



**Université de Montréal**

**Impact de l'insuffisance rénale chronique sur les transporteurs de glucose et  
les effets subséquents sur la résistance à l'insuline**

**Par  
Christopher Dumayne**

**Département de pharmacologie  
Faculté de médecine**

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.  
en Pharmacologie

Décembre 2013

© Christopher Dumayne, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé :

Impact de l'insuffisance rénale chronique sur les transporteurs de glucose et les effets subséquents sur la résistance à l'insuline

Présenté par :  
Christopher Dumayne

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Pierre S. Haddad, président-rapporteur  
Dr. Vincent Pichette, directeur de recherche  
Dr. Éric Thorin, membre du jury

## RÉSUMÉ

Parmi l'ensemble des désordres métaboliques retrouvés en insuffisance rénale chronique (IRC), la résistance à l'insuline demeure l'un des plus importantes à considérer en raison des risques de morbidité et de mortalité qu'elle engendre via les complications cardiovasculaires. Peu d'études ont considéré la modulation de transporteurs de glucose comme mécanisme sous-jacent à l'apparition et à la progression de la résistance à l'insuline en IRC. Nous avons exploré cette hypothèse en étudiant l'expression de transporteurs de glucose issus d'organes impliqués dans son homéostasie (muscles, tissus adipeux, foie et reins) via l'utilisation d'un modèle animal d'IRC (néphrectomie 5/6<sup>e</sup>). La sensibilité à l'insuline a été déterminée par un test de tolérance au glucose (*GTT*), où les résultats reflètent une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie, et par les études de transport au niveau musculaire qui témoignent d'une diminution du métabolisme du glucose en IRC (~31%;  $p < 0,05$ ). La diminution significative du GLUT4 dans les tissus périphériques (~40%;  $p < 0,001$ ) peut être à l'origine de la résistance à l'insuline en IRC. De plus, l'augmentation de l'expression protéique de la majorité des transporteurs de glucose (SGLT1, SGLT2, GLUT1;  $p < 0,05$ ) au niveau rénal en IRC engendre une plus grande réabsorption de glucose dont l'hyperglycémie subséquente favorise une diminution du GLUT4 exacerbant ainsi la résistance à l'insuline. L'élévation des niveaux protéiques de GLUT1 et GLUT2 au niveau hépatique témoigne d'un défaut homéostatique du glucose en IRC. Les résultats jusqu'ici démontrent que la modulation de l'expression des transporteurs de glucose peut être à l'origine de la résistance à l'insuline en IRC.

L'impact de la parathyroïdectomie (PTX) sur l'expression du GLUT4 a été étudié étant donné que la PTX pourrait corriger l'intolérance au glucose en IRC. Nos résultats démontrent une

amélioration de l'intolérance au glucose pouvant être attribuable à la moins grande réduction de l'expression protéique du GLUT4 dans les tissus périphériques et ce malgré la présence d'IRC. L'excès de PTH, secondaire à l'hyperparathyroïdie, pourrait alors être à l'origine de la résistance à l'insuline en IRC en affectant l'expression du GLUT4.

L'IRC partage de nombreuses similitudes avec le prédiabète quant aux défaillances du métabolisme du glucose tout comme l'hyperinsulinémie et l'intolérance au glucose. Aucune étude n'a tenté d'évaluer si l'IRC pouvait ultimement mener au diabète. Nos résultats ont par ailleurs démontré que l'induction d'une IRC sur un modèle animal prédisposé (rats *Zucker*) engendrait une accentuation de leur intolérance au glucose tel que constaté par les plus hautes glycémies atteintes lors du *GTT*. De plus, certains d'entre eux avaient des glycémies à jeun dont les valeurs surpassent les 25 mmol/L. Il est alors possible que l'IRC puisse mener au diabète via l'évolution de la résistance à l'insuline par l'aggravation de l'intolérance au glucose.

**Mots-clés:** IRC, résistance à l'insuline, GLUT, PTH, diabète, *Zucker*.

## **ABSTRACT**

Of all metabolic disorders found in chronic renal failure (CRF), insulin resistance remains one of the most important to consider because of the risk of morbidity and mortality it causes via cardiovascular complications. Few studies have considered the modulation of glucose transporters as the mechanism underlying the emergence and progression of insulin resistance in CRF. We explored this hypothesis by studying the expression of glucose transporters from organs involved in its homeostasis (muscle , fat , liver and kidneys) through the use of an animal model reflecting CRF (5/6<sup>th</sup> nephrectomy). The insulin sensitivity was determined by a glucose tolerance test (GTT), where the results reflect glucose intolerance and hyperinsulinemia , and transport studies in muscle show a decrease in glucose uptake in CRF rats (~31% , p<0.05). The significant decrease in GLUT4 in peripheral tissues (~40%, p<0.001) may be the cause of insulin resistance in CRF. Furthermore, increased protein expression of the majority of glucose transporters (SGLT1, SGLT2, GLUT1, p<0.05) within the kidney in CRF causes greater glucose reabsorption in which consequential hyperglycemia promotes a decrease in GLUT4 thus exacerbating insulin resistance. Elevated protein levels of GLUT1 and GLUT2 in the liver reflects an impaired glucose homeostasis in CRF. The results show that the modulation of the expression of glucose transporters may be responsible for insulin resistance in CRF.

The impact of parathyroidectomy (PTX) on the expression of GLUT4 was studied since PTX is known to correct glucose intolerance in CRF. Our results show an improvement in glucose intolerance which may be due to less reduction of GLUT4 protein expression in peripheral tissues despite the presence of CRF. The excess of PTH, linked to secondary

hyperparathyroidism, could be held responsible to the presence of insulin resistance in CRF by affectant GLUT4 expression.

CRF shares many similarities with prediabetes in regards to impaired glucose metabolism such as hyperinsulinemia and glucose intolerance. No studies have attempted to assess whether CRF could lead to diabetes. Our results demonstrated that the induction of CRF in a predisposed animal model (*Zucker* rats) provoked greater glucose intolerance as evidenced by the highest blood glucose levels reached in the GTT. In addition, some of them had fasting blood glucose levels whose values exceeded 25 mmol/L. It is therefore possible that CRF can lead to diabetes through the evolution of insulin resistance by the worsening of glucose intolerance.

**Keywords:** CRF, insulin resistance, GLUT, PTX, diabetes, *Zucker*.

# Table des matières

1. INTRODUCTION .....	1
1.1 Insuffisance rénale chronique .....	1
1.1.1 Causes .....	2
1.1.2 Désordres métaboliques .....	5
1.2 Résistance à l'insuline.....	8
1.2.1 Rôles de l'insuline.....	9
1.2.2 Progression de la résistance à l'insuline .....	10
1.2.3 Importance de la résistance à l'insuline .....	11
1.2.4 Pathogenèse de la résistance à l'insuline .....	12
1.3 Résistance à l'insuline en insuffisance rénale chronique.....	18
1.3.1 Répercussions de la résistance à l'insuline sur la fonction rénale .....	19
1.3.2 Répercussions d'une fonction rénale altérée sur la sensibilité à l'insuline.....	19
1.3.3 Complications cardiovasculaires en IRC .....	21
1.3.4 Étiologies de la résistance à l'insuline en IRC chez l'humain.....	22
1.3.5 Étiologies de la résistance à l'insuline en IRC chez des modèles animaux.....	25
1.3.6 Impacts de l'IRC sur les transporteurs membranaires .....	27
1.3.7 Impacts de l'IRC sur les transporteurs de glucose.....	31
1.3.8 Induction du diabète chez des sujets atteints d'IRC .....	33
1.4 Hypothèse et objectifs de ma maîtrise .....	33
2. RÉSULTATS.....	36
2.1 Article .....	36
2.2 Études complémentaires .....	65
2.2.1 Matériel et Méthodes .....	65
2.2.2 Résultats.....	66
3. DISCUSSION.....	76
3. 1 Rappel du projet.....	76
3.2 Évaluation de la résistance à l'insuline chez le modèle NPX.....	76
3.3 Tissus périphériques.....	78
3.3.1 Muscles squelettiques .....	79
3.3.2 Tissus adipeux.....	80
3.4 Reins .....	82

3.4.1 Compensations.....	83
3.4.2 Répercussions extra-rénales.....	85
3.5 Foie .....	85
3.6 Transport de glucose.....	87
3.7 Qui est responsable? .....	89
3.8 L'IRC peut-elle mener au diabète?.....	91
3.9 Études futures.....	94
4. CONCLUSION.....	95
5. LIMITES DU MODÈLE DE NÉPHRECTOMIE .....	97

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> Stratification de la sévérité de l'insuffisance rénale chronique .....	2
---	---

### Article

<b>Table 1</b> TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR .....	59
<b>Table II</b> Biochemical parameters and body weight in control and CRF rats .....	59

<b>Tableau II</b> Paramètres biochimiques et poids corporels de rats avec ou sans IRC et PTX .....	62
<b>Tableau III</b> Paramètres biochimiques et poids corporels de rats <i>Zucker</i> avec ou sans IRC .....	74

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b> Pathogenèse de l'ostéodystrophie rénale.....	7
<b>Figure 1.2</b> Homéostasie du glucose via l'insuline .....	9
<b>Figure 1.3</b> Développement du T2D .....	11
<b>Figure 1.4</b> Rôles des NEFA dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline .....	16
<b>Figure 1.5</b> Influence des désordres métaboliques de l'IRC sur la sensibilité à l'insuline.....	20
<b>Figure 1.6</b> Métabolisme du glucose dans les cellules musculaires .....	24

### Article

<b>Figure 1</b> Glucose and insulin responses to an intraperitoneal glucose challenge at 4 weeks of uremia.....	60
<b>Figure 2</b> mRNA expression of select organ glucose transporters in CRF rats.....	61
<b>Figure 3</b> Protein expression of select organ glucose transporters in CRF rats.....	62
<b>Figure 4</b> Ex vivo accumulation of radio-labeled glucose in <i>epitrochlearis</i> muscles of CRF rats.....	64

<b>Figure 2.1</b> Glycémies et insulïnémies à la suite d'une hyperglycémie provoquée à 4 semaines post-néphrectomie.....	69
<b>Figure 2.2</b> Impact de la PTX sur l'expression génique du GLUT4 .....	70
<b>Figure 2.3</b> Impact de la PTX sur l'expression protéique du GLUT4.....	72
<b>Figure 2.4</b> Glycémies et insulïnémies à la suite d'une hyperglycémie provoquée à 4 semaines post-néphrectomie chez des rats <i>Zucker</i> .....	75

## **LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS**

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** 1,25-dihydroxycholécalférol

**ABC** *ATP-Binding Cassettes*

**Ang II** Angiotensine II

**CrCl** Clairance rénale de créatinine

**DFG** Débit de filtration glomérulaire

**DN** Néphropathie diabétique

**EPO** Érythropoïétine

**G6P** Glucose-6-phosphate

**GLUT** Transporteur de glucose

**GSIS** *Glucose-stimulated insulin secretion test*

**GTT** *Glucose tolerance test*

**H<sup>+</sup>** Ion hydrogène

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>** Ion bicarbonate

**HD** Hémodialyse

**IgA** Immunoglobuline A

**IL-6** *Interleukine-6*

**IRC** Insuffisance rénale chronique

**IRT** Insuffisance rénale terminale

**LDL** *Low-density lipoprotein*

**MODY** *Maturity-onset diabetes of the young*

**MEC** Matrice extracellulaire

**Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>** Sodium-potassium

**NEFA** Acide gras non-estérifié

**NH<sub>3</sub>** Ammoniac

**NO** oxyde nitrique

**NPX** Néphrectomie

**PPAR $\gamma$**  *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

**PTH** Parathormone

**PTX** Parathyroïdectomie

**RAAS** Système rénine-angiotensine-aldostérone

**ROS** Espèces réactives de l'oxygène

**SGLT** Cotransporteur sodium-glucose dépendant

**SLC** *Solute Carriers*

**T1D** Diabète de type I

**T2D** Diabète de type II

**TGF- $\beta$ 1** *Transforming growth factor beta 1*

**TNF- $\alpha$**  *Tumor-necrosis factor alpha*

**TZD** Thiazolidinediones

*Un expert est un homme qui a fait toutes  
les erreurs qui peuvent être faites dans un  
domaine très étroit. (Niels Henrik David Bohr)*

## **REMERCIEMENTS**

En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier le Dr. Vincent Pichette de m'avoir offert une place au sein de son laboratoire et de m'avoir confié un projet que j'ai énormément à cœur. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir continué à m'appuyer malgré mes nombreuses idées farfelues.

J'aimerais remercier les membres du laboratoire qui m'ont aidé à élaborer ce projet et qui m'ont donné de nombreux conseils qui m'auront été utiles tout au long de ma maîtrise. Votre grain de sel a su contribuer à ma réussite. Je tiens également à souligner leur gentillesse étant donné qu'ils ont su tolérer ma déficience en rangement.

Merci au Dr. François A. Leblond pour son expertise technique dans d'innombrables domaines qui m'a souvent sorti du pétrin lors de mes moments de panique. Son savoir encyclopédique a permis de tirer de nombreuses conclusions intéressantes à mon projet de maîtrise.

J'aimerais adresser mes remerciements au personnel de l'animalerie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leur aide indispensable nécessaire à la réussite de mes expériences.

Un grand merci à ma famille qui a su me supporter tout au long de mes années universitaires. Leur soutien moral m'a été grandement bénéfique. Je tiens également à remercier ma muse, Katherine, pour sa patience et surtout pour son encouragement.

Merci à tous et à toutes!

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 Insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) se caractérise par une perte progressive et considérable de la fonction rénale. Elle représente un fardeau grandissant dans notre société où son incidence ne cesse d'augmenter depuis les dernières décennies. En effet, l'incidence et la prévalence de tous les stades reportés de l'IRC se sont élevées à plus de 13,1% de la population américaine en 2004, alors qu'elle n'atteignait que 10% d'entre elle en 1991; phénomène possiblement attribuable à l'augmentation des prévalences de diabète, d'hypertension et d'obésité. Cette hausse entraîne également une élévation importante de patients souffrant d'insuffisance rénale terminale (IRT) : 43% d'augmentation depuis les vingt dernières années(1, 2). La population atteinte d'IRT nécessite des traitements de substitution rénale dont notamment la dialyse péritonéale, l'hémodialyse et la transplantation rénale(3); alternatives essentielles dont les coûts peuvent s'élever à plus de 60 000\$ par patient annuellement(4).

Deux critères sont requis pour le diagnostic d'une IRC. En premier lieu, elle peut se définir par des dommages rénaux (anomalies structurales ou fonctionnelles), persistant pendant plus de 3 mois, avec ou sans atteinte du débit de filtration glomérulaire (DFG). En second lieu, une diminution du DFG en-dessous de  $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , avec ou sans dommage rénal, participe également à la définition de l'IRC(5). La sévérité de l'IRC s'échelonne sur 5 stades définis par le DFG ainsi que par certains marqueurs d'atteintes rénales (albuminurie, hématurie et protéinurie)(6, 7) (**Tableau I**)(6).

Stade	Description	GFR (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Domage rénal avec DFG normal ou élevé	≥ 90
2	Domage rénal avec DFG légèrement diminué	60-89
3	DFG modérément diminué	30-59
4	DFG sévèrement diminué	15-29
5	Défaillance rénale	< 15

1

**Tableau I** Stratification de la sévérité de l'insuffisance rénale chronique (tiré de (6))

### 1.1.1 Causes

La hausse de l'incidence peut être attribuée aux principaux facteurs de risques de l'IRC dont le diabète, l'hypertension et l'obésité(7). La glomérulonéphrite, les infections et obstructions urinaires, les intoxications médicamenteuses et la maladie polykystique rénale figurent également parmi les causes répertoriées de l'IRC(2, 8).

#### 1.1.1.1 Diabète

Le diabète affecte plus de 21 millions de personnes aux États-Unis, un nombre qui s'élève à plus de 171 millions dans le monde. Parmi eux, 5-10% sont diagnostiqués d'un diabète de type I (T1D) qui se développe en raison d'une incapacité de l'organisme à produire suffisamment d'insuline. Cependant, la majorité des cas répertoriés présentent un diabète de type II (T2D) qui survient lorsque l'organisme est incapable de répondre correctement à l'insuline qu'il produit et où un défaut de sécrétion survient éventuellement(9).

La néphropathie diabétique (DN), cause principale de l'IRT, se caractérise par un dépôt excessif de matrice extracellulaire (MEC) conduisant à une protéinurie, une expansion mésangiale glomérulaire et une fibrose tubulo-interstitielle(10). Plusieurs évidences pharmacologiques soutiennent l'implication du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS), et plus particulièrement l'angiotensine II (AII), comme facteur causal, parmi tant d'autres, dans l'apparition et l'évolution de la DN. L'AII, hormone régulant la pression artérielle et l'équilibre hydrosodique, favoriserait l'accumulation de matrice extracellulaire via l'accumulation et l'activation de la TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor beta 1), cytokine proscélrotique(11). L'hyperglycémie, critère diagnostique clé du diabète, serait également impliquée dans la régulation à la hausse du TGF- $\beta$ 1 soit directement ou soit en favorisant l'élévation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'AII, qui à leur tour induisent l'activation de cette cytokine(11, 12).

#### **1.1.1.2 Hypertension**

Considérée à la fois comme une complication et une cause de l'IRC, l'hypertension demeure un déterminant majeur dans la progression des atteintes rénales (6, 13). En effet, certaines études confirment qu'une pression artérielle élevée est associée de manière significative à un déclin plus rapide du DFG, et ce en présence ou en l'absence de diabète(6). L'utilisation d'agents hypotenseurs est reconnue pour ses répercussions bénéfiques dans le pronostic rénal des patients hypertendus(13).

L'augmentation de la pression au niveau rénal entraîne un étirement mécanique des capillaires et des cellules mésangiales du glomérule ce qui a pour effet d'induire un mécanisme de

réparation induit par des cytokines fibrogéniques et par l'AII; phénomène menant au développement d'une glomérulosclérose(14). Ainsi, l'hypertension favorise une progression du déclin de la fonction rénale en aggravant les dommages glomérulaires et la protéinurie, marqueur sensible et précoce au diagnostic de l'IRC(6), qui à leur tour sont propices à aggraver les dommages glomérulaires et tubulo-interstitielles(14).

### **1.1.1.3 Obésité**

L'obésité est un élément caractéristique du syndrome métabolique, perturbation pouvant favoriser le développement du T2D et de l'hypertension qui sont des causes majeures de la progression vers une IRT(15). Cependant, l'obésité, indépendamment du syndrome métabolique, y contribue également(16). En effet, l'obésité augmente les risques de protéinurie, élément précoce observé dans les atteintes rénales. De plus, malgré que les risques d'être diagnostiqué d'une IRC s'avèrent plus élevés chez les obèses diabétiques et/ou hypertendus, des corrélations significatives ont été répertoriées exclusivement entre un indice de masse corporelle important et le risque de développer une IRC (17).

Outre la protéinurie, l'obésité augmente également les risques de gloméruloscléroses. Ces répercussions néfastes peuvent être expliquées par différents facteurs. En effet, plusieurs perturbations associées à l'obésité, telles la résistance à l'insuline, l'activation du RAAS et l'élévation de l'activité du système sympathique, pourraient favoriser l'hyperfiltration glomérulaire. De plus, l'hyperlipidémie, caractéristique phénotypique des patients obèses, engendre des dommages rénaux par la prolifération des cellules mésangiales et de leur MEC via le LDL-cholestérol(18). De ce fait, une étude rapporte que le traitement de

l'hyperlipidémie chez des rats Zuckers obèses diminuerait l'évolution des gloméruloscléroses, atteintes rénales observées régulièrement chez ce modèle animal(19). La leptine, hormone dérivée des adipocytes, retrouvée en grande quantité dans le sérum de personnes obèses, serait impliquée dans la stimulation du TGF- $\beta$ 1, cytokine proscélrotique pouvant endommager la morphologie et la fonction rénale (18, 20).

### **1.1.2 Désordres métaboliques**

L'IRC entraîne l'accumulation et le déficit de substances endogènes en plus d'un dérèglement de voies métaboliques dont ces modifications sont associées à une multitude de perturbations métaboliques. Ces complications augmentent les risques de morbidités et de mortalités en IRC(3).

#### **1.1.2.1 Anémie**

L'anémie, caractérisée par une diminution de la concentration d'hémoglobine, de l'hématocrite ou du nombre de globules rouges, affecte plus de la moitié des patients atteints d'IRC, tous stades confondus. Les statistiques révèlent que la prévalence d'anémie s'accroît avec la sévérité de l'insuffisance rénale. Ce désordre est à considérer en raison de son implication dans le développement d'hypertrophie ventriculaire gauche augmentant ainsi les risques de défaillance cardiaque, particulièrement chez les patients hémodialysés.

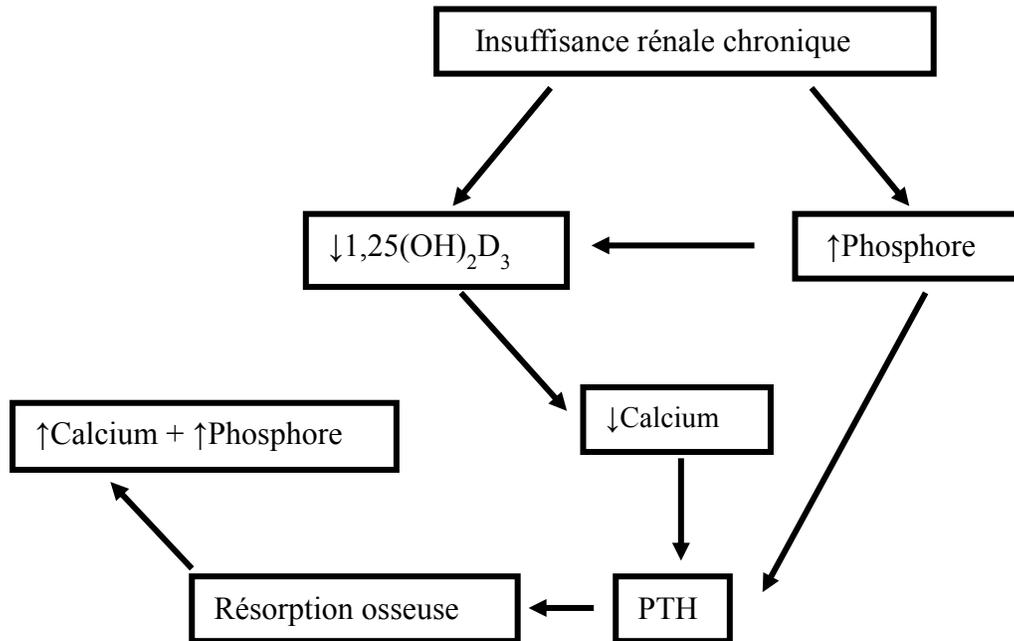
Plusieurs causes sont à l'origine de l'anémie en IRC. On dénote entre autres une déficience en fer, folate et vitamine B12, mais la réduction de la synthèse d'érythropoïétine (EPO) demeure la cause majeure. L'EPO, glycoprotéine essentielle à la croissance et à la différenciation des

érythrocytes au niveau de la moelle osseuse, voit sa synthèse rénale diminuée en IRC en raison d'une fibrose tubulo-interstitielle. Certaines perturbations caractéristiques rencontrées en IRC peuvent aggraver l'anémie en ayant des répercussions sur la production et la survie des globules rouges telles les toxines urémiques et la parathormone (PTH). De plus, l'hémodialyse (HD) peut également accentuer l'anémie initiale par la relâche de radicaux libres, phénomène induit par le contact entre les leucocytes et la membrane de la dialyse(3, 21). L'HD favorise aussi la fragilité des érythrocytes en induisant une chute des taux de L-carnitine. La L-carnitine, impliquée entre autres dans la stabilité structurale des globules rouges via son rôle dans le transport et l'incorporation d'acides gras dans leur membrane cellulaire, chute de plus de 75% lors des traitements de dialyse(22, 23).

