de différentes manipulations métaboliques, soit la surcompensation alimentaire et la réalisation d'une activité physique aiguë.

Au total, 45 rats Sprague-Dawley ont été soumis à un protocole d'adaptation à l'exercice pendant 8 jours et par la suite ont été distribués de façon aléatoire dans un des cinq groupes expérimentaux : contrôle (normalement nourris), surcompensé (jeûne de 24 heures suivi de nourriture à volonté), demi-jeûne (ingestion alimentaire réduite à la moitié pendant les 24 dernières heures), exercice (course d'une heure sur tapis roulant juste avant de commencer l'expérimentation) et surcompensé-exercice. Des canules placées dans la veine jugulaire et l'artère carotide des rats anesthésiés nous ont permis de prélever du sang et d'infuser du glucose marqué ($3\text{-}^3\text{H}$ Gluc), du glucagon et du plasma de façon simultanée.

Suivant la méthode classique utilisée pour la mesure de la production de glucose hépatique dans ces circonstances, celle de Steele à un seul compartiment (Steele, 1959), des analyses ont été conduites afin de déterminer les taux d'apparition et de disparition de ce substrat dans le sang. Parallèlement, le glycogène hépatique et musculaire ainsi que le glucagon, l'insuline et le glucose plasmatiques ont été mesurés.

Une augmentation du glucagon a été observée dans tous les groupes expérimentaux, arrivant dans tous les cas à des valeurs supra-normales. Le taux de production de glucose hépatique est aussi augmenté, toutefois sa cinétique est différente pour chaque groupe expérimental.

Des taux d'apparition de glucose dans le sang plus élevés chez le groupe exercice et surcompensé-exercice suggèrent que la réalisation d'une activité physique aiguë augmente la sensibilité du foie au glucagon à court terme (dans les 10-20 premières minutes). Par ailleurs, l'absence d'un R_a ou taux d'apparition du glucose plus élevé chez le groupe surcompensé par rapport au groupe contrôle indique que le niveau accru de glycogène hépatique n'influence pas à court terme la production endogène de glucose. Il est toutefois intrigant de constater que la glycémie est maintenue à un niveau plus élevé chez le groupe surcompensé. Il est donc possible que l'utilisation périphérique de glucose soit réduite par la diète de surcompensation. Enfin, la présence de glycogène devient essentielle pour minimiser l'effet évanescent du glucagon.

Table des Matières

SOMMAIRE	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XI
DÉDICACE	XII
REMERCIEMENTS	XIII
CHAPITRE 1 – REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. PRODUCTION DE GLUCOSE : GÉNÉRALITÉS.	1
2. MESURE DE LA PRODUCTION DE GLUCOSE HÉPATIQUE.....	3
3. LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION DE GLUCOSE HÉPATIQUE	18
3.1. LA GLYCÉMIE COMME FACTEUR RÉGULATEUR DE LA PGH	20
3.2. LE GLUCAGON COMME FACTEUR RÉGULATEUR DE LA PGH	21
3.3. L'INSULINE COMME FACTEUR RÉGULATEUR DE LA PGH	23
3.4. LES CATÉCHOLAMINES COMME FACTEURS RÉGULATEURS DE LA PGH	24
3.5. AUTRES FACTEURS RÉGULATEURS DE LA PGH.....	24

4. RÔLES ET ACTIONS DU GLUCAGON PANCRÉATIQUE.....	27
4.1. LA SÉCRÉTION DES HORMONES PANCRÉATIQUES.....	27
4.1.1. LA SÉCRÉTION D'INSULINE.....	29
4.1.2. LA SÉCRÉTION DE GLUCAGON.....	31
4.2. LES EFFETS DU GLUCAGON SUR LA PRODUCTION DE GLUCOSE HÉPATIQUE...33	
4.3. LES EFFETS DU GLUCAGON SUR L'UTILISATION DE GLUCOSE.....37	
4.4. DIFFÉRENCES ENTRE UNE INJECTION ET UNE INFUSION DE GLUCAGON.38	

CHAPITRE 2 – INTERACTIONS OF INITIAL HEPATIC GLYCOGEN

CONTENT AND PRIOR EXERCISE ON HYPERGLUCAGONEMIA-INDUCED

HEPATIC GLUCOSE PRODUCTION.....	41
SUMMARY	43
1. INTRODUCTION.....	44
2. METHODS	46
3. RESULTS	51
4. DISCUSSION	55
LEGENDS	64
REFERENCES.....	66

CHAPITRE 3 – DISCUSSION	77
1. LE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE ET MUSCULAIRE	77
2. LE TAUX DE GLUCOSE PLASMATIQUE	79
3. LA PRODUCTION DE GLUCOSE HÉPATIQUE	80
4. L'UTILISATION DE GLUCOSE	82
5. LE GLUCAGON ET L'INSULINE PLASMATIQUES	83
CHAPITRE 4 – OUVRAGES DE RÉFÉRENCES	86

Liste des figures

Figures du chapitre 1

Figure 1.	Taux de renouvellement du glucose dans le sang	2
Figure 2.	Représentation graphique du modèle à un compartiment	6
Figure 3.	Représentation graphique du modèle à deux compartiments.....	13
Figure 4.	Représentation graphique du modèle de dispersion.....	16
Figure 5.	Facteurs influençant la production de glucose hépatique. SNA : activité nerveuse sympathique (Kjaer, 1998).....	19
Figure 6.	Représentation schématique d'un îlot de Langerhans montrant la distribution des cellules sécrétant du glucagon, de la somatostatine et de l'insuline. Les types de cellules pour lesquelles les fonctions n'ont pas été établies ont été omises du dessin (Unger <i>et al.</i> 1976).....	28

Figures du chapitre 2

- Figure 1. Liver glycogen concentrations (A) before and after the infusion of glucagon and decreases (B) following the infusion of glucagon in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from all other groups, $P < 0.01$; + significantly different from the corresponding pre-infusion condition, $P < 0.01$; * significantly different from the Exercise group, $P < 0.05$ 71
- Figure 2. Plasma glucose concentrations (A) and total area under glucose concentration curves (times 0-10, 30-60, and 0-60 min; B,C,D) before and during the glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups (< 0.01), * $P < 0.05$ 72
- Figure 3. Glucose production (A) and total area under glucose production rate curves (times 0-10, 30-60, and 0-60min; B,C,D) before and during glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups ($P < 0.01$), * $P < 0.05$ 73

- Figure 4. Blood glucose utilization (A) and total area under glucose utilization rate curves (times 0-10, 30-60, and 0-60 min) before and during glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups (P < 0.01), * P < 0.05.74
- Figure 5. Total areas under glucose (A), glucose production (B), and glucose utilization (C) curves per 10 min intervals in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; * significantly different from the respective 0-10 min interval, P < 0.05; + significantly different from the respective 50-60 min interval, P < 0.05.75
- Figure 6. Plasma glucagon (A) and insulin (A) concentrations and total area under glucagon and insulin concentration curves before and after the infusion of glucagon and muscle (soleus) glycogen concentrations (C) measured at the end of the experiment in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups (P < 0.01), * P < 0.05; + significantly different from overloaded, overloaded + exercise, and 1/2-fast, P < 0.05; β significantly different from overloaded and overloaded-exercise at the 60-min time period, P < 0.05.76

Liste des sigles et abréviations

AGL : Acides gras libres

HGP : Hepatic glucose production

PGH : Production de glucose hépatique

Ra : Rate of appearance – Taux d'apparition

Rd : Rate of disappearance – Taux de disparition

Dédicace

Aquesta memoria us la dedico especialment a vosaltres, Papà i Mamà, per valorar-me i estimar-me tal com sóc, per recolzar-me i per ajudar-me a assolir tot el què sempre m'he proposat, fins i tot quan per vosaltres no era fàcil d'entendre.

À toi, Pierre-Pascal, que tu vas rester toujours dans mon cœur.

I a tu Carola, per no deixar-me mai i estimar-me com a la teva pròpia germana.

Remerciements

Je remercie très spécialement mon directeur de recherche, le Dr Jean Marc Lavoie, qui en me dirigeant dans ce travail, m'a permis non seulement d'approfondir un domaine qui m'était auparavant inconnu, mais aussi de jouir de ce beau pays qu'est le Canada et particulièrement le Québec.

Je tiens à remercier tous les copains et copines qui m'ont accompagné et guidé jour après jour, ne daignant pas d'interrompre leurs occupations pour me donner un coup de pouce en faisant toujours preuve de patience à mon égard. Merci Dr. Martin Latour, Patrice Bélanger, Karine Légendre et Karine Couturier.

J'adresse aussi ma reconnaissance aux gens qui ont permis cette recherche par leur appui technique.

Je veux remercier de façon très spéciale toutes les personnes qui de façon directe ou indirecte m'ont aidé pendant mon travail.

A tota la meva família, que esteu sempre al meu costat per tot el què cal i més. Moltes gràcies Papà, Mamà, Lolita, Pipo i Quique perquè amb el vostre carinyo heu fet més suportable aquest temps lluny vostre.

Merci beaucoup à toi, Pierre-Pascal, parce que tu m'as montré une vie différente et tu m'as ouvert les yeux dans les meilleurs et dans les pires moments. Tu m'as écouté et conseillé lorsque j'en avais besoin et tu as toujours été à côté de moi. Sans toi, je n'aurais jamais pu faire ce travail.

Carola, la meva millor i fidel amiga per la que mai tindré prou paraules d'agraïment. Moltíssimes gràcies per recolzar-me incondicionalment i oferir-me els teus valiosos consells en tot moment.

Marie, je n'oublierai jamais l'important soutien que tu m'as offert. En toi j'ai trouvé une belle et gentille amie en qui je peux toujours faire confiance. Chantal, mon amie du NB, qu'avec ton accent et tes histoires sans fin, tu as toujours été capable de me tirer un sourire.

Moltes gràcies també a tots els amics que d'alguna o altra manera m'heu ajudat en la distància: Noemí, Vanesa, Pili, Ignacio i Míriam.

Dicen que "el que la sigue la consigue", con la ayuda de todos vosotros, yo he podido seguir y ahora, por fin, lo consigo.

Muchas, muchísimas gracias a todos. ¡Nunca os olvidaré!

Chapitre 1 – Revue de Littérature

1. Production de glucose : généralités.

Les hydrates de carbone sont une importante source d'énergie pour l'organisme. Le glucose, le galactose et le fructose sont les produits finaux de la digestion des hydrates de carbone dans le tube digestif. Après l'absorption intestinale, la plupart du galactose et du fructose sont transformés en glucose par le foie. Le glucose représente donc de 90% à 95% de tous les monosaccharides circulants dans le sang (Guyton, 1994).

Le glucose peut aussi être fourni de façon endogène : les cellules hépatiques assurent la production de glucose par les processus de néoglucogenèse (formation de glucose à partir d'acides aminés) et de glycogénolyse (formation du glucose à partir du glycogène emmagasiné). La quantité de glucose mise en circulation par le foie est semblable à celle pouvant être absorbée par les tissus. Ceci permet de maintenir l'homéostasie du glucose en tout temps, soit au repos, après un repas, durant la réalisation d'une activité physique, en post-exercice et autres (Guyton, 1994).

Le taux d'apparition ("rate of appearance" ou Ra) est généralement utilisé pour désigner la quantité d'un métabolite entrant dans le sang ou dans une autre partie de l'organisme. D'autre part, le taux de disparition ("rate of disappearance" ou Rd) fait référence à la quantité de métabolite disparaissant de la circulation, soit pour être utilisé par une cellule ou pour être éliminé (Hetenyi *et al.* 1983). (Figure 1). Le taux de renouvellement du glucose tient compte de la quantité de glucose entrant et sortant de la circulation sanguine.

Par ailleurs, suite à un jeûne ou à un effort physique, le taux d'apparition du glucose dans le sang correspond précisément à la production de glucose hépatique.

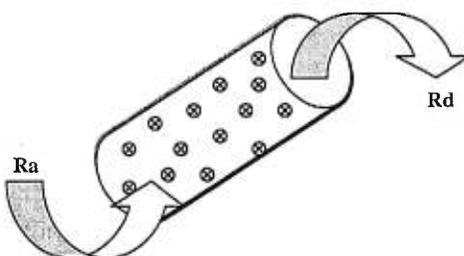


Figure 1. Taux de renouvellement du glucose dans le sang.

2. Mesure de la production de glucose hépatique

Pour mesurer la production de glucose hépatique *in vivo*, des substances marquées, radioactives ou non (isotopes stables) sont souvent injectées de façon intraveineuse. Les "méthodes de traçage" fournissent de l'information sur les niveaux de production et d'utilisation de la substance étudiée ainsi que de sa distribution dans l'organisme (Hetenyi *et al.* 1983). Il s'agit d'une procédure relativement non invasive, donc applicable à des animaux éveillés et même à des humains.

La substance marquée ne doit pas endommager l'organisme de l'individu. Cependant, elle doit se comporter de façon physiologiquement identique à la substance étudiée et être facilement détectable à de faibles concentrations.

Les isotopes plus communément utilisés pour mesurer la production de glucose hépatique sont le [^{14}C]glucose (Steele, 1959), le [$2\text{-}^3\text{H}$]glucose, le [$6\text{-}^3\text{H}$]glucose (Radziuk *et al.* 1978), le [$3\text{-}^3\text{H}$]glucose (Chiasson *et al.* 1977 ; Vissing *et al.* 1988 et 1989 ; Molina *et al.* 1990 ; Bergeron *et al.* 1999) et le D-[$2,3,4,6,6\text{-}^2\text{H}$]glucose (Lavoie *et al.* 1997 A). Il est important de bien connaître les caractéristiques propres de chacun, car certaines différences existent entre eux. À titre d'exemple, le taux d'apparition mesuré en état stable à partir du [$2\text{-}^3\text{H}$]glucose est significativement plus élevé que celui mesuré avec le [^{14}C]glucose ou le [$6\text{-}^3\text{H}$]glucose (Radziuk *et al.* 1978), car le [$2\text{-}^3\text{H}$]glucose

mesure le taux de déphosphorilation du glucose-6-phosphate plutôt que la production nette de glucose (Katz *et al.* 1967).

Plusieurs relations mathématiques permettent de quantifier la production de glucose par le foie. Elles sont basées sur les différents modèles représentant l'espace glucose, c'est-à-dire l'espace virtuel que le glucose occupe dans l'organisme. En effet, le glucose est réparti parmi différentes régions de l'organisme anatomiquement bien définies, soit les fluides vasculaire, interstitiel et intracellulaire, malgré que dans celui-ci on retrouve des très petites quantités, car il est vite phosphorylé (Radziuk *et al.* 1978).

L'espace glucose est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Espace glucose (\%)} = \frac{\text{quantité de glucose (g)} / [\text{glucose}]_{\text{artériel}} \text{ (g/L)}}{\text{masse corporelle (kg)}} \quad \text{Équation 1.}$$

L'espace glucose est souvent exprimé en pourcentage de la masse corporelle. Chez l'humain, cet espace est d'environ 20% mais il change pour chaque espèce animale. Par exemple, il est entre 65% et 75% chez le rat (Hetenyi *et al.* 1983).

Divers modèles ont été proposés pour illustrer l'espace glucose :

- le modèle à un compartiment ;
- le modèle à plusieurs compartiments ; et
- le modèle de dispersion.

Ces derniers ont tous en commun les hypothèses suivantes :

- a) les comportements physique et chimique de la substance marquée (injectée ou infusée) et de la substance "naturelle" sont les mêmes ;
- b) les variations du taux d'apparition sont plus lentes que le temps de mélange dans la région ou le compartiment où le traceur et la molécule tracée apparaissent ;
- c) les échantillons sont prélevés du site où le traceur et la molécule tracée se mélangent adéquatement ;
- d) les paramètres dépendants du temps ou des concentrations sont restreints à une seule quantité représentant la fraction de disparition (R_d).

Le but de ces modèles n'est pas de décrire en détail le comportement d'une substance dans le corps, mais plutôt de fournir une base empirique pour le calcul du taux de renouvellement de la substance étudiée dans le système (Radziuk *et al.* 1978).

Modèle à un compartiment (Figure 2)

Selon ce modèle, l'espace glucose se limite à un compartiment unique. Malheureusement, la réalité physiologique indique que le glucose ne se distribue pas de cette façon, ce qui a conduit Steele à proposer le concept de "pool fraction" (p) ou d'espace d'échange rapide. Cet espace d'échange rapide représente la fraction (p) du volume de distribution total du glucose (V) dans l'organisme agissant comme un seul compartiment et est une constante empirique variant normalement entre 50% et 75% de V (Cowan *et al.* 1969; Norwich *et al.* 1974; Radziuk *et al.* 1974 et 1978; Steele 1959).

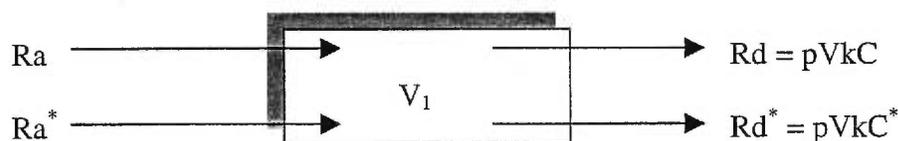


Figure 2. Représentation graphique du modèle à un compartiment.

Tout le glucose (marqué et non marqué) est distribué de façon uniforme à l'intérieur de ce volume effectif, d'où sont prélevés les échantillons servant à la mesure de l'activité spécifique et de la concentration.

Le facteur pV le plus fréquemment utilisé oscille entre 100 et 187.5 mL/kg, mais il peut varier de valeurs négatives jusqu'à des valeurs dépassant la quantité totale d'eau corporelle. De plus, il change en fonction du temps. Puisque le taux d'apparition de glucose est inconnu, la valeur exacte de pV est aussi inconnue. Les taux d'apparition (R_a) et de disparition (R_d) dépendent directement du facteur pV assumé, spécialement lorsque l'activité spécifique et la concentration de glucose changent rapidement en fonction du temps. En conséquence, le taux de changement de ces deux variables doit être minimisé afin de réduire le degré d'erreur.

Lorsque l'organisme se trouve dans un état stable, l'activité spécifique et la concentration de glucose sont constantes. À ce moment, le taux d'apparition du glucose dans le sang est identique au taux de disparition :

$$R_a = R_d \qquad \text{Équation 2.}$$

La production de glucose hépatique est alors calculée au moyen de l'équation de Steele pour l'état stable (1959) :

$$R_a = \frac{F}{AS} \qquad \text{Équation 3.}$$

où :

Ra est le taux d'apparition du glucose dans le sang (mg/min.)

F est le flux de glucose marqué infusé (dpm/min.)