#### **1.1.2.2 Anomalies osseuses et minérales**

L'ostéodystrophie rénale, amalgame d'anomalies osseuses secondaires à l'IRC, est le résultat d'une hyperphosphatémie, d'une hypocalcémie et d'une carence en vitamine D active. En effet, l'atteinte du parenchyme rénale détériore la capacité d'excrétion du phosphore et aussi la conversion de la vitamine D (25-hydroxycholecalciférol) sous sa forme active,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Cette dernière, impliquée dans l'absorption intestinale du calcium, entraîne une hypocalcémie en raison de sa régulation à la baisse en IRC. Un débalancement dans l'homéostasie phosphocalcique stimule la synthèse et la sécrétion de PTH, hormone relâchée par les glandes parathyroïdes(3, 21). La détérioration de la santé osseuse survient lorsque la PTH induit la résorption des os afin de rétablir les niveaux calciques (**Figure 1.1**)(24).

L'hypocalcémie et l'hyperphosphatémie stimulent la PTH par différents mécanismes. À court-terme, l'hypocalcémie favorise la transcription de précurseurs de la PTH engendrant ainsi une plus grande disponibilité. À long-terme, elle entraîne une hyperplasie des glandes parathyroïdes ce qui a pour effet d'augmenter la synthèse et la sécrétion de PTH. L'hyperphosphatémie accentue l'hypocalcémie en réduisant l'activité de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Outre les traitements conventionnels pour traiter ces déséquilibres (chélateurs du phosphore et analogues de la vitamine D), la L-carnitine pourrait inhiber la résorption osseuse en contrant l'ostéoclastogénèse(24).



1

**Figure 1.1** Pathogenèse de l'ostéodystrophie rénale (adaptée de (24))

### 1.1.2.3 Acidose métabolique

Le déséquilibre acido-basique est fréquent lors de la progression de l'insuffisance rénale affectant plus de 80% de la population avec un DFG de moins de 30mL/min. De manière

physiologique, le rein assure la régulation du pH sanguin à l'intérieur de balises étroites où toutes variations importantes pourraient entraîner des répercussions néfastes au niveau systémique (e.g. détérioration de l'IRC, élévation de l'inflammation systémique, prédispositions aux maladies cardiovasculaires, etc.)(25). Pour contrer l'excès d'acide ( $H^+$ ), le rein réabsorbe du bicarbonate ( $HCO_3^-$ ) et stimule l'ammoniagenèse (production de  $NH_3$ ); mécanismes de tamponnage affectés en IRC(25-27). Les atteintes rénales affectent également le transport de glutamine, acide aminé impliqué dans la neutralisation des excès d'acides et dans la régénération de  $HCO_3^-$ (28).

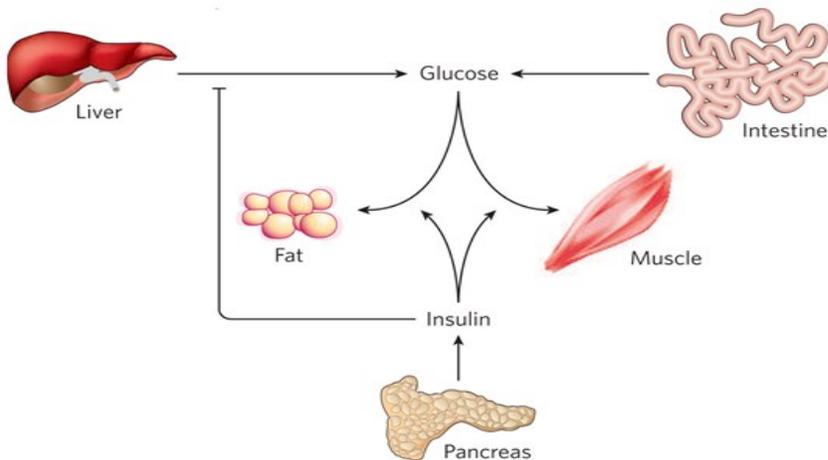
Il existe quelques mécanismes de compensation pour contrer, de manière temporaire, ce bilan positif en ions  $H^+$ . En effet, une résorption osseuse induite par l'acidose peut rétablir le pH sanguin et les taux de bicarbonates(29). De plus, l'ammoniagenèse est augmentée dans les néphrons résiduels(25, 26).

## **1.2 Résistance à l'insuline**

La résistance à l'insuline est également une complication observée en IRC(3, 20). Elle se définit par une diminution de réponse aux concentrations physiologiques circulantes d'insuline; trait caractéristique du T2D(30). Bien que le diabète est un déterminant majeur dans la progression de l'IRC, la résistance à l'insuline peut également se manifester en IRC chez les non-diabétiques(3, 30).

### 1.2.1 Rôles de l'insuline

L'insuline joue un rôle notoire dans l'homéostasie du glucose afin de maintenir la glycémie à un niveau physiologique. En réponse à une hyperglycémie, survenant à la suite de l'ingestion d'un repas, l'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Celle-ci entraîne également le transport de glucose dans les tissus adipeux et les muscles (tissus périphériques), et prévient toute élévation additionnelle du glucose en inhibant la glycogénolyse entreprise par le foie et la gluconéogenèse hépatique et rénale(31-35)(**Figure 1.2**)(36). Il n'est pas étonnant qu'un défaut de ces mécanismes de régulation à ces 4 sites anatomiques (pancréas, foie, reins et tissus périphériques) puisse affecter le maintien de l'homéostasie du glucose tel qu'observé dans le diabète(32). L'insuline possède alors un rôle primordial dans la régulation du glucose de par ses répercussions multiples(31). L'insuline a également un rôle dans l'équilibre énergétique en assurant le stockage de substrats dans les tissus périphériques et le foie via la lipogenèse et la synthèse de glycogène et de protéines, tout en inhibant la lipolyse, la glycogénolyse et la dégradation protéique(31).



2

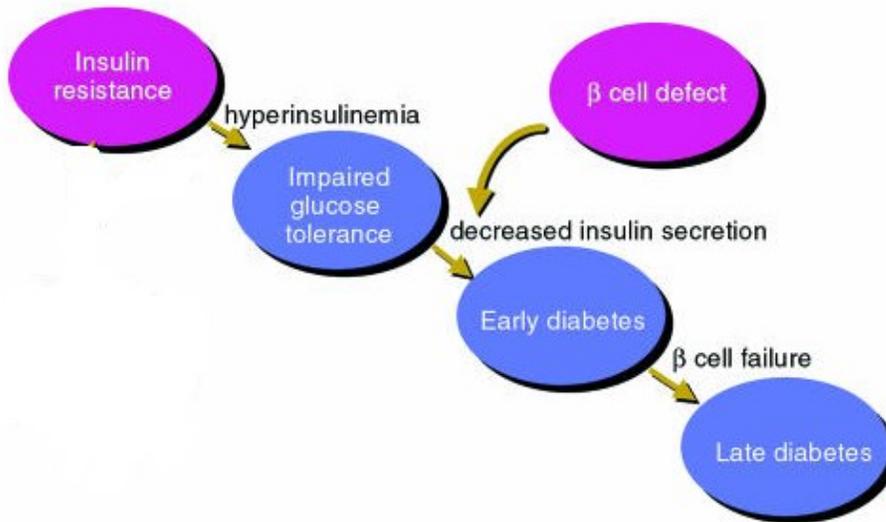
**Figure 1.2** Homéostasie du glucose via l'insuline (tirée et adaptée de (36)).

### 1.2.2 Progression de la résistance à l'insuline

La notion de «résistance à l'insuline» est apparue dans les années 30 soit plus de dix ans après la découverte de l'insuline par Banting et Best en 1922(30). Himsworth, clinicien et chercheur de renom, avait observé une différence dans la réponse glycémique suite à l'administration d'insuline chez des patients diabétiques. Cette découverte permis alors de catégoriser le diabète selon la sensibilité à l'insuline et de réfuter la cause exclusive du diabète de l'époque soit une déficience en insuline(37). Grâce aux dosages radio-immunologiques établis par Berson et Yalow dans les années 50, ils confirmèrent les observations de Himsworth en observant que certains patients diabétiques présentaient des taux élevés d'insuline (T2D)(30).

Le T2D n'est que le point culminant d'une détérioration de l'action de l'insuline(38, 39). Dès l'apparition d'une résistance à l'insuline, le corps tente de contrer l'hyperglycémie subséquente en favorisant l'élévation de la sécrétion d'insuline post-prandiale. À la longue, cette hyperinsulinémie n'est plus en mesure d'abaisser adéquatement la concentration circulante de glucose post-prandiale; phénomène communément reconnu comme le prédiabète ou l'intolérance au glucose. La sécrétion d'insuline s'affaiblit progressivement et mène aux premiers stades du diabète(30, 38, 40, 41) (**Figure 1.3**)(30).

### Metabolic staging of Type 2 diabetes



3

**Figure 1.3** Développement du T2D (tirée et adaptée de(30)).

#### 1.2.3 Importance de la résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline peut être de nature physiologique. En effet, certaines études démontrent l'implication du vieillissement dans la perte de sensibilité à l'insuline(42, 43). Il a aussi été répertorié que la relâche d'insuline puisse être augmentée ou retardée en réponse à une hyperglycémie provoquée(43) et que sa sécrétion basale soit diminuée avec le vieillissement(44). De plus, quelques phénomènes habituellement associés au vieillissement pourraient également contraindre l'action de l'insuline (e.g. sédentarité, augmentation de la masse adipeuse abdominale, inflammation, etc.)(45). Néanmoins, outre cette résistance à l'insuline dite «physiologique», l'ampleur atteinte par l'endémie de l'obésité semble alimentée la prévalence de résistance à l'insuline(30, 38, 45-47).

Même en l'absence de diabète, la résistance à l'insuline est impliquée dans de multiples états pathologiques dont l'obésité, le syndrome polykystique ovarien et la stéatose hépatique non-alcoolique(30, 38, 48). De plus, la résistance à l'insuline est fortement associée à de nombreux facteurs de risques, telles que la dysfonction endothéliale, la coagulopathie, l'inflammation, le stress oxydatif et la dyslipidémie, pouvant être à l'origine d'athérosclérose et de complications macrovasculaires (49, 50). De fait, elle est considérée comme un facteur de risque non-traditionnel de complications cardiovasculaires (47, 51, 52). Ainsi, la compréhension de la pathogenèse de la résistance à l'insuline demeure d'une importance capitale afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

#### **1.2.4 Pathogenèse de la résistance à l'insuline**

Malgré que plusieurs éléments génétiques puissent prédisposer certaines personnes au développement d'une résistance à l'insuline, l'influence environnementale, telle une diète riche en glucides et en lipides et un manque d'exercice, y joue également un rôle prépondérant(38, 53). Étant donné que le diabète est le point culminant de la détérioration de la sensibilité à l'insuline, la résistance à l'insuline peut être présente plus de 10 à 20 ans avant le T2D(39). Ainsi, en limitant les répercussions induites par la composante environnementale, l'apparition et/ou l'aggravation d'un état diabétique peut donc être ralentie ou évitée.

##### **1.2.4.1 Glucotoxicité**

En présence de résistance à l'insuline, une augmentation de la glycémie à jeun s'ensuit même si elle reste dans un barème physiologique étant donné que le pancréas tente de contrer à cette hyperglycémie via la sécrétion d'insuline. Malgré l'élévation subséquente compensatoire de la

sécrétion d'insuline, le pancréas peut finir par s'épuiser d'où l'apparition d'une hyperglycémie importante(54). Celle-ci n'est pas seulement considérée comme une conséquence d'une résistance à l'insuline, mais elle peut également être vue comme une cause majeure menant à la détérioration de la résistance à l'insuline et à une diminution de la sécrétion d'insuline(55). En effet, plusieurs études soutiennent que l'hyperglycémie entraîne de nombreuses répercussions délétères sur la sécrétion (56-59) ainsi que sur l'action de l'insuline(60, 61); phénomène communément reconnu sous le nom de «glucotoxicité»(62, 63).

Quelques mécanismes ont été suggérés pour pouvoir expliquer la résistance à l'insuline induite par une hyperglycémie chronique. Plusieurs études effectuées sur des lignées cellulaires(64, 65) et sur des modèles animaux(66, 67) ont permis d'élucider que le stress oxydatif, soit une génération abondante de ROS, pouvait expliquer entre autres les répercussions de la glucotoxicité sur l'action de l'insuline. En effet, plusieurs essais cliniques démontrent que l'utilisation de certains antioxydants comme l'acide  $\alpha$ -lipoïque, la vitamine C, la vitamine E et la glutathione pouvaient améliorer la sensibilité à l'insuline(64, 66, 68, 69). Il est possible que le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie puisse réduire la disponibilité de NO, agent vasodilatateur, ce qui favorise une vasoconstriction entraînant ainsi une baisse de la circulation sanguine et par conséquent la quantité de glucose pouvant être délivrée aux tissus périphériques (résistance à l'insuline périphérique)(70-72).

Outre la correction du stress oxydatif induite par l'élévation de glucose, certains ont agi directement à la source en traitant l'hyperglycémie par l'entremise d'agents pharmacologiques normalisant le glucose sanguin en inhibant la réabsorption du glucose au niveau du tubule

proximal. La phlorizine, employée chez des rats pancréatectomisés, a démontré une amélioration de la sensibilité à l'insuline sans affecter sa sécrétion(60). L'utilisation d'agents hypoglycémisants a également permis d'illustrer les répercussions que peuvent avoir l'hyperglycémie sur la cascade signalétique de l'insuline, soit un défaut de translocation et/ou d'activité du GLUT4 (transporteur de glucose 4), transporteur essentiel au transport de glucose dans les tissus périphériques(55, 73-77).

Malgré un contrôle étroit de la glycémie, certaines études stipulent que ces interventions ne peuvent considérer la glucotoxicité comme cause exclusive de la résistance à l'insuline(64, 78). De plus, malgré qu'il n'y ait aucune évidence d'hyperglycémie apparente, certaines personnes obèses peuvent néanmoins démontrer une résistance à l'insuline(79, 80). Le tissu adipeux peut alors jouer un rôle important dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline.

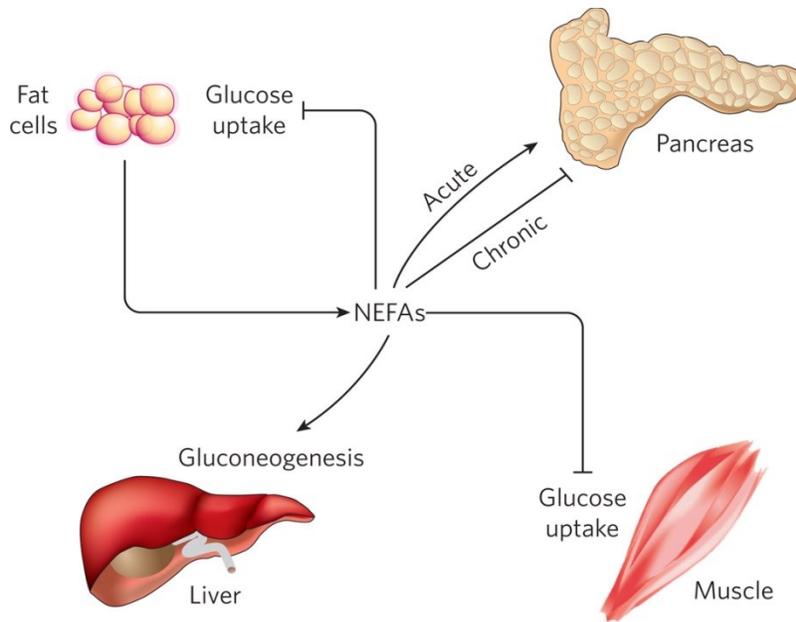
#### **1.2.4.2 Lipotoxicité**

Plusieurs études démontrent l'importance endocrine du tissu adipeux(20, 36). Certains traits pathologiques à l'égard de l'adiposité, dont l'obésité et la lipodystrophie, sont associés à une résistance à l'insuline et à une hyperglycémie. De plus, certaines interventions comme la chirurgie bariatrique(81) et la restriction calorique(82) améliorent la sensibilité à l'insuline et retarde l'apparition du diabète chez des rats prédisposés. L'utilisation d'agents pharmacologiques, tels les activateurs de PPAR $\gamma$ , améliore la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique et musculaire, malgré que cette cible thérapeutique soit présente dans le tissu adipeux(36, 50). De ces faits, on dénote l'implication majeure de ce compartiment endocrinien

dans l'homéostasie du glucose où plusieurs mécanismes peuvent mener à la résistance à l'insuline(20, 36).

#### **1.2.4.2.1 Acides gras non-estérifiés**

Plusieurs évidences suggèrent que l'élévation d'acides gras non-estérifiés (NEFA) seraient à l'origine d'une résistance à l'insuline(54, 83, 84). Normalement, en conditions de jeûne, les NEFA sont relâchés par les adipocytes comme sources d'énergie afin de conserver les carbohydrates pour les neurones et les érythrocytes(36). Pour y parvenir, les NEFA entraînent une diminution du transport de glucose dans les tissus périphériques et favorisent la production hépatique endogène de glucose. En post-prandial, l'insuline, qui est sécrétée en réponse à l'hyperglycémie, inhibe la relâche de ces acides gras (lipolyse) afin d'éviter tout débalancement de l'homéostasie du glucose(85, 86). Les personnes obèses présentent des taux importants de NEFA, qui semblent corrélés avec l'augmentation de leur masse adipeuse, exacerbant ainsi leurs rôles dans l'homéostasie du glucose et menant ultimement à la résistance à l'insuline (**Figure 1.4**)(36). De plus, l'abondance de NEFA observée en obésité, peut également mener à une dysfonction des cellules pancréatiques via un stress oxydatif ce qui mène éventuellement à une réduction de la sécrétion d'insuline(64, 65, 87).



4

**Figure 1.4** Rôles des NEFA dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline (tirée de(36)).

### 1.2.4.2.2 Adipokines

Le tissu adipeux est une source considérable d'hormones et de peptides impliquées dans la régulation du métabolisme communément reconnus sous le nom d'adipokines(36, 83).

#### 1.2.4.2.2.1 Leptine

La leptine, hormone sécrétée par les adipocytes, intervient dans la balance énergétique et la satiété où elle est impliquée dans l'homéostasie du glucose. En effet, un supplément de cette hormone chez des souris déficientes en leptine, ou en son récepteur (souris ob/ob), permet de renverser l'hyperglycémie caractéristique de ce modèle animal sans même corriger l'excès de poids. Cependant, l'administration de leptine chez l'humain n'est pas aussi prometteuse étant donné que l'obésité est associée à une résistance à la leptine(36, 85, 88, 89).

#### **1.2.4.2.2 Adiponectine**

L'adiponectine est inversement proportionnelle à la masse adipeuse et se retrouve réduite en présence d'obésité, de résistance à l'insuline et de T2D. Il est mentionné que l'amélioration de la sensibilité à l'insuline par l'utilisation de thiazolidinediones (TZD), activateurs de PPAR $\gamma$ , nécessitent la participation d'adiponectine, élément également impliquée dans l'activation de PPAR $\gamma$ . Cette adipokine pourrait aussi augmenter la sensibilité à l'insuline en diminuant les taux de NEFA (36, 83, 86).

#### **1.2.4.2.3 Inflammation et Adipocytokines**

L'obésité est un état inflammatoire chronique caractérisé par une production abondante de cytokines et par une activation importante de voies de signalisation de l'inflammation(83). Plusieurs évidences suggèrent qu'il y ait une association entre l'inflammation, observée en obésité, et le développement de la résistance à l'insuline(36, 90). Les adipocytes et les macrophages, les deux types cellulaires les plus abondants dans les tissus adipeux, sécrètent des cytokines inflammatoires, toujours du groupe des adipocytokines, dont la concentration s'accroît avec la masse adipeuse(20, 86, 91).

##### **1.2.4.2.3.1 *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* (TNF- $\alpha$ )**

Le TNF- $\alpha$  a été considéré comme étant la première cytokine à être impliquée dans la pathogenèse de l'obésité et de la résistance à l'insuline étant donné l'ampleur de sa concentration observée en obésité et en conditions pathologiques où la résistance à l'insuline est présente(83). Le TNF- $\alpha$  parvient à réduire la sensibilité à l'insuline de différentes manières. Il induit la lipolyse, favorisant ainsi la relâche de NEFA, acides gras déjà présent en

grande quantité chez les personnes obèses, exacerbant ainsi leur résistance à l'insuline. Il intervient également dans la cascade signalétique de l'insuline pouvant ultimement avoir des répercussions sur le transport de glucose dans les tissus périphériques(90, 92). L'utilisation d'agents thérapeutiques ciblés contre le TNF- $\alpha$  s'avère prometteuse chez des rongeurs obèses, malgré que les bénéfices soient peu présents chez l'humain(83, 90).

#### **1.2.4.2.3.2 Interleukine-6 (IL-6)**

Les concentrations circulantes d'IL-6 sont corrélées de manière positive avec l'obésité, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline. De plus, une administration périphérique d'IL-6 *in vivo* favorise le développement d'hyperlipidémie, d'hyperglycémie et de résistance à l'insuline en interférant dans la signalisation de l'insuline et dans la production d'adiponectine et en induisant la lipolyse(83, 86, 87).

### **1.3 Résistance à l'insuline en insuffisance rénale chronique**

Les défaillances de l'homéostasie du glucose sont fréquentes chez les patients atteints d'IRC et quasi omniprésentes en IRT (93-99). La néphropathie diabétique, complication commune à long-terme du diabète, est subséquente à la détérioration du contrôle glycémique. Il est donc possible que le diabète participe de manière prédominante dans la défaillance de l'homéostasie du glucose en IRC(31, 38, 51). Il est à souligner que le diabète est la cause principale de la défaillance rénale. En effet, plus du tiers des patients dialysés sont diabétiques. Cependant, la majorité d'entre eux demeurent non-diabétiques(3). Il est donc à savoir si la résistance à l'insuline est antécédente à l'IRC via le diabète ou si elle demeure une conséquence d'une atteinte à la fonction rénale.

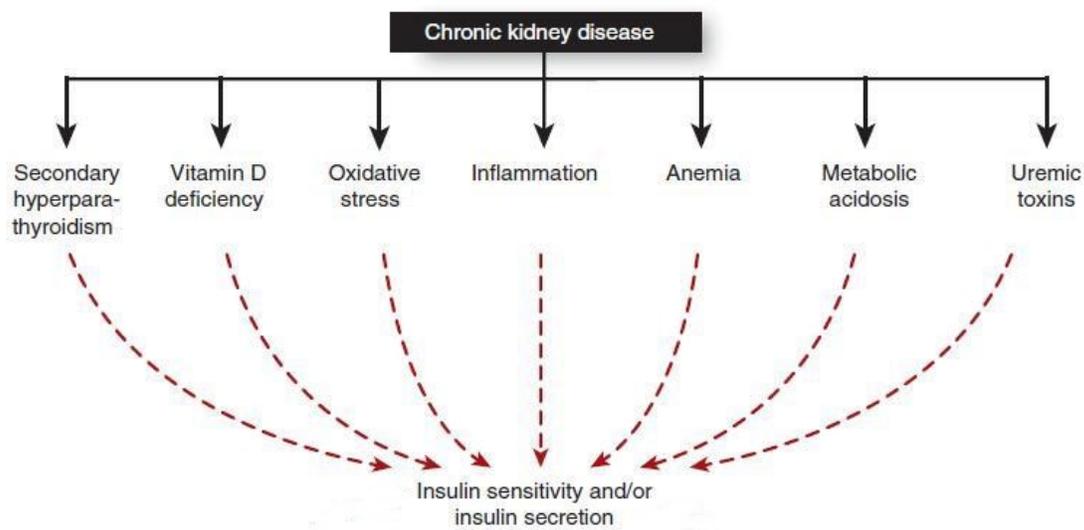
### **1.3.1 Répercussions de la résistance à l'insuline sur la fonction rénale**

La résistance à l'insuline augmente les risques de développer une IRC chez des patients atteints du syndrome métabolique, état caractérisé par un amalgame de défauts métaboliques (résistance à l'insuline, dyslipidémie, obésité, hypertension)(100, 101). Malgré que la résistance à l'insuline, en soit, puisse altérer la fonction rénale, plusieurs conséquences d'une détérioration de la sensibilité à l'insuline (hyperglycémie et hyperinsulinémie) le peuvent également. En effet, plusieurs études soutiennent l'implication de la résistance à l'insuline dans l'albuminurie, la protéinurie, l'hypertension et l'hyperfiltration glomérulaire, l'expansion mésangiale glomérulaire et la podocytopathie; autant d'éléments pouvant mener au développement de gloméruloscléroses et d'atteintes tubulo-interstitielles(102-107).

### **1.3.2 Répercussions d'une fonction rénale altérée sur la sensibilité à l'insuline**

Certaines études soutiennent qu'il y ait une progression de la résistance à l'insuline avec la détérioration de la fonction rénale(108). En effet, la réduction de la clairance rénale de la créatinine (CrCl), mesure employée pour déterminer la fonction rénale, corrèle de façon significative avec la diminution de la sensibilité à l'insuline(109). De plus, plusieurs désordres métaboliques observés en IRC, dont la gravité s'accroît avec la détérioration de la fonction rénale, participent à l'apparition et à la progression de la résistance à l'insuline. Parmi ceux-ci, on répertorie la déficience en vitamine D, l'anémie, les toxines urémiques, la PTH, l'acidose métabolique, le stress oxydatif, la dyslipidémie et l'inflammation chronique(97, 109-112). Plusieurs évidences suggèrent que leur correction pourrait améliorer le profil glycémique en IRC. En effet, l'administration d'EPO, de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> et de bicarbonates pour corriger respectivement l'anémie, les anomalies osseuses et l'acidose métabolique en IRC, peuvent

améliorer la sensibilité à l'insuline(29, 113-115). De plus, plusieurs modalités de traitements de substitution rénale, comme la dialyse péritonéale et l'HD, sont reconnus pour améliorer la résistance à l'insuline. La dialyse en soit permettrait la clairance de nombreuses substances reconnues pour affecter la sensibilité à l'insuline (e.g. cytokines inflammatoires, adipokines, adipocytokines, toxines urémiques, etc.)(20, 116). Cependant, la dialyse conventionnelle ne parvient pas toujours à une clairance efficace des toxines urémiques où certaines d'entre elles se retrouvent conjointement liées à l'albumine sérique(117). Par l'entremise de l'ensemble de ces résultats, la résistance à l'insuline, complication commune en IRC, semblent donc être secondaire à plusieurs autres désordres métaboliques également présents lorsque la fonction rénale se détériore(97, 110, 118) (**Figure 1.5**)(119).



5

**Figure 1.5** Influence des désordres métaboliques de l'IRC sur la sensibilité à l'insuline (tirée et adaptée de(119)).

Néanmoins, la résistance à l'insuline peut également être présente en IRC en l'absence d'anémie, d'hyperparathyroïdie secondaire, de déficience en vitamine D et d'acidose métabolique. Par ailleurs, certains auteurs ont montré qu'il n'y a pas de détérioration de la sensibilité à l'insuline avec la progression de l'IRC(120). La résistance à l'insuline n'exige pas une défaillance rénale importante. En effet, sa présence est également retrouvée dans des stades plus modérés où elle peut être apparente dès un DFG de moins de 50mL/min(20, 121). Une étude s'est concentrée sur le degré de variabilité de la sensibilité à l'insuline de patients atteints de maladies rénales d'origine immune (glomérulonéphrite IgA) et non-immune (maladie polykystique rénale adulte) où il a été constaté que la sensibilité à l'insuline de ces patients ne corrélait aucunement avec la valeur du DFG. De plus, la résistance à l'insuline était également présente chez des patients dont les valeurs du DFG restaient dans un barème physiologique. Ceci dit, les valeurs de DFG peuvent être normales même si le parenchyme rénal est affecté(120).

### **1.3.3 Complications cardiovasculaires en IRC**

Peu importe l'origine de la résistance à l'insuline, antécédente ou non à la détérioration de la fonction rénale, sa présence a des répercussions importantes pouvant mener à l'augmentation des risques de morbidités et de mortalités en IRC. Même en l'absence d'atteinte rénale, la résistance à l'insuline en soit est associée à un risque cardiovasculaire accru chez des patients atteints du syndrome métabolique. Il est donc possible que les maladies rénales, où la résistance à l'insuline est également présente, puissent aussi être associées à des complications cardiovasculaires(120). En effet, l'IRC augmente de 3 à 4 fois les risques de mortalité comparativement à la population générale où plus de 50% des cas de mortalité répertoriés sont

reliés aux complications cardiovasculaires(122). De plus, la mortalité associée aux maladies cardiaques est 10 fois plus élevée chez les patients sous dialyse que dans l'ensemble de la population(123). Il est à souligner que l'excès de mortalité en IRC n'est pas expliqué par des facteurs de risques traditionnels comme l'hypertension, l'obésité, l'hyperlipidémie et le T2D. La résistance à l'insuline serait alors reconnue comme un facteur de risque non-traditionnel contribuant aux maladies cardiovasculaires(124). Conséquemment, la résistance à l'insuline demeure une cible thérapeutique importante afin de prévenir ce type de complications chez les patients atteints d'IRC. Il est donc essentiel de connaître les mécanismes menant à la détérioration de la sensibilité à l'insuline en IRC.

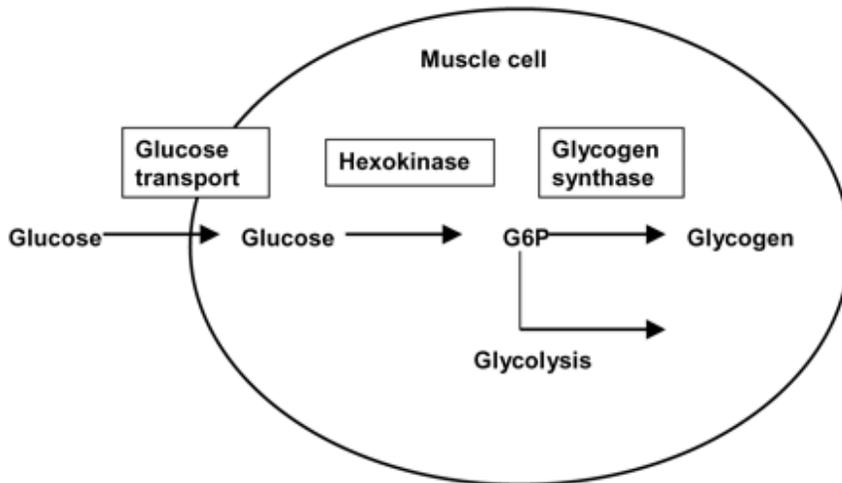
#### **1.3.4 Étiologies de la résistance à l'insuline en IRC chez l'humain**

Plusieurs hypothèses ont été considérées afin d'expliquer le développement de la résistance à l'insuline chez les patients atteints d'IRC : 1) Une perturbation de la sécrétion et de l'élimination de l'insuline par le pancréas et les reins, respectivement; 2) Une diminution de la capacité de l'insuline à moduler le transport de glucose, la synthèse de glycogène, la glycogénolyse et la gluconéogenèse hépatiques; 3) une baisse du transport de glucose dans les tissus périphériques (muscles et tissus adipeux) induite par l'insuline(34, 107).

Il a été démontré que la synthèse pancréatique d'insuline était affectée en IRC(93, 125-128), mais semble néanmoins apparaître qu'après l'arrivée des symptômes de la résistance à l'insuline(99). Par ailleurs, une augmentation de la concentration d'insuline et de sa demi-vie générée par une détérioration de la filtration glomérulaire sont évidentes en IRC(129, 130), mais ne peuvent pas expliquer la résistance à l'insuline observée dans les tissus

périphériques(96). Une diminution de la capacité de l'insuline à inhiber la production endogène de glucose via la glycogénolyse et la gluconéogenèse hépatiques a été considérée comme cause potentielle de l'hyperglycémie(95, 131), mais plusieurs études s'opposent à la présence d'une résistance à l'insuline hépatique en IRC(96, 107, 132). Une réduction de la clairance rénale peut entraîner une accumulation de plusieurs adipokines et adipocytokines favorisant la lipolyse(20, 133-135). L'élévation de la concentration de NEFA qui s'ensuit peut affecter la signalisation de l'insuline au niveau des cellules musculaires(136-138).

Plusieurs études ciblent les muscles squelettiques comme étant le site principal de la résistance à l'insuline en IRC (93, 96, 107, 110, 124, 139) où le problème est généralement associé à un défaut post-récepteur(140, 141). Une diminution du transport de glucose dans le foie et les muscles squelettiques ainsi qu'un défaut des voies intracellulaires impliquées dans la transformation du glucose peuvent mener à la défaillance de son homéostasie chez les patients atteints d'IRC(95, 142-144). La captation et l'élimination du glucose, suite à une stimulation à l'insuline, se font majoritairement dans les muscles via la conversion du glucose en glycogène et via son métabolisme anaérobique (glycolyse). Ces activités sont régies par le transport et par les activités enzymatiques intracellulaires du glucose. **(Figure 1.6).**



6

**Figure 1.6** Métabolisme du glucose dans les cellules musculaires (tirée de (90)).

Certaines études *in vivo* ont démontré que les concentrations intracellulaires de glucose et de glucose-6-phosphate (G6P; intermédiaire entre le glucose et le glycogène) étaient réduites chez des rongeurs et des humains atteints de résistance à l'insuline. Ces résultats étaient attribués à une signalisation de l'insuline altérée et à une baisse de transport de glucose stimulé par l'insuline(90, 137, 138, 145, 146). Parallèlement, des études moléculaires, effectuées sur des modèles non-urémiques, ont suggéré que la résistance à l'insuline pouvait être attribuée à un moins grand taux de translocation du GLUT4, en grande partie dû à un défaut de signalisation de l'insuline(147, 148). De plus, il a également été démontré que l'activité du GLUT4 est affectée en résistance à l'insuline. Chez les patients diabétiques, les expressions génique et protéique de ce transporteur sont significativement réduites mais des évidences de ce genre sont manquantes en IRC(149, 150).

### **1.3.5 Étiologies de la résistance à l'insuline en IRC chez des modèles animaux**

Peu d'études ont été répertoriées sur les mécanismes sous-jacents menant à la résistance à l'insuline chez des modèles animaux, et malgré les quelques sources tirées de la littérature, celles-ci présentent des données très limitées. En ce qui a trait aux humains, certaines hypothèses ont été suggérées quoiqu'elles soient souvent contradictoires.

#### **1.3.5.1 Défaut de l'homéostasie hépatique du glucose**

Un défaut de l'homéostasie du glucose au niveau hépatique a été suggéré, mais les résultats s'avèrent contradictoires. En effet, les modèles animaux d'IRC démontrent une diminution de la liaison de l'insuline aux membranes totales hépatiques, malgré que sa clairance au niveau du foie ne soit pas affectée(151). Néanmoins, certains illustrent le contraire en ce qui a trait à sa liaison(152). Une hausse de la production hépatique endogène de glucose a été répertoriée chez des rats néphrectomisés (NPX) en raison de leur grande teneur en glycogène dans le foie(153). Cependant, il a également été mentionné que l'urémie entraînait une diminution des réserves de glycogène hépatique suggérant ainsi une réduction de la glycolyse et une augmentation de la gluconéogenèse(154, 155).

#### **1.3.5.2 Parathormone (PTH)**

Plusieurs complications métaboliques retrouvées en IRC détériorent la capacité sécrétoire de l'insuline(119). Malgré qu'elle ne puisse expliquer la résistance à l'insuline, l'hyperparathyroïdie secondaire, caractérisée par ses taux élevés de PTH, affecte ce paramètre chez les chiens et les rats atteints d'IRC. La parathyroïdectomie (PTX) améliore l'homéostasie du glucose chez ces animaux en favorisant une plus grande relâche d'insuline. De plus,

l'hyperparathyroïdie induite par administration de PTH diminuait la libération d'insuline des îlots pancréatiques chez des rats sains(125, 126). Des études similaires ont été rapportées chez l'humain où la PTX augmentait la sécrétion d'insuline sans pour autant améliorer la sensibilité à l'insuline en IRC(142). Toutefois, une étude a démontré que la PTH pouvait entraîner une réduction de l'expression (156) et de l'activité du GLUT4 dans les adipocytes(157), suggérant ainsi l'implication de l'hyperparathyroïdie secondaire dans la détérioration de la sensibilité à l'insuline.

### **1.3.5.3 Protéolyse musculaire**

L'accélération de la dégradation des protéines musculaires a aussi été considérée comme cause possible de la résistance à l'insuline en IRC. Celle-ci peut mener à la modulation 1) des transporteurs de glucose; 2) des enzymes responsables du métabolisme du glucose; 3) de la synthèse de glycogène; 4) du récepteur de l'insuline et d'autres éléments impliqués dans la cascade signalétique de l'insuline. Plusieurs signaux cataboliques présents en IRC sont responsables de l'activation de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome(158-161). La protéolyse pourrait découler d'une acidose métabolique, complication commune en IRC, reconnue pour stimuler le catabolisme protéique au niveau musculaire. Il est également suggéré que l'acidose bloque l'effet antiprotéolytique de l'insuline en altérant sa signalisation(28). La protéolyse entraîne de nombreuses répercussions sur le métabolisme du glucose stimulé par l'insuline. En effet, certaines études chez des rats atteints d'insuffisance rénale aiguë, démontrent une diminution du transport de glucose et de synthèse de glycogène en réponse à des doses physiologiques et supraphysiologiques d'insuline malgré le maintien de la glycolyse au niveau musculaire(162).

### **1.3.6 Impacts de l'IRC sur les transporteurs membranaires**

Plusieurs évidences suggèrent que les maladies rénales affectent de manière différentielle les transporteurs d'influx et d'efflux dans de nombreux tissus(163-172). De plus, des résultats similaires ont été décrits pour des transporteurs impliqués dans l'homéostasie de molécules endogènes(164, 173, 174). Les mécanismes à l'origine de ces perturbations restent peu connues, mais semblent néanmoins être reliés à des médiateurs urémiques(163, 164, 172, 175-177). Avant d'évaluer les effets de l'IRC sur les transporteurs de glucose, nous allons décrire les plus importants.

#### **1.3.6.1 Transporteurs de glucose**

Le transport du glucose se fait par l'entremise de protéines afin de traverser la membrane plasmique de ces organes pour satisfaire les différentes étapes comprises dans l'homéostasie du glucose soit l'absorption intestinale, la production hépatique et la consommation du glucose par la totalité des tissus(178, 179). L'homéostasie du glucose est contrôlée par deux familles distinctes de transporteurs de glucose qui comprennent les cotransporteurs glucose sodium dépendant (SGLT) et les transporteurs de glucose (GLUT) (178-180).

##### **1.3.6.1.1 Cotransporteurs glucose sodium dépendant (SGLT)**

La famille SGLT est structurellement composée de 14 hélices  $\alpha$  transmembranaires avec deux extrémités hydrophobes faisant face au côté extracellulaire de la membrane plasmique(178, 181). Considérés comme symporteurs, les SGLTs assurent principalement le transport du glucose, mais également celui du galactose, à une affinité moindre, selon un mécanisme de transport actif secondaire(178). La pompe  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase, localisée sur la membrane

basolatérale des cellules, crée un gradient de  $\text{Na}^+$  qui est utilisé comme source d'énergie pour permettre l'entrée du glucose contre son gradient de concentration à travers la face apicale des cellules. Ce type de transport s'effectue dans la muqueuse de l'intestin grêle et les tubules proximaux des reins via SGLT1 et SGLT2, respectivement, où les deux peuvent être bloquées de manière non sélective par la phlorizine(178, 179, 181-183).

#### **1.3.6.1.1.1 SGLT1**

Le SGLT1 est un symport de faible capacité à haute affinité permettant le transport du sodium et du glucose à un ratio 2:1. Bien que principalement exprimé sur la membrane apicale des entérocytes, SGLT1 se retrouve également dans les tubules proximaux des reins (segment S3) où il finalise la réabsorption rénale du glucose (<10%), majoritairement entreprise par le SGLT2, empêchant ainsi la glycosurie. Malgré qu'il soit considéré de moindre importance dans la réabsorption du glucose comparativement au SGLT2, certaines études suggèrent qu'il ait une plus grande capacité de transport du glucose. Sa présence a également été reportée dans le cœur et le cerveau(178, 179, 181, 184).

#### **1.3.6.1.1.2 SGLT2**

Le SGLT2 est un cotransporteur de haute capacité à faible affinité permettant une absorption du sodium et du glucose à un ratio 1:1. Sa présence est principalement exprimée sur la membrane apicale des tubules rénaux proximaux (segments S1 et S2) permettant la réabsorption de plus de 90% du glucose provenant du filtrat glomérulaire. De ce fait, son inhibition a été considérée comme un traitement potentiel de l'hyperglycémie chez les diabétiques (178, 179, 181-183).

### **1.3.6.1.2 Transporteurs de glucose (GLUT)**

La structure des membres de la famille des GLUT se compose de 12 hélices  $\alpha$  hydrophobes transmembranaires avec les deux extrémités N et C-terminale dirigées vers le cytoplasme. Leur différenciation est principalement basée sur leur expression dans le tissu spécifique, leurs substrats et leur affinité pour le glucose. Les membres classiques de la famille des GLUT (classe I) comprennent GLUT1-4 et GLUT14(178, 180).

#### **1.3.6.1.2.1 GLUT1**

Notamment responsable du transport basal de glucose dans les cellules, GLUT1 est principalement exprimé dans les érythrocytes et les cellules endothéliales du cerveau alors que sa présence a également été quantifiée comme modérée dans le tissu adipeux, les muscles et le foie. GLUT1 transporte également d'autres hexoses tels que le galactose, le mannose et la glucosamine(178-180).

#### **1.3.6.1.2.2 GLUT2**

Considéré comme un capteur de glucose en raison de sa grande capacité et faible affinité pour cet hexose, GLUT2 est principalement exprimé dans les cellules  $\beta$  pancréatiques, le foie, les reins et l'intestin grêle. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la réabsorption rénale du glucose, sa sortie au niveau hépatique et son absorption intestinale. La sécrétion d'insuline s'explique également par la présence du GLUT2 qui détecte l'entrée du glucose dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Via plusieurs modifications métaboliques, le glucose permet la hausse d'ATP qui génère la fermeture des canaux potassiques. La dépolarisation cellulaire qui s'ensuite entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants ainsi

qu'une entrée massive de calcium allouant la sortie de granules contenant l'insuline. Dans les tissus où se trouvent le GLUT2, l'absorption du glucose ne dépend pas du nombre ou de l'activité de GLUT2, mais seulement de la concentration de glucose présente dans le sang. Ainsi, l'activité du GLUT2 ne peut pas être saturée par des concentrations physiologiques de glucose dans le sang. Ce transporteur est aussi en mesure de transporter le fructose, le mannose et la glucosamine(47, 178-180).

#### **1.3.6.1.2.3 GLUT3**

Considéré comme un transporteur de glucose spécifique aux neurones de par son expression dominante dans le cerveau chez diverses espèces, GLUT3 est également exprimé dans les tissus nécessitant une forte demande pour le glucose comme les testicules (spermatozoïdes), le placenta, l'embryon préimplantatoire, ou certaines cellules et tissus cancéreux(178-180).

#### **1.3.6.1.2.4 GLUT4**

Comme le GLUT1, le GLUT4 affiche également une forte affinité pour le glucose. Principalement exprimé dans les tissus sensibles à l'insuline (le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux), le GLUT4 est essentiellement impliqué dans la réduction de la glycémie après son élévation survenant à la suite d'un repas. Sa fonction est sous l'influence de l'insuline qui favorise sa translocation à la membrane plasmique, à partir de réserves intracellulaires, résultant en une hausse d'absorption de glucose de 10 à 20 fois plus élevée. Toute modification affectant son expression, sa translocation et / ou son activité a fortement été associée à la résistance à l'insuline. Bien que le GLUT4 soit considéré comme l'unique transporteur de glucose sensible à l'insuline, le GLUT1 a également été considéré comme partiellement sensible à l'insuline dans les tissus adipeux. (178-180, 185).

#### **1.2.3.1.2.5 GLUT14**

Apparaissant comme une conséquence d'une duplication génique du GLUT3, celui-ci n'est exprimé que dans les testicules(178, 180).

#### **1.3.7 Impacts de l'IRC sur les transporteurs de glucose**

Étant donné que l'IRC affecte l'expression et l'activité d'une multitude de transporteurs et ce, dans divers tissus, il est plausible qu'elle puisse également moduler les transporteurs de glucose, également membres de la grande famille des transporteurs de type *Solute Carriers (SLC)*.

Peu de groupes ont pu montrer des modulations de l'expression des transporteurs de glucose en IRC. Une étude a comparé l'expression du GLUT4, à partir de biopsies de muscles, entre des patients urémiques non-diabétiques et des volontaires sains, et n'a pas constaté de variation dans l'expression du transporteur malgré une diminution significative du transport de glucose(141). Cependant, des résultats contradictoires, tirés d'une étude *in vitro*, ont démontré une translocation réduite des transporteurs de glucose chez les adipocytes. Le tout est expliqué par une diminution de 17% de la concentration totale des transporteurs de glucose retrouvés dans les membranes isolées de rats urémiques(186). Toutefois, cette étude a été réalisée sur les tissus adipeux qui ne représentent qu'une faible fraction du métabolisme global du glucose(34). Une autre étude a démontré une diminution du transport chez les adipocytes isolés de rats urémiques, mais l'expression des GLUT n'a pas été mesurée(152). Un groupe de recherche a observé une augmentation du transport de glucose, de la conversion du glucose en CO<sub>2</sub> et de l'expression génique du GLUT4 dans le tissu adipeux de rats atteints d'IRC(187).