AS est l'activité spécifique du glucose, calculée à partir de la concentration du traceur (dpm/mL ou cpm/mL) et du glucose total (mg/mL) :

$$AS = \frac{[\text{marqueur}]}{[\text{glucose}]} \quad \text{Équation 4.}$$

Pour atteindre l'équilibre nécessaire à l'application de l'équation de Steele à l'état stable, une infusion constante de glucose marqué est administrée. Par la suite, un délai est nécessaire en vue d'obtenir une distribution homogène des substrats dans le corps. Ce processus peut se prolonger sur plusieurs heures. Néanmoins, l'injection préalable d'un bolus de glucose à une concentration plus élevée et sur une période plus courte peut réduire ce délai (Drouin *et al.* 1998; Lavoie *et al.* 1997 A; Vissing *et al.* 1988).

Cependant, plusieurs situations telles qu'un exercice physique ou une infusion intraveineuse de glucose ou de glucagon, amènent l'organisme à un état non stable où la production et l'utilisation de glucose sont différentes. Dans cette situation, certaines modifications s'appliquent aux équations de Steele afin de

mesurer le taux d'apparition du glucose ainsi que le taux de disparition pour chaque intervalle de temps :

$$Ra = \frac{[F - pV(C_2 + C_1)/2][(AS_2 - AS_1)/(t_2 - t_1)]}{(AS_2 + AS_1/2)} \quad \text{Équation 5.}$$

$$Rd = Ra - pV(C_2 + C_1)/(t_2 - t_1) \quad \text{Équation 6.}$$

Dans les équations précédentes :

Ra est le taux d'apparition du glucose (mg/kg/min.)

F est le taux d'infusion du glucose marqué (Bq/min.)

p est le "pool fraction"¹, dont la valeur plus souvent utilisée est 0.65

V est le volume total de distribution du glucose, assumé à 250 mL/kg

C est la concentration de glucose plasmatique (mg/100mL)

AS est l'activité spécifique obtenue du ratio du glucose marqué sur le glucose non marqué (Bq/mg)

t est le temps (min.)

¹ Définition fournie à la page 6.

Une faible valeur du deuxième terme de l'équation de Steele (Équation 5) cause un taux d'apparition calculé semblable au taux d'infusion de glucose marqué. Il est donc important d'éviter des changements abrupts dans le taux d'infusion, car ceci peut introduire des variations non physiologiques dans le taux d'apparition. Un taux d'infusion plus élevé de la molécule marquée au début d'une perturbation physiologique, comme la réalisation d'un exercice physique ou une infusion de glucagon, permet de s'approcher aux valeurs obtenues par l'augmentation du taux d'apparition du glucose. De cette façon, les variations de la concentration et de l'activité spécifique du glucose lors de ces intervalles sont moins importantes.

Ce modèle est limité par le fait que les échantillons sont prélevés à des intervalles discrets, contrairement au phénomène, qui lui est continu. En effet, l'activité spécifique du glucose (AS) ainsi que les concentrations totales de marqueur et de molécule marquée (C) varient de façon continue en fonction du temps. L'augmentation de la fréquence de prélèvement des échantillons ne minimise pourtant pas l'erreur, mais plutôt inversement puisque l'augmentation d'échantillons accentue l'effet des erreurs analytiques lors de la détermination de l'activité spécifique et de la concentration de la molécule marquée. La solution proposée est de réaliser un lissage ("smooth") autant de l'activité spécifique que des concentrations afin d'obtenir la dérivée de ces variables par rapport au temps. De cette façon, il est possible de calculer des taux d'apparition (R_a) et de disparition (R_d) du glucose en tant que fonction continue. Différentes approches ont été proposées, comme le calcul de la moyenne sur plusieurs points, le dessin

des segments optimaux ou le lissage à partir de courbes polynomiales ou autres fonctions s'accordant le mieux aux valeurs obtenues lors de l'expérimentation. D'un autre côté, alors qu'il est possible de réduire les changements de la concentration de glucose (C), on peut souvent moins modifier l'activité spécifique (AS), laquelle a un plus grand impact sur le calcul du taux de disparition.

Dans notre étude, nous avons utilisé la méthode à un seul compartiment pour calculer la production de glucose par le foie, car une infusion stable de glucose exogène nous a permis d'atteindre l'équilibre nécessaire pour son application. Un bolus de 4.95 mL/h de glucose marqué ($3\text{-}^3\text{H}$ -Glucose), correspondant à la quantité de 1480 KBq/mL de glucose, a été infusé pendant 60 secondes afin de réduire le délais. Puis, une infusion de stabilisation de 0.14 mL/h de $3\text{-}^3\text{H}$ -Glucose (3453 Bq/min.) a été administrée tout au long de 75 minutes. Par après, l'infusion a été augmentée à 0.25 mL/h (6167 Bq/min.) pour les dernières 60 minutes afin de maintenir des valeurs constantes d'activité spécifique. Nos animaux ont réalisé de l'exercice physique et ont subi des manipulations diététiques. Les équations 5 et 6 ont donc été utilisées pour la mesure respective du R_a et du R_d .

Les limites du modèle proposé par Steele tiennent à la trop grande simplification du système du glucose. Un modèle plus réaliste est le modèle à plusieurs compartiments proposant des estimations des taux d'apparition (R_a) et de disparition (R_d) plus exactes. Par contre, les informations disponibles sont souvent

insuffisantes sous certaines conditions physiologiques, tel que la grandeur de l'espace d'échange, les coefficients d'échange, etc.

Modèle à plusieurs compartiments (Figure 3)

Lorsque l'organisme se trouve dans un état non stable, des changements rapides ont lieu et le modèle à un seul compartiment ne peut plus les représenter (Radziuk *et al.* 1978). Afin de les représenter, un espace d'échange rapide variant avec le temps a été suggéré par Issekutz *et al.* (1974) : c'est le modèle à plusieurs compartiments. Toutes les méthodes illustrant le système du glucose avec divers compartiments reproduisent les différents taux d'infusion en fonction du temps avec seulement 10% d'erreur (Radziuk *et al.* 1978). Récemment, le système d'équations différentielles nécessaire pour calculer le taux d'apparition du glucose avec un modèle compartimental a été lissé de façon à ce qu'il puisse être traité par ordinateur.

Après un bolus de glucose marqué, la diminution de l'activité spécifique dans le plasma peut être décrite mathématiquement par plusieurs termes exponentiels. Chacun d'eux correspond à un compartiment. Pour le glucose, la chute de l'activité spécifique après l'injection de glucose marqué requiert deux ou trois termes exponentiels, représentant deux ou trois compartiments.

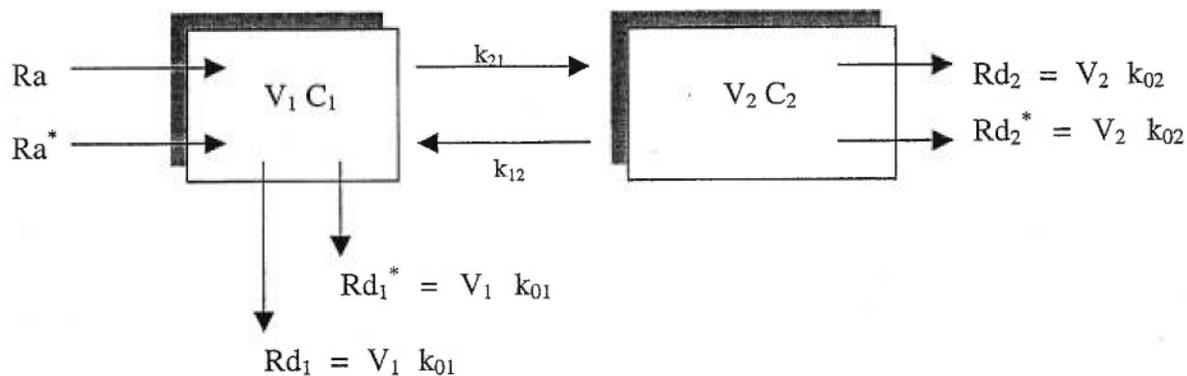


Figure 3. Représentation graphique du modèle à deux compartiments.

Les équations décrivant ce modèle sont:

$$\frac{dC_1}{dt} = -(k_{01} + k_{21})C_1 + k_{12}C_2 + \frac{Ra}{V_1} \quad \text{Équation 7.}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = k_{21}C_1 - (k_{02} + k_{12})C_2 \quad \text{Équation 8.}$$

où :

C_1 et C_2 sont les concentrations de glucose dans le premier et deuxième compartiments respectivement (mg/100 mL)

k_{01} et k_{02} sont les taux de disparition dépendant du temps (min.^{-1})

k_{12} et k_{21} sont les coefficients d'échange entre les deux compartiments (min.^{-1})

V_1 est le volume du premier compartiment (mL)

R_a est le taux d'apparition (mg/min.)

Pour le modèle à deux compartiments utilisé par Radziuk *et al.* (1978), afin de valider la technique de mesure de la production de glucose hépatique, deux hypothèses sont nécessaires :

- a) le premier compartiment correspond à l'espace vasculaire. Il s'agit du site où le glucose et le marqueur apparaissent et où les concentrations de chacun sont déterminées ;
- b) les changements de la concentration de glucose influencent surtout le taux de disparition (R_d) de celui-ci. C'est pourquoi, les coefficients d'échange entre les deux compartiments (k_{12} et k_{21}) sont assumés constants. Par contre, le taux de disparition du glucose dépendant du temps (k_{01} et k_{02}) peut être mesuré dans les deux sens :
 - si R_d n'a lieu que dans le premier compartiment, alors $k_{02} = 0$.

- si Rd a lieu dans les deux compartiments, la fraction dans chacun est assumée égale ; donc $k_{01} = k_{02}$.

De plus, l'utilisation de cette méthode implique l'estimation de certains paramètres comme le volume du premier compartiment (V_1) et les coefficients d'échange entre les deux compartiments (k_{12} et k_{21}). Ces mesures s'obtiennent à partir des concentrations du glucose marqué avant de commencer une expérimentation en état non stable, soit tout de suite après l'injection du traceur ou pendant une infusion constante.

Les principales limites des modèles à plusieurs compartiments ont rapport avec l'identité mathématique et physiologique. En effet, il est possible de structurer un modèle capable d'expliquer la décroissance de l'activité spécifique (AS) du marqueur dans le plasma, mais celui-ci peut demeurer irrésolu à cause d'informations inadéquates, comme par exemple trop d'inconnus ou pas assez d'équations. Pour résoudre ces difficultés, il est souvent nécessaire de simplifier en faisant de nouvelles hypothèses ou en obtenant des mesures supplémentaires à partir d'autres compartiments que le plasma.

Modèle de dispersion (Figure 4)

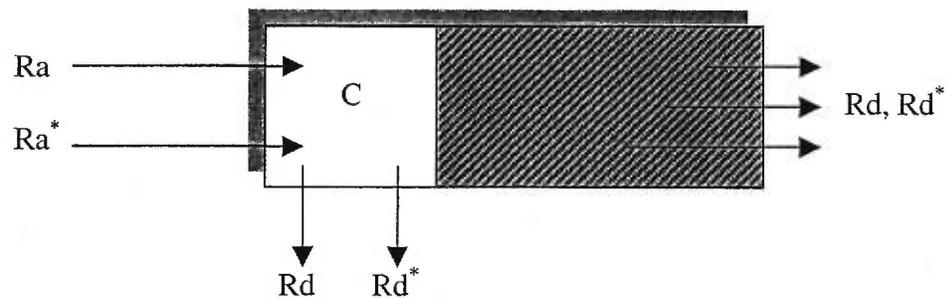


Figure 4. Représentation graphique du modèle de dispersion.

Le modèle de dispersion, ou "méthode d'impulsion-réponse", nécessite moins de connaissances structurelles sur le système du glucose. Il peut s'agir d'un ensemble de compartiments ou tout simplement d'une région où la dispersion est possible par des mécanismes de diffusion et de convection (Radziuk *et al.* 1978).

Plusieurs hypothèses sont nécessaires lors de l'utilisation de ce modèle :

- a) le glucose et la molécule marquée sont mélangés dans une région spécifique et accessible pour le prélèvement des échantillons ;
- b) la molécule ne se distribue pas nécessairement de façon uniforme dans la deuxième région. Le glucose marqué et non marqué disparaissent par cette région ;

- c) lors d'une expérimentation en état instable, les différents taux de disparition augmentent de façon égale dans l'ensemble du système, même si les niveaux de base peuvent différer entre les régions ou encore pour chaque point dans l'espace.

Ce système est le plus général pour la mesure du taux d'apparition du glucose puisqu'il peut directement être mesuré à partir de l'expérimentation (Radziuk *et al.* 1978). Les formules utilisées dans ce cas sont très complexes.

3. La régulation de la production de glucose hépatique

La production de glucose par le foie est régulée par divers paramètres, tels que la glycémie (Lavoie *et al.* 1997 A; Dobbins *et al.* 1998; Drouin *et al.* 1998) et certains signaux neuro-hormonaux (Drouin *et al.* 1998, Lavoie *et al.* 1997 A; Kjaer *et al.* 1993; Kjaer 1998). Dans la figure 5, les principaux facteurs influençant la production hépatique de glucose sont représentés.

L'exercice physique affecte tous ces facteurs. En effet, la glycémie (Lavoie *et al.* 1997 A), les niveaux de glucagon (Dobbins *et al.* 1998; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A; Fell *et al.* 1980; Conlee *et al.* 1978) et les taux de catécholamines (Lavoie *et al.* 1997 A; Wasserman 1995; Fell *et al.* 1980; Conlee *et al.* 1978; Kjaer *et al.* 1993) sont augmentés, alors que les concentrations plasmatiques d'insuline sont diminuées (Fell *et al.* 1980; Conlee *et al.* 1978). De cette façon, l'exercice physique augmente la production de glucose hépatique. Cette augmentation est plus importante lors des 30 à 60 premières minutes d'exercice (Shoemaker *et al.* 1959). Par exemple, Lavoie *et al.* 1997 (A) rapportent des valeurs chez l'humain de $27.6 \pm 1.4 \mu\text{mol/kg/min.}$ suite à un exercice aigu maintenu à 40% du $\text{VO}_2\text{max.}$ Les valeurs de repos étaient de $12.1 \pm 0.2 \mu\text{mol/kg/min.}$, soit deux fois plus basses.

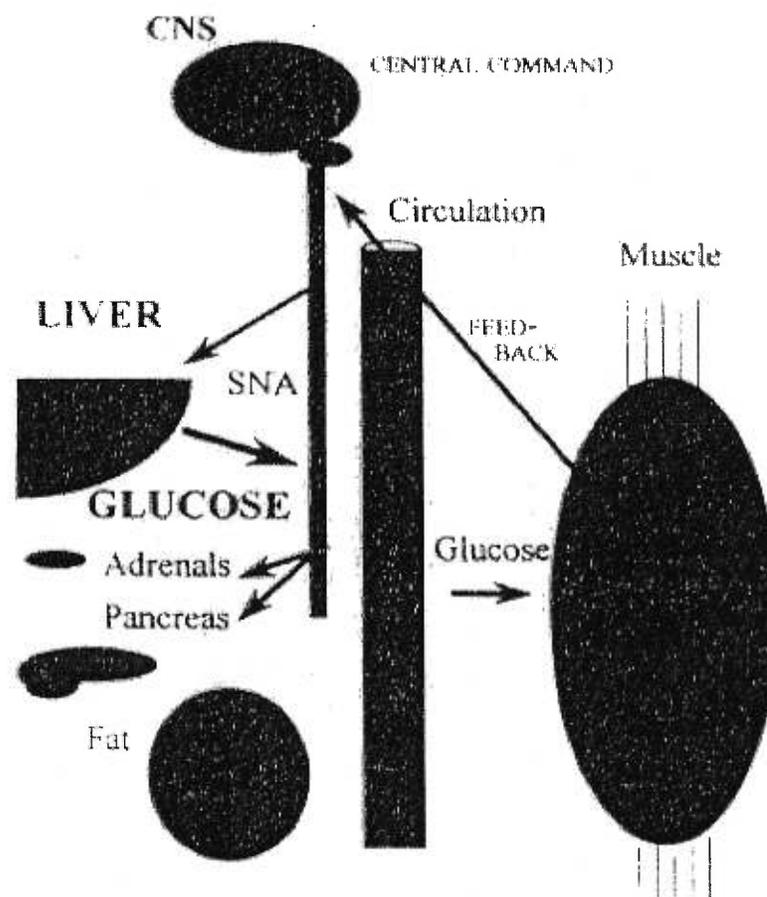


Figure 5. Facteurs influençant la production de glucose hépatique. SNA : activité nerveuse sympathique (Kjaer, 1998).

3.1. La glycémie comme facteur régulateur de la production de glucose

La glycémie ou taux de glucose dans le sang est une constante biologique. Cependant, on verra à continuation que certaines situations peuvent modifier l'homéostasie de glucose provoquant de l'hypoglycémie ou de l'hyperglycémie

Pendant la réalisation d'un exercice physique d'intensité modérée, les hydrates de carbone sont une source d'énergie essentielle. Dans cette situation, si du glucose n'est pas ingéré auparavant, le foie devient la seule source de libération de glucose (Bonen *et al.* 1998; Drouin *et al.* 1998; Vissing *et al.* 1989). Effectivement, l'équilibre entre la production et l'utilisation de glucose est d'abord assuré autant par l'augmentation de la glycogénolyse et que de la néoglucogenèse. Lorsque l'exercice se prolonge plus de deux heures, est principalement la néoglucogenèse qui assure cette stabilité (Lavoie *et al.* 1997 A; Donovan *et al.* 1997; Drouin *et al.* 1998; Kjaer 1998).

Certains auteurs ont rapporté une hypoglycémie suite à la réalisation d'une activité physique soutenue sur une longue période (Donovan *et al.* 1997). L'incapacité de produire assez de glucose pour répondre aux besoins musculaires pourrait être due à cette hypoglycémie (Donovan *et al.* 1997). L'augmentation de la production de glucose chez les sujets entraînés est donc essentielle pour éviter la diminution du taux de glucose plasmatique (Donovan *et al.* 1997).

Lors des études avec des clamps de glucose, Sheu *et al.* (1990) ont mis en évidence que la production de glucose hépatique peut être aussi régulée par les différents taux d'infusion de glucose exogène. Les niveaux de base de la production de glucose sont directement influencés par l'hyperglycémie : Dobbins *et al.* ont montré en 1998 que 40% de la diminution de la production de glucose est due à la diminution de la glycémie ; les 60% restant sont due à la désensibilisation hépatique aux effets du glucagon sur la glycogénolyse. L'absence de glucagon réduit donc la production de glucose hépatique (Lavoie *et al.* 1997 A).

3.2. Le glucagon comme facteur régulateur de la production de glucose

Des niveaux élevés de glucagon sont essentiels pour l'accroissement de la production de glucose hépatique lors d'un exercice physique (Dobbins *et al.* 1998; Wasserman 1995; Kjaer 1998; Lavoie *et al.* 1997 A). Au contraire, en manque de glucagon, la néoglucogenèse et la glycogénolyse n'augmentent pas (Lavoie *et al.* 1997 A).