Aksentijevic et al. ont observé une élévation marquée du GLUT4 dans le cœur de rats urémiques, sans pour autant affecter le GLUT1, malgré une diminution considérable du transport dans ce tissu(188). Cette étude n'a pas fourni d'analyse détaillée dans les muscles squelettiques. L'expression du GLUT1 rénal, obtenue chez des souris ayant préalablement eu une NPX subtotale, semble être de nature biphasique telle que caractérisée par une augmentation initiale suivie d'une chute considérable de son expression lors de la progression de l'IRC(189).

Peu d'études ont été faites sur la modulation de l'expression des SGLT en IRC. Par l'entremise d'un modèle animal d'insuffisance rénale aiguë, obtenu par administration de LPS et/ou cytokines pro-inflammatoires, l'expression du SGLT2 ainsi que celle du GLUT2, étaient significativement diminuées. En ce qui a trait au SGLT1 et au GLUT1, leur expression se voyait augmentée. Cela pourrait suggérer un phénomène de compensation dans la réabsorption du glucose. La normalisation de l'expression de chacun de ces transporteurs s'effectuait à la suite d'une administration de glucocorticoïdes suggérant ainsi une forte participation de l'inflammation chronique, trait également caractéristique de l'IRC, dans la modulation des transporteurs tubulaires(33, 130, 182). Takahashi et al. ne démontrent néanmoins aucune variation des SGLT deux semaines suivant la NPX chez des rats(190). Cependant, ce même groupe a pu observer une diminution drastique de l'expression génique du SGLT2 lorsque les rats étaient affectés par l'IRC depuis plus longtemps(191).

### **1.3.8 Induction du diabète chez des sujets atteints d'IRC**

Le diabète est la principale cause d'IRT. Inversement, l'IRC est également associée à diverses altérations dans le métabolisme du glucose et de l'insuline(192). Les patients non-diabétiques atteints d'IRC ont souvent une intolérance au glucose probablement en raison d'une résistance périphérique à l'insuline(3). Quelques études confirment une forte prévalence de troubles du métabolisme du glucose chez des patients atteints de néphropathies chroniques sans mentionner la présence de diabète(96, 99, 193-196). Il y a beaucoup de raisons de croire que l'IRC est un état diabétique. En effet, l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie caractérisant le prédiabète se retrouvent chez les patients non-diabétiques souffrant de maladies rénales avant même une altération de la fonction rénale ou de l'urémie. En général, le prédiabète peut être l'origine d'une diminution de l'action ou de la concentration de l'insuline(99, 120, 197). De rares études ont démontré que l'IRC pouvait induire une résistance à l'insuline chez des modèles animaux non-diabétiques(152, 186-188). Cependant, aucune étude n'a tenté jusqu'à présent, d'évaluer si l'IRC pouvait accentuer la résistance à l'insuline à un point tel que la capacité sécrétoire de l'insuline des cellules  $\beta$  pancréatiques soit affaiblie menant ainsi ultimement à l'apparition du diabète.

### **1.4 Hypothèse et objectifs de ma maîtrise**

Depuis les 15 dernières années, le laboratoire a investigué les répercussions de l'IRC sur la clairance non-rénale de médicaments. Il a été démontré à maintes reprises que l'IRC entraîne une modulation de l'expression et de l'activité de plusieurs transporteurs de médicaments issus

des familles des *ATP-Binding Cassettes (ABC)* et des *Solute Carriers (SLC)* et ce, dans différents tissus (foie, intestin, cerveau, rein).

D'après les résultats publiés discutés ci-dessus, l'IRC et la résistance à l'insuline sont liées par un mécanisme qui reste inconnu. Nous avons donc émis l'hypothèse que : 1) l'IRC pourrait moduler l'expression de transporteurs de glucose clés impliqués dans son homéostasie conduisant ainsi à la résistance à l'insuline, 2) l'IRC est associée à une diminution du transport de glucose dans des tissus sensibles à l'insuline, et 3) l'IRC pourrait mener au développement du diabète chez des sujets susceptibles.

**But 1 : Déterminer si l'IRC induit une résistance à l'insuline et un défaut d'expression des transporteurs de glucose.** Deux groupes de rats seront étudiés (contrôle et IRC, induit par une néphrectomie 5/6<sup>e</sup>). La glycémie et l'insulinémie à jeun seront mesurées. Les défaillances de l'homéostasie du glucose seront établies par un test de tolérance au glucose (*GTT*) ainsi que par l'évaluation de la sécrétion d'insuline suite à une hyperglycémie provoquée (*GSIS*). Les expressions protéique et génique des transporteurs de glucose seront évaluées dans différents tissus clés impliqués dans l'homéostasie du glucose (muscles, tissus adipeux, foie, reins).

**But 2 : Démontrer que la modulation des transporteurs de glucose dans des tissus sensibles à l'insuline est associée à une diminution du transport de glucose.** Le transport de glucose sera effectué sur des biopsies de muscles (*épitrochléaris*) de rats urémiques et témoins en présence ou non d'insuline. Le transport de glucose se fera sur un même rat sous

anesthésie où l'un des deux muscles sera utilisé pour évaluer le transport basal et le muscle controlatéral sera sujet au transport de glucose en présence d'un bolus d'insuline.

**But 3 : Évaluer si la PTH est responsable de l'intolérance au glucose en IRC.** Quatre groupes de rats seront étudiés (contrôle et IRC, avec ou sans parathyroïdectomie). Les défaillances de l'homéostasie seront établies par un *GTT* et un *GSIS*. Les expressions protéique et génique du GLUT4 seront évaluées dans les tissus périphériques.

**But 4 : Démontrer que la résistance à l'insuline induite par l'IRC pourrait favoriser le développement du diabète dans un modèle animal qui y est prédisposé.** Deux groupes de rats seront étudiés : Les Sprague-Dawley et les *Zucker* (contrôle et IRC). Ces animaux seront suivis jusqu'à 12 semaines post-NPX afin de déterminer l'apparition du diabète à l'aide d'une glycémie et d'une glycosurie à jeun. Un seul test de tolérance au glucose (*GTT*) sera effectué.

Ces expériences nous permettront ainsi de définir de nouveaux traitements ciblés à la résistance à l'insuline et de possiblement prévenir l'apparition du T2D en IRC.

## **2. RÉSULTATS**

### **2.1 Article**

# **IMPACT OF CHRONIC RENAL FAILURE ON GLUCOSE TRANSPORTERS AND ITS SUBSEQUENT EFFECT ON INSULIN RESISTANCE**

**Christopher Dumayne BSc<sup>1,2</sup>, Stéphanie Beauchemin MSc<sup>1</sup>, Nathalie Henley MSc<sup>1</sup>,  
François A. Leblond PhD<sup>1</sup>, Sylvie Lesage PhD<sup>1,3</sup>, Stéphane Lefrançois PhD<sup>1,4</sup>, Vincent  
Pichette MD PhD<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada, H1T 2H4.

<sup>2</sup>Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup>Département de Microbiologie et d'Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

<sup>4</sup>Département de Médecine, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Québec, Canada.

**a) Running title:** Glucose transporters in chronic renal failure

**b) Correspondence addressed to:** Vincent Pichette MD, Ph.D.  
Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont  
5415 boul. de l'Assomption, Montréal, Québec, Canada  
H1T 2M4  
Tel: (514) 252-3400 ext. 3484  
Fax: (514) 252-3430

**c)**

Number of text pages: 17

Number of tables: 2

Number of figures: 4

Number of references: 52

Number of words in Abstract: 246 words

Number of words in Introduction: 430 words

Number of words in Discussion: 1370 words

List of non-standard abbreviations: BSA: bovine serum albumin, CRF: chronic renal failure, CTL: control, ESRD: end-stage renal disease, GAPDH: glyceraldehyde-3 dehydrogenase, GLUT: glucose transporter, GSIS: glucose-stimulated insulin secretion, GTT: glucose tolerance test, HIV: human immunodeficiency virus, KHB: Krebs Henseleit buffer, NPX: nephrectomy, PBS: phosphate-buffered saline, PCR: polymerase chain reaction, PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride, PTH: parathyroid hormone, SGLT: sodium-glucose transporter.

## **ABSTRACT**

Insulin resistance, a common feature of patients with chronic renal failure (CRF), substantially increases their risks of morbidity and mortality through cardiovascular complications. In this study, CRF was induced in adult male Sprague-Dawley rats using the 5/6<sup>th</sup> nephrectomy model and the expression of glucose transporters was simultaneously studied as to investigate the mechanism behind insulin resistance in renal impairment. The surgical procedure resulted in renal impairment accompanied with disturbed glucose metabolism as reflected by glucose intolerance and hyperinsulinemia. Insulin sensitivity was considerably reduced in uremic rats as determined by an intraperitoneal glucose challenge and muscular glucose uptake studies (~31%;  $p < 0.05$ ). The profound down-regulation of the expression of GLUT4 in peripheral tissues (~40%;  $p < 0.001$ ) may account for the presence of insulin resistance in CRF. Moreover, the modulation of other known glucose transporters involved in glucose homeostasis may also be responsible. Indeed, CRF induced a noteworthy increase in the protein expression of most renal glucose transporters (SGLT1, SGLT2, GLUT1;  $p < 0.05$ ) that allows a greater reabsorption of glucose in which hyperglycaemia may further exacerbate insulin resistance through the down-regulation of GLUT4. Furthermore, CRF may be associated to hepatic insulin resistance as elevated protein levels of GLUT1 and GLUT2 in liver reflect greater glucose output and a more important storage of glycogen that may also contribute to the release of glucose. Thus, the modulation of the expression of several glucose transporters in CRF may partially explain the presence of insulin resistance.

**Keywords:** insulin resistance, chronic renal failure, GLUT4, glucose transporters.

## INTRODUCTION

The prevalence of chronic renal failure (CRF) is steadily increasing(1) and its metabolic and hormonal outcomes have been the subject of many research projects(2). Alongside, type II diabetes, leading factor of end-stage renal disease (ESRD), is an important and growing health problem(3). The convergence of these two conditions could lead to mutual exacerbation and worsening of the patient's health(4, 5).

Glucose intolerance is a common finding in patients and animal models affected by renal impairment(6, 7). Numerous studies imply the contribution of peripheral insulin resistance and impaired insulin secretion as causative factors for diminished glucose metabolism(8, 9). As the insulin resistance component may already be present in CRF due to diabetes, kidney disease could also lead to a deterioration of insulin sensitivity(10, 11). By means of its presence, the morbidity and mortality of CRF are substantially increased through cardiovascular risks, as more than half of the reported cases of death in patients with ESRD are associated to heart diseases(12, 13). Consequently, insulin resistance remains an important therapeutic target to prevent such complications in patients with CRF.

Although insulin resistance in CRF is usually regarded as a post-receptor defect (14), the mechanisms underlying this disorder are still poorly understood. Several lines of emerging evidence have demonstrated that CRF leads to a modulation of the expression and activity of several drug transporters from the *ATP-Binding Cassette* and *Solute Carriers* families in various tissues (liver, intestine, brain and kidneys)(15-18). It therefore seems plausible that glucose transporters, as members of the large family of *Solute Carriers*, could also be altered.

Although a few groups have reported modulations in the expression of glucose transporters in CRF and its role in insulin resistance, the results from these studies are conflicting (14, 19-21). Some studies have shown a lower glucose uptake in muscle biopsies obtained from uremic patients while GLUT4 expression (the glucose transporter strongly linked to insulin resistance) remained unchanged(14). On the other hand, other studies have shown a reduced expression of glucose transporters in adipocytes retrieved from nephrectomized rats(20), although fat tissue represents only a minor fraction of global glucose metabolism(22).

The purpose of this study was to determine whether CRF modifies key transporters involved in glucose homeostasis which could ultimately lead to insulin resistance and, if CRF is associated with impaired glucose uptake in insulin-sensitive organs. The hypothesis was confirmed by measuring insulin resistance in partially nephrectomised rats (5/6 NPX) and the expression of glucose transporters in several key organs involved in carbohydrate metabolism. Also, it was determined that the modulation of these transporters is associated with a reduced glucose uptake in insulin-sensitive tissues.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental Model**

Male Sprague-Dawley and Zucker rats (Charles River Canada, Montreal, Qc, Canada) weighing 175 to 225 g were housed in the Research Center animal care facility and maintained on Harlan Teklad rodent diet (Harlan Teklad Global Diets, Montreal, Qc, Canada) and water *ad libitum*. Animals were allowed an acclimatization period of at least 7 days before the first nephrectomy was performed. All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care guidelines for the care and use of laboratory animals and under the supervision of our local animal care committee.

### **Experimental Protocol**

Studies were performed in two groups of animals: control pair-fed and CRF. Muscular, adipose, renal and hepatic tissues glucose transporters' protein expression and mRNA levels were measured in at least 12 rats per group. Glucose uptake was calculated *ex vivo* through the muscular accumulation of [<sup>3</sup>H]2-deoxy-glucose in at least 4 rats per group, per experiment.

CRF was induced by two-stage five-sixth nephrectomy as described previously(23). Every animal had free access to water, but in order to minimize the effects of CRF-induced malnutrition, control pair-fed rats were fed the same amount that CRF rats ate on the previous day. At day 41 after nephrectomy, the rats were housed in metabolic cages, and urine was collected for 24 h to determine creatinine clearance. Rats were sacrificed by decapitation 42 days after nephrectomy for organ and blood collection. After the rats were sacrificed, hindlimb muscles, epididymal fat tissue, kidneys and liver were immediately excised, rinsed in ice-cold

saline and flash-frozen in liquid nitrogen. Blood was collected for the measurement of urea and creatinine.

### **Preparation of Total Membranes**

Rat muscle, adipose tissue, kidney and liver biopsies (1-2.5g) were homogenized in 4 to 5ml of homogenizing buffer (250mM sucrose, 250mM HEPES and 250mM Tris-HCl, pH 7.4) containing 0.1mM of phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) using a Potter-Elvehjem tissue grinder (Wheaton Science Products, Millville, NJ). Differential centrifugation was used to obtain a total membrane fraction(24). Briefly, the respective organ samples were centrifuged at 10,000g for 12 min at 4°C. The supernatant was then spun at 40,000g for 64 min at 4°C, and the resulting pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). Homogenates were then sonicated on ice for 10 s to ensure homogeneity. Protein concentration was determined using either the method of *Lowry et al.* (25) for muscle, liver and kidney samples, or by microBCA(26) for adipose tissue samples, using bovine serum albumin as a reference protein. Aliquots were stored at -80°C up to Western blot analysis.

### **Western Blot Analysis**

Glucose transporters were assessed by Western blot analysis following a previously described protocol (15-17). Protein expression in control animals was arbitrarily defined as 100%. GLUT1 and 4 were detected using polyclonal antibodies from Thermo Scientific Pierce Antibodies (Rockford, IL) and GLUT2 was identified using an antibody from Aviva Systems Biology (San Diego, CA). SGLT1 and 2 were detected using antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers, MA) and Novus Biologicals (Littleton, CO) respectively.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -actin and Villin-1, used as loading controls, according to tissues, were detected using rabbit anti-GAPDH, anti- $\beta$ -actin and anti-Villin-1 (Abcam Inc., Cambridge, MA).

### **mRNA Analysis**

Total RNA was extracted from frozen tissue using either TRIzol reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) for muscle, liver and kidney samples or RNeasy Lipid Tissue (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) for adipose tissue samples according to the manufacturer's protocol. RNA concentrations were determined by measuring absorbance at a wavelength of 260 nm. One microgram of total RNA was used to prepare cDNA by reverse transcription using the SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The mRNA encoding for GLUT1 (slc2a1), GLUT2 (slc2a2), GLUT4 (slc2a4), SGLT1 (slc5a1), SGLT2 (slc5a2), GAPDH,  $\beta$ -actin and Villin-1 was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) using iTaq Fast Supermix with ROX and appropriate primers on an ICycler thermocycler (BioRad, Mississauga, ON, Canada) with a 10 min denaturation at 95°C, a 15 s incubation at 95°C and a 60 s incubation at 60°C for 40 cycles. Table I shows the sequences of primers used for the quantification of mRNA for each transporter. PCR products were analyzed using the  $\Delta\Delta C_T$  method(27) using GAPDH,  $\beta$ -actin and Villin-1 as standard genes according to tissues.

### **Intraperitoneal Glucose Tolerance Test**

A two hour intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) was initiated on the two rat groups at 4 weeks post-NPX. Briefly, after a 16 h fast, the animals received 2 g of D-

glucose/kg of body weight, solubilized in saline, as an intraperitoneal bolus injection. A total of 5 blood samples (200 $\mu$ l) were obtained from the jugular vein prior and following the administration of glucose at different time-points (t=15, 30, 60 and 120 min) for glucose and insulin measurements. A single blood drop was sufficient to quantify the rats' glycaemia with the ACCU-CHEK Advantage system device. The measurement of serum insulin was obtained by ELISA (Crystal Chem, Downers Grove, IL, USA) in order to establish the glucose-stimulated insulin secretion (GSIS).

### **Ex Vivo Glucose Uptake**

Intra-muscular accumulation of radio-labeled glucose was done as previously described(28). Following anaesthesia, the *epitrochlearis* muscles were quickly harvested. Tissues were then been incubated into a 20 ml vial containing 2 ml of Krebs-Henseleit buffer solution (KHB) with 0.1% of bovine serum albumin (BSA) supplemented with 2 mM of sodium pyruvate and 6 mM of mannitol at 35°C for 30 min. During this incubation, one muscle was maintained in the presence (for measurement of maximal insulin-stimulated glucose uptake) while the other was in absence (for measurement of basal glucose uptake) of insulin (2 mU/mL). Afterwards, muscles samples were further incubated at 35°C for 20 min in 2 ml of KHB solution containing 1mM of 2-deoxy-D-glucose, 9 mM of mannitol, 2.5 $\mu$ l/mL of [<sup>3</sup>H]-2-deoxy-glucose and 2  $\mu$ l/mL [<sup>14</sup>C]-mannitol in the presence or absence of insulin (2 mU/mL). Vials were continuously supplied with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> throughout the experiment. Tissues were then removed and rapidly flash-frozen in liquid nitrogen, weighed and processed in perchloric acid for assay of glucose transport. Radioactivity was counted on a Hidex 300SL beta-counter (Hidex, Turku, Finland) in 0.2 mL

of dissolved muscle tissue and 8 mL of ScintiSafe Plus Scintillant (Fisher, Ottawa, Ontario, Canada). Results are expressed as  $\mu\text{mol}$  of glucose uptake / mL of tissue and reported as percentage of the mean value of control animals.

### **Statistical Analysis**

The results are expressed as mean  $\pm$  S.D. Differences between groups were assessed using an unpaired Student's *t* test. The threshold of significance was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### **Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Rats**

The biochemical parameters and body weights of NPX and control rats are shown in **Table II**. Compared to control pair-fed animals, CRF rats had higher levels of serum creatinine and urea and lower creatinine clearance (reduced by 80%,  $p < 0.001$ ). Additionally, glucose levels were slightly but significantly more elevated in instance of CRF ( $p < 0.001$ ).

### **Intraperitoneal Glucose Tolerance Test**

Glucose tolerance test (GTT) performed on Sprague-Dawley rats at 4 weeks post nephrectomy, resulted in an impaired glucose metabolism in the nephrectomised cohort, as displayed by their higher glycaemia at each time-point as well as higher AUC when compared to control rats (**Figure 1A**). Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) was also impaired in nephrectomised rats, as demonstrated by a 1.5-2 fold greater insulin secretion compared to control rats at both 15 and 30 minutes (**Figure 1B**).

### **mRNA Expression of SGLT and GLUT Glucose Transporters in CRF Rats**

Since we found that CRF rats had higher glycaemia than control rats, we tested whether or not this was the result of a differential expression of glucose transporters. First, we determined whether or not glucose transporters mRNA levels were different in CRF versus control rats. We found that the mRNA coding for key organs glucose transporters involved in glucose homeostasis was significantly decreased for GLUT1 and GLUT2 (33 and 40%;  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  respectively) in CRF rat livers compared to controls (**Figure 2**). Renal impairment doubled kidney GLUT2 expression ( $p < 0.01$ ) compared to control rats. However,

mRNA expression of the residual kidney glucose transporters remained stable (SGLT1, SGLT2, GLUT1). GLUT4 mRNA expression was the sole glucose transporter in muscles to be affected by chronic renal failure as seen by a 46% reduction ( $p < 0.05$ ). The levels of mRNA expression of glucose transporters in fat tissue remained unchanged.

### **Protein Expression of GLUT and SGLT Glucose Transporters in CRF Rats**

As mRNA levels do not always coincide with the regulation of protein levels, we measured protein expression of select glucose transporters in various tissues involved in glucose metabolism. The results were obtained from a total membrane preparation from control and CRF rats. Renal impairment induced hepatic GLUT1 and GLUT2 by 162 and 72% ( $p < 0.01$ ) respectively, as compared to control rat livers (**Figure 3**). The levels of expression of GLUT1, SGLT1 and SGLT2 were significantly increased by more than 2-fold in CRF rat kidneys compared to controls as shown on Western blot. On the other hand, kidney GLUT2 expression was reduced by 52% in CRF ( $p < 0.01$ ). In muscles, the expression of GLUT4 was considerably diminished to 60% ( $p < 0.001$ ) by kidney disease. Interestingly, we found a significant correlation ( $p < 0.05$ ) between its protein expression and creatinine clearance ( $r = 0.689$ ) (data not shown). However, the levels of GLUT1 remained stable in instance of CRF. Fat tissue demonstrated a similar reduction in GLUT4 expression as seen in CRF rat muscles while GLUT1 remained unchanged.

**Ex Vivo Accumulation of Radio-Labeled Glucose in the *Epitrochlearis* Muscles of CRF rats.**

Since GTT and GSIS experiments as well as the modulation of glucose transporters expression both showed impaired glucose metabolism, we decided to investigate glucose transport to see whether it could further contribute to insulin resistance in CRF. The fold-increase following insulin stimulation versus basal condition have shown a lower glucose uptake in the CRF cohort (reduced by ~31%,  $p < 0.05$ ) (**Figure 4**).

## DISCUSSION

A glucose tolerance test (GTT) was performed in order to portray both insulin sensitivity and secretion in a CRF animal model (5/6<sup>th</sup> nephrectomised rat model). Our results confirmed impaired glucose tolerance in the NPX cohort as revealed by their higher AUC (**Figure 1A**) despite increased insulin secretion (**Figure 1B**). The enhanced insulin synthesis by the pancreas is generally a sign of insulin resistance as it tries to overcome the rise in blood glucose that occurs in response to reduced insulin sensitivity(29). Additionally, the increased insulin secretion was insufficient to counteract hyperglycaemia as higher blood glucose levels were seen in rats with renal impairment thus providing evidence of an evolution of insulin resistance (*see biochemical parameters*). Although high insulin levels are recognized as a good indicator of insulin resistance, its presence in end-stage renal disease (ESRD) is occasionally mistaken by its reduced renal clearance(30, 31). Nevertheless, since the GTT experiments were conducted on rats whose renal function was not as compromised by CRF, notwithstanding the 5/6<sup>th</sup> nephrectomy, a significant reduction in renal clearance of insulin does not explain the obtained hyperinsulinemia. The results thus suggest an impaired compensatory insulin secretion to stabilize hyperglycaemia as the latter occurs in presence of insulin resistance and impaired insulin action.

Having established that CRF could lead to insulin resistance, the expression of glucose transporters was simultaneously measured in key organs involved in glucose metabolism in order to determine whether any alterations could be the underlying cause of this metabolic condition when kidney function is compromised. Our research investigated mainly on fat and

muscles glucose transporters as impaired insulin sensitivity in CRF is generally ascribed to peripheral tissues(10, 30).

We paid particular attention to GLUT4 as any abnormality affecting its expression, its translocation and/or its activity has strongly been linked to insulin resistance(32). Interestingly, our results show a significant decline of its protein expression in both fat and muscles (~40%) in instance of renal impairment (**Figure 3**). Although the literature is scarce of information on its modulation in CRF, most studies reveal constancy in skeletal and cardiac muscles GLUT4 expression despite reduced insulin-stimulated glucose uptake(14, 33). Nonetheless, a number of research groups have published evidence of a variability of GLUT4 responses to diabetes and insulin resistance, as well as to insulin treatment depending on the muscle fibers(34, 35). Moreover, the assessment of the expression of GLUT4 in humans is generally derived from biopsies of *vastus lateralis* and *rectus abdominis* muscles where GLUT4 is negligibly affected by diabetes(34). This could explain why no study has so far been able to clearly demonstrate a reduction of GLUT4 in CRF. Moreover, since our studies refer to the muscles of the hindlimb, which is made up of more than one type of muscle fiber, it is possible that our results underestimate the actual reduction in the expression of GLUT4 in kidney diseases.

Although fat occupies a small proportion of the overall glucose metabolism(22), the substantial reduction of GLUT4 in this tissue, as depicted by our results, should not be underestimated. Indeed, a low level of GLUT4 in adipose tissue has been linked to several conditions where insulin resistance is present(36). Studies performed on genetically modified

animal models have shown the considerable importance of GLUT4 associated to adipose tissue as it can restore insulin sensitivity within this endocrine organ but also in muscles where most of glucose metabolism occurs(37). Consequently, the reduction of GLUT4 in fat tissue, as observed in our results, contributes to the underlying mechanism of insulin resistance in CRF.

The considerable down-regulation of GLUT4 expression as seen in peripheral tissues of NPX rats can explain the insulin resistance in renal failure. That said, other organs are also involved in glucose metabolism.

While the presence of a defective hepatic glucose metabolism in CRF has usually been disregarded, no study has so far focused on the modulation of its glucose transporters. Our results have shown a noteworthy and substantial increase in the protein expression of GLUT1 and GLUT2 (**Figure 3**). Glucose intolerance has been reported as consequential to an increase in liver GLUT2 expression generally reflecting greater gluconeogenesis(38, 39). Furthermore, few studies have stated an increase in the release of glucose by liver in CRF that is usually a sign of hepatic insulin resistance(40, 41). PTH (parathyroid hormone), a common uremic toxin seen in renal impairment, has been regarded as a possible cause as it enhances gluconeogenesis and glycogenolysis(42, 43). Increased hepatic glucose production in CRF has also been linked to higher glycogen content in liver(40). As high GLUT1 levels are representative of enhanced glycolysis(44), this could in turn translate into elevated glycogen levels in CRF. Therefore the considerable augmentation in the protein expression of GLUT1

and 2 could reflect higher glycogen storage and glucose release by liver in CRF thus providing evidence of a potential hepatic insulin resistance.

Kidneys play an important role in glucose homeostasis as they ensure its reabsorption through glucose transporters. Their modulation in renal impairment has rarely been mentioned in literature and most studies imply a down-regulation of the SGLT2-GLUT2 segment compensated by an increase in SGLT1-GLUT1(45, 46). Our research has nevertheless produced conflicting results in regards to SGLT2 as its expression is greatly augmented in CRF (**Figure 3**). As SGLT2 is responsible for most of glucose reabsorption ( $\geq 90\%$ ), its increase, as portrayed by our results, has generally been linked to an exacerbation of hyperglycaemia in diabetes. Besides, its inhibition has been shown to improve insulin sensitivity(47, 48). Indeed, studies have concluded that the normalization of blood glucose in streptozotocin-induced diabetic rats, through the use of phlorizin, restored the levels of expression and translocation of GLUT4 similar to those found in control rats(49). Thus, the rise in the number of renal glucose transporters (**Figure 3**) may cause an increase in the reabsorption of glucose which could ultimately contribute to insulin resistance in CRF by promoting the reduction of GLUT4 expression in muscle as seen in our results.

Glucose uptake studies were carried out on muscles since they represent the main site of insulin resistance in CRF(10, 30). Experiments were done *ex-vivo* to avoid any compromising effects achieved by extra-muscular hormonal and metabolic factors on GLUT4 expression and/or translocation levels as they may impede glucose transport(36, 50). The *epitrochlearis* muscle was used as it corresponds to a good representation of the majority of

muscles found within the rat(51). Our results demonstrated a clear reduction of glucose transport (fold-increase following insulin stimulation vs basal condition) of ~31% in CRF (**Figure 4**) which could be explained by the profound down-regulation of the expression of GLUT4 in muscles as GLUT1 remained stable in kidney failure. Jacobs et al. have reported a similar conclusion in adipose tissues of uremic rats, although it referred to total glucose transporters(20). A closer examination of each isoform's expression is important as it allows us to determine which of the glucose transporters is mainly responsible for the reduced glucose uptake in CRF. Indeed, granting the level of expression of GLUT1 is a twentieth of that of GLUT4, impaired glucose homeostasis has yet shown to induce an increase in the expression of GLUT1 at the cellular membrane thus ensuring a greater accountability in glucose transport as it usually does in physiological conditions(32). Future studies should be undertaken to consider the exact contribution of each glucose transporters through the use of selective inhibitors such as *indinavir* used as a treatment for HIV(52).

Studying the expression of glucose transporters clearly demonstrated an undeniable impairment of glucose metabolism in CRF as confirmed by the GTT experiments. Indeed, a significant reduction of GLUT4 in peripheral tissues reflects insulin resistance. This modulation may also explain the reduced glucose uptake reported by muscles in CRF. Moreover, the increased protein expression of the majority of kidney glucose transporters in CRF allows a greater reabsorption of glucose in which hyperglycaemia further contributes to the down-regulation of GLUT4 and hence exacerbation of insulin resistance. Elevated proteins levels of hepatic GLUT1 and GLUT2 may reflect a greater storage of glycogen and release of glucose by liver in CRF, possibly inferring the presence of hepatic insulin resistance which

subsequently contribute to the impaired glucose metabolism in CRF. Thus, CRF leads to insulin resistance through the modulation of the expression of various key transporters involved in glucose homeostasis.

## REFERENCES

1. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-47.
2. Cibulka R, Racek J. Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *Physiol Res*. 2007;56(6):697-705.
3. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2007;49(2 Suppl 2):S12-154.
4. Dzurik R, Spustova V, Janekova K. The prevalence of insulin resistance in kidney disease patients before the development of renal failure. *Nephron*. 1995;69(3):281-5.
5. Sit D, Kadiroglu AK, Kayabasi H, Yilmaz ME. The prevalence of insulin resistance in nondiabetic nonobese patients with chronic kidney disease. *Adv Ther*. 2006;23(6):988-98.
6. Akmal M, Massry SG, Goldstein DA, Fanti P, Weisz A, DeFronzo RA. Role of parathyroid hormone in the glucose intolerance of chronic renal failure. *J Clin Invest*. 1985;75(3):1037-44.
7. Chen SM, Young TK, Ho LT. Effects of parathyroid hormone infusion on glucose tolerance and glucose-stimulated insulin secretion in normal and uremic rats. *Diabetes research and clinical practice*. 1998;41(2):85-94.
8. DeFronzo RA, Tobin JD, Rowe JW, Andres R. Glucose intolerance in uremia. Quantification of pancreatic beta cell sensitivity to glucose and tissue sensitivity to insulin. *J Clin Invest*. 1978;62(2):425-35.
9. Massry SG, Fadda GZ, Zhou XJ, Chandrasoma P, Cheng L, Filburn CR. Impaired insulin secretion of aging: role of renal failure and hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 1991;40(4):662-7.
10. Liao MT, Sung CC, Hung KC, Wu CC, Lo L, Lu KC. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:691369.
11. Kobayashi S, Maesato K, Moriya H, Ohtake T, Ikeda T. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(2):275-80.
12. Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int*. 1998;53(5):1343-7.
13. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-47.
14. Friedman JE, Dohm GL, Elton CW, Rovira A, Chen JJ, Leggett-Frazier N, et al. Muscle insulin resistance in uremic humans: glucose transport, glucose transporters, and insulin receptors. *Am J Physiol*. 1991;261(1 Pt 1):E87-94.
15. Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, et al. Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(3):978-85.
16. Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A, Pichette V. Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(1):124-8.
17. Naud J, Michaud J, Beauchemin S, Hebert MJ, Roger M, Lefrancois S, et al. Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(8):1363-9.

18. Naud J, Laurin LP, Michaud J, Beauchemin S, Leblond FA, Pichette V. Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40(1):39-46.
19. Aksentijevic D, Bhandari S, Seymour AM. Insulin resistance and altered glucose transporter 4 expression in experimental uremia. *Kidney Int*. 2009;75(7):711-8.
20. Jacobs DB, Hayes GR, Truglia JA, Lockwood DH. Alterations of glucose transporter systems in insulin-resistant uremic rats. *Am J Physiol*. 1989;257(2 Pt 1):E193-7.
21. Szolkiewicz M, Sucajtys E, Wolyniec W, Rutkowski P, Stelmanska E, Korczynska J, et al. Mechanisms of enhanced carbohydrate and lipid metabolism in adipose tissue in uremia. *J Ren Nutr*. 2005;15(1):166-72.
22. Bjorntorp P, Sjostrom L. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism: clinical and experimental*. 1978;27(12 Suppl 2):1853-65.
23. Leblond F, Guevin C, Demers C, Pellerin I, Gascon-Barre M, Pichette V. Downregulation of hepatic cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(2):326-32.
24. Chow EC, Sun H, Khan AA, Groothuis GM, Pang KS. Effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on transporters and enzymes of the rat intestine and kidney in vivo. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 2010;31(1):91-108.
25. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
26. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985;150(1):76-85.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
28. Cartee GD, Bohn EE. Growth hormone reduces glucose transport but not GLUT-1 or GLUT-4 in adult and old rats. *Am J Physiol*. 1995;268(5 Pt 1):E902-9.
29. Saltiel AR. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest*. 2000;106(2):163-4.
30. Pham H, Utzschneider KM, de Boer IH. Measurement of insulin resistance in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(6):640-6.
31. Mak RH. Insulin and its role in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(3):355-62.
32. Marette A, Atgie C, Liu Z, Bukowiecki LJ, Klip A. Differential regulation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of a new model of type II diabetes. The obese SHR/N-cp rat. *Diabetes*. 1993;42(8):1195-201.
33. Dikow R, Wasserhess C, Zimmerer K, Kihm LP, Schaier M, Schwenger V, et al. Effect of insulin and glucose infusion on myocardial infarction size in uraemic rats. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(5):571-9.
34. Hardin DS, Dominguez JH, Garvey WT. Muscle group-specific regulation of GLUT 4 glucose transporters in control, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 1993;42(10):1310-5.

35. Gaster M, Poulsen P, Handberg A, Schroder HD, Beck-Nielsen H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;278(5):E910-6.
36. Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim HI, Ahn YH. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*. 2007;59(3):134-45.
37. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism*. 2007;5(4):237-52.
38. Mokuno T, Uchimura K, Hayashi R, Hayakawa N, Makino M, Nagata M, et al. Glucose transporter 2 concentrations in hyper- and hypothyroid rat livers. *The Journal of endocrinology*. 1999;160(2):285-9.
39. Kemp HF, Hundal HS, Taylor PM. Glucose transport correlates with GLUT2 abundance in rat liver during altered thyroid status. *Molecular and cellular endocrinology*. 1997;128(1-2):97-102.
40. Delmez JA, Rutherford WE, Klahr S, Blondin J. Studies on the role of the liver and splanchnic tissues in the production of carbohydrate intolerance in uremia. *Metabolism: clinical and experimental*. 1981;30(7):658-65.
41. Schmitz O. Peripheral and hepatic resistance to insulin and hepatic resistance to glucagon in uraemic subjects. Studies at physiologic and supraphysiologic hormone levels. *Acta endocrinologica*. 1988;118(1):125-34.
42. Hruska KA, Blondin J, Bass R, Santiago J, Thomas L, Altsheler P, et al. Effect of intact parathyroid hormone on hepatic glucose release in the dog. *J Clin Invest*. 1979;64(4):1016-23.
43. Moxley MA, Bell NH, Wagle SR, Allen DO, Ashmore J. Parathyroid hormone stimulation of glucose and urea production in isolated liver cells. *Am J Physiol*. 1974;227(5):1058-61.
44. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 2009;174(4):1544-52.
45. Mehta RL. Glycemic control and critical illness: is the kidney involved? *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(10):2623-7.
46. Nakamura N, Masuda S, Takahashi K, Saito H, Okuda M, Inui K. Decreased expression of glucose and peptide transporters in rat remnant kidney. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2004;19(1):41-7.
47. Kahn BB, Shulman GI, DeFronzo RA, Cushman SW, Rossetti L. Normalization of blood glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose transport in adipose cells without restoring glucose transporter gene expression. *J Clin Invest*. 1991;87(2):561-70.
48. Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1987;79(5):1510-5.
49. Marette A, Dimitrakoudis D, Shi Q, Rodgers CD, Klip A, Vranic M. Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Endocrine*. 1999;10(1):13-8.
50. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*. 1995;38(7):764-71.

51. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of applied physiology*. 1996;80(1):261-70.
52. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *Aids*. 2002;16(6):859-63.

## TABLES

Table I TaqMan gene expression assays used for Real-time PCR.

	<b>Gene</b>	<b>TaqMan Gene Expression Assay</b>
<b>GLUT1</b>	<i>slc2a1</i>	Rn01417099_m1
<b>GLUT2</b>	<i>slc2a2</i>	Rn00563565_m1
<b>GLUT4</b>	<i>slc2a4</i>	Rn00562597_m1
<b>SGLT1</b>	<i>slc5a1</i>	Rn01640634_m1
<b>SGLT2</b>	<i>slc5a2</i>	Rn00574917_m1
<b>β-ACTIN</b>	<i>β-actin</i>	Rn00667869_m1
<b>GAPDH</b>	<i>gapdh</i>	Rn01775763_g1
<b>VILLIN-1</b>	<i>villin-1</i>	Rn01254356_g1

2

Table II Biochemical Parameters and Body Weight in Control and CRF Rats

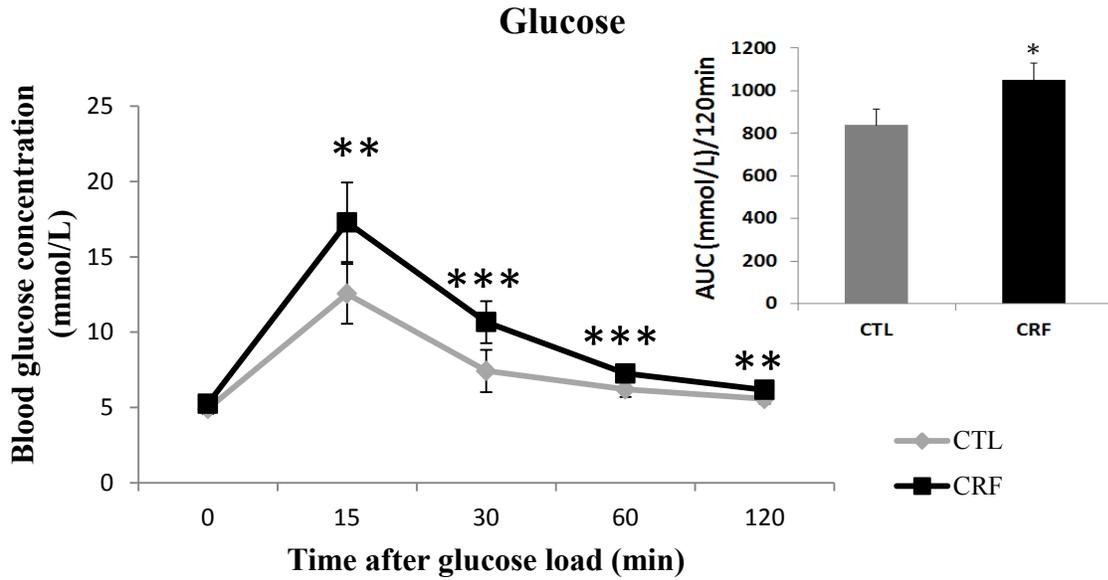
	<b>Control (n=59)</b>	<b>CRF (n=63)</b>	<b>p-value</b>
<b>Body Weight (grams)</b>	383.6 ± 33.2	350.2 ± 61.6	p<0.001
<b>Serum Creatinine (μmol/L)</b>	40.9 ± 5.2	201.4 ± 105.3	p<0.001
<b>Creatinine Clearance (μl/100 g b.wt./min)</b>	417.7 ± 112.6	76.6 ± 52.8	p<0.001
<b>Serum Urea (mmol/L)</b>	3.7 ± 1.0	37.9 ± 27.8	p<0.001
<b>Glycemia</b>	5.4 ± 0.7	6.8 ± 2.0	p<0.001

3

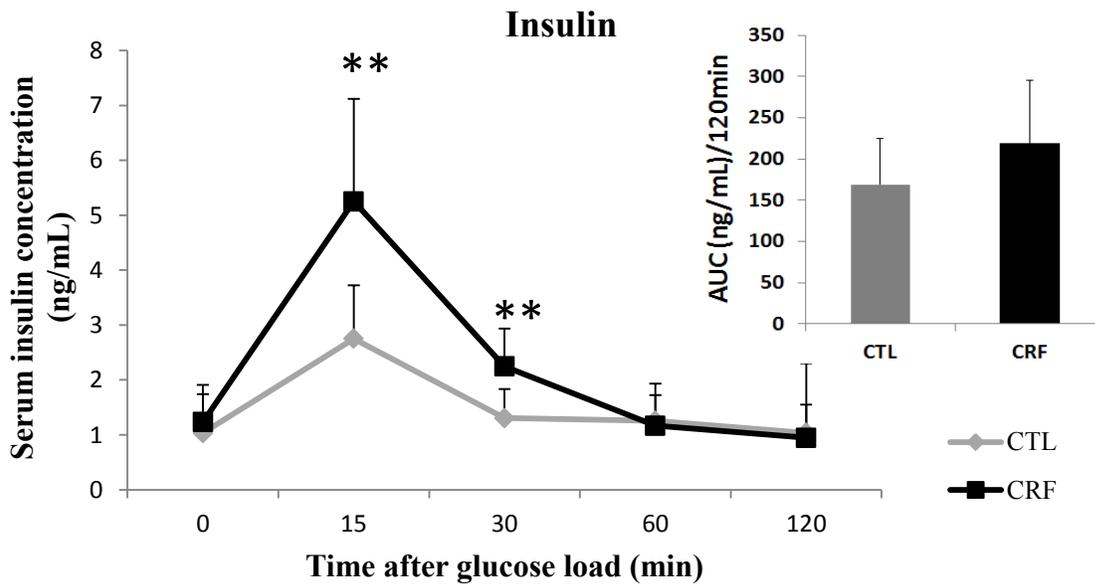
Data are the mean ± S.D. Measurements were taken at the time of sacrifice (6 weeks post-NPX). Twenty-four hour urinary collection began the day before. Blood urea and creatinine, and urine creatinine were determined with an Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada).

**FIGURES**

**A.**

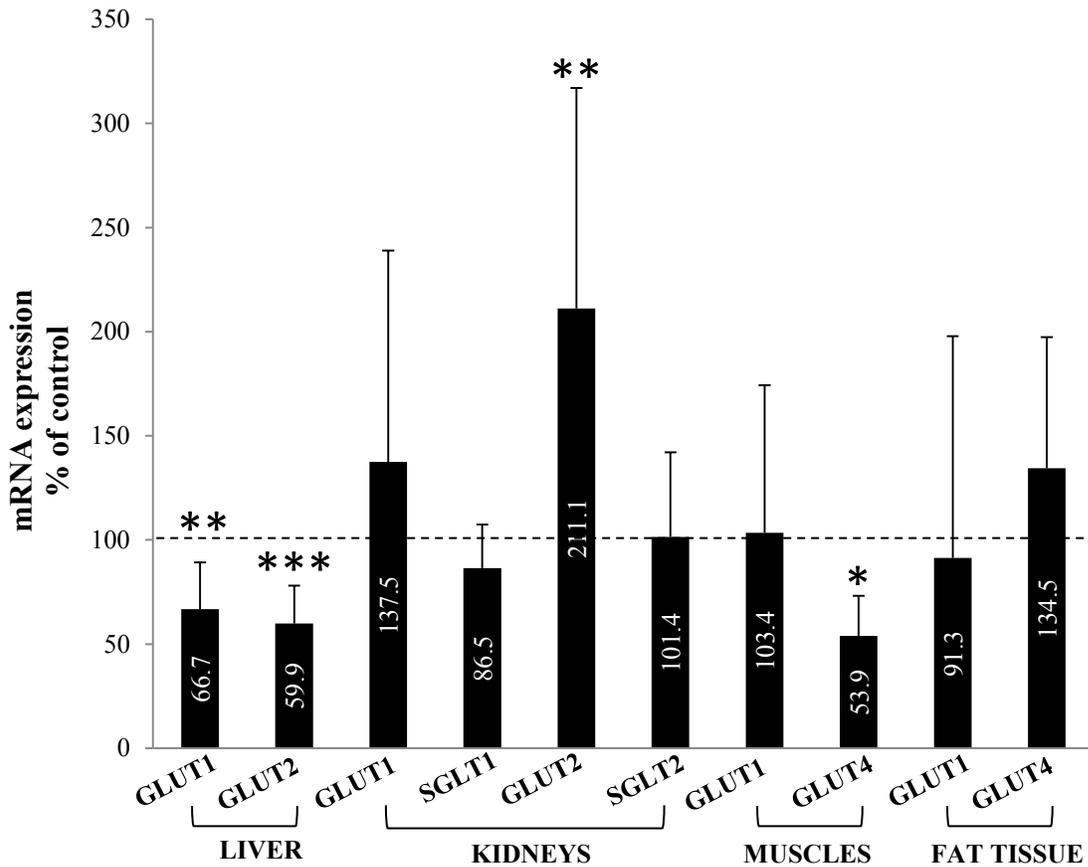


**B.**



7

**Figure 1 | Glucose and insulin responses to an intraperitoneal glucose challenge at 4 weeks post-nephrectomy. A.** Glucose and **B.** insulin responses to an intraperitoneal glucose challenge (2g/kg) performed on Sprague-Dawley rats at 4 weeks post-nephrectomy following a 16 hours fast. Values are mean  $\pm$  S.D. for n=8, \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 compared to control rats. A representation of the overall experiment is presented under an AUC graph.