Dans un premier temps, le glucagon stimule le processus de glycogénolyse. Ce n'est qu'après un certain délais (1 heure) qu'il devient responsable de l'augmentation de l'efficacité de la néoglucogenèse. Quand une diminution du taux de glucagon survient, le niveau de dégradation de glycogène diminue (Cherrington, 1998). La glycogénolyse est directement reliée au contenu de glycogène hépatique pendant l'exercice (Vissing *et al.* 1989). L'effet évanescent de

la production de glucose hépatique est dû à la glycogénolyse pendant les 15 premières minutes. Par après, la néoglucogenèse en prend la responsabilité (Cherrington, 1998).

Le glucagon et l'exercice sont les plus puissants stimulants de la néoglucogenèse dans le foie (Drouin *et al.* 1998). L'augmentation de glucagon induite par l'exercice est importante pour l'extraction des précurseurs néoglucogéniques et pour la conversion d'alanine en glucose dans le foie (Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A). Les principaux précurseurs sont le lactate, le pyruvate, le glycérol et certains acides aminés, principalement l'alanine (Kreisberg *et al.* 1972; Katz 1985; Chiasson *et al.* 1977; Donovan *et al.* 1997; Lavoie *et al.* 1997 A). Kreisberg *et al.*, en 1972, ont trouvé que 50% de la néoglucogenèse provenant des acides aminés est dû à la conversion d'alanine. Les concentrations artérielles plasmatiques d'alanine augmentent à l'exercice en fonction du temps et de l'intensité (Felig *et al.* 1971). Au moins 4% de la production de glucose hépatique ayant lieu pendant la réalisation d'un exercice physique provient de l'alanine (Lavoie *et al.* 1997 A).

En 1995, Wasserman confirma que l'intensité de travail affecte les mécanismes par lesquels les flux de glucose sont régulés. De cette façon, tant au repos que lors d'un exercice modéré, la réponse glucorégulatrice est identique et la production de glucose hépatique est contrôlée par le glucagon et l'insuline. Par contre, lorsque le sujet effectue un exercice de haute intensité ou qu'il est soumis à

une situation de contrainte, la réponse des catécholamines est nettement augmentée et les niveaux de glucose sont accrus.

3.3. L'insuline comme facteur régulateur de la production de glucose

L'insuline augmente considérablement le transport de glucose vers l'intérieur des cellules. Quand le pancréas génère de grandes quantités d'insuline, la pénétration de glucose dans la plupart des cellules peut augmenter jusqu'à 10 fois. L'utilisation de glucose dépend donc directement de la sécrétion pancréatique d'insuline.

Par ailleurs, les mêmes auteurs proposent que certains mécanismes peuvent assurer l'augmentation de la production de glucose à l'exercice en manque d'insuline (Lavoie *et al.* 1997 B). Il s'agit de l'augmentation du flux sanguin ainsi que des niveaux de glucose dans le sang.

D'un autre côté, la diminution d'insuline induite par l'exercice incite la libération de glucagon pancréatique ainsi qu'une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon, stimulant ainsi la néoglucogénèse et la glycogénolyse. S'il manque de l'insuline mais que les niveaux de glucagon sont normaux, la néoglucogénèse augmente 93% au-dessus des valeurs de repos lors d'un exercice prolongé de faible intensité, chez des sujets sains (Lavoie *et al.* 1997 A). La présence d'insuline, même dans des taux plus bas que l'exercice, est importante

pour prévenir l'augmentation excessive de néoglucogenèse pouvant éventuellement produire une hyperglycémie (Lavoie *et al.* 1997 A).

3.4. Les catécholamines comme facteurs régulateurs de la PGH

Les catécholamines dans le sang et surtout une plus grande concentration d'épinéphrine lors d'un exercice physique peuvent aussi contribuer à l'augmentation de production de glucose par le foie. Cependant, leur rôle est moins probant que celui des hormones pancréatiques et de l'entraînement (Lavoie *et al.* 1997 A). En effet, Kjaer *et al.* (1993) ont montré que des concentrations plus élevées d'épinéphrine peuvent augmenter le Ra chez les humains lors d'un exercice physique. Par contre, les concentrations normales d'épinéphrine ne sont pas un stimulus suffisant pour produire cet accroissement (Kjaer, 1998).

3.5. Autres facteurs régulateurs de la PGH

La production hépatique de glucose a souvent été étudiée suite à la réalisation d'un exercice physique. Donovan *et al.* (1997) suggèrent que l'activité physique chronique augmente la capacité hépatique de la néoglucogenèse, et donc de production de glucose (Donovan *et al.* 1997).

Des mécanismes et des réflexes neuraux affectent aussi de façon importante la production hépatique de glucose, autant par des processus de

feedback (réflexes afférents) que de feedforward (commandement central) (Vissing *et al.* 1988; Kjaer, 1998). À titre d'exemple, le mécanisme de feedback a toujours été associé à la régulation de la mobilisation de glucose dans des situations où des manipulations métaboliques ont lieu, soit la diète ou l'exercice physique. Dans ces circonstances, l'euglycémie est maintenue grâce au feedback. Par contre, le feedforward correspond au contrôle central de ce processus, via le cerveau, capable d'agir sur des mécanismes de locomotion et endocrines afin d'augmenter la production de glucose hépatique. Le taux de production de glucose hépatique est très sensible au mécanisme d'inhibition du processus de feedback métabolique pendant un exercice physique de basse intensité (Vissing *et al.* 1988). Les réflexes neuraux afférents peuvent causer une augmentation de la mobilisation de glucose pendant l'exercice physique sans qu'elle soit essentielle chez les sujets normaux (Kjaer *et al.* 1993 et 1998). Cependant, ce processus de feedback peut être d'importance vitale chez des sujets avec certains problèmes métaboliques.

De plus, des études portant sur la régulation de la production de glucose chez les rats et les humains montrent que la mobilisation de glucose hépatique pendant l'exercice est aussi régulée par l'activité du système nerveux central (Kjaer, 1998; Vissing *et al.* 1988). En effet, les centres moteurs cérébraux activent en parallèle des mécanismes locomoteurs et neuroendocrins, lesquels provoquent l'augmentation de la production de glucose par le foie. Ce mécanisme de feedforward est surtout important pour de la production hépatique de glucose lors d'exercices physiques de haute intensité.

L'augmentation de la production de glucose due à des mécanismes nerveux n'est probablement pas déterminée uniquement par l'activité des centres moteurs, mais aussi par l'état nutritionnel (Vissing *et al.* 1988). Enfin, selon les études de Kjaer *et al.* en 1993 et en 1998, l'activité sympathique hépatique n'est pas un stimulus déterminant de la production de glucose pendant l'exercice. La réponse du Ra pendant une activité physique est donc augmentée par la diminution d'insuline, par l'augmentation du glucagon et probablement par d'autres stimulus encore inconnus.

4. Rôles et actions du glucagon pancréatique

4.1. La sécrétion des hormones pancréatiques.

En plus de ses fonctions digestives, le pancréas sécrète plusieurs hormones régulatrices. En effet, les îlots de Langerhans possèdent au moins trois types de cellules : *alpha*, *beta* et *delta*. Leurs différences se trouvent au niveau de leur morphologie et de leur coloration. La figure 6 montre la distribution des différentes cellules pancréatiques.

L'insuline est sécrétée par les cellules *beta*, constituant environ 60% du total des cellules. Les cellules *alpha*, représentant environ 25% du total, sécrètent du glucagon. Enfin, les cellules *delta*, les moins nombreuses, sécrètent la somatostatine. De plus, il existe au moins une autre sorte de cellule pancréatique dans les îlots de Langerhans connue comme cellule PP, sécrétant une quatrième hormone : le polypeptide pancréatique (Guyton, 1994).

Les étroites relations existant entre les différents types de cellules des îlots de Langerhans permettent de réguler la sécrétion de ces hormones. Ainsi, l'insuline inhibe la sécrétion du glucagon et la somatostatine inhibe autant la sécrétion de l'insuline que du glucagon (Guyton, 1994). La sensibilité et la capacité de réponse de certaines de ces hormones pancréatiques peuvent être altérés par l'entraînement (Donovan *et al.* 1997).

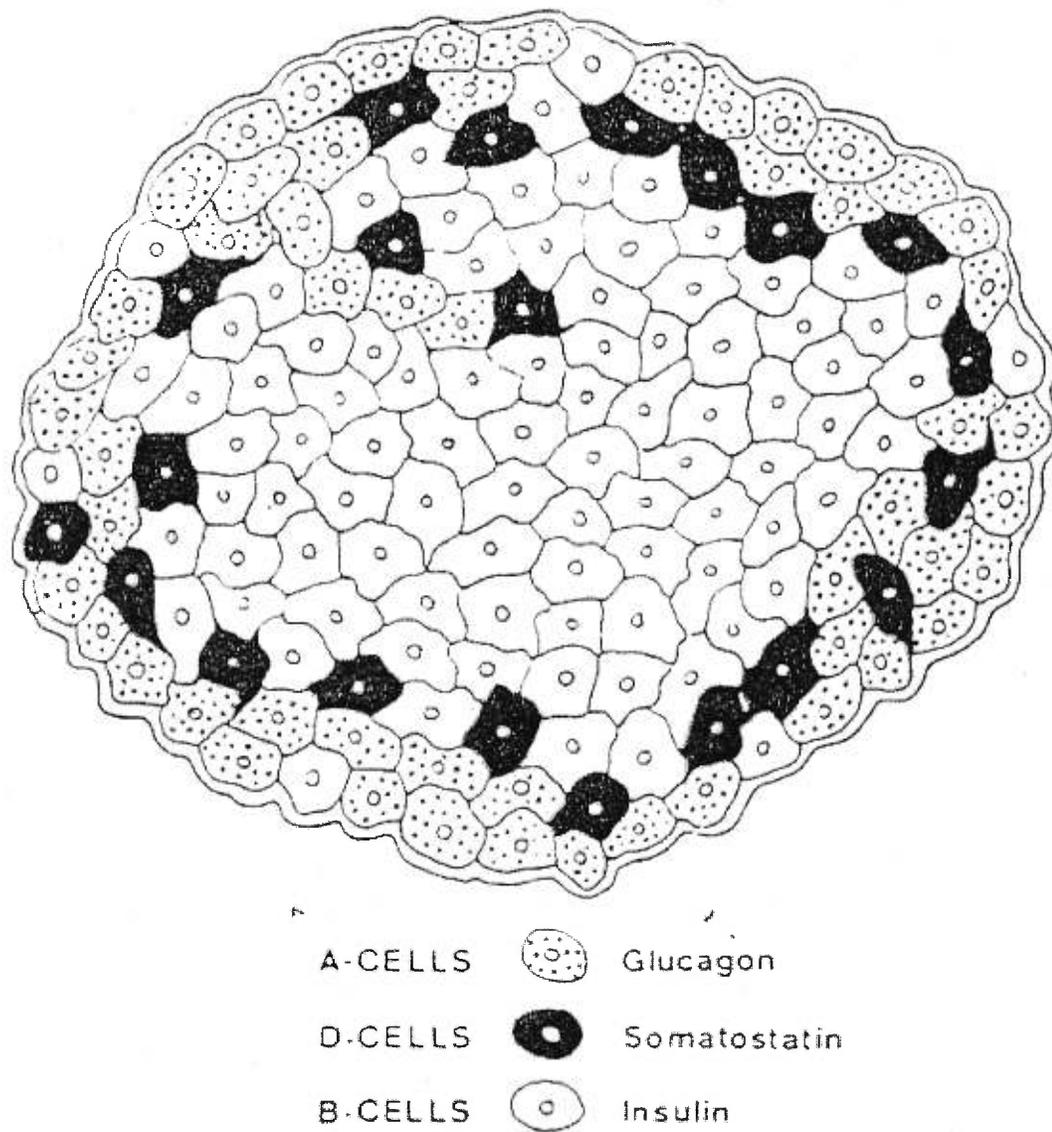


Figure 6. Représentation schématique d'un îlot de Langerhans montrant la distribution des cellules sécrétant du glucagon, de la somatostatine et de l'insuline. Les types de cellules pour lesquelles les fonctions n'ont pas été établies ont été omises du dessin (Unger *et al.* 1976).

4.1.1. La sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline est surtout stimulée par l'augmentation du glucose sanguin. Cependant, d'autres facteurs peuvent aussi affecter sa sécrétion, soit les acides aminés, les systèmes nerveux sympathique et parasympathique ainsi que certaines hormones comme le glucagon (Guyton, 1994).

La principale action de l'insuline est de faciliter l'utilisation des hydrates de carbone pour en obtenir de l'énergie, réduisant en même temps l'utilisation lipidique. De plus, l'insuline agit directement sur le foie pour diminuer le taux de production de glucose (Steele, 1959). Dans l'étude de Chiasson *et al.* (1977), par exemple, les auteurs ont trouvé qu'une infusion d'insuline de 5 mU/Kg/min. chez le chien provoque une diminution de la glycémie ainsi qu'une augmentation probable de la prise de glucose par le muscle.

L'exercice physique provoque une réduction des niveaux d'insuline dans le plasma. Cependant, même à ces taux plus bas, l'insuline est nécessaire pour prévenir une surproduction de glucose par le foie et un développement d'hyperglycémie, car elle restreint la production de glucose hépatique et la néoglucogénèse induites par le glucagon (Lavoie *et al.* 1997 A). En effet, l'hyperglycémie *per se*, de la même façon que l'hypersinsulinémie, sont capables de supprimer complètement la production endogène de glucose (Ferrannini *et al.* 1982).

Lavoie *et al.* (1997 A) ont aussi déterminé que la diminution de la concentration d'insuline induite par l'exercice provoque la libération de glucagon pancréatique ainsi que l'augmentation de la sensibilité du foie à cette hormone. De cette façon, l'insuline contribue directement à stimuler la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

L'insuline supprime l'effet stimulant du glucagon sur la production de glucose, mais son effet est moins remarquable sur l'action des catécholamines (Wasserman, 1995). De plus, elle s'oppose aussi aux effets lipolytiques tant du glucagon que des catécholamines (Fell *et al.* 1980).

Chez l'humain, le taux de libération d'insuline au repos avec une glycémie normale est d'environ 25 ng/min./kg. Cependant, ce taux peut augmenter jusqu'à vingt fois si la concentration de glucose sanguin est anormalement augmentée (Guyton, 1994).

Chez les autres animaux, les concentrations d'insuline peuvent varier énormément. Ainsi, Fell *et al.* (1980) ont porté des études chez les rats et ont montré qu'un exercice menant à l'épuisement peut diminuer environ 3% le taux d'insuline plasmatique au repos, soit de 3.54 ± 1.13 ng/mL à 0.08 ± 0.05 ng/mL. Ces concentrations remontent lentement avec le temps et une bonne alimentation.

Il est important de bien déterminer le site de prise des échantillons d'insuline, car les niveaux périphériques d'insuline sont plus bas que les niveaux portaux. Ceci pourrait entraîner une sous-estimation de l'effet physiologique de l'insuline (Lavoie *et al.* 1997 A).

4.1.2. La sécrétion de glucagon

Le glucagon est une hormone pancréatique provenant des cellules *alpha* des îlots de Langerhans. Une fois sécrété dans l'espace extracellulaire par le processus d'émiocytose, le glucagon se mélange avec le sang dans la veine porte hépatique et par la suite il est livré au foie (Unger *et al.* 1976; Guyton 1994; Cherrington, 1998). Des études récentes montrent que le foie et les reins détruisent chacun 25% du glucagon sécrété. Le restant est donc éliminé par d'autres parties de l'organisme comme l'intestin, les erythrocytes ou les adipocytes (Unger *et al.* 1976; Cherrington 1998).

Au contraire de l'insuline, le glucagon est sécrété lorsque la concentration de glucose sanguin et les acides gras libres diminuent (Guyton 1994; Cherrington 1998). Ainsi, il devient fondamental surtout dans des situations où une hypoglycémie survient, comme lors de l'exercice physique ou un jeûne.

Le glucagon est connu pour ses diverses actions physiologiques et pharmacologiques au niveau du foie, du pancréas, du tissu adipeux et du muscle

cardiaque (Takayama *et al.* 1995; Unger *et al.* 1976). Les deux effets principaux du glucagon sur le métabolisme des hydrates de carbone sont l'augmentation de la glycogénolyse (Guyton 1994; Drouin *et al.* 1998) ainsi que de la néoglucogenèse (Guyton 1994; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A; Dobbins *et al.* 1998). Une augmentation de la production de glucose hépatique survient suite à ces deux processus (Stevenson *et al.* 1987). Chez l'humain, l'administration de 1 mg/kg de glucagon peut accroître la concentration de glucose sanguin d'environ 20 mg/dL, en vingt minutes (Guyton, 1994). Chez le chien, une infusion de glucagon de 4 ng/kg/min. peut élever le taux de glucagon de presque 170%, soit jusqu'à 210 ng/mL (Dobbins *et al.* 1998). Chez le rat, une dose constante administrée de 2 µg/kg/min. précédée par un bolus de 20 µg/kg sur une minute fait augmenter le taux de glucagon plasmatique d'environ 200 pg/mL à plus que 60000 pg/mL en 15 minutes (Bélangier *et al.* 2000).

Le glucagon agit directement sur le foie, contrairement à l'effet périphérique de l'insuline sur le métabolisme du glucose (Lavoie *et al.* 1997 B). Ainsi, le glucagon bloque la prise hépatique ("uptake") de glucose lors des situations d'hyperglycémie et insulinémie normale (Dobbins *et al.* 1998).

Cependant, certaines hormones comme l'insuline et les catécholamines ainsi que divers substrats comme les acides aminés et les acides gras libres, altèrent la réponse des hépatocytes au glucagon (Dobbins *et al.* 1998). De plus, le

glucagon a un effet direct de facilitation de l'action du système nerveux sympathique. En effet, il stimule les aires hypothalamiques et surtout le noyau hypothalamique latéral, augmentant ainsi l'activité sympathique et la concentration sanguine de catécholamines (Takayama *et al.* 1995).

Il est bien connu que l'exercice physique provoque plusieurs changements au niveau métabolique. Un entraînement en endurance, par exemple, augmente la sensibilité hépatique au glucagon (Drouin *et al.* 1998). Ceci pourrait être relié aux récepteurs de glucagon, mais aussi à l'augmentation du contenu hépatique en glycogène ou à la diminution des niveaux d'acides gras libres (Drouin *et al.* 1998). Le manque de glucagon et d'insuline, par contre, augmente significativement l'oxydation des graisses dans le foie (Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 B). Contrairement au foie, le muscle est insensible aux effets du glucagon (Fell *et al.* 1980; Cherrington 1998).

4.2. Les effets du glucagon sur la production de glucose hépatique.

La fonction principale du glucagon en état basal est de maintenir un taux de production hépatique de glucose suffisant pour remplacer l'utilisation de ce métabolite (Unger *et al.* 1976). De cette façon, des taux d'infusion de glucagon très élevés, comme par exemple de 7.5 ng/kg/min. chez les chiens (Stevenson *et al.* 1987), ou de 20 ng/kg/min. chez les rats, provoquent des situations d'hyperglycémie.

Tel que vu précédemment, des augmentations physiologiques de glucagon plasmatique provoquent une augmentation de la production endogène de glucose (Stevenson *et al.* 1987; Lavoie *et al.* 1997 A; Ferrannini *et al.* 1982; Felig *et al.* 1976). En effet, la production de glucose hépatique au repos dépend à 50% des sécrétions pancréatiques de glucagon (Lavoie *et al.* 1997 A). Cependant, la réponse à l'hyperglucagonémie est transitoire, car la production de glucose retourne aux valeurs de repos dans les 30 à 60 minutes suivantes, même chez les sujets diabétiques (Cherrington 1998; Ferrannini *et al.* 1982; Dobbins *et al.* 1998). Plusieurs hypothèses ont été soulevées pour expliquer ce phénomène. Dans un premier temps, l'adaptation du foie à l'hormone semblait être la cause la plus probable. En effet, Drouin *et al.* (1998) ont montré qu'une hyperglucagonémie chronique entraîne une diminution de la sensibilité hépatique au glucagon. Cependant, certaines évidences mettent en doute cette théorie, comme par exemple le fait que la production de glucose diminue significativement suite à l'interruption d'une infusion constante de glucagon. Parallèlement, l'augmentation du taux d'infusion provoque un deuxième pic dans la production de glucose. En définitive, il semble que le foie répond autant aux hauts qu'aux bas niveaux de glucagon (Ferrannini *et al.* 1982).

L'augmentation de glucagon, soit par injection ou par infusion, provoque une augmentation considérable de la production de glucose hépatique. Cependant, elle redescend avec le temps (Dobbins *et al.* 1998); il s'agit de "l'effet d'évanescence" du glucagon sur la production de glucose. En effet, la combinaison

de jeûne avec la manipulation de certaines hormones (somatostatine, insuline et glucagon) peut stimuler la production de glucose par le foie de 350% par rapport aux niveaux de base. Par la suite, cette production de glucose peut diminuer jusqu'à seulement 15% au-dessus des niveaux de base en trois heures (Dobbins *et al.* 1998). Les auteurs interprètent ce phénomène comme une désensibilisation hépatique au glucagon, associée à un taux de formation plus faible d'AMPc. La sensibilité normale au glucagon est rapidement récupérée quand les concentrations hormonales retournent aux niveaux de base. La déplétion de glycogène hépatique peut aussi être la cause de la désensibilisation du foie au glucagon (Dobbins *et al.* 1998).

Dobbins *et al.* (1998) ont d'ailleurs montré que de tous petits changements dans la concentration de glucagon se reflètent rapidement par la sensibilité hépatique à cette hormone. Effectivement, des changements presque imperceptibles dans la concentration artérielle de glucagon peuvent provoquer des altérations importantes dans la production de glucose (Cherrington, 1998).

Dans le cas de l'exercice physique l'utilisation de glucose par le muscle augmente de façon significative. Ceci requiert une augmentation équivalente de la production de glucose hépatique afin de préserver l'euglycémie. Au niveau des hormones pancréatiques, une augmentation du glucagon et une diminution de l'insuline plasmatiques surviennent simultanément. Cette combinaison permet de maintenir l'homéostasie dans ces circonstances (Unger *et al.* 1976). Pendant un

exercice d'intensité modérée, la production endogène de glucose doit augmenter rapidement jusqu'à trois fois les doses de repos pour éviter l'hypoglycémie. Le glucagon joue un rôle fondamental dans cette situation (Cherrington 1998; Unger *et al.* 1976). En effet, l'augmentation de glucagon est responsable du 50% de la production hépatique de glucose pendant un exercice d'intensité modérée (Cherrington, 1998).

Il existe une controverse par rapport au rôle du glucagon dans la régulation de la PGH. Lavoie *et al.* (1997 A) proposent qu'elle puisse être liée avec le site de prise de l'échantillon, car il est possible que les niveaux périphériques de glucagon ne reflètent pas toujours l'augmentation des niveaux portaux. En effet, le glucagon prélevé au niveau artériel, ne reflète pas avec exactitude les concentrations de cette hormone dans le foie (Cherrington, 1998).

Plusieurs auteurs ont remarqué que les effets du glucagon sur la production de glucose hépatique et sur la néoglucogenèse peuvent être substantiellement réduits par le phénomène de rétroaction de l'insuline (Stevenson *et al.* 1987; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A). Cependant, il semble qu'en état d'hyperglucagonémie, les effets de rétroaction de l'insuline et de l'hyperglycémie sont minimes.

4.3. Les effets du glucagon sur l'utilisation de glucose

Des augmentations de glucagon ont souvent été associées à une utilisation importante de glucose. Cependant, cette augmentation est toujours moins considérable que celle du taux de glucose plasmatique. De cette façon, le glucagon exerce un léger effet inhibiteur sur la prise de glucose au niveau de tout l'organisme. Cette inhibition est plus évidente au niveau du foie que des tissus périphériques (Stevenson *et al.* 1987; Cherrington, 1998).

Dans des situations d'hyperglycémie, le foie prend une petite quantité de glucose plasmatique, même en manque d'insuline (McGuinness *et al.* 1994). Le glucagon agit limitant cette prise. De cette façon, les augmentations de glucagon provoquent une légère diminution de la clearance du glucose par la réduction du flux sanguin dans le foie. Ainsi, le glucagon assure l'exportation maximale de glucose aux autres tissus (Cherrington, 1998).

Suite à l'ingestion de glucose, le taux de glucagon diminue. Ceci accroît l'effet de l'insuline sur le foie. Inversement, l'augmentation de glucagon diminue la capacité de l'insuline de stimuler la prise de glucose hépatique. De cette façon, il est possible d'éviter l'hypoglycémie qui survient à des concentrations élevés d'insuline plasmatique (Cherrington, 1998).

4.4. Différences entre une injection et une infusion de glucagon.

Dans la littérature, on retrouve plusieurs façons d'administrer le glucagon : certains auteurs préfèrent le réaliser sous forme de bolus ou d'injection rapide appliquée sur une courte période de temps, normalement une minute (Takayama *et al.* 1995; Shoemaker *et al.* 1959). Par contre, d'autres choisissent la méthode de l'infusion continue sur une longue période (Drouin *et al.* 1998; Chiasson *et al.* 1977). Dobbins *et al.* (1998) ont montré que les injections de glucagon (par pics) ne provoquent pas d'effets aussi importants sur la glycémie et sur la production de glucose hépatique qu'une infusion constante de glucagon.

Une injection intraveineuse de glucagon provoque une augmentation rapide de la concentration de glucose veineux. Cette augmentation arrive à son point maximum entre les dix et vingt premières minutes suite à l'injection (Shoemaker *et al.* 1959). Cependant, les effets initiaux sont déjà évidents deux ou trois minutes après l'injection (Takayama *et al.* 1995). Par la suite, la concentration de glucose baisse jusqu'aux valeurs de base en moins d'une heure (Shoemaker *et al.* 1959).

Après l'administration d'un bolus intraveineux d'un milligramme de glucagon, Takayama *et al.* (1995) ont observé chez l'humain une augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle (systolique et diastolique) et de l'activité sympathique aux muscles, provoquant ainsi vasoconstriction.

Les variations du flux sanguin hépatique dépendent directement de la concentration de glucose (Shoemaker *et al.* 1959). Suite à une injection de glucagon, ce flux sanguin augmente si les réservoirs de glycogène sont correctement remplis. Cette augmentation de flux peut être due à l'augmentation de la glycolyse hépatique (Shoemaker *et al.* 1959).

Déjà en 1977, Chiasson *et al.* ont observé qu'une infusion de glucagon de 15 ng/kg/min. chez le chien provoque aussi une augmentation de la glycémie et de la production de glucose hépatique. Cependant, ils n'ont remarqué aucun changement au niveau des principaux précurseurs néoglucogéniques, malgré que les concentrations plasmatiques de glucose peuvent doubler suite à une infusion de glucagon (Dobbins *et al.* 1998). De plus, cette augmentation est plus importante chez les sujets entraînés (Drouin *et al.* 1998).

Avec des niveaux de glucagon et d'insuline normaux, une infusion de glucose augmente le taux de glucose plasmatique. Cette hyperglycémie diminue la production de glucose hépatique de 75% par rapport aux niveaux de base, soit de 14.3 ± 3.7 à 3.4 ± 1.7 $\mu\text{mol/kg/min.}$ chez le chien, par exemple (Dobbins *et al.* 1998). Cependant, une infusion de glucagon de 4 ng/kg/min. provoque une augmentation de la production de glucose par le foie de 15.2 ± 0.9 à 52.7 ± 6.5 $\mu\text{mol/kg/min.}$ (Dobbins *et al.* 1998). La production de glucose

hépatique atteint son maximum dans les quinze minutes suivant l'infusion de glucagon (Dobbins *et al.* 1998).

Le glucagon sensibilise donc le foie et augmente la production de glucose hépatique. Notre étude a permis de préciser jusqu'à quel point d'autres manipulations métaboliques comme la diète et l'exercice physique peuvent aussi influencer la réponse du foie dans une situation d'hyperglucagonémie provoquée par une infusion constante de glucagon.

Chapitre 2 – Influence of supranormal liver glycogen content and / or prior exercise on hyperglucagonemia-induced hepatic glucose production.

**INFLUENCE OF SUPRANORMAL LIVER GLYCOGEN CONTENT
AND / OR PRIOR EXERCISE ON HYPERGLUCAGONEMIA-INDUCED
HEPATIC GLUCOSE PRODUCTION**

**Victoria Matas Bonjorn, Martin G. Latour, Patrice Bélanger,
and Jean-Marc Lavoie**

**Département de kinésiologie
Université de Montréal**

Running title: Glycogen levels and hepatic glucose production

**Mailing proofs: Dr. Jean-Marc Lavoie
Département de Kinésiologie
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal (Québec) Canada H3C 3J7
Tel: (514) 343-7044
Fax: (514) 343-2181**



Summary

The purpose of the present study was to test the hypothesis that a supranormal initial level of liver glycogen or a prior period of exercise, both can be associated with a higher hyperglucagonemia-induced hepatic glucose production. Hepatic glucose production (HGP) was measured in five groups of anesthetized rats infused with glucagon (intravenously, 2 ug/kg/min) over a period of 60 min. Among these groups, hepatic glycogen levels had previously been manipulated either by a fast-refed diet (overloaded), a reduction in food intake (1/2-fast) or exercise (60 min of running, 15-26 m/min, 0% grade). A fourth group (overloaded+exercise) underwent both the diet overloading and exercise protocols described above, and a fifth group of rats (control) were normally fed. Plasma glucagon and insulin levels were increased similarly in all 5 conditions. Pre-experimental manipulations resulted in initial liver glycogen levels that were all significantly ($P < 0.01$) different from one another (i.e. overloaded = 200 % of normal levels). Glucagon-induced hyperglycemia was higher ($P < 0.01$) in the overloaded group than in all other groups during the last 30 min of the infusion. HGP in the overloaded group was not, however, on the whole more elevated than in the control group. The higher hyperglycemia in the overloaded compared to the control group was explained by a better maintenance of HGP during the last 30 min of the infusion and a slower increase in glucose utilization in the first 30 min of the infusion period. Exercised rats, on the other hand, had higher HGP and glucose utilization in the first 10 min of the glucagon infusion. Overloaded+exercise group had the highest HGP throughout the 60 min experiment. It is concluded that higher than normal levels of liver glycogen does not, as such, stimulate hyperglucagonemia-induced HGP in the first 30 min of the

infusion. Hyperglucagonemia-induced HGP is, however, rapidly (~10 min) stimulated by a prior period of exercise, suggesting an increased action of glucagon on liver during exercise.

Key words: glucagon infusion, glycemia, overloaded liver glycogen.

1. Introduction

Hepatic glucose production is a metabolic process that is absolutely essential for the maintenance of glycemia in the post-prandial periods as well as during exercise (23,26). To maintain adequate blood glucose supply, hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis processes are regulated by complex interactions of metabolic and hormonal stimuli (16). Among these stimuli, glucagon secretion in relation to exercise has been the subject of considerable interest over the years (for a review see ref. 28 and 32). From these studies, it appears that the existence of basal glucagon levels is clearly required at rest and during exercise to attain typical glucose production rates (16,30). The importance of glucagon to the increment in hepatic glucose production is further enlightened by the recognition of glucagon as a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise (31).

Although the contribution of glucagon to the increment in hepatic glucose production is well recognized, the nature of the signals initiating the glucoregulatory response to exercise is still poorly understood (28). Small changes in arterial glucose have been reported to trigger the appropriate glucoregulatory

responses (29). However, it is possible to find deviations from this general concept (4,7,25). In a recent study, our laboratory has provided evidence that the decrease in blood glucose concentration is not the sole determinant of the glucagon response during exercise (25). In the latter study (25), it was inferred that the liver glycogen content might be involved in the stimulation of the glucagon response to exercise. One of the reason why the signals initiating the glucagon response to several metabolic situations are still badly understood, might be that the factors susceptible to modulate the action of glucagon on the target organ, that is the liver, have not received a great deal of attention. One of these factors might be the level of liver glycogen. There is one report that higher than normal initial levels of liver glycogen increase hepatic glucose production during exercise (27). Recent observations from our laboratory indicated that a supranormal level of liver glycogen is associated with a higher hyperglucagonemia-induced liver glycogen breakdown (3). Results of the latter study specifically suggest that the liver response to glucagon may be influenced by the initial level of liver glycogen. In agreement with this view is the recent report that livers of trained individuals are more responsive to a glucagon infusion than untrained individuals (13). Trained individuals are most likely to have higher resting level of liver glycogen as they have for muscle glycogen (1,14). On the other hand, chronic exercise may have increased the sensitivity of the liver of a trained individual to the action of glucagon by increasing the density of glucagon receptors (18). It is not known, however, if an acute bout of exercise may influence the action of glucagon on liver cells as it does with insulin on muscle cells (8). In the present study, we were

specifically interested in testing the possibility that hepatic glucose production in response to glucagon may be influenced by supranormal initial hepatic glycogen levels or a prior bout of exercise.

The purpose of the present study was to determine if a supranormal initial level of liver glycogen and an acute bout of exercise influence the extent to which hepatic glucose production and related variables (plasma glucose and insulin levels) are changed by a constant 60-min infusion of glucagon. It was hypothesized that a supranormal level of liver glycogen or a prior bout of exercise would result in a higher hyperglucagonemia-induced hepatic glucose production. The possibility that a prior period of exercise could affect glucagon-induced hepatic glucose production was examined in a normal and an overloaded liver glycogen condition.

2. Methods

Animal care. Male Sprague-Dawley strain rats (Charles River, Canada, St. Constant, Québec), weighing 220-240 g were housed in individual cages and allowed pellet rat chow and tap water ad libitum for ~13 days after they were received in our laboratory. The lighting schedule was such that lights were on from 07:00 until 19:00, and the room temperature was maintained at 20-23°C. Two days after their arrival, rats underwent a habituation running protocol on a motor-driven rodent treadmill consisting of six sessions over a 8-day period beginning with 20 min/day at 15 m/min and progressively increased to 60 min/day at

26 m/min (0% grade), so that they were well accustomed to running and being handled. The last habituation session was held 2 or 3 days before the experiment for all rats.

Groups and surgery. After completion of their running habituation protocol, rats were randomly assigned to one of the five experimental groups. One group of rats (control) was normally fed. One group (overloaded) had its liver glycogen content overloaded by being submitted to a 24-h fast before access to the normal chow diet for 24 h. The third group of rats (1/2-fast) received only 50% of their daily food intake the night before experimentation. The fourth group of rats (Exercise) was normally fed but was subjected to 60-min of running exercise on a treadmill (10 min at 15 m/min, 20 min at 20 m/min, and 30 min at 26 m/min, 0% grade) before the beginning of the experiment. The fifth group of rats (overloaded+exercise) underwent both the fast-refed and exercise protocols described above.

The morning of the experiment, rats in overloaded+exercise and Exercise groups were first submitted to the one-hour exercise bout described above followed by a 15-min rest period before being submitted to the same surgical and experimental manipulations as rats in the other groups. The morning of the experiment, rats in all groups were weighed and anesthetized with pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) as the whole experiment was conducted with the animals under anesthesia. All rats were then implanted with two catheters into the right jugular vein for the respective infusions of glucagon and tritiated glucose, and one into the carotid artery for blood sampling. All catheters were filled with sterile

0.9% NaCl. A small mid-abdominal incision (2-2.5 cm) was, thereafter, made to give free access to the liver. An open liver biopsy (~100 mg) was then taken according to Daemen et al.(11). After presenting the liver via the abdominal incision, a small piece of liver tissue (80-100 mg) was cut out of the edge of a liver lobe with a sharp scissor cooled to liquid-nitrogen temperature. The use of a cooled scissor allowed almost no bleeding. After the biopsy the abdomen was closed. The whole surgery period lasted approximately 15 min and was followed by a 10-min recovery period before the beginning of the infusions. The body temperature of the animals during the entire experiment was maintained by the use of a heating blanket.

Experimental protocol. On the morning of the experiment, any remaining food was removed from the cages 3 h before the experiment, which was conducted between 07:00 AM and 13:00 PM. After the exercise (when appropriate) and the surgical procedures described above, a 75-min period was allowed to anesthetized rats for tracer stabilization (tritiated glucose) with arterial blood samplings taken every 5 min during the last 10 min of this period for the determination of the basal rate of glucose turnover. This period was immediately followed by a 60-min period of glucagon infusion in all rats. For that, a primed (20 mg/kg over 1 min) constant-rate (2 mg/kg/min) infusion of glucagon (from porcine pancreas; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Canada) dissolved (20 mg/kg/mL) in diluting fluid (1.6% glycerine and 0.2% phenol) with saline (15) was delivered intravenously by a precision pump (Harvard Apparatus Inc.). This dose of glucagon was chosen to mimic the bolus dose recently used by Rao (22) to demonstrate that chronically

malnourished rats are glucagon-resistant in the liver. During the infusion period, minor arterial blood samplings (250 μ L) were taken every 5 min for determination of glucose turnover and major arterial blood samplings (1 mL) were taken every 15 min for additional measurements of insulin and glucagon. Red blood cells obtained from blood centrifuged without preservatives were resuspended in saline and reinjected in the animal. After the last blood sampling was taken, the abdominal cavity was reopened and a piece of liver was removed and frozen with aluminum block tongs cooled to liquid nitrogen temperature. Immediately after, the soleus muscle of the right leg was removed, freeze clamped, and placed in liquid nitrogen.