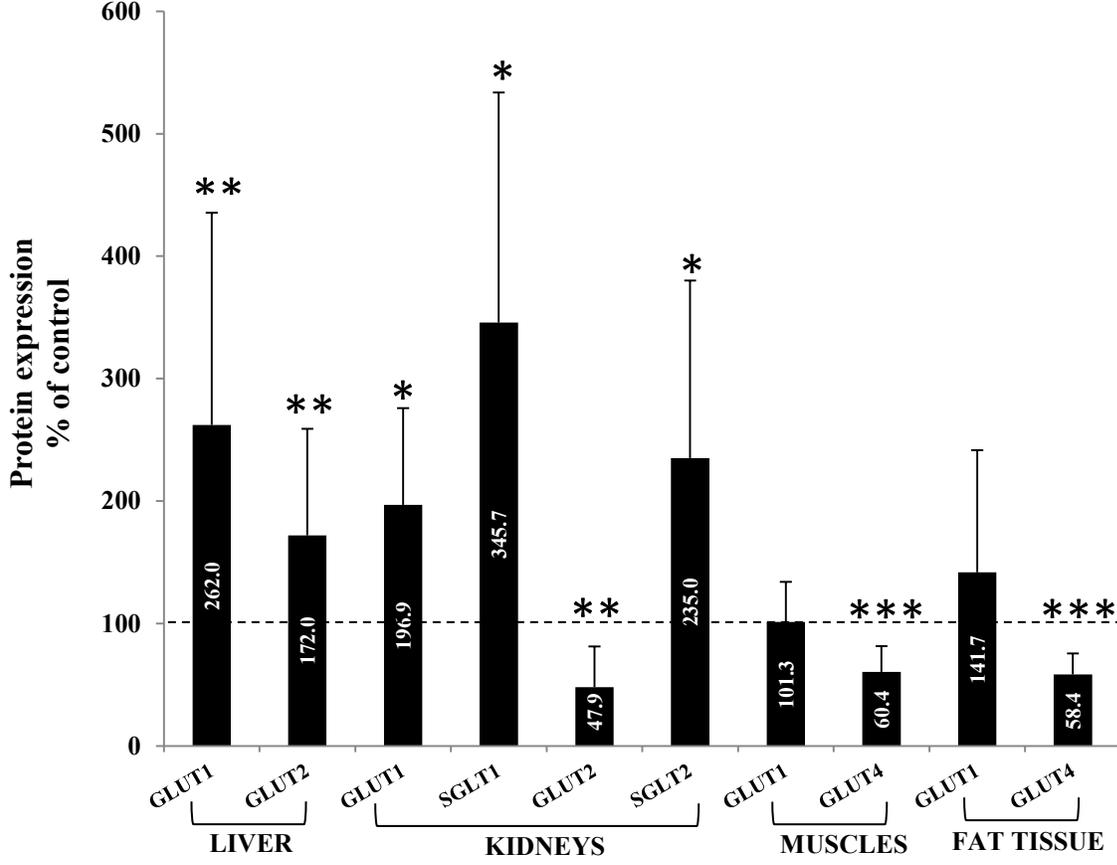


8

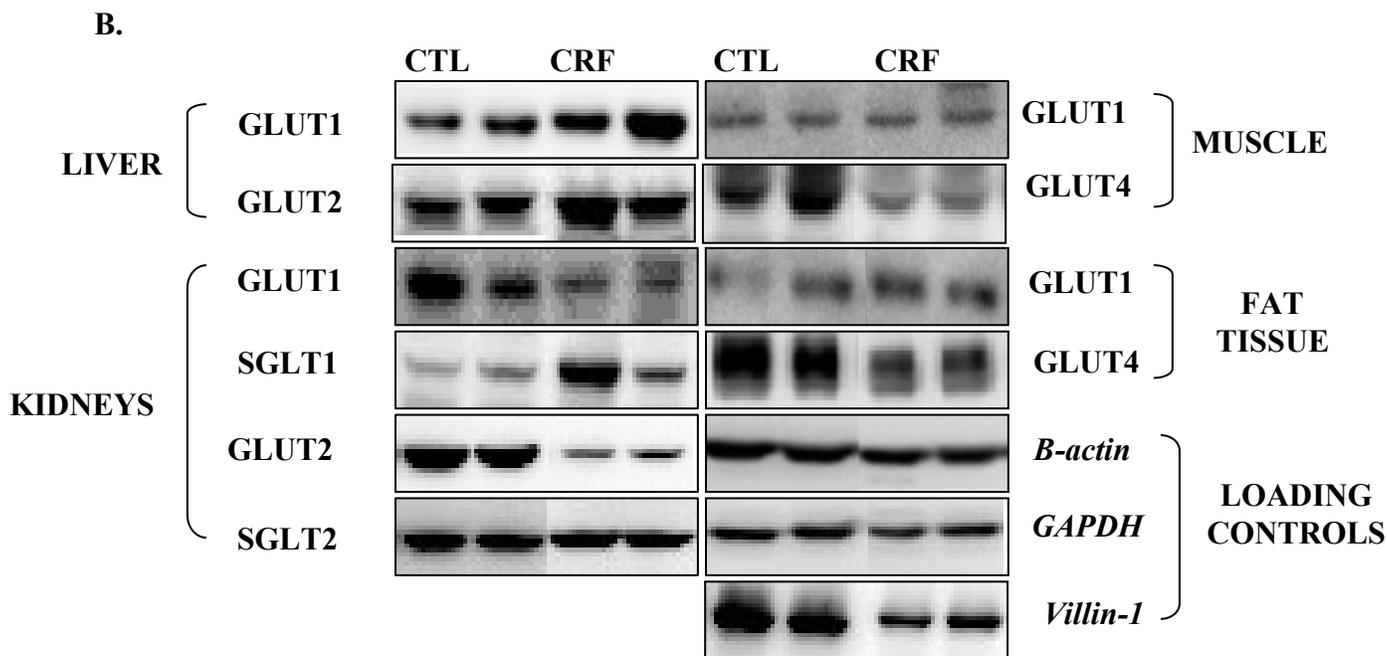
**Figure 2 | mRNA expression of select organs' glucose transporters in CRF rats.**

mRNA encoding select organs' glucose transporters in control and CRF rats were measured by quantitative real-time PCR. mRNA levels are expressed in relative quantities using the  $\Delta\Delta C_T$  method(27) with *GAPDH* (liver and muscle), *Villin-1* (kidneys) and  $\beta$ -actin (fat tissues) as reference genes. The mean relative quantity of control rats was arbitrarily defined as 100% (dotted line). The graphic shows the mean expression in CRF rats expressed as percentage of controls  $\pm$  S.D. of 12 rats in each group. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  compared to control rats.

A.

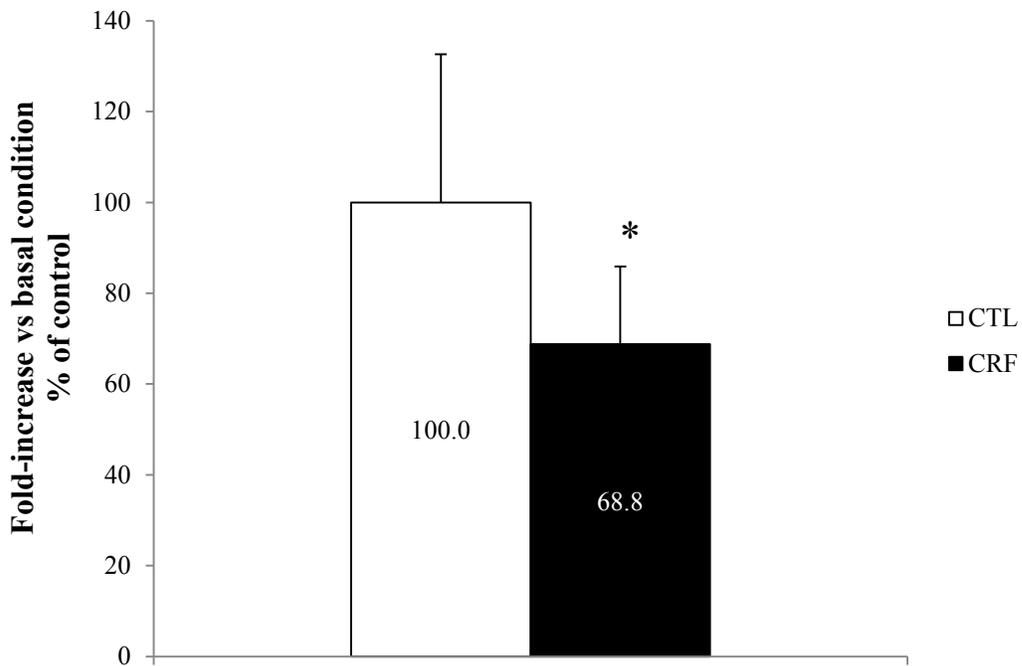


9



**Figure 3 | Protein expression of select organs' glucose transporters in CRF rats.**

**A.** Protein bands are expressed in densitometry units. The densitometry units measured for glucose transporters were standardized by dividing them by the value obtained for the respective loading control (*β-actin*: fat tissue; *GAPDH*: liver and muscles; *villin-1*: kidneys). The standardized densitometry units of control rats were arbitrarily defined as 100% (dotted line). The graph shows the mean expression in CRF rats expressed as percentage of controls ± S.D. of 12-18 rats in each group. \*, p<0.05; \*\*, p<0.01 as compared to CTL rats. **B.** Representative Western blots for each glucose transporter. Each blot presents bands for two control (left) and two CRF (right) rats.



10

**Figure 4 | Ex vivo accumulation of radio-labeled glucose in *epitrochlearis* muscles of CRF rats.** Muscle radioactivity (counts per minute) in control (CTL) (white bar) and chronic renal failure (CRF) (black bar) rats. The mean ratio for CTL animals was arbitrarily defined as 100%. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. of 4 rats in each group. \* $p < 0.05$  compared to CTL rats.

## **2.2 Études complémentaires**

### **2.2.1 Matériel et Méthodes**

#### ***Section «Qui est responsable?» (influence de la PTX)***

L'étude porte sur les répercussions de la PTX afin d'évaluer si cette intervention chirurgicale améliore l'intolérance au glucose via la régulation à la hausse de l'expression du GLUT4. L'étude s'est effectuée sur 4 groupes expérimentaux : CTL  $\pm$  PTX et IRC  $\pm$  PTX. 8 rats par groupe ont été utilisés pour le test de tolérance au glucose. L'analyse de l'expression génique et protéique du GLUT4 dans le muscle et le tissu adipeux épидидymaire a été effectuée sur au moins 6 rats par groupe. Les méthodes utilisées correspondent à celles décrites dans la section *Materials and Methods* de l'article.

La parathyroïdectomie totale (PTX) a été réalisée comme décrit précédemment(198). Brièvement, sous microscope chirurgical, la PTX a été réalisée en laissant la glande thyroïde intacte. Le succès de la chirurgie a été déterminé par une réduction significative de calcium et un niveau indétectable de PTH sept jours après la PTX. L'eau des animaux a été supplémentée avec du gluconate de calcium (contrôle: 5%; IRC: 2,5%) pour éviter une hypocalcémie. Les animaux ont eu une semaine pour récupérer avant de subir la néphrectomie 5/6<sup>e</sup>. Les animaux témoins ont eu une intervention chirurgicale de type sham dans la région du cou.

#### ***Section «L'IRC peut-elle mener au diabète?» (rats Zucker)***

Cette étude tente d'évaluer si l'IRC peut mener au diabète dans une population prédisposée en induisant l'IRC sur un modèle animal de syndrome métabolique (rats *Zucker*). L'étude s'est effectuée sur 2 groupes expérimentaux : CTL et IRC. 4 rats par groupe ont été utilisés pour le

test de tolérance au glucose à 4 semaines post-néphrectomie. L'évaluation hebdomadaire de la glycémie et de la glycosurie a eu lieu sur 12 semaines après la première intervention chirurgicale via le système ACCU-CHECK et les bandelettes *Keto Diastix Reagent Strips for Urinalysis* (Bayer Inc., Toronto, Ont. Canada). Chacune des méthodes utilisées correspondent à celles décrites dans la section *Materials and Methods* de l'article.

### **Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Les différences entre les groupes ont été évaluées selon le *Student's t test* non-pairé pour les expériences effectuées sur les rats *Zucker* ou une analyse d'un test de variance factorielle (*2-way Anova*) pour celles effectuées sur les rats PTX. Si la variance était significative, la comparaison des groupes se faisait selon un post hoc de *Scheffe*. Le seuil de significativité était de  $p < 0,05$ .

## **2.2.2 Résultats**

### ***Section «Qui est responsable?» (influence de la PTX)***

#### **Paramètres biochimiques et poids corporels des rats PTX et non-PTX**

Le tableau présente les paramètres biochimiques et les poids corporels de chacun des groupes. Comparés aux rats contrôles respectifs, les animaux atteints d'IRC démontraient de plus grandes valeurs de créatinine et d'urée sériques et une plus petite valeur de clairance de créatinine (diminuée de 75-80%,  $p < 0,001$ ).

### **Test de tolérance au glucose intrapéritonéal des rats PTX et non-PTX**

Le test de tolérance au glucose démontre la présence d'une défaillance du métabolisme du glucose en IRC. En effet, les glycémies atteintes lors du *GTT* sont nettement supérieures dans la cohorte néphrectomisée comparativement aux rats contrôles. La PTX semble diminuer l'intolérance au glucose en IRC étant donné que les glycémies atteignent de moins grandes valeurs lors du *GTT* comparativement aux rats ayant conservés leurs glandes parathyroïdes (**Figure 2.1A.**). Bien que la PTX infligée aux rats urémiques améliore leur glycémie à  $t=30\text{min}$  ( $p<0,05$ ), cette intervention chirurgicale n'affecte pas le profil glycémique sur l'ensemble de l'expérience (graphique inséré de la (**Figure 2.1A.**)). L'insulinémie ne semble pas être améliorée par la PTX en IRC (sauf à  $t=30\text{min}$ ;  $p<0,05$ ) étant donné qu'elle suit la même tendance (**Figure 2.1B.**). Aucune différence significative n'a été constatée entre les groupes IRC et IRC-PTX sur l'ensemble de l'expérience (graphique inséré de la (**Figure 2.1B.**)).

### **Impact de la PTX sur l'expression génique du GLUT4 dans les tissus périphériques**

La **Figure 2.2** présente l'expression génique du GLUT4 dans les tissus périphériques. Les résultats démontrent une baisse considérable du GLUT4 au niveau musculaire (environ 40%,  $p<0,05$ ) (**Figure 2.2A.**) entre les rats atteints d'IRC et leurs contrôles respectifs. La PTX n'améliore pas l'effet de l'IRC. La NPX et la PTX n'ont entraîné aucune modulation dans l'expression génique du GLUT4 dans le tissu adipeux (**Figure 2.2B.**)).

### Impact de la PTX sur l'expression protéique du GLUT4 dans les tissus périphériques

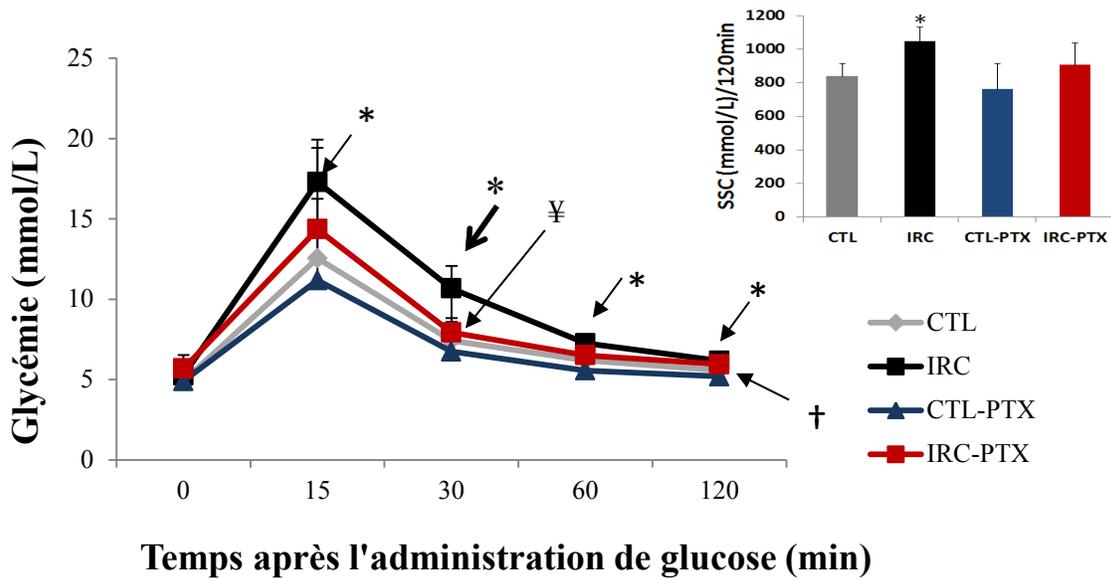
La **Figure 2.3** présente l'expression protéique du GLUT4 dans les tissus périphériques. Les résultats sont obtenus à partir d'une préparation membranaire totale de rats contrôles et atteints d'IRC avec ou sans PTX. Au niveau musculaire, l'IRC induit une diminution de moins grande envergure (~25%) (**Figure 2.3A.**) que celle observée dans les résultats de l'article. Bien que l'interaction NPX-PTX ne soit pas significative, la PTX favorise néanmoins la hausse de l'expression du GLUT4 dans le muscle ( $p < 0,05$ ) (graphique inséré **Figure 2.3A.**). Aucune conclusion significative n'a pu être émise à l'égard de l'impact de la PTX sur l'expression protéique du GLUT4 dans le tissu adipeux en raison de la grande variabilité des résultats (**Figure 2.3B.**).

Tableau II Paramètres biochimiques et poids corporels de rats avec ou sans IRC et PTX

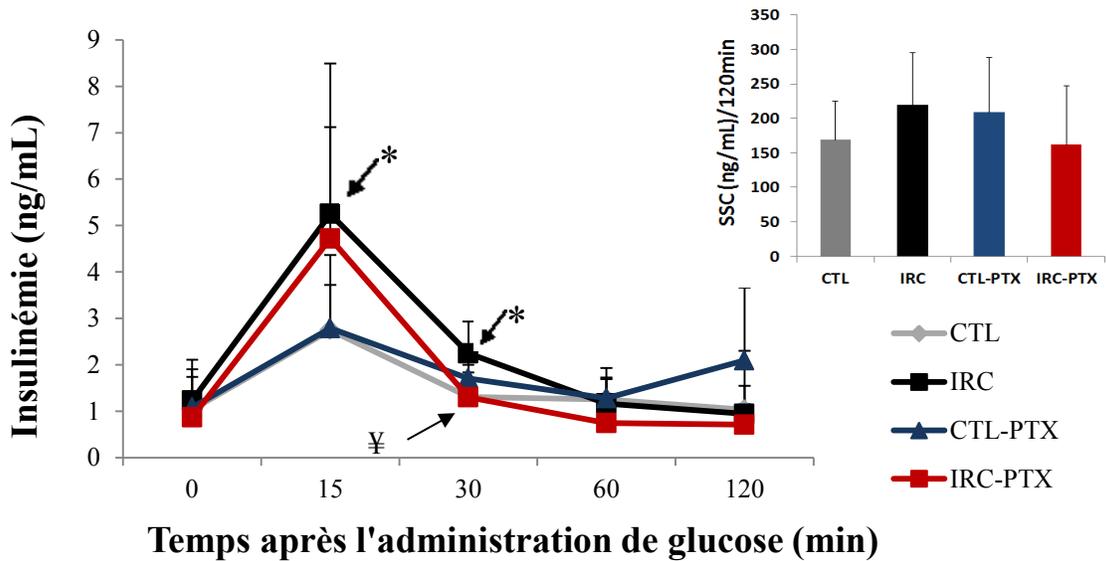
	CTL(n=24)	IRC (n=20)	CTL-PTX (n=10)	IRC-PTX (n=12)
<b>Poids (grams)</b>	372,8 ± 14,0	344,2 ± 58,3	432,2 ± 25,0	388,7 ± 47,2 <sup>†</sup>
<b>Créatinine sérique (µmol/L)</b>	43,7 ± 6,6	169,6 ± 100,0 <sup>*</sup>	43,9 ± 4,0	166,5 ± 52,2 <sup>†</sup>
<b>Clairance de la créatinine (µl/100g/min)</b>	418,8 ± 141,5	102,6 ± 62,7 <sup>*</sup>	352,1 ± 107,6	83,9 ± 29,9 <sup>†</sup>
<b>Urée sérique (mmol/L)</b>	3,6 ± 1,3	43,1 ± 14,0 <sup>*</sup>	5,2 ± 0,9	22,2 ± 6,6 <sup>†</sup>
<b>Glycémie (mmol/L)</b>	5,6 ± 0,7	6,5 ± 2,6	7,3 ± 2,0	7,1 ± 2,2

Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type. Les mesures ont été prises au moment du sacrifice (6 semaines post-NPX). Une cage métabolique de 24 heures se faisait 1 journée avant. La créatinine et l'urée sérique, et la créatinine urinaire ont été déterminées via l'appareil Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada). \*,  $p < 0,05$  vs CTL, †,  $p < 0,05$  vs CTL-PTX.