Glucose turnover. A primed (74 KBq) continuous infusion of [3-3H]-glucose (dissolved in ultra-pure water, 1480 KBq/ml: New England Nuclear, Boston, MA: > 97% pure) was delivered intravenously by a precision pump (Harvard Apparatus Inc.). The infusion rate of the tracer during the stabilization period (2.457 KBq/min; -75 to 0 min) was increased (4.914 KBq/min) at the beginning of the glucagon infusion. Glucose appearance (R_a) and disappearance (R_d) were calculated using the formula for non-steady state conditions developed by Steele (24) and validated by Radziuk et al. (21).

The volume of distribution in which rapid changes in glucose concentration and specific activity of [3-3H]-glucose takes place was set to 188 ml/kg body wt (9). Smoothing of the glucose and specific activity values to reduce rapid changing of these variables with respect to time was conducted by an independent researcher using curve fitting by hand (2).

Analytical methods. Blood was collected into 1-cc syringes with Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (7%; EDTA). For the assay of [3-3H]-glucose radioactivity, 70 mL of plasma were deproteinized with 35 mL of 1 N perchloric acid and centrifuged (17). Duplicate aliquots (30 mL) of the supernatant were evaporated overnight under a stream of air to remove tritiated water. The dry residue was redissolved in 200 mL 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 (17). The fraction of blood (150 μ L), to be used for glucagon determination, was preserved in TrasylolTM (50 μ L) before centrifugation. The remainder of the blood was also centrifuged (Eppendorf centrifuge, #5415), and the plasma was stored for subsequent glucose and insulin determinations. All tissue and blood samples were stored at -78°C until analyses were performed.

Plasma glucose concentrations were determined by the use of a glucose analyzer (Yellow Springs Instruments 2300, Yellow Springs, OH). Insulin and glucagon concentrations were determined by commercially available radioimmunoassay kits (Radioassay System Laboratory; ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA; distributed by Immunocorp, Montreal, Quebec). Liver and muscle glycogen concentrations were determined by use of the phenol-sulfuric acid reaction (19).

Statistical analyses. All data are reported as means \pm SE. The total area under the concentration curve and above base line for glucose, glucose production,

glucose utilization, insulin, and glucagon was calculated using a trapezoidal model. Inter-group comparisons were conducted using these areas calculated for the first 10 min (short term response), the last 30 min (a more stable condition), and for the whole 60 min period of the glucagon infusion. The total area under the concentration curve and above base line for glucose, glucose production, and glucose utilization was also calculated per 10 min intervals. Statistical comparisons were done using a two- and a one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated and non-repeated measures design, respectively. A 95% level of confidence was accepted for all comparisons.

3. Results

Dietary and exercise manipulations resulted in pre-infusion liver glycogen concentrations that were all significantly ($P < 0.01$) different from one group to another (Fig.1A). Liver glycogen content in the overloaded group was approximately twice as much as the liver glycogen content in the control group. Following glucagon infusion, all groups with the exception of 1/2-fast ($P < 0.08$), had their liver glycogen content significantly ($P < 0.01$) decreased (Fig.1A). As presented in Fig. 1B, the extent of the liver glycogen breakdown was the same in all groups with the exception of a significantly ($P < 0.01$) lower decrease in 1/2-fast than in all other groups and a slightly but significantly ($P < 0.05$) larger decrease in the control than in the Exercise group.

Blood glucose concentrations before and in response to the glucagon infusion are presented in Fig.2A. In the pre-infusion period, plasma glucose concentrations were significantly ($P < 0.01$) lower in the 1/2-fast rats than in all other groups. Plasma glucose concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased in all groups following the glucagon infusion (Fig.2A) The area under the glucose concentration curves during the first 10 min after the beginning of the infusion was significantly ($P < 0.01$) higher in the Exercise group compared to all other groups with the exception of the 1/2-fast group ($P < 0.09$; Fig.2B). During the last 30 min of the glucagon infusion the area under the glucose concentration curves for the overloaded group was significantly ($P < 0.01$) higher than in all other groups (Fig.2C). During the same time, the response for the overloaded+exercise group was, significantly ($P < 0.01$) higher than in the 1/2-fast and Exercise groups ($P < 0.06$ vs control) while the response of the control group was significantly ($P < 0.05$) higher than that of the Exercise group (Fig.2C). For the whole 60-min period, the area under the glucose concentration curves was also significantly ($P < 0.05$) higher in the overloaded compared to all other groups, while the response of the overloaded+exercise group was significantly ($P < 0.05$) higher than the 1/2-fast and Exercise groups (Fig.2D).

Hepatic glucose production before and in response to the glucagon infusion is presented in Fig.3A. In the pre-infusion period, the only inter-group difference ($P < 0.05$) in glucose production was between the Exercise and the 1/2-fast groups. The infusion of glucagon resulted in a rapid ($P < 0.01$) increase in hepatic glucose production in all groups. During the first 10 min of the glucagon infusion, the area

under the glucose production curves was significantly ($P < 0.01$) higher in the Exercise group than in all other groups with the exception of the overloaded+exercise group ($P < 0.06$; Fig.3B). During the same time, the response of the overload+exercise group was significantly ($P < 0.05$) higher than the one in the overloaded group (Fig.3B). During the last 30 min of the glucagon infusion, the total area under the glucose production curves was significantly ($P < 0.01$) higher in the overloaded+exercise group than in all other groups with the exception of the overloaded group, the overloaded and the control groups showing values higher ($P < 0.05$) than in the 1/2-fast and Exercise groups (Fig. 3C). For the whole 60-min period, the area under the glucose production curves was significantly ($P < 0.05$) greater in the overloaded+exercise compared to all groups with the exception of the overloaded group ($P < 0.08$), while values of the 1/2-fast group were lower ($P < 0.05$) than values in all other groups (Fig.3D).

Glucose utilization before and in response to the glucagon infusions are presented in Fig.4A. In the pre-infusion period, glucose utilization in the 1/2-fast group was significantly ($P < 0.05$) lower than in all other groups. Glucose utilization was significantly ($P < 0.01$) increased in all groups following glucagon infusion. During the first 10 min of the glucagon infusion, the area under the glucose utilization curves was significantly ($P < 0.05$) higher in the Exercise group than in all other groups with the exception of the control group (Fig.4B). The same measurements for the 30-60 min period revealed higher ($P < 0.05$) values in the exercise+overloaded group compared to all groups with the exception of the control ($P < 0.07$), while values in the 1/2-fast group were also lower ($P < 0.01$)

than values in the control and overloaded groups (Fig.4C). For the whole 60-min period, the total area under the glucose utilization curves was significantly ($P < 0.05$) higher in the overloaded+exercise than in the overloaded group and significantly ($P < 0.01$) lower in the 1/2-fast group than in all groups with the exception of the overloaded (Fig.4D). All data for glucose, glucose production and glucose utilization per intervals of 10 min are presented in Fig.5. For sake of simplicity, statistical comparisons were limited to intra-group comparisons with each interval being compared to its respective first and last 10-min intervals. The main observations from these comparisons are: 1) the overloaded group shows a progressive increase in glucose production and utilization levels that were maintained in the last 30 min of the experiment; 2) the Exercise group shows a rapid increase in glucose production and utilization levels that steadily decreased thereafter; and 3) the overloaded+exercise group shows a pattern of response for glucose production and utilization (at least for the first 30 min) that is intermediate between the Exercise and overloaded rats and that is well maintained for the last 30 min.

As expected, plasma glucagon concentrations were significantly ($P < 0.01$) increased following the glucagon infusion (Fig.6A). There were no significant ($P > 0.05$) inter-group differences in the glucagon concentrations at any of the experimental times. Plasma insulin concentrations were also increased significantly ($P < 0.01$) following the glucagon infusion (Fig.6B). Although a strong tendency for the hyperinsulinemic values to be lower in the 1/2-fast group can be observed, no inter-group differences ($P > 0.05$) in insulin concentrations

were found at the different time points during the first 45 min of the glucagon infusion and for the overall 60 min period (total area). The only significant ($P < 0.05$) inter-group differences in insulin values were at the 60-min time point where the 1/2-fast and Exercise groups show values lower than the two overloaded groups while the control group shows values different from all groups but the Exercise group. Glucagon-insulin molar ratio (data not shown) increased from values around 0.2 in the pre-infusion period to values approximately 100 fold larger during the infusion. No significant inter-group differences were found at any time in the glucagon-insulin molar ratio, with the exceptions of higher values ($P < 0.01$) in the 1/2-fast and Exercise groups at time 60 min. Glycogen concentrations from the soleus muscle, measured only at the end of the experiment, were significantly ($P < 0.01$) lower in the 1/2-fast group than in all other groups, while the overloaded group shows values significantly ($P < 0.05$) higher than in all groups with the exception of the overloaded+exercise group (Fig.6C).

4. Discussion

The dietary and exercise manipulations used in the present experiment resulted in different pre-experimental initial levels of liver glycogen. As expected, liver glycogen content was approximately doubled compared to control in the overloaded group. The pre-experimental bout of exercise substantially reduced liver glycogen content compared to control. A similar reduction was seen in the

overloaded+exercise compared to the overloaded group. Since liver biopsies were taken at the beginning and at the end of the experiment, glucagon-induced liver glycogen breakdown for the same rats can be calculated. This measurement, at first glance, indicates that overloading the liver in glycogen does not increase glucagon-induced liver glycogen breakdown. This is in agreement with what we recently reported for a 60-min period following glucagon injections in similarly overloaded rats (3). In the latter study (3), however, hyperglucagonemia-induced liver glycogen breakdown was accentuated in the liver glycogen overloaded group in the subsequent 30 min (60 to 90 min). A prior period of exercise did not increase subsequent glucagon-induced liver glycogen breakdown (Fig.1B). It may be argued that initial liver glycogen levels were reduced in the Exercise compared to control. However, glucagon-induced liver glycogen breakdown following exercise was the same in the Exercise compared to the overloaded+exercise group. Overall, within the limits of the measurement of liver glycogen content over a 60-min period, it appears that a supranormal initial level of liver glycogen or a prior period of exercise does not increase liver glycogen breakdown.

Overloading effects. Even though the supranormal level of liver glycogen or prior exercise did not influence the overall glucagon-induced liver glycogen decrease, this does not mean that the time course of glucose metabolism in response to the glucagon infusion was not affected by these manipulations. In addition, measurements of liver glycogen decrease do not take into account glucose produced by the gluconeogenesis pathway or the glycogen that may have been resynthesized during the course of the glucagon infusion. The first

observation related to the overall glucose metabolism is that the overloaded group has maintained the highest glucagon-induced hyperglycemic values (Fig.2C and D). The difference in blood glucose levels during the last 30 min of the glucagon infusion was twice as much in the overloaded than in the control group (Fig.2C). This as such indicates that the fast-refed protocol had an influence on overall glucose metabolism in response to the glucagon infusion. Surprisingly, glucose production, whether measured for the last 30 min of the experiment or for the overall 60-min period, was not higher in the overloaded than in the control group (Fig.3). This might be interpreted as if a supranormal level of liver glycogen did not result in a higher glucagon-induced glucose production over a 60-min period. This interpretation would be compatible with the fact that liver phosphorylase is much more tightly controlled by phosphorylation modulated from extracellular signals involved in the maintenance of the blood glucose level than by allosteric regulation (5). However, when considering the glucose production by 10-min intervals (Fig.5), one is able to observe that glucose production in the overloaded group was higher in the last four 10-min intervals compared to the first 10-min interval. This was not observed in the control group. This might be interpreted as if glucose production was better maintained in the last 30 min of the experiment in the overloaded group, while it was slowly decreasing in the control group. This phenomenon might have contributed to the maintenance (min 30 to 60) of higher hyperglycemic levels in the overloaded group. However, if, as hypothesized, supranormal initial levels of liver glycogen have a regulatory influence resulting in an increase in glucagon-induced hepatic glucose production, this should have been

more prominent in the first than in the last 30 min of the glucagon infusion. The possibility that glucose production was better maintained in the overloaded than in the control group in the last 30 min of the glucagon infusion might be simply explained by a lack of hepatic glycogen in the latter. Overall then, the present data do not provide any strong evidence that a supranormal initial level of liver glycogen may, as such, increase glucagon-induced hepatic glucose production.

On the other hand, it is also possible that glucose utilization might have been affected by the overloading diet protocol. Even though the overall (0-60 min period) and the 30-60 min period of glucose utilization were not significantly different between the overloaded and the control groups (Fig.4), the analysis of glucose utilization by 10-min intervals (Fig.5) shows that it took a longer period (interval 20-30) for the overloaded rats to reach a high level of glucose utilization than for the control rats (interval 10-20). This might be interpreted as if the overloading diet had resulted in a slowing down of glucose utilization in the first 30 min of the glucagon infusion. This in turn may explain the constant rise in blood glucose levels in the first 30 min of the experiment in the overloaded group (Fig.5A). From a mechanistical point of view, it is possible that the fast-refeeding regimen has induced a resistance in muscle glucose uptake that may explain the early reduction in glucose utilization in the overloaded group. The higher post-experimental level of glycogen in the soleus muscle in the overloaded compared to the control group, in view of a tendency of lower glucose utilization in the former than in the latter, suggests that the initial muscle glycogen level might have been increased by the fast-refeeding regimen, possibly contributing to a down

regulation of factors involved in muscle glucose uptake. On the whole, it seems that the higher overall glucagon-induced hyperglycemic values in the overloaded compared to the control group may be explained by a reduction in glucose utilization in the first 30 min combined to a better maintenance of glucose production in the last 30 min in the overloaded rats.

Exercise effects. The second purpose of the present experiment was to determine if a prior period of exercise influences glucagon-induced hepatic glucose production. The main observation from the present data on this question is that in the first 10 min of the glucagon infusion, prior exercise in the Exercise group resulted in a larger increase in glucose production than the one measured in the control group. This increase in glucose production during the first 10 min of the glucagon infusion was approximately 30 to 40% higher in the Exercise than in the control and overloaded groups (Fig.5B), in spite of lower initial levels of liver glycogen. Dobbins et al. (12) have recently reported data showing that a step increase in glucagon results in rapid stimulation of glucose production reaching half-maximal stimulation in just 4.5 min. The early larger increase in glucose production in the Exercise group resulted in a concomitantly larger increase in plasma glucose concentration in the first 10 min, even though glucose utilization was also much more increased than most of all other groups during the same time (Fig.4B). Exercise is well known to stimulate glucose utilization, most likely at the muscle level.

The present data, however, are the first to indicate that an acute bout of exercise also increased glucose production response to glucagon during the

recovery period. This observation suggests that exercise might have sensitized the liver to the action of glucagon as it has been reported following chronic exercise training (13). The early increase in glucose production and utilization in the exercise group was not, however, carried on during the remainder of the experiment as glucose production and utilization as well as plasma glucose values were steadily decreased during the last 40 to 50 min of the experiment (Fig.5). This is most likely due to the reduced initial levels of liver glycogen in the Exercise group. This interpretation is supported by the similar time course in glucose production, utilization and plasma glucose values observed for the Exercise and the 1/2-fast groups (Fig.5). It is interesting to observe that in the 1/2-fast group, glucose production was normal in the first 10 min of the glucagon infusion (Fig.3B). The steady decrease in glucose production in the 1/2-fast group during the last 50 min of the glucagon infusion is most likely related to a waning effect of glucagon (9) due to the low initial levels of liver glycogen, even though gluconeogenesis was most likely stimulated by the supra-physiological infusion of glucagon (16). Overall, the present data indicate that a prior period of exercise increases hepatic glucose production response to glucagon suggesting an increase in liver sensitivity to glucagon action following an acute bout of exercise.

Exercise+overloading effects. One of the interest of studying the glucagon effects on glucose production in the exercise+overloaded condition is to reexamine the effects of exercise in a condition where liver glycogen level is still above normal levels by comparing the overloaded+exercise group to the overloaded group. The first observation from the present data relative to this question is that,

in the first 10 min of the glucagon infusion, glucose production was significantly higher in the overloaded+exercise compared to the overloaded group. (Fig.3B). In addition, in the exercise+overloaded condition, the overall (60 min) glucose production was maintained to the highest levels when compared to all other groups ($P < 0.08$ vs the overloaded group, Fig.3D). This confirms that exercise increases hepatic glucose production response to glucagon, more especially if liver glycogen is present in sufficient amount. On the other hand, even though glucose production was larger in the exercise+overloaded group plasma glucose concentrations were not maintained as high in that group as they were in the overloaded group (Fig.2D). This is explained by the fact that, unsurprisingly, the increase in glucose utilization was larger in the exercise+overloaded group than in the overloaded group. Overall then, data in the two overloading liver glycogen conditions confirm what has been observed in the normally fed state, that is that prior exercise is associated with an early (10 min) larger hyperglucagonemia-induced glucose production, which can be carried on for a longer period of time (60 min) providing that enough liver glycogen is available. These data strongly support the above-mentioned suggestion that liver sensitivity to glucagon is increased by an acute bout of exercise as it is in response to chronic exercise training (13). It can be postulated that the density of glucagon receptors in the liver can be rapidly increased by an acute bout of exercise as it has been recently shown to increase after an endurance training program (18).

The second advantage of the inclusion of an overloaded+exercise group in our experimental protocol is that our interpretation of the effects of a

supramaximal initial level of liver glycogen on glucagon-induced glucose production and utilization can be reexamined by comparing data of the overloaded+exercise group to data of the Exercise group. Glucose production was higher in the overloaded+exercise than in the Exercise group only during the last 30 min of the glucagon infusion, and not in the first 10 min (Fig.3C and 5B). This observation confirms our interpretation that supranormal initial levels of liver glycogen do not act as metabolic regulator to rapidly stimulate hepatic glucose production. On the other hand, glucose utilization was lower in the overloaded+exercise than in the Exercise group in the first 10 min of the glucagon infusion (Fig.4B). This supports our interpretation that the fast-feeding regimen has induced a reduction in glucose utilization which can be observed in the first part of the experiment.

There are limits to the interpretation of the present data that need to be addressed. Plasma glucagon concentrations in the present experiment were increased similarly in all groups indicating that the different HGP responses among groups were not due to different glucagon concentrations.

The interpretation of the present data is, however, limited to the situation of hyperglucagonemia. There is a possibility that the observed effects might have been different with a more physiological infusion of glucagon. It is also possible that the glucagon-induced reactive hyperinsulinemia might have interfered differently among groups with the effects of glucagon. There was, however, no significant difference in insulin responses among groups, with the exception of the 1/2-fast group.

In vivo and in vitro studies have also indicated that the effects of insulin in liver may be overridden by high doses of glucagon (6,20), as was the case in the present study. Finally, the present data do not provide any clear information as to what extent gluconeogenesis and/or glycogenolysis have been respectively stimulated by the glucagon infusion. It is interesting to observe that the groups (1/2-fast and Exercise) showing the lowest values for glucose production and plasma glucose values during the last 30 min of the glucagon infusion, also show the lowest initial and final levels of liver glycogen. This suggests, as previously reported (10), that the present glucagon-induced glucose production depends to a large extent on hepatic glycogenolysis, although it is not excluded that gluconeogenesis was also stimulated.

In summary, results of the present experiment indicate that higher than normal initial levels of liver glycogen are not associated with a mechanism that would rapidly (30 min) increase hyperglucagonemia-induced HGP. Supranormal levels of liver glycogen were, however, associated with higher hyperglucagonemia-induced hyperglycemia over a period of 60 min that was explained by a reduction in glucose utilization in the first 30 min combined to a better maintenance of glucose production in the last 30 min. The present data are also the first to indicate that prior exercise stimulates hyperglucagonemia-induced hepatic glucose production (first 10 min), suggesting an increase of glucagon action on liver during exercise.

Legends

Fig.1. Liver glycogen concentrations (A) before and after the infusion of glucagon and decreases (B) following the infusion of glucagon in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from all other groups, $P < 0.01$; + significantly different from the corresponding pre-infusion condition, $P < 0.01$; * significantly different from the Exercise group, $P < 0.05$.

Fig.2. Plasma glucose concentrations (A) and total area under glucose concentration curves (times 0-10, 30-60, and 0-60 min; B,C,D) before and during the glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups (< 0.01), * $P < 0.05$.

Fig.3. Glucose production (A) and total area under glucose production rate curves (times 0-10, 30-60, and 0-60min; B,C,D) before and during glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups ($P < 0.01$), * $P < 0.05$.

Fig.4. Blood glucose utilization (A) and total area under glucose utilization rate curves (times 0-10, 30-60, and 0-60 min) before and during glucagon infusion (time 0-60 min) in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups ($P < 0.01$), * $P < 0.05$.

Fig.5. Total areas under glucose (A), glucose production (B), and glucose utilization (C) curves per 10 min intervals in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; * significantly different from the respective 0-10 min interval, $P < 0.05$; + significantly different from the respective 50-60 min interval, $P < 0.05$.

Fig.6. Plasma glucagon (A) and insulin (A) concentrations and total area under glucagon and insulin concentration curves before and after the infusion of glucagon and muscle (soleus) glycogen concentrations (C) measured at the end of the experiment in rats subjected to different dietary and exercise manipulations. Values are means \pm SE; n = 8-10 rats/group. ** significantly different from indicated groups ($P < 0.01$), * $P < 0.05$; + significantly different from overloaded, overloaded+exercise, and 1/2-fast, $P < 0.05$; β significantly different from overloaded and overloaded-exercise at the 60-min time period, $P < 0.05$.

References

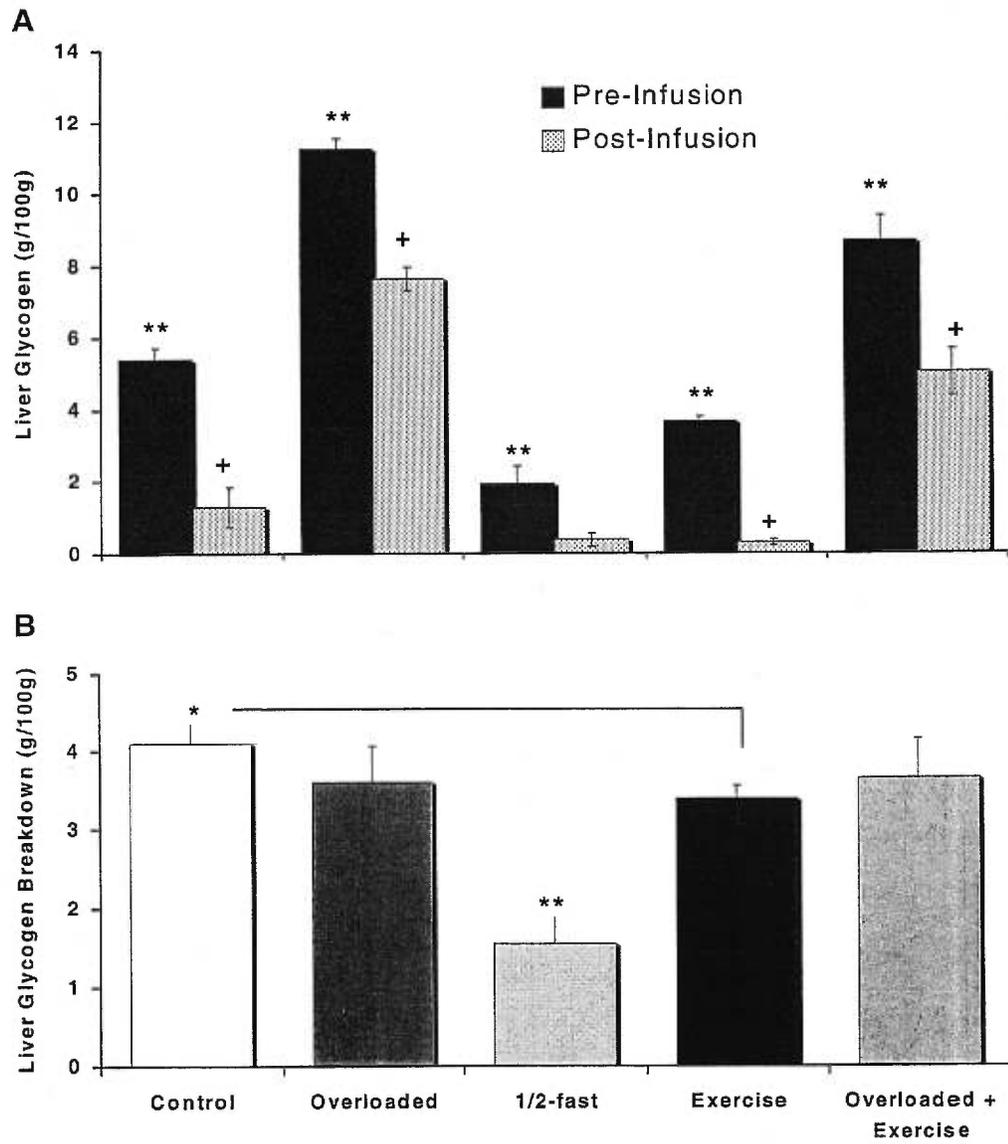
- 1) Adams, J.H., and J.H. Koeslag. Post-exercise ketosis and glycogen content of liver and muscle in rats on high carbohydrate diet. *Eur. J. Appl. Physiol.* 59:189-194, 1989.
- 2) Allsop, J.R., R.R. Wolfe, and J.F. Burke. The reliability of rates of glucose appearance in vivo calculated from constant tracer infusions. *Biochem. J.* 172: 407-416, 1978.
- 3) Bélanger, P., K.Couturier, M.G. Latour, and J.-M. Lavoie. Effects of supranormal liver glycogen content on hyperglucagonemia-induced liver glycogen breakdown. *Eur. J. Appl. Physiol.* 83: 328-335, 2000.
- 4) Berger, C.M., P.J. Sharis, D.P. Bracy, D. Brooks Lacy, and D.H. Wasserman. Sensitivity of exercise-induced increase in hepatic glucose production to glucose supply and demand. *Am. J. Physiol.* 267 (Endocrinol. Metab. 30): E411-E421, 1994.
- 5) Bolleni, M., S. Keppens, and W. Stalmans. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem. J.* 336 : 19-31, 1998.
- 6) Bomboy, J.D., S.B. Lewis, B.C. Sinclair-Smith, W.W. Lacy, and J.E. Liljenquist. Insulin-glucagon interaction in controlling splanchnic glucose production in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44: 474-480, 1977.

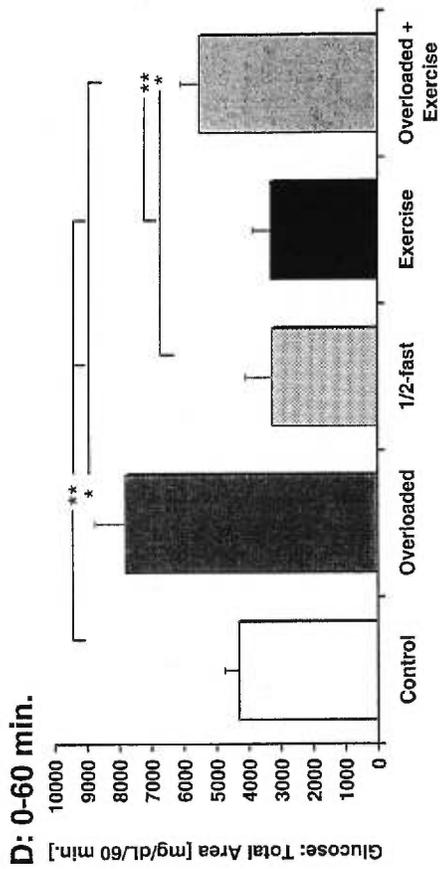
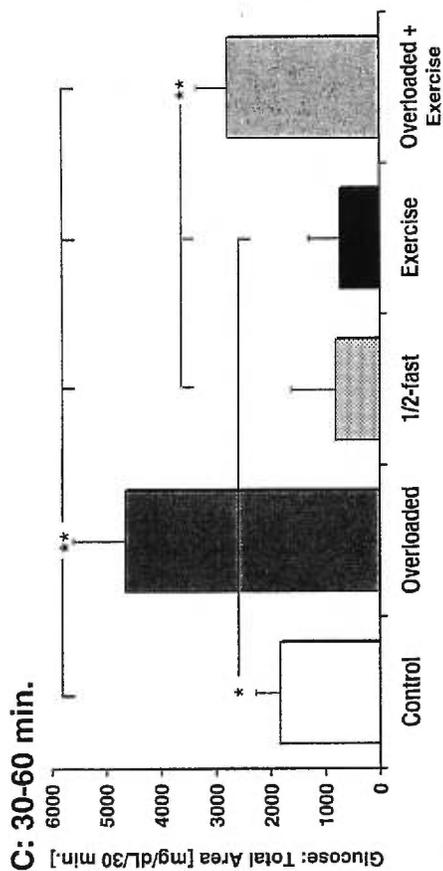
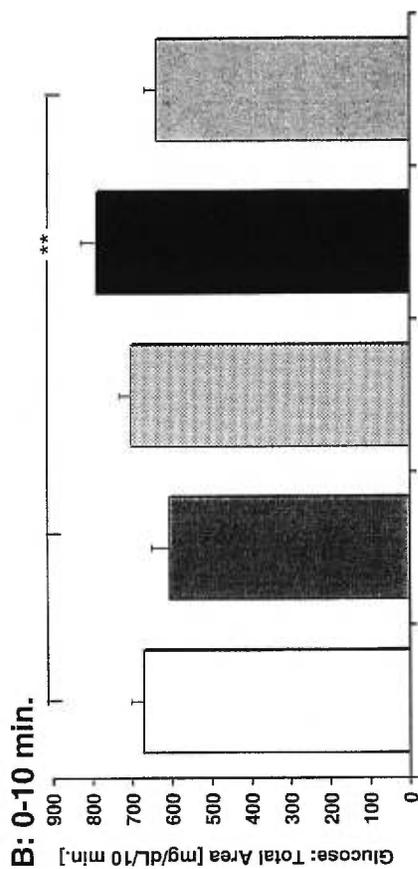
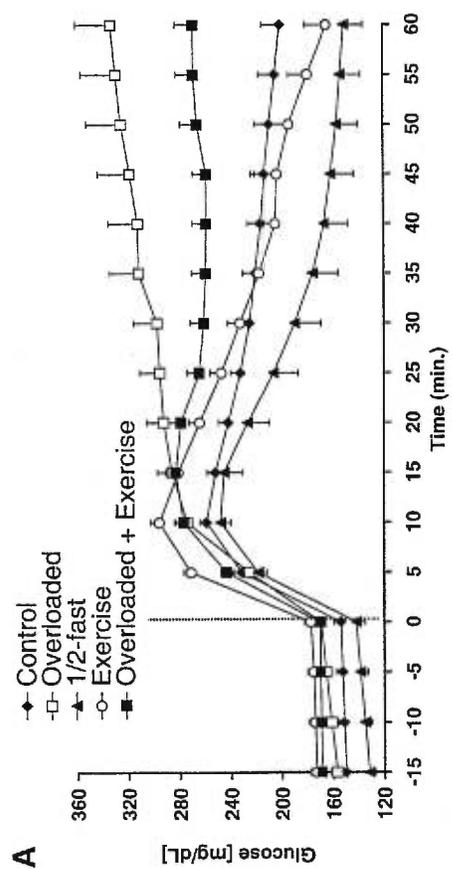
- 7) Bracy, D.P., B.A. Zinker, J.C. Jacobs, D. Brooks Lacy, and D.H. Wasserman. Carbohydrate metabolism during exercise: influence of circulating fat availability. *J. Appl. Physiol.* 79: 506-513, 1995.
- 8) Burstein, R., C.Polychronakos, C.J. Toews, J.D.MacDougall, H.J. Guyda, and B.I.Posner. Acute reversal of the enhanced insulin action in trained athletes: association with insulin receptor changes. *Diabetes* 34: 656-760, 1985.
- 9) Cherrington, A.D., M.P. Diamond, D.R. Green, and P.E. Williams. Evidence for an intrahepatic contribution to the waning effect of glucagon on glucose production in the conscious dog. *Diabetes* 31 : 917-922, 1982.
- 10) Cherrington, A.D., P.E. Williams, G.I. Shulman, and W.W. Lacy. Differential time course of glucagon's effect on glycogenolysis and gluconeogenesis in the conscious dog. *Diabetes* 30: 180-187, 1981.
- 11) Daemen, M.J.A.P., H.T.M. Vervoot-Peters, and H.H.W. Thijssen. Apparent dose dependency of the hepatic (S)-acenocoumarol clearance in the rat: a study using open liver biopsies. *J.Pharmacol. Sci.* 75: 238-240, 1986.
- 12) Dobbins, R.L., S.N. Davis, D. Neal, A. Caumo, C. Cobelli, and A.D. Cherrington. Rates of glucagon activation and deactivation of hepatic glucose production in conscious dogs. *Metabolism* 47: 135-142, 1998.
- 13) Drouin, R., C. Lavoie, J. Bourque, F. Ducros, D. Poisson, and J.-L. Chiasson. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.* 274 : E23-E28, 1998.

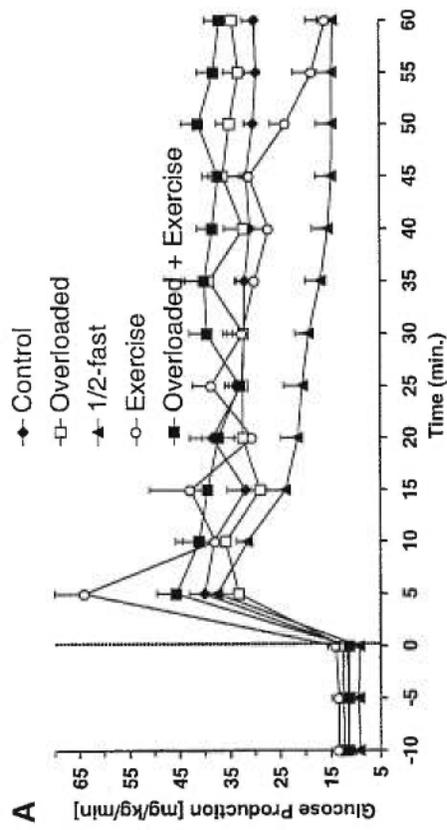
- 14) Galbo, H., P. Saugmann, and E.A. Richter. Increased hepatic glycogen synthase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol.Scand.* 107 : 269-272, 1979.
- 15) Geary, N., J. Le Sauter, and U. Noh. Glucagon acts in the liver to control spontaneous meal size in rats. *Amer. J. Physiol.* 264: R116-R122, 1993.
- 16) Issekutz, B., and M. Vranic. Significance of glucagon in the control of glucose production during exercise. *Am. J. Physiol.* 238 : E13-E20, 1980.
- 17) Kjaer, M., B. Kiens, M. Hargreaves, and E.A. Richter. Influence of active muscle mass on glucose homeostasis during exercise in humans. *J. Appl. Physiol.* 71: 552-557, 1991.
- 18) Légaré, A., R. Drouin, M. Milot, D. Massicotte, F. Péronnet, G. Massicotte, and C. Lavoie. Increased density of glucagon receptors in liver from endurance trained rats. *Am. J. Physiol.* In Press, 2001.
- 19) Lo, S., J.C. Russell, and A.W. Taylor. Determination of glycogen in small tissue samples. *J. Appl. Physiol.* 28: 234-236, 1970.
- 20) Mackrell, D.J., and J.E. Sokal. Antagonism between the effects of insulin and glucagon on the isolated liver. *Diabetes* 18: 724-732, 1969.
- 21) Radziuk, J., K.H. Norwich, and M. Vranic. Experimental validation of measurements of glucose turnover in nonsteady state. *Am. J. Physiol.* (Endocrinol. Metab.) 234: E84-E93, 1978.

- 22) Rao, R.H. Adaptations in glucose homeostasis during chronic nutritional deprivation in rats: hepatic resistance to both insulin and glucagon. *Metabolism* 44: 817-824, 1995.
- 23) Rothman, D.L., I. Magnusson, L.D. Katz, R.G. Shulman, and G.I. Shulman. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ¹³C NMR. *Science*. 254:573-576, 1991.
- 24) Steele, R. Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann. NY Acad. Sci.* 82: 420-430, 1959.
- 25) Tadjoré, M., R. Bergeron, M. Latour, F. Désy, C. Warren, and J.-M. Lavoie. Effects of dietary manipulations and glucose infusion on glucagon response during exercise in rats. *J. Appl. Physiol.* 83 : 148-152, 1997
- 26) Turcotte L.P., A.S. Rovener, R.R. Roark, and G.A. Brooks. Glucose kinetics in gluconeogenesis-inhibited rats during rest and exercise. *Am. J. Physiol.* 258 : E203-E211, 1990.
- 27) Vissing, J., J.L. Wallace, and H. Galbo. Effect of liver glycogen content on glucose production in running rats. *J. Appl. Physiol.* 66 : 318-322, 1989
- 28) Wasserman, D.H. Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state. *Annu. Rev. Physiol.* 57 : 191-218, 1995.
- 29) Wasserman, D.H., D.B. Lacy, C.A. Colburn, D.P. Bracy, and A.D. Cherrington. Efficiency of compensation for the absence of the fall in insulin during exercise. *Am. J. Physiol.* 261 : E587-E597, 1991.