**A.**

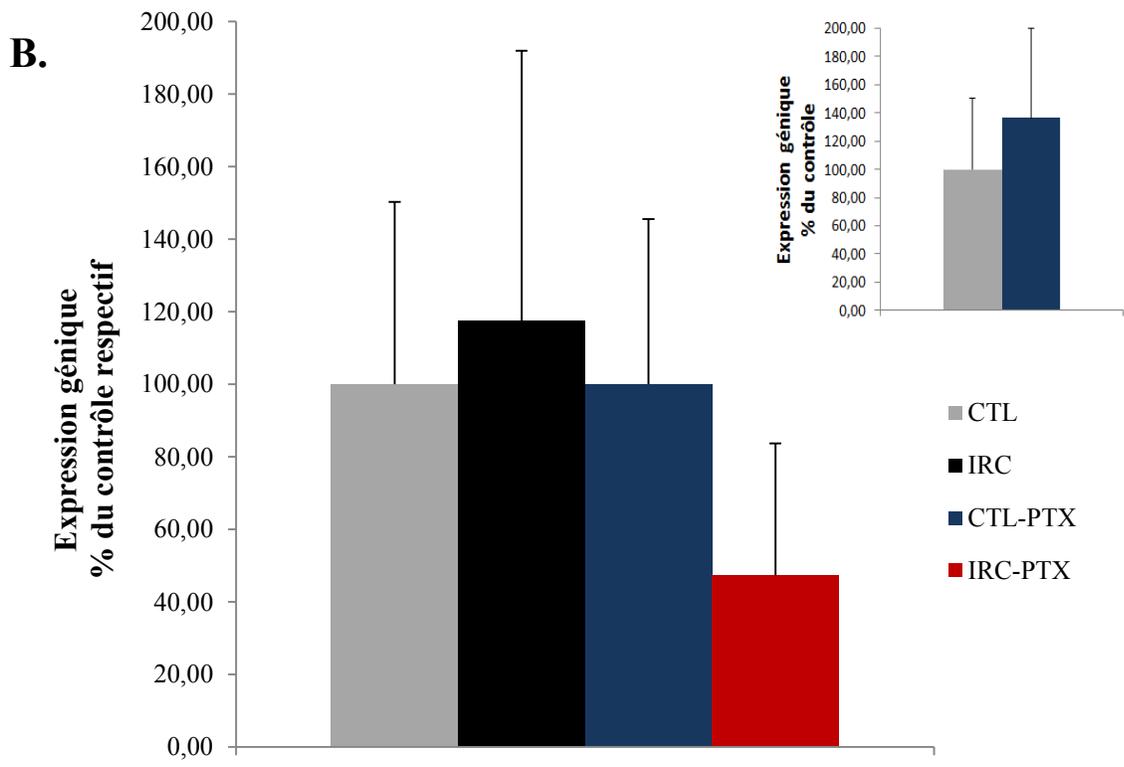
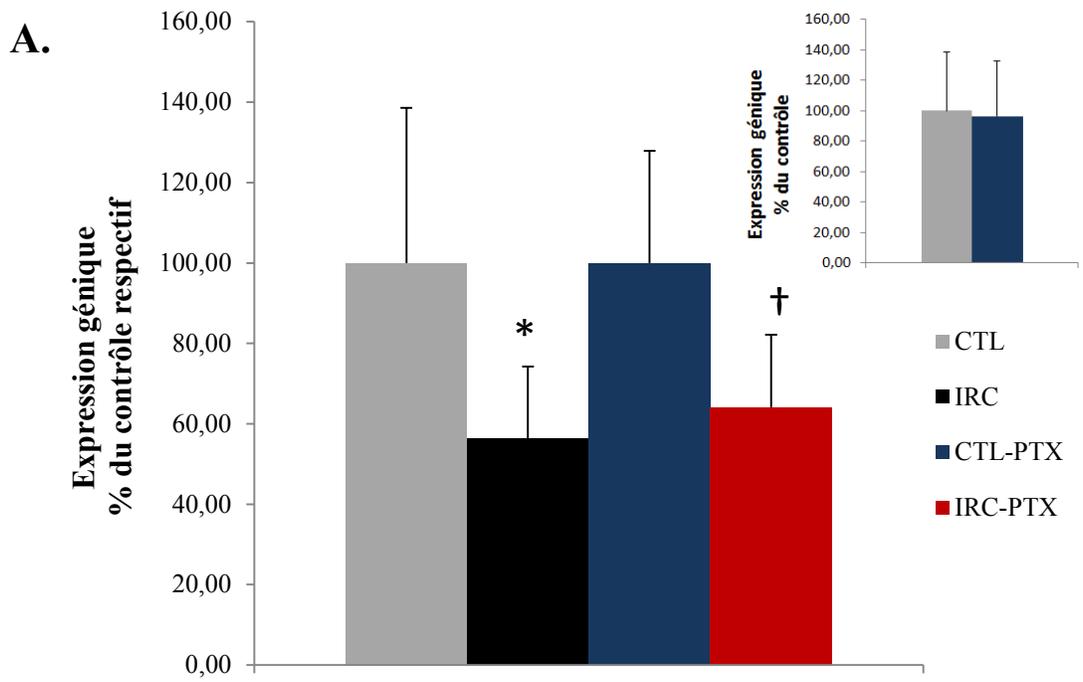


**B.**



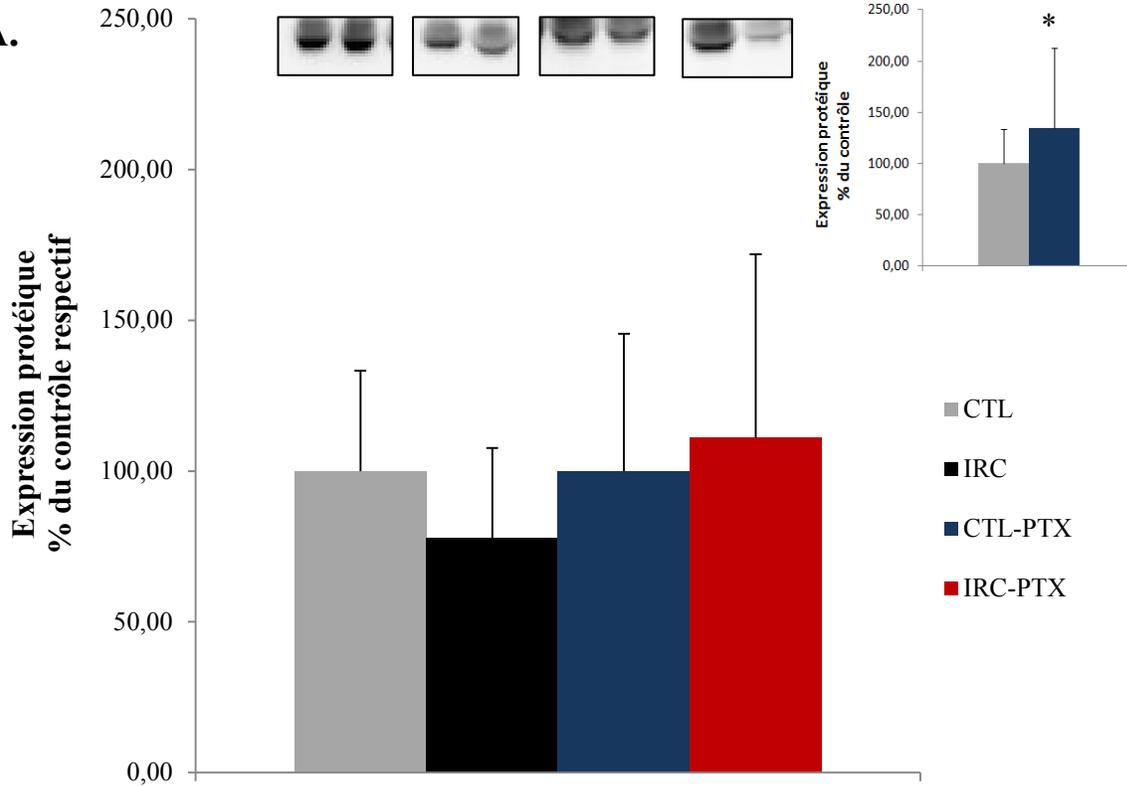
11

**Figure 2.1 | Glycémies et insulinémies à la suite d'une hyperglycémie provoquée à 4 semaines d'urémie chez des rats PTX. (A.) Glycémies et (B.) insulinémies en réponse à un bolus de glucose (2g/kg) donné de manière intrapéritonéale (I.P.) à des rats Sprague-Dawley ayant subi ou non une parathyroïdectomie (PTX) à 4 semaines post-NPX à la suite d'un jeûne de 16 heures. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± écart-type avec n=8 pour le groupe non-PTX et n=6 pour le groupe PTX, \*, p<0,05 vs CTL, †, p<0,05 vs CTL-PTX, ‡, p<0,05 vs IRC. Les graphiques insérés représentent la surface sous la courbe correspondant à l'ensemble de l'expérience.**

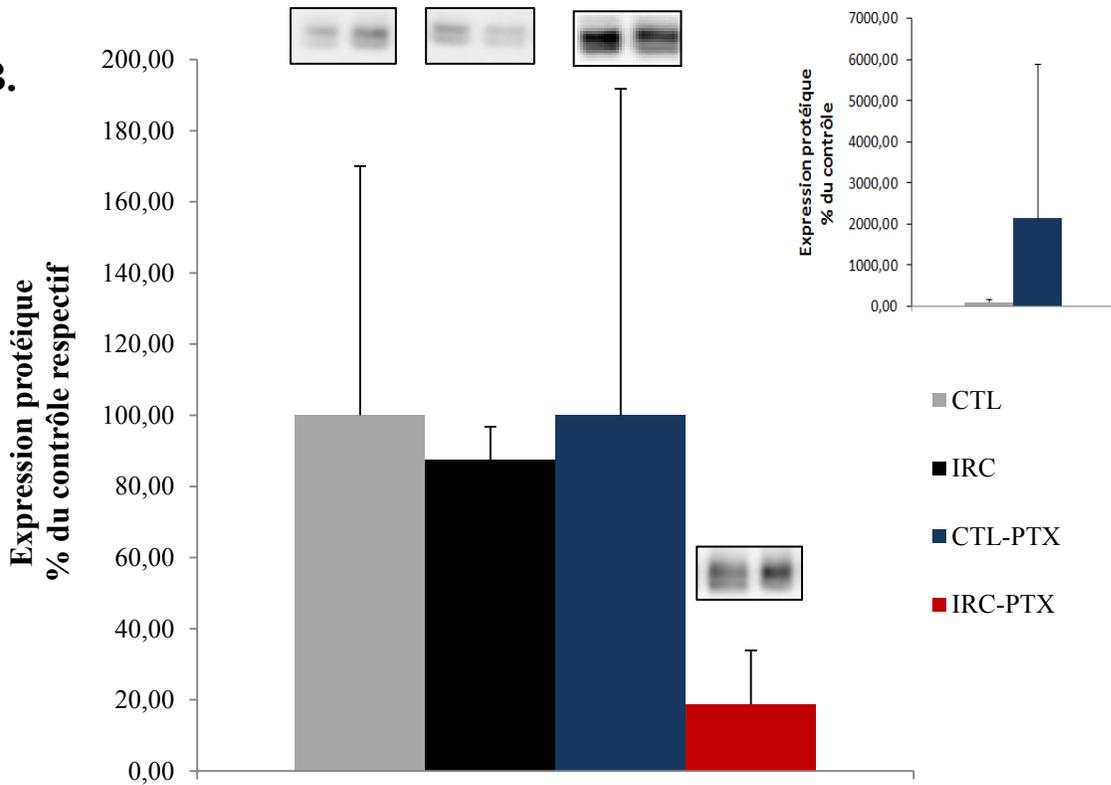


**Figure 2.2 Impact de la PTX sur l'expression génique du GLUT4** | L'ARNm codant pour le transporteur de glucose 4 (GLUT4) dans le muscle (**A.**) et dans le gras épидидymaire (**B.**) de rats Sprague-Dawley avec ou sans parathyroïdectomie (PTX) a été mesuré par PCR en temps réel. Les niveaux d'ARNm sont exprimés en quantités relatives en utilisant la méthode  $\Delta\Delta C_T$  (199) où la GAPDH et la  $\beta$ -actine sont utilisées comme gène respectif pour le muscle et le gras épидидymaire. La quantité relative moyenne des rats contrôles avec et sans PTX est arbitrairement définie à 100%. Les rats atteints d'IRC sont comparés par rapport à leur contrôles respectifs (CTL vs IRC; CTL-PTX vs IRC-PTX) où l'expression moyenne est exprimée sous forme de pourcentage des contrôles  $\pm$  écart-type avec n=8 pour chacun des groupes, \*, p<0,05 vs CTL, †, p<0,05 vs CTL-PTX. Le graphique inséré démontre l'impact de la PTX sur l'expression basale du GLUT4 chez des rats contrôles.

**A.**



**B.**



**Figure 2.3 Impact de la PTX sur l'expression protéique du GLUT4** | L'expression protéique du transporteur de glucose 4 (GLUT4) a été mesurée dans les membranes totales de muscle (A.) et de gras épидидymaire (B.) de rats Sprague-Dawley avec ou sans parathyroïdectomie (PTX). Les bandes sont exprimées en unités densitométriques. Les unités densitométriques pour le GLUT4 ont été standardisées en les divisant par les valeurs obtenues pour la GAPDH (muscle) et la  $\beta$ -actine (gras épидидymaire). Les unités densitométriques standardisés pour les rats contrôles (CTL et CTL-PTX) ont été arbitrairement définies à 100%. Les rats atteints d'IRC sont comparés par rapport à leur contrôles respectifs (CTL vs IRC; CTL-PTX vs IRC-PTX). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type pour n=6 par groupe, \*p<0,05. Des blots représentatifs sont illustrés. Le graphique inséré démontre l'impact de la PTX sur l'expression basale du GLUT4 chez des rats contrôles.

### ***Section «L'IRC peut-elle mener au diabète?» (rats Zucker)***

#### **Paramètres biochimiques et poids corporel des rats Zucker**

Le tableau III présente les paramètres biochimiques et les poids corporels de chacun des groupes. Comparés aux rats contrôles, les animaux atteints d'IRC démontraient de plus grandes valeurs de créatinine et d'urée sériques et une plus petite valeur de clairance de créatinine (diminuée de 80%, p<0,001). De plus, la glycémie était plus élevée en IRC (p<0.001).

#### **Test de tolérance au glucose intrapéritonéal des rats Zucker**

Le test de tolérance au glucose démontre la présence d'une intolérance au glucose en IRC chez les rats *Zucker* telles que démontrées par leurs glycémies significativement supérieures au temps 15 et 30 minutes comparativement aux rats contrôles (**Figure 2.4A.**). Cependant, bien que l'IRC semble favoriser la présence d'une hyperinsulinémie, les résultats ne sont pas significatifs (**Figure 2.4B.**).

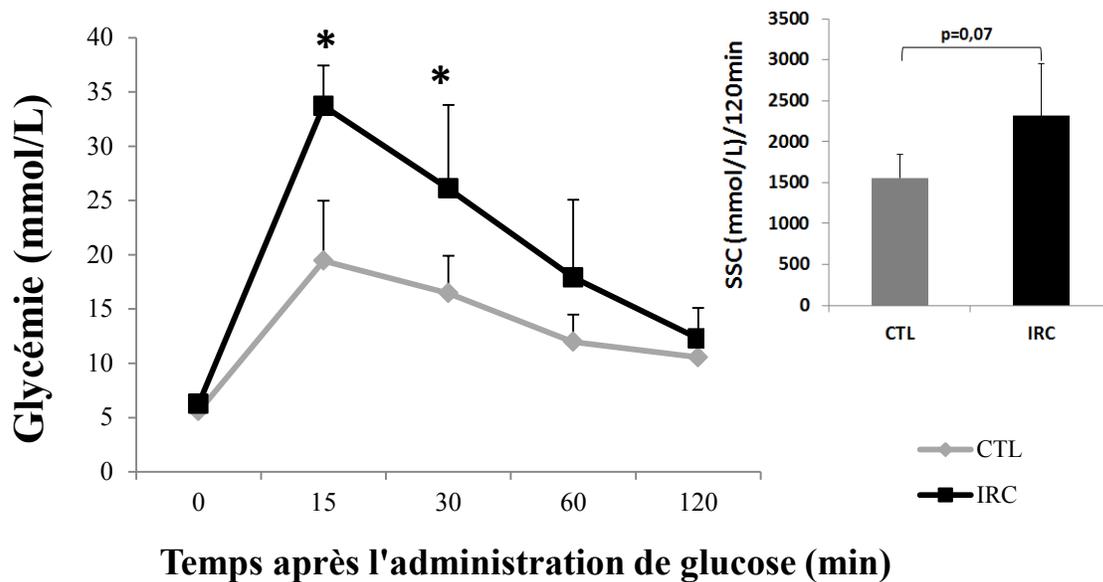
Tableau III Paramètres biochimiques et poids corporels de rats *Zucker* avec ou sans IRC

	<b>CTL(n=4)</b>	<b>IRC (n=4)</b>	<b>p-value</b>
<b>Poids (grams)</b>	320,5 ± 12,0	297,3 ± 56,9	N.S.
<b>Créatinine sérique (µmol/L)</b>	48,5 ± 1,3	189,0 ± 57,6	p<0,05
<b>Clairance de la créatinine (µl/100g/min)</b>	175,8 ± 79,4	31,1 ± 10,8	p<0,05
<b>Urée sérique (mmol/L)</b>	4,8 ± 0,3	43,1 ± 14,0	p<0,05
<b>Glycémie (mmol/L)</b>	4,3 ± 0,3	6,9 ± 0,7	p<0,001

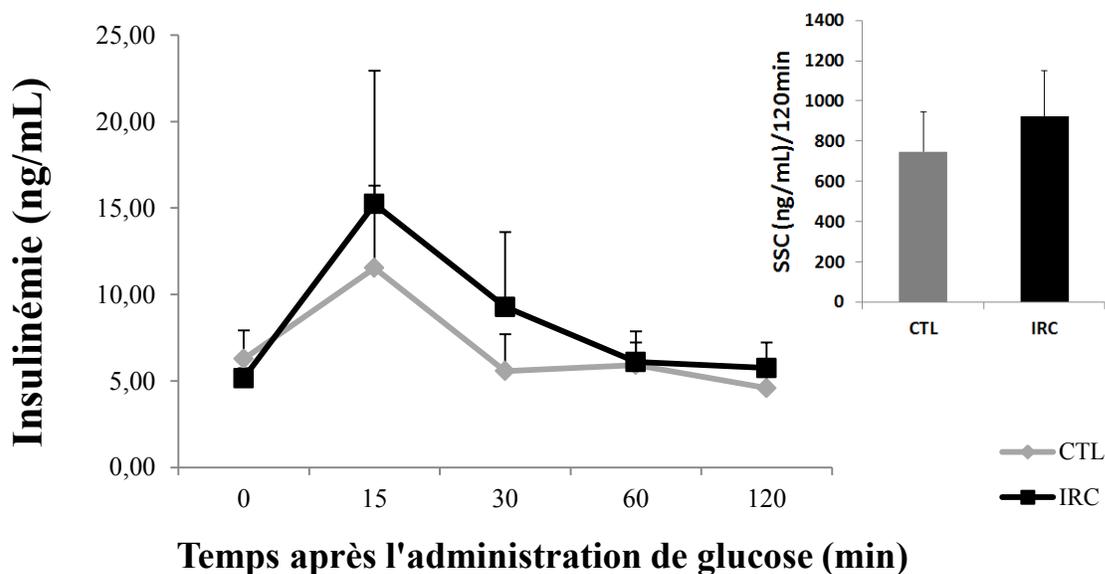
5

Les données sont exprimées sous forme de moyenne ± écart-type. Les mesures ont été prises 6 semaines post-néphrectomie. Une cage métabolique de 24 heures se faisait 1 journée avant. La créatinine et l'urée sérique, et la créatinine urinaire ont été déterminées via l'appareil Architect C1600 clinical analyzer (Abbott, Saint-Laurent, QC, Canada).

A.



B.



14

**Figure 2.4 | Glycémies et insulinémies à la suite d'une hyperglycémie provoquée à 4 semaines d'urémie chez des rats Zucker.** (A.) Glycémies et (B.) insulinémies en réponse à un bolus de glucose (2g/kg) donné de manière intrapéritonéale (I.P.) à des rats Zucker à 4 semaines post-NPX à la suite d'un jeûne de 16 heures. Les données sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type pour  $n=4$ ,  $*p<0.05$  vs contrôle. Les graphiques insérés représentent la surface sous la courbe sur l'ensemble de l'expérience.

### **3. DISCUSSION**

#### **3.1 Rappel du projet**

Le but de ce travail de maîtrise était d'étudier les effets de l'IRC sur les transporteurs de glucose afin de comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant au développement de la résistance à l'insuline, complication métabolique omniprésente chez les patients souffrant de maladies rénales chroniques. Mon hypothèse de travail est que la modulation de l'expression et de l'activité de transporteurs situés dans une multitude de tissus clés impliqués dans l'homéostasie du glucose, dont notamment les muscles, les tissus adipeux, le foie et les reins, serait à l'origine de la défaillance du métabolisme glucidique en IRC. Ces répercussions pourraient ultimement mener au développement du diabète dans une population prédisposée. Pour ce faire, les études ont été menées dans un modèle de rat atteint d'IRC induite par néphrectomie 5/6° (NPX).

#### **3.2 Évaluation de la résistance à l'insuline chez le modèle NPX**

Le modèle de rat NPX a été testé afin de confirmer sa fiabilité pour étudier la résistance à l'insuline en IRC. Plusieurs approches répertoriées dans la littérature nous permettent d'établir la sensibilité à l'insuline grâce aux valeurs de glycémie et d'insulinémie à jeun (e.g. *HOMA-IR*, *QUICKI*). Cependant, les conclusions émises de ces méthodes dites « statiques » ne sont pas représentatives de la résistance à l'insuline en IRC vue qu'elles indiquent plutôt une sensibilité à l'insuline au niveau hépatique. En effet, en condition de jeûne, la sensibilité à l'insuline est déterminée par la capacité de l'insuline à inhiber la production hépatique de glucose (124, 200). Pourtant, ces techniques sont encore utilisées dans la littérature pour confirmer la présence d'une résistance à l'insuline lors d'atteintes rénales(109, 188). Nous

avons alors opté pour une méthode « dynamique » étant plus représentative de la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus périphériques, soit le site de la résistance à l'insuline en IRC(124).

Bien que la résistance à l'insuline soit présente en permanence en IRC, sa sécrétion n'est pas toujours compromise(118, 125). Un test de tolérance au glucose (*GTT*) a néanmoins été réalisé afin d'évaluer si ces deux paramètres étaient affectés dans notre modèle animal. L'administration du glucose lors du *GTT* s'est faite de manière intrapéritonéale (I.P.) pour contrer l'impact des incrétines sur la stimulation de la sécrétion d'insuline lorsque celle-ci se fait par voie orale (P.O.)(124, 200-202). Les résultats confirment une intolérance au glucose chez les rats néphrectomisés par leur surface sous la courbe plus élevée (**Figure 1A**) et par la sécrétion d'insuline accrue à la suite de l'hyperglycémie provoquée (**Figure 1B**). Ceci reflète ainsi une résistance à l'insuline accompagnée d'une altération de la sécrétion compensatoire pancréatique. En effet, la sécrétion d'insuline est insuffisante pour rétablir la glycémie qui s'élève en instance de résistance à l'insuline. Ainsi, ne pouvant remédier à l'élévation du glucose sanguin par une sécrétion plus accrue d'insuline, les animaux néphrectomisés démontrent une glycémie dont la valeur excède de plus de 20% celle des rats contrôles au moment du sacrifice (**Table II; section article**). Cette intolérance au glucose suggère donc une progression dans la détérioration du contrôle glycémique en IRC(30, 38). Aucune corrélation n'a pu être observée entre la sévérité de la maladie rénale et le degré de résistance à l'insuline; phénomène également décrit dans la littérature(120, 121).

### **3.2.1 Hyperinsulinémie parfois trompeuse?**

L'hyperinsulinémie, élément indicateur d'une résistance à l'insuline, peut souvent être confondue avec une diminution de la clairance rénale de l'insuline en IRC. En effet, les reins jouent un rôle important dans le métabolisme de l'insuline en assurant plus de la moitié de son élimination. Dans les stades modérés de l'IRC, la clairance métabolique de l'insuline est faiblement atteinte en raison d'une élévation compensatoire de son extraction via les vaisseaux péri-tubulaires. Ce n'est que lorsque le DFG est maintenu en-dessous de 15-20 ml/min que la clairance de l'insuline se voit considérablement diminuée contribuant ainsi au prolongement de sa demi-vie (118, 124, 130). Nos résultats démontrent la présence d'une résistance à l'insuline plutôt qu'un défaut de sa dégradation en IRC étant donné que l'hyperinsulinémie n'est observée qu'aux temps 30 et 60 minutes lors du *GTT*. Si l'hyperinsulinémie était maintenue tout au long de l'expérience, elle serait plutôt représentative d'une plus grande défaillance rénale. Il est alors possible que l'expérience ait eu lieu sur des rats dont le DFG ne s'avère pas pour autant affecté par l'IRC. De plus, aucune corrélation n'a pu être établie entre la sévérité de l'IRC et l'insulinémie des rats utilisés pour le *GTT*. Une diminution considérable de la clairance rénale de l'insuline n'explique pas alors l'hyperinsulinémie observée dans cette expérience. Les résultats obtenus suggèrent ainsi une sécrétion compensatoire d'insuline afin de contrer l'hyperglycémie en réponse à la résistance à l'insuline qui affecte les rats néphrectomisés.