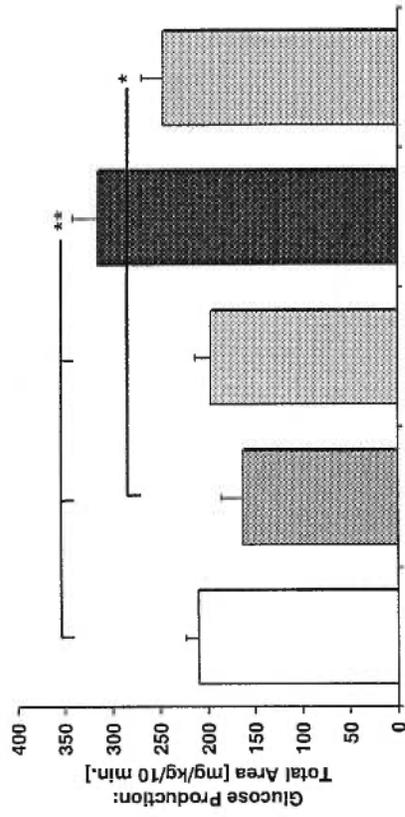
- 30) Wasserman, D.H., H.L.A. Lickley, and M. Vranic. Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs. *J. Clin. Invest.* 74 : 1404-1413, 1984.
- 31) Wasserman, D.H., J.A. Spalding, D.B. Lacy, C.A. Colburn, R.E. Goldstein, and A.D. Cherrington. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am. J. Physiol.* 257 : E108-E117, 1989.
- 32) Wasserman, D.H., R.M. O'Doherty, and B.A. Zinker. Role of endocrine pancreas in control of fuel metabolism by the liver during exercise. *Int. J. Obes.* 196 : S22-S30, 1995.



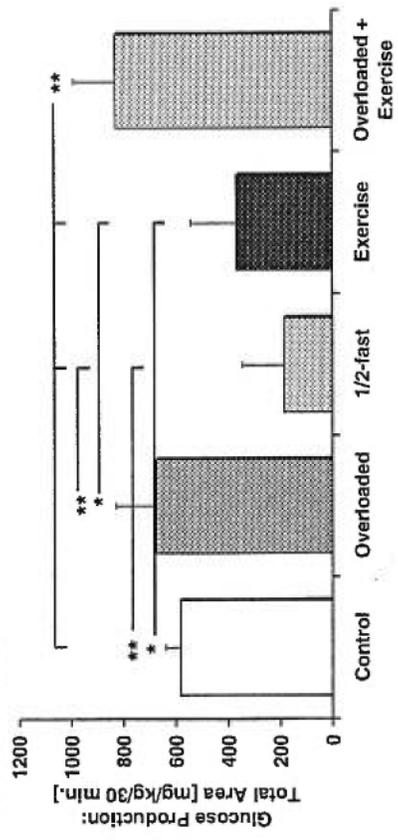




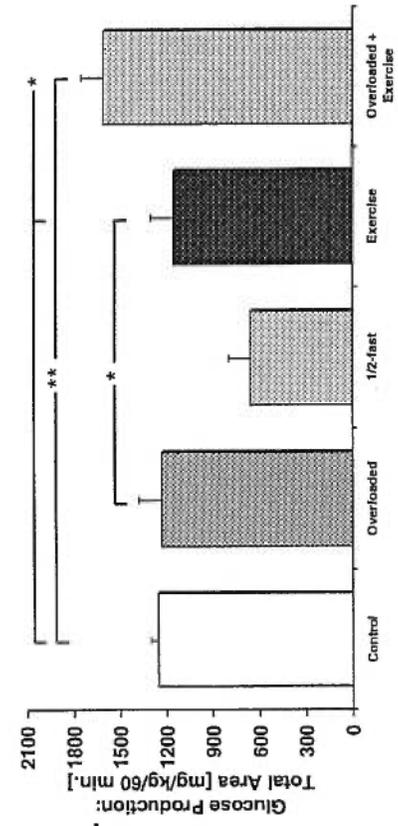
B: 0-10 min.

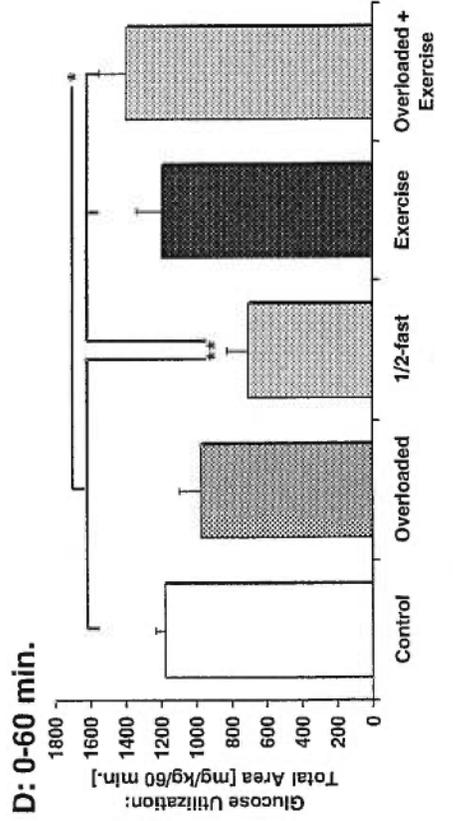
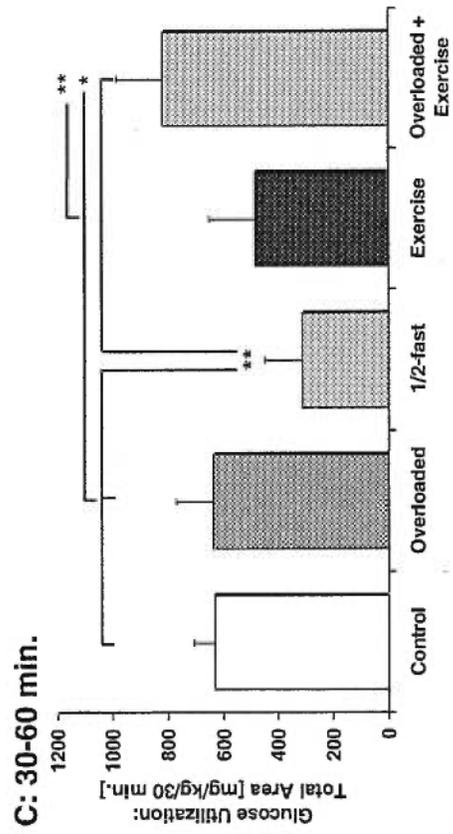
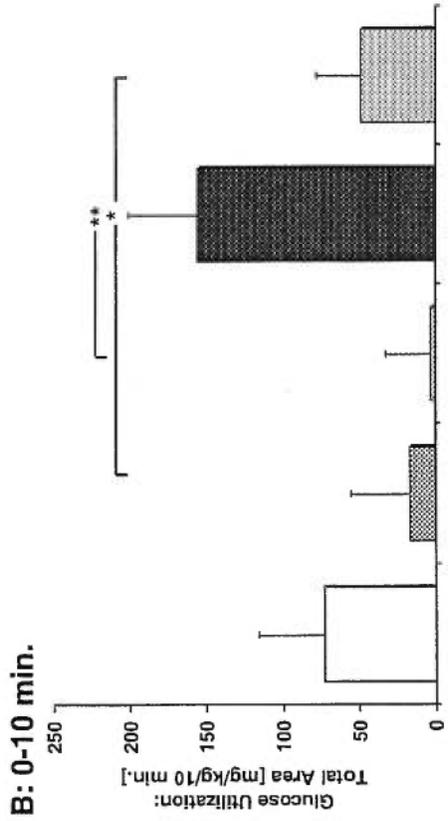
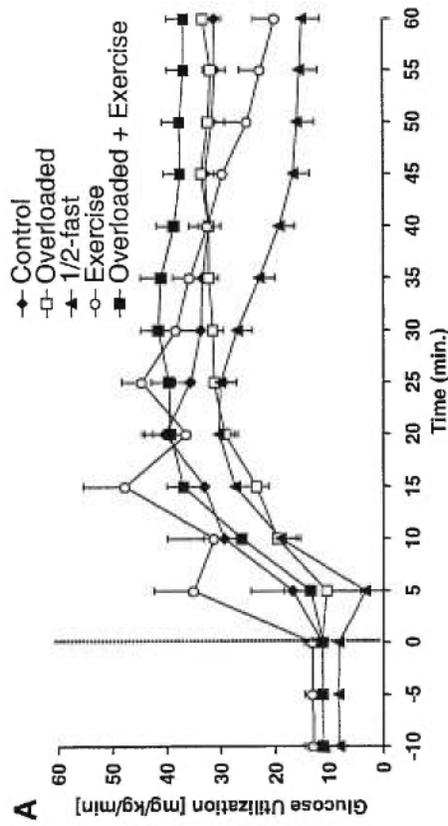


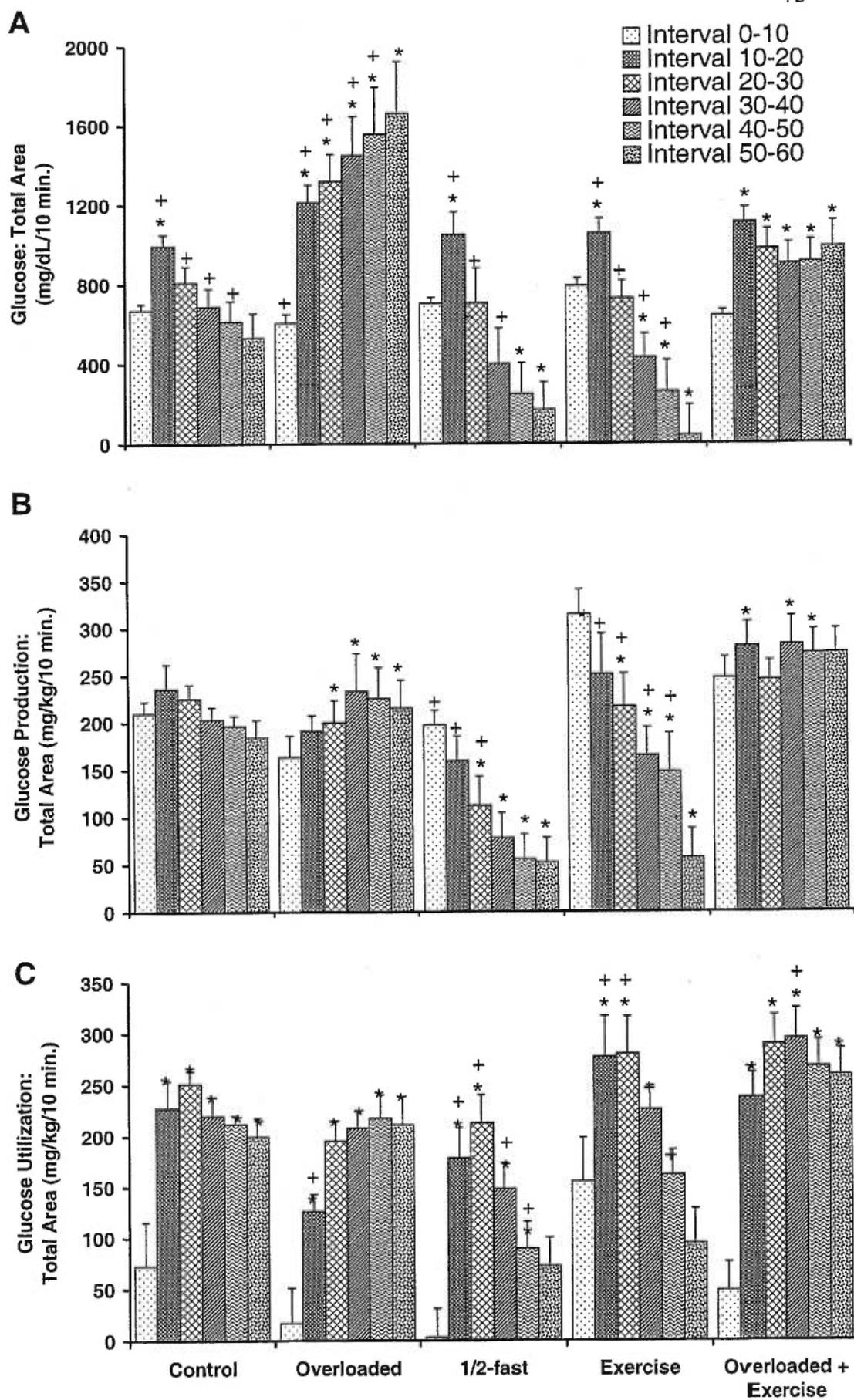
C: 30-60 min.

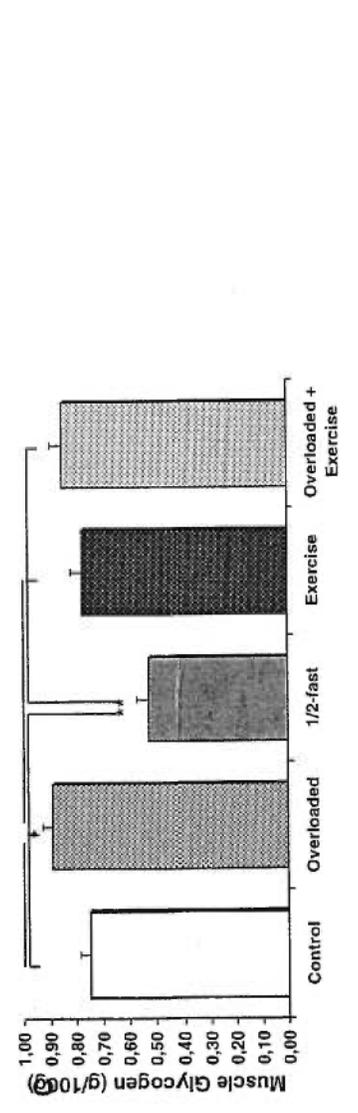
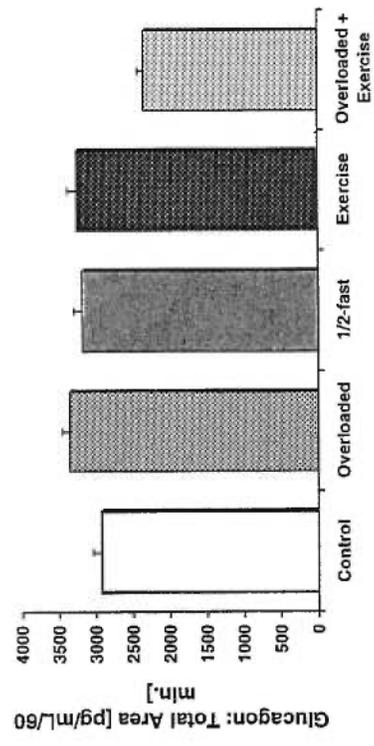
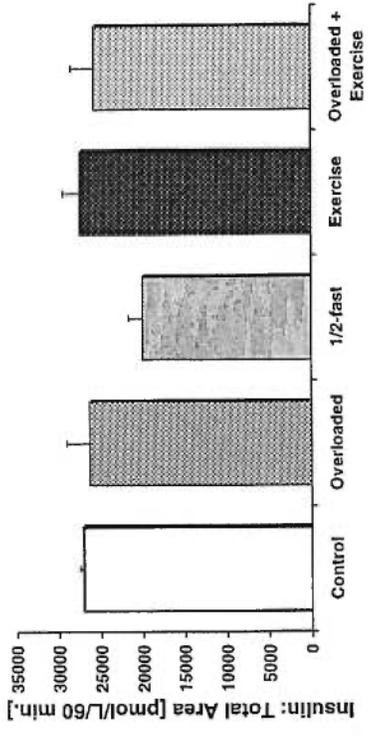
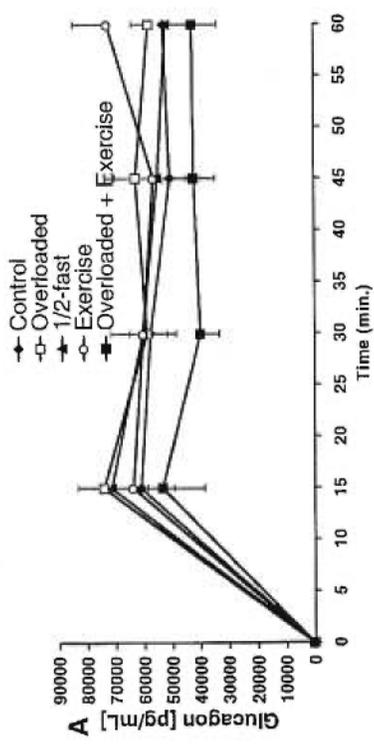
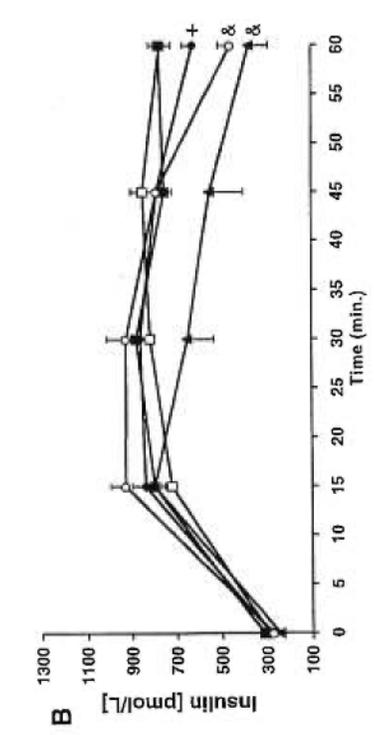


D: 0-60 min.









Chapitre 3 – Discussion

1. Le glycogène hépatique et musculaire

Il est bien connu que les manipulations diététiques altèrent les concentrations de glycogène hépatique et musculaire (Conlee *et al.* 1990; Bonen *et al.* 1989; Vissing *et al.* 1989; Fell *et al.* 1980). Dans notre étude, les niveaux de glycogène hépatique initiaux observés dans les groupes expérimentaux étaient tous significativement différents entre eux. Les groupes surcompensés montraient les concentrations les plus élevées : $11,24 \pm 0,31$ g/100g et $8,68 \pm 0,69$, respectivement. Le groupe demi-jeûne avait des contenus de glycogène hépatique beaucoup plus bas que normaux au début de l'expérimentation ($1,92 \pm 0,52$ g/100g de poids du rat). Enfin, les groupes contrôle et exercice se trouvent à mi-chemin, soit $5,41 \pm 0,32$ et $3,67 \pm 0,13$ g/100g de poids, respectivement.

Le taux de glycogène hépatique est aussi influencé par la réalisation d'un exercice physique (McDermott *et al.* 1991; Kirwan *et al.* 1990; Bonen *et al.* 1989; Fell *et al.* 1980). Effectivement, au niveau du foie, des valeurs plus basses ont été observées chez les groupes exercice et surcompensé-exercice, comparativement aux groupes contrôle et surcompensé.

Les biopsies prélevées avant et après l'expérimentation montrent que la diminution de glycogène hépatique n'est pas différente entre les groupes contrôle et surcompensé ($4,10 \pm 0,28$ et $3,60 \pm 0,46$ g/100g de poids, respectivement), pas plus qu'entre les groupes exercice et surcompensé-exercice ($3,38 \pm 0,17$ et $3,65 \pm 0,50$ g/100g de poids du rat, respectivement). La diminution du contenu de glycogène hépatique chez le groupe demi-jeûne est plus basse ($1,64 \pm 0,38$ g/100g de poids) dû au fait que les concentrations initiales sont aussi moins élevées que dans les autres cas. De plus, dans d'autres études conduites dans notre laboratoire (Bélanger *et al.* 2000), on a pu constater que des niveaux supraélevés de glycogène dans le foie ne produisent pas une dégradation de glycogène supérieure. La diminution de glycogène suite à l'infusion de glucagon dans tous les groupes expérimentaux n'est donc affectée ni par l'exercice physique ni par la surcompensation hépatique.

Le glycogène musculaire a été mesuré seulement dans le muscle soléaire, car des études portées précédemment dans notre laboratoire (Bélanger *et al.* 2000) ont montré que c'est précisément dans ce muscle que les changements au niveau du glycogène sont les plus probants. Le prélèvement à la fin de l'expérimentation montre des différences significatives ($P < 0,01$) entre les groupes demi-jeûne et les autres groupes, le premier ayant moins de glycogène que les autres groupes expérimentaux. Par contre, le groupe surcompensé montre des concentrations plus élevées de glycogène musculaire ($0,89 \pm 0,03$ g/100 de poids), significativement supérieures ($P < 0,05$) au groupe contrôle ($0,75 \pm 0,04$ g/100 de poids) et exercice

($0,78 \pm 0,04$ g/100 de poids) . La course sur tapis roulant pendant 60 minutes réalisée avant l'expérimentation n'a pas augmenté les contenus de glycogène musculaire de façon significative. Ainsi, le groupe exercice et surcompensé-exercice montrent des niveaux de glycogène dans le muscle soléaire statistiquement équivalents à ceux du groupe contrôle. Ces données suggèrent que le taux de glycogène musculaire suite à une infusion prolongée de glucagon est directement relié à la diète subie. En effet, si l'ingestion de glucose est suffisamment élevée, les réservoirs de glycogène continuent pleins. Par contre, l'effet de l'exercice physique sur les concentrations de glucose dans le muscle soléaire est moins remarquable.

2. Le taux de glucose plasmatique

Avant de commencer l'expérimentation, les taux de glucose plasmatique étaient semblables pour tous les groupes. Seul le groupe demi-jeûne partait d'un niveau significativement plus bas. Suite à l'infusion de glucagon, une augmentation de la glycémie est observée dans tous les groupes expérimentaux. Ercan *et al.* 1995 suggèrent que cet incrément soit surtout dû à l'augmentation de la néoglucogenèse hépatique causée par le glucagon. En effet, plusieurs auteurs ont observé que le glucagon et l'exercice sont les plus puissants stimulateurs de la production de glucose dans le foie (Fell *et al.* 1980; Dobbins *et al.* 1998; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A).

Dans notre étude, le groupe exercice a un taux de glucose plasmatique plus élevé que les autres groupes ($P < 0,05$) pendant l'intervalle des 10 premières minutes d'expérimentation. Ce taux est même plus élevé que celui des groupes surcompensés (789 ± 39 mg/dL/10 min. versus 369 ± 29 mg/dL/10 min. pour le groupe surcompensé-exercice et 606 ± 43 mg/dL/10 min. pour le surcompensé). Par contre, la glycémie se maintient stable et elle peut même augmenter dans ces deux derniers groupes, au fur et à mesure que le temps passe.

Les groupes expérimentaux ayant plus de glycogène hépatique en réserve (surcompensé et surcompensé-exercice), sont capables de maintenir des taux de glycémie élevés. Par contre, les groupes exercice et demie-jeûne, n'ayant plus de glycogène dans le foie, montrent des niveaux très bas de glucose plasmatique.

La production de glucose hépatique est directement reliée au taux de glucose sanguin et en est un des facteurs plus importants dans sa régulation. Dans les prochains paragraphes apprécier qu'effectivement, des taux plus élevés de glycémie provoquent une PGH majeure.

3. La production de glucose hépatique

Le groupe exercice montre un Ra de départ légèrement plus élevé que le reste de groupes expérimentaux. De plus, ce taux de production de glucose augmente de façon plus importante que dans les autres groupes pendant les dix

premières minutes d'expérimentation. Par après, la PGH diminue progressivement jusqu'à atteindre des valeurs similaires à celles du groupe demi-jeûne au terme de l'expérimentation ($15,77 \pm 3,9$ mg/kg/min. pour le groupe exercice et $14,36 \pm 2,95$ mg/kg/min. pour le demi-jeûne). Cette cinétique de PGH pour le groupe exercice est la même que celle de la glycémie. Ceci confirme que l'exercice physique stimule à court terme la production endogène de glucose induite par une hyperglucagonémie provoquée. Ces résultats suggèrent une augmentation de la sensibilité hépatique au glucagon en situation post-exercice.

Suite à l'exercice physique, le foie produit moins de glucose à long terme : c'est l'effet d'évanescence ou « *waning effect* ». On n'apprécie ce phénomène que dans les groupes manquant de glycogène hépatique, soit l'exercice et le demi-jeûne. Le « *waning effect* » semble donc très relié aux réserves de glycogène.

Ceci suggère que l'exercice physique aigu sensibilise le foie, augmentant ainsi la production de glucose hépatique à court terme (dans les 10-20 premières minutes). Cependant le Ra diminue à fur et à mesure que le temps passe, car les réserves de glycogène du foie diminuent. D'un autre côté, il est possible qu'à court terme, la production de glucose hépatique en réponse au glucagon soit ralentie par une surcompensation en glycogène. Cependant, elle est essentielle pour maintenir stables les niveaux de production endogène de glucose tout au long de l'expérimentation.

4. L'utilisation de glucose

Le taux de disparition du glucose (« *Rate of disappearance* » ou « Rd ») équivaut au glucose utilisé par les tissus périphériques. Les courbes de Rd évoluent de manière très semblable à celles du Ra, car la mesure du Rd est directement liée à celle-ci (Steele *et al.* 1959).

On peut constater à la lecture des données, que le taux de disparition du glucose est fortement stimulé par l'exercice pendant les 15 premières minutes d'expérimentation. Ce groupe montre les taux de Rd significativement plus élevés à court terme (155 ± 55 mg/kg ; $P < 0,05$). À la fin de l'expérimentation, la situation est complètement différente : le groupe exercice n'ayant plus de glycogène dans les réservoirs hépatiques, n'est plus capable de maintenir des valeurs de Rd élevées.

De la même façon qu'avec la production de glucose, l'effet d'évanescence du Rd apparaît avec le manque de glycogène hépatique, chez les groupes exercice et demi-jeûne. Par contre, dans le cas où ces réservoirs seraient toujours pleins, l'effet stimulateur de l'exercice perdure. Le groupe surcompensé-exercice est donc celui qui utilise le plus de glucose à la fin de l'expérimentation ($36,75 \pm 3,12$ mg/kg/min., par rapport aux $33,14 \pm 3,36$ mg/kg/min. et $31,09 \pm 2,42$ mg/kg/min. des groupes surcompensé et contrôle respectivement.

À la vu de ces résultats on peut suggérer que la combinaison entre exercice et surcompensation joue un rôle essentiel dans l'utilisation de glucose. L'exercice physique produit un effet stimulateur à court terme, effet d'autant plus considérable s'il y a du glucose en quantité dans les cellules.

5. Le glucagon et l'insuline plasmatiques

Le glucagon, surtout infusé de manière constante (Chiasson *et al.* 1977; Dobbins *et al.* 1998), provoque rapidement des effets sur la production de glucose hépatique *via* l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse (Drouin *et al.* 1998; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A; Dobbins *et al.* 1998; Stevenson *et al.* 1987). Dobbins *et al.* 1998, indiquèrent que la première période de 15 minutes suivant le début de l'infusion de glucagon est la plus critique.

Dans notre étude, un bolus de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sur 60 secondes suivi d'une infusion constante de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ sur 59 minutes ont provoqué des effets immédiats sur les concentrations de glucagon plasmatique et conséquemment sur la PGH (tel que vu précédemment). Effectivement, 15 minutes après le bolus, une hyperglucagonémie survient au niveau de tous les groupes expérimentaux sans exception : les valeurs passent d'environ 200 pg/mL à 50000-70000 pg/mL , soit 300 fois plus élevées. Cette situation d'excès de glucagon sanguin est maintenue pour toute la durée de l'expérimentation, sans différences significatives entre les groupes.

L'effet évanescant du glucagon sur la production endogène de glucose a été attribué au glycogène (Dobbins *et al.* 1998). Cet effet de diminution du Ra en réponse au glucagon a lieu dans les groupes où il manque du glycogène, soit le groupe exercice et le demi-jeûne, principalement. Dobbins *et al.* 1998 interprètent ce phénomène comme une desensibilisation hépatique au glucagon, associée à un taux de formation plus faible d'AMPc.

À la différence du glucagon, l'insuline agit plutôt au niveau périphérique sur le métabolisme du glucose (Lavoie *et al.* 1997 B). Plusieurs auteurs ont remarqué que les effets du glucagon sur la PGH et sur la néoglucogénèse peuvent être substantiellement réduits par le phénomène de rétroaction de l'insuline (Stevenson *et al.* 1987; Wasserman 1995; Lavoie *et al.* 1997 A). Cependant, il semblerait qu'en état d'hyperglucagonémie, les effets de rétroaction de l'insuline et de l'hyperglycémie sont minimes.

Tout au long de l'expérimentation, on n'observe pas de différences significatives entre les groupes quant à la réponse de l'insuline. Des différences sur la réponse de cette hormone sont observables seulement lors de la dernière minute (prélèvement de la minute 60), quand les groupes ayant plus de glycogène hépatique, donc le surcompensé et le surcompensé-exercice, sont capables de maintenir des taux d'insuline plus élevés que les autres groupes expérimentaux ($P < 0,05$). En définitive, le rôle de l'insuline dans les circonstances où notre étude se déroule est assez mineur.

À la lumière de nos résultats, trois conclusions peuvent être tirées de cette étude. En premier lieu, la surcompensation en glycogène hépatique n'augmente pas spontanément la production de glucose hépatique. Deuxièmement, l'exercice stimule autant le Ra que le Rd, mais seulement à court terme : à l'intérieur des 10-20 premières minutes. Par la suite, une diminution de ces deux paramètres survient. Enfin, l'effet évanescent (weaning effect) du glucagon disparaît si les réserves de glycogène hépatique sont plus importantes, soit dans le cas de surcompensation alimentaire.

Chapitre 4 – Ouvrages de références

- Bélangier P., Couturier K., Latour M.G. & Lavoie J-M. (2000). “Effects of supranormal liver glycogen content on hyperglucagonemia-induced liver glycogen breakdown.” Eur. J. Appl. Physiol. **83**: 328-335.
- Bergeron R., Kjaer M., Simonsen L., Bulow J. & Galbo H. (1999). “Glucose production during exercise in humans: a-hv balance and isotopic-tracer measurements compared.” J. Appl. Physiol. **Jul; 87(1)**: 111-115.
- Bonen A., McDermott J.C. & Hutber C.A., (1989). “Carbohydrate metabolism in skeletal muscle: an update of current concepts.” Int. J. Sports Med. **Dec; 10(6)**: 385-401.
- Cherrington AD. (1998). The Metabolic Actions of Glucagon. Clinical Research in Diabetes and Obesity. Part I: Methods, Assessment, and Metabolic Regulation: 221-242.
- Chiasson J. L., Liljenquist J.E., Lacy W.W., Jennings A.S. & Cherrington A.D. (1977). “Gluconeogenesis: methodological approaches in vivo.” Fed. Proc. **Feb; 36(2)**: 229-235.
- Conlee R. K., Hammer R.L., Winder W.W., Bracken M.L., Nelson A.G. & Barnett D.W. (1990). “Glycogen repletion and exercise endurance in rats adapted to a high fat diet.” Metabolism : Clinical and Experimental **39**: 289-294.

- Conlee RK., Hickson RC., Winder WW., Hagberg JM. & Holloszy JO. (1978).
“Regulation of glycogen resynthesis in muscles of rats following exercise.”
Am. J. Physiol. **Sep**; **235**(3): R145-R150.
- Cowan JS., Vranic M. & Wrenshall GA. (1959). “Effects of preceding diet and
fasting on glucose turnover in normal dogs.” Metabolism. **Apr**; **18**(4): 319-
330.
- Dobbins R.L., Davis S.N., Neal D., Caumo A., Cobelli C. & Cherrington AD.
(1998). “Rates of glucagon activation and deactivation of hepatic glucose
production in conscious dogs.” Metabolism **47**(2): 135-142.
- Donovan C.M. & Sumida K.D. (1997). “Training enhanced hepatic
gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise.”
Med. Sci. Sports Exerc. **29**(5): 628-634.
- Drouin R., Lavoie C., Bourque J., Ducros F., Poisson D. & Chiasson J-L. (1998).
“Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained
subjects.” Am. J. Physiol. **274**(Endocrinol. Metab. 37): E23-E28.
- Ercan N., Gannon M.C. & Nuttall F.Q. (1995). “Effects of glucagon with or
without insulin administration on liver glycogen metabolism.” Am. J.
Physiol. **269**: E231-E238.
- Felig P. & Wahren J. (1971). “Amino Acid metabolism in exercising man.” J.
Clin. Investigation **50**: 2703-2714.
- Felig P., Wahren J. & Hendler R. (1976). “Influence of physiologic
hyperglucagonemia on basal and insulin-inhibited splanchnic glucose
output in normal man.” J. Clin. Invest. **58**: 761-765.

- Fell R., McLane J.A., Winder W.W. & Holloszy J.O. (1980). "Preferential resynthesis of muscle glycogen in fasting rats after exhausting exercise." Am. J. Physiol. **May; 238(5):** R328-R332.
- Ferrannini E., DeFronzo RA. & Sherwin RS. (1982). "Transient hepatic response to glucagon in man: role of insulin and hyperglycemia." Am. J. Physiol. **Feb; 242(2):** E73-E81.
- Guyton AC. (1994). Tratado de Fisiología Médica, McGraw-Interamericana de España.
- Hetenyi G., Perez G. & Vranic M. (1983). "Turnover and precursor-product relationships of nonlipid metabolites." Physiological Reviews **April; 63(2):** 606-667.
- Issekutz TB., Issekutz B. Jr. & Elahi D. (1974). "Estimation of hepatic glucose output in non-steady state. The simultaneous use of 2-³H-glucose and ¹⁴C-glucose in the dog." Can. J. Physiol. Pharmacol. **52:** 215-224.
- Katz J. (1985). "Determination of gluconeogenesis in vivo with 14C-labeled substrates." Am. J. Physiol. **Apr; 248(4 Pt 2):** R391-R399.
- Katz J. & Dunn A. (1967). "Glucose-2-T as a tracer for glucose metabolism." Biochemistry **6:** 1-5.
- Kirwan J. P., Costill D.M., Flynn M.G., Neuffer P.D., Fink W.J. & Morse W.M. (1990). "Effects of increased training volume on the oxidative capacity, glycogen content and tension development of rat skeletal muscle." International Journal of Sports Medicin **11:** 479-483.

- Kjaer M., Engfred K., Fernandes A., Secher N.H. & Galbo H. (1993). "Regulation of hepatic glucose production during exercise in humans: role of sympathoadrenergic activity." Am. J. Physiol. **Aug; 265**(2 Pt. 1): E275-E283.
- Kjaer M. (1998). "Hepatic glucose production during exercise." Adv. Exp. Med. Biol. **441**: 117-127.
- Kreisberg RA., Siegal AM. & Owen W.C. (1972). "Alanine and gluconeogenesis in man: effect of ethanol." J. Clin. Endocrinol. Metab. **34**(5): 876-883.
- Lavoie C., Ducros F., Bourque H., Languelier H. & Chiasson J-L. (1997. A.). "Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin in the regulation of glucose utilization." Can. J. Physiol. Pharmacol. **75**: 36-43.
- Lavoie C., Ducros F., Bourque H., Languelier H. & Chiasson J-L. (1997. B.). "Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis." Can. J. Physiol. Pharmacol. **75**: 26-35.
- McDermott J. C., Elder G.C. & Bonen A. (1991). "Non-exercising muscle metabolism during exercise." Pflügers Archiv **418**: 301-307.
- McGuinness OP., Burgin K., Moran C., Bracy D. & Cherrington AD. (1994). "Role of glucagon in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog." Am. J. Physiol. **266**: E438-E447.
- Molina J.M., Baron A.D. Edelman SV., Brechtel G., Wallace P. & Olefsky JM. (1990). "Use of a variable tracer infusion method to determine glucose turnover in humans." Am. J. Physiol. **Jan; 258**(1 Pt. 1): E16-E23.

- Norwich KH., Radziuk J., Lau D. & Vranic M. (1974). "Experimental validation of nonsteady rate measurements using a tracer infusion method and inulin as tracer and tracee." Can. J. Physiol. Pharmacol. **Jun; 52(3)**: 508-521.
- Radziuk J., Norwich KH. & Vranic M., (1974). "Measurement and validation of nonsteady turnover rates with applications to the inulin and glucose systems." Fed. Proc. **Jul; 33(7)**: 1855-1864.
- Radziuk J., Norwich KH. & Vranic M., (1978). "Experimental validation of measurements of glucose turnover in nonsteady state." Am. J. Physiol. **234(1)**: E84-E93.
- Sheu WH., Hollenbeck CB., Wu MS., Jaspán JB., Chen YD. & Reaven GM. (1990). "Effect of difference in glucose infusion rate on quantification of hepatic glucose production." J. Clin. Endocrinol. Metab. **70(5)**: 1354-1360.
- Shoemaker WC., Van Itallie TB. & Walker WF. (1959). "Measurement of hepatic glucose output and hepatic blood flow in response to glucagon." Am. J. Physiol. **196(2)**: 315-318.
- Steele R. (1959). "Influences of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output." Annals of NY Acad. Sci. **82**: 420-430.
- Stevenson R.W., Steiner K.E., Davis M.A., Hendrick G.K., Williams P.E., Lacy W.W., Brown L., Donahue P., Lacy D.B. & Cherrington A.D. (1987). "Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo." Diabetes Mar; **36(3)**: 382-389.
- Takayama S. (1995). "Increased muscle sympathetic nerve activity after glucagon administration in man." J Auton Nerv Syst. **Aug 4; 54(2)**: 171-175.

- Unger R. & Orci L. (1976). "Physiology and pathophysiology of glucagon." Physiol. Rev. **Oct; 65**(4): 778-826.
- Vissing J., Wallace JL. & Galbo H. (1989). "Effect of liver glycogen content on glucose production in running rats." J. Appl. Physiol. **Jan; 66**(1): 318-322.
- Vissing J., Sonne B. & Galbo H. (1988). "Regulation on hepatic glucose production in running rats studied by glucose infusion." J. Appl. Physiol. **65**(6): 2552-2557.
- Wasserman D.H. (1995). "Regulation of glucose fluxes during exercise in the postabsorptive state." Annu. Rev. Physiol. **57**: 191-218.