### **3.3 Tissus périphériques**

Ayant démontré que l'IRC pouvait mener à l'apparition d'une résistance à l'insuline, les expressions des transporteurs de glucose ont conjointement été évaluées afin d'établir si ces

modulations pouvaient être à l'origine de cette complication métabolique. Aucune modulation n'a été rapportée pour le GLUT1 en IRC. Une attention particulière a été portée au GLUT4, l'unique transporteur de glucose sensible à l'insuline (bien que le GLUT1 du tissu adipeux ne le soit partiellement (185)), localisé dans les tissus périphériques (muscles et tissus adipeux), dont toute anomalie affectant son expression, sa translocation et/ou son activité a fortement été liée à une résistance à l'insuline (178-180, 203).

### 3.3.1 Muscles squelettiques

Bien que la littérature s'appuie sur le fait qu'il y ait un défaut de translocation du GLUT4 dans les tissus périphériques et une diminution de son expression dans les adipocytes lors d'une résistance à l'insuline(204), plusieurs études émettent des résultats contradictoires quant à la modulation de son expression dans les muscles squelettiques(149, 203, 205). Nos résultats démontrent par contre une diminution significative de l'expression protéique du GLUT4 (~40%) en IRC (**Figure 3**), possiblement attribuable à la réduction de même envergure de son ARNm (**Figure 2**), pouvant ainsi expliquer, en partie, la résistance à l'insuline qui y est présente. Nous avons également observé une corrélation inverse entre la sévérité de l'insuffisance rénale et l'expression protéique du GLUT4 (*résultats non présentés*). Toutefois, *Friedman et al.* n'ont pas pu constater de modulation dans l'expression du GLUT4, issu de biopsies de muscles de patients urémiques, malgré une diminution marquée du transport de glucose(141). *Dikow et al.* décrivent également une absence de modulation de l'expression du GLUT4 dans les cellules cardiaques de rats atteints d'IRC malgré une perte de la sensibilité à l'insuline(206).

### 3.3.1.2 *Des muscles plus forts que d'autres*

Cela dit, certains groupes de recherche soutiennent qu'une variabilité dans l'expression basale du GLUT4 et dans sa régulation via l'insuline en fonction du muscle étudié expliquent les résultats contradictoires quant à l'expression de ce transporteur au niveau musculaire en IRC. En effet, dépendamment des fibres musculaires que composent le muscle, le GLUT4 réagit de manière différentielle au diabète et à la résistance à l'insuline, ainsi qu'au traitement à l'insuline(207, 208). Il est également à souligner que l'évaluation de l'expression du GLUT4 chez l'humain se fait principalement à partir de biopsies issus de *vastus lateralis* ou de *rectus abdominis*, muscles dont le GLUT4 est faiblement affecté par le diabète(207, 209). Cela pourrait expliquer pourquoi aucune étude, sauf la nôtre, n'a jusqu'à présent pu démontrer clairement une réduction du GLUT4 en IRC. De plus, étant donné que nos études se réfèrent aux muscles de la patte postérieure du rongeur, membre constitué de plus d'un type de fibres musculaires, il est possible que nos résultats sous-estiment la réelle diminution de l'expression du GLUT4 en IRC.

### 3.3.2 Tissus adipeux

Nos études ont démontré une diminution similaire (~40%) au niveau de l'expression protéique du GLUT4 dans les tissus adipeux de rats urémiques (**Figure 3**) sans pour autant affecter son ARNm (**Figure 2**). Malgré que la littérature stipule qu'une altération dans l'homéostasie du glucose affecte l'expression génique du GLUT4 en intervenant de manière plus rapide dans les adipocytes que dans les muscles squelettiques, cette répercussion n'est cependant pas observée en IRC(210). Cela suggère une régulation génique différentielle de ce transporteur selon le tissu périphérique. *Jacobs et al.* ont également rapportée une diminution

du nombre de transporteurs de glucose, de moins grande envergure (~17%), dans les adipocytes issus de rats atteints d'IRC(186). Cependant, *Szolkiewicz et al.* ont observé une augmentation de l'expression génique du GLUT4 dans les tissus adipeux de rats néphrectomisés(187).

### **3.3.2.1 *Ne pas sous-estimer le gras!***

Plusieurs conditions pathologiques, où la résistance à l'insuline est de mise, entraînent une réduction de l'expression du GLUT4 dans les tissus adipeux. Un *knock-out* sélectif du GLUT4 dans les adipocytes de rongeurs favorise une résistance à l'insuline et une amélioration de la sensibilité à l'insuline peut être obtenue par une surexpression de ce transporteur(211). De plus, il est à noter qu'une surexpression du GLUT4 dans les tissus adipeux d'un rongeur ayant subi un *knock-out* sélectif de ce transporteur exclusivement dans les muscles squelettiques corrige l'intolérance au glucose et le diabète qui le caractérisaient(180, 205). Ainsi, malgré que les tissus adipeux ne s'occupent que d'une faible proportion du métabolisme global du glucose(34, 36), le GLUT4 spécifique à cet organe endocrinien reste néanmoins d'une importance considérable étant donné qu'il peut restaurer la sensibilité à l'insuline non seulement dans le tissu même, mais également dans les muscles, tissus responsables de plus de 80% du métabolisme du glucose(204). Ainsi, cette diminution du GLUT4 en IRC, telle qu'observée dans nos résultats, vient contribuer au mécanisme sous-jacent à la résistance à l'insuline.

### **3.3.2.2 *Le gras a ses excuses***

Tel que décrit dans les muscles, il est possible qu'une variabilité dans l'expression du GLUT4 au niveau des tissus adipeux s'applique également. Différents compartiments de graisses existent où certains éléments impliqués dans le transport du glucose varient d'un type adipeux à l'autre. En effet, *Christen et al.* ont démontré une différence dans le transport de glucose entre les tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés(212). *Marette et al.* ont confirmé une variation dans l'expression du GLUT4 selon différents sites adipeux issus de biopsies de femmes obèses subissant une chirurgie gastro-intestinale(213). Il est alors possible que nos résultats ne représentent qu'une estimation de l'image globale de la modulation du GLUT4 dans les tissus adipeux en IRC étant donné que notre travail s'est concentré sur le gras épидидymaire.

Les résultats obtenus jusqu'à présent soulignent une diminution de la sensibilité à l'insuline en IRC expliquée par une réduction considérable du GLUT4 dans ces tissus insulino-dépendants. Ceci dit, malgré que la résistance à l'insuline en insuffisance rénale s'établie dans les tissus périphériques, d'autres organes participent également au contrôle glycémique via les différents transporteurs de glucose qui s'y retrouvent.

### **3.4 Reins**

Les reins, dont la fonction est fortement compromise en IRC, garantissent un rôle important dans l'homéostasie du glucose en assurant sa réabsorption totale. Cette tâche est entreprise par une multitude de transporteurs de glucose travaillant conjointement, SGLT2-GLUT2 et SGLT1-GLUT1. Nos résultats montrent une expression protéique augmentée de manière

significative en IRC, à l'exception de celle du GLUT2 (diminution de plus ~40%) (**Figure 3**). Malgré que peu de publications font référence aux impacts d'atteintes rénales sur les transporteurs de glucose du rein, les quelques informations issues de la littérature démontrent une augmentation de l'expression globale de GLUT1 et SGLT1 accompagnée d'une réduction de celle du GLUT2(130). L'absence d'une modulation de l'expression génique du SGLT2 en IRC a été rapportée(190) alors que certaines études démontrent une diminution en insuffisance rénale (130, 191). Il se peut que la discordance des résultats pour l'étude des transporteurs de glucose au niveau rénal provienne de la spécificité du gène rapporteur que nous avons utilisé, la villine-1, protéine exclusive aux cellules en bordure de brosse du tubule proximal(168, 214).

### **3.4.1 Compensations**

#### **3.4.1.1 *De nature anatomique***

Différents phénomènes peuvent expliquer la régulation à la hausse des transporteurs de glucose au niveau rénal tel que constaté dans nos résultats. Une adaptation compensatoire structurelle et fonctionnelle s'applique en IRC. En effet, Kaufman et al. ont observé une compensation remarquable de la masse rénale et du DFG par néphron, malgré un DFG net diminué, survenant à la suite de néphrectomies partielle et subtotale chez le rat(215). De ce fait, si les reins sont impliqués dans le maintien de la glycémie et dans la résolution de l'hyperglycémie(130), il serait possible qu'en instance d'IRC, où il y a une diminution du nombre de néphrons fonctionnels, la masse rénale résiduelle soit marquée par un plus grand nombre de transporteurs de glucose afin de préserver l'équilibre glucidique.

### **3.4.1.2 De nature biochimique**

Il est également possible que l'élévation de l'expression de ces transporteurs soit attribuable au déséquilibre de l'homéostasie du glucose tel que décrit chez nos rats atteints d'IRC (glycémie plus élevée chez les rats urémiques). En effet, en conditions d'hyperglycémie, la capacité rénale de réabsorption du glucose devient mal adaptée entraînant une augmentation de l'expression du SGLT2, transporteur responsable de plus de 90% de la réabsorption du glucose(33, 182, 216). Le diabète est également associé à une augmentation des transporteurs de glucose au niveau rénal(33). De ce fait, les diabétiques peuvent se retrouver à réabsorber 20% de glucose de plus qu'un patient sain, exacerbant ainsi l'hyperglycémie initiale. De plus, la hausse de la réabsorption du glucose repousse le seuil auquel l'hyperglycémie peut entraîner une glycosurie ce qui pourrait expliquer son absence chez les rats urémiques(216-218).

### **3.4.1.3 Intra-rénales**

Malgré l'élévation du SGLT2 chez les rats urémiques, le GLUT2, transporteur finalisant l'entrée du glucose accomplie par ce premier, se voit diminué en IRC. Marks et Carvou ont démontré qu'en présence d'hyperglycémie, le GLUT2, localisé à la membrane basolatérale, pouvait également être transloqué à la membrane apicale du tubule proximal facilitant ainsi la réabsorption du glucose entreprise par le SGLT2(219). Étant donné que l'expression du GLUT2 se voit réduite de manière drastique en IRC (**Figure 3**), une moins grande quantité de ce transporteur est disponible pour venir en aide au SGLT2 afin d'assurer la réabsorption massive du glucose qui a lieu. Il est alors possible qu'une plus grande quantité de SGLT1-GLUT1 soit exprimée afin de compléter la réabsorption et d'éviter l'accumulation intra-rénale de glucose. L'absence de glycosurie dans notre modèle d'IRC suggère ainsi que

l'hyperglycémie observée n'est pas assez élevée pour surpasser la capacité des transporteurs de glucose.

### **3.4.2 Répercussions extra-rénales**

Somme toute, l'augmentation de ces transporteurs de glucose au niveau rénal pourrait contribuer à l'élévation de la glycémie en IRC en favorisant une plus grande réabsorption de glucose. Plusieurs traitements pharmacologiques, tels le T-1095, la sergliflozine et la remogliflozine, inhibent sélectivement le SGLT2 pour contrer la réabsorption du glucose qui est augmentée chez les diabétiques. Par ailleurs, son inhibition favoriserait une amélioration de la sensibilité à l'insuline(182, 220). En effet, des études menées par Dimitrakoudis et Marette ont examiné les répercussions de l'hyperglycémie sur l'expression et la translocation du GLUT4 au niveau des muscles squelettiques chez des rats diabétiques induits par streptozotocine. Ils ont conclu que la normalisation de la glycémie, par l'entremise de la phlorizine, rétablissait l'expression totale et le niveau de GLUT4 acheminé à la membrane apicale à des valeurs similaires à celles retrouvées chez les rats contrôles(73, 74). Ainsi, l'augmentation de la réabsorption de glucose, reflétée par la hausse du nombre de transporteurs de glucose au niveau rénal, pourrait également contribuer à la résistance à l'insuline en IRC en favorisant la réduction de l'expression de GLUT4 au niveau musculaire, tel que vu dans nos résultats.

### **3.5 Foie**

Plusieurs résultats s'avèrent contradictoires quant à l'homéostasie du glucose dans le foie en IRC où la littérature suggère que la résistance à l'insuline associée aux atteintes rénales est

ciblée exclusivement dans les tissus périphériques, dont particulièrement les muscles squelettiques. Cela dit, plusieurs études émettent la possibilité d'une résistance à l'insuline au niveau hépatique. En effet, Schmitz et al. ont perçu une moins grande capacité à inhiber la production endogène hépatique de glucose en présence d'un bolus d'insuline chez des patients urémiques comparativement à des volontaires sains (131). Delmez et al. en sont parvenu aux mêmes conclusions chez des rats néphrectomisés(153). De plus, l'excès de PTH, secondaire à l'hyperparathyroïdie, complication commune de l'IRC, augmenterait la production hépatique de glucose via la glycolyse et la gluconéogenèse(221-223), résultats néanmoins contredits(224). Aucune étude ne s'est pourtant attardée aux variations des transporteurs de glucose au niveau du foie en instance d'IRC.

Nos résultats ont démontré une hausse considérable de l'expression protéique du GLUT1 et du GLUT2 en IRC (**Figure 3**) malgré une diminution significative de leur ARNm (**Figure 2**). Ces résultats suggèrent une prolongation de la demi-vie de ces transporteurs en IRC. Étant donné qu'aucune étude n'a examiné les répercussions de l'urémie sur l'expression des transporteurs de glucose hépatiques, nous avons alors comparé nos résultats à quelques études qui tiennent compte de ces paramètres en conditions de déséquilibre glucidique. L'altération des états thyroïdiens est généralement associée à la détérioration de l'homéostasie du glucose. En effet, l'hyperthyroïdie favorise l'élévation de la production hépatique de glucose, particulièrement la gluconéogenèse(225, 226). Kemp et al. ont répertorié qu'une augmentation de l'expression du GLUT2, observée en hyperthyroïdie, corrélait avec l'amplitude du transport de glucose au niveau hépatique(227). Malgré qu'ils aient émis des conclusions similaires, Mokuno et al. ont par ailleurs rapporté que les modulations de l'expression du GLUT2 pouvait

être représentatives soit de la glycolyse ou de la gluconéogenèse. Ils ont également démontré que l'intolérance au glucose associée à l'hyperthyroïdie s'expliquait par la hausse de GLUT2 au niveau du foie(225). En ce qui a trait au GLUT1, une élévation de son expression, telle que contemplée dans certains cancers, serait associée à une hausse de la glycolyse, phénomène notoire de la tumorigenèse(228). Somme toute, malgré l'élévation de l'expression protéique du GLUT1 et GLUT2 en IRC, celle-ci ne peut que refléter un défaut de l'homéostasie du glucose au niveau hépatique étant donné qu'ils ne reflètent qu'une augmentation du transport du glucose via le foie (entrée et/ou sortie de glucose). Une étude plus approfondie est nécessaire afin d'évaluer si la production de glucose est réellement augmentée en mesurant les réserves de glycogène et les enzymes gluconéogéniques et si celle-ci serait à l'origine d'une résistance hépatique à l'insuline.

### **3.6 Transport de glucose**

Les études de transport ont été effectuées sur les muscles, non seulement en raison de leur contributions majeures dans la consommation du glucose (>90%) lorsqu'il y a une stimulation à l'insuline(229), mais également parce qu'ils représentent le site de résistance à l'insuline en IRC(93, 96). Les expériences ont eu lieu *ex-vivo* afin d'éviter toutes répercussions compromettantes sur le transport de glucose. En effet, bien que le GLUT4 soit exclusif aux tissus périphériques, ce dernier est sous l'influence de différents facteurs hormonaux et métaboliques extra-musculaires contrôlant son expression et sa translocation à la membrane plasmique; paramètres dont toute modulation peut affecter le transport de glucose. Parmi ceux-ci se trouvent en autres les hormones thyroïdiennes, les cytokines inflammatoires et les acides gras non-estérifiés(92, 205, 211). L'*épitrochléaris* a été utilisé pour les études de

transport de glucose en raison de sa petite géométrie qui facilite la diffusion d'oxygène et de 2-déoxy-glucose entraînant ainsi moins de limitations durant l'expérience comparativement à d'autres muscles(230). De plus, l'*épitrochléaris* est comparé à la majorité des muscles retrouvés chez le rat en raison des fibres musculaires qui le composent(231).

Nos résultats démontrent que l'IRC entraîne une diminution du transport de glucose (stimulé à l'insuline par rapport au transport basal) de 31,2% comparativement aux rats contrôles (**Figure 4**); observation unanime dans la littérature autant chez l'homme que chez l'animal urémique(96, 141, 232-234). N'ayant observé de modulation du GLUT1 en IRC, ce constat pourrait être expliqué par la réduction de l'expression totale du GLUT4, telle qu'observée dans nos résultats. Aucune étude jusqu'à présent, sauf la nôtre, n'a pu démontrer qu'au niveau musculaire une diminution du transport de glucose en IRC pouvait être associée à la baisse de l'expression du GLUT4 bien que *Jacobs et al.* l'ont décrit exclusivement dans les adipocytes. Cependant, ces derniers n'ont rapporté qu'une diminution du nombre total des transporteurs de glucose dans les tissus adipeux de rats urémiques sans les différencier (↓GLUT1 et/ou GLUT4?)(186). Cela dit, Marette et al. ont démontré que le niveau d'expression du GLUT1 au niveau musculaire ne représente que le vingtième de celui du GLUT4 assurant ainsi à ce dernier une plus grande responsabilité du transport de glucose. Néanmoins, ce même groupe a démontré que le diabète favorise une régulation différentielle de ces transporteurs avec une augmentation de l'expression du GLUT1 et une diminution de celle du GLUT4 à la membrane plasmique attribuant alors au GLUT1 une plus grande importance dans le transport du glucose dans le muscle lorsqu'en déséquilibre de l'homéostasie du glucose(203). L'utilisation d'agents pharmacologiques favorables à l'inhibition du GLUT4, tels l'*indinavir*, inhibiteur de protéases

utilisé dans le traitement du VIH(235, 236), serait intéressant afin d'évaluer la réelle contribution de chacun des isoformes dans le transport du glucose malgré la prédominance du GLUT4(203).

### **3.7 Qui est responsable?**

L'IRC entraîne l'accumulation et le déficit de substances endogènes pouvant ultimement avoir des répercussions néfastes sur la sensibilité à l'insuline(3). En effet, les cytokines inflammatoires et les toxines urémiques, caractéristiques communes des atteintes rénales, affectent le transport et le métabolisme du glucose au niveau des tissus périphériques(234, 237). Parmi ces toxines urémiques, l'excès de PTH associée à l'hyperparathyroïdie secondaire est à l'origine de manifestations délétères en IRC telles que les défaillances du métabolisme des médicaments via la diminution de l'expression d'enzymes de phases I(198) et II(238) de la biotransformation des médicaments. La PTX préviendrait les répercussions métaboliques malgré la présence de l'IRC(198, 238). Plusieurs études ont également suggéré la PTH comme élément responsable du défaut de métabolisme du glucose en IRC(125, 126, 142). La normalisation du métabolisme du glucose en IRC à la suite d'une PTX proviendrait d'une plus grande sécrétion d'insuline puisque la PTX n'aurait aucun impact sur la sensibilité à l'insuline(125, 128, 142). Néanmoins, ce dernier point reste à débattre étant donné que plusieurs études démontrent le contraire(239, 240). Pour démystifier le tout, nous avons évalué si la PTX pouvait améliorer la sensibilité et la sécrétion à l'insuline en IRC en réalisant un *GTT* sur 4 groupes distincts : CTL±PTX et NPX±PTX. D'après nos résultats, la PTX améliore le métabolisme du glucose en IRC sans pour autant normaliser l'intolérance au glucose. En effet, malgré qu'il n'y ait pas de différences significatives entre les groupes NPX

et NPX-PTX sur l'ensemble de l'expérience (graphique inséré **Figure 2.1A.**), les rats issus de ce dernier groupe semblent moins affectés par l'effet du *GTT* où leurs glycémies atteignent des valeurs moins élevées au cours de l'expérience comparativement aux rats n'ayant subi qu'une néphrectomie (**Figure 2.1A.**). De ce fait, nonobstant une amélioration possible de l'intolérance au glucose dans le groupe NPX-PTX, ce constat ne pourrait pas être expliqué par une plus grande sécrétion d'insuline étant donné qu'il n'y a aucune différence distincte dans la sécrétion d'insuline au cours de l'expérience (graphique inséré **Figure 2.1B.**). Il est alors probable que la sensibilité à l'insuline ait été améliorée. Nous avons donc procédé à l'évaluation de l'expression globale du GLUT4 dans les tissus périphériques de rats ayant subi l'ablation des glandes parathyroïdes étant donné qu'il a été démontré que la PTH affecte la sensibilité à l'insuline en favorisant une diminution de l'expression du GLUT4(156).

Étant donné la grande variabilité des résultats obtenus quant à l'égard de l'impact de la PTX sur l'expression globale (génique et protéique) du GLUT4 dans les tissus adipeux, aucune conclusion n'a pu être émise. Bien que la PTX favorise la hausse de l'expression protéique basale du GLUT4 des muscles squelettiques ( $p < 0,05$ ) (graphique inséré **Figure 2.3A.**), la PTX ne semble pas atténuer la diminution de son expression protéique en IRC (l'interaction NPX-PTX n'est pas significative). De plus, la PTX ne semble pas améliorer l'expression génique du GLUT4 en IRC étant donné qu'elle mène à une réduction de même envergure (environ 40%) entre les deux groupes (CTL vs IRC et CTL-PTX vs IRC-PTX) ( $p < 0,05$ ) (**Figure 2.2A.**). Somme toute, il est difficile d'évaluer si les répercussions de la PTX sur l'expression du GLUT4 puissent être responsables de l'amélioration de l'intolérance au glucose en IRC étant donné le faible échantillonnage et la variabilité des résultats. Des études supplémentaires sont

nécessaires afin de démontrer si la PTX améliore le transport de glucose, basal et stimulé à l'insuline, dans les tissus adipeux et les muscles de rats atteints d'IRC tout en évaluant si ces résultats correspondent aux variations du GLUT4.

### **3.8 L'IRC peut-elle mener au diabète?**

#### ***La goutte qui fait déborder le vase***

Plusieurs éléments caractéristiques du prédiabète sont présents chez les patients insuffisants rénaux chroniques non-diabétiques telles que l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie(99, 120). Ainsi, ces perturbations du contrôle glycémique pourraient-elles se détériorer au point de mener au diabète, particulièrement chez les personnes prédisposées (e.g. syndrome métabolique, historique familial de diabète)? Pour répondre à ce questionnement, nous avons induit une NPX dans un modèle animal de syndrome métabolique qui ne développe pas de diabète. Les rats obèses *Zucker* se caractérisent par une résistance périphérique à l'insuline, une hyperinsulinémie et une hyperlipidémie, traits métaboliques issus d'une mutation du récepteur de la leptine (*fa/fa*)(241, 242). La glycémie et la glycosurie à jeun étaient régulièrement évaluées pendant 12 semaines afin d'estimer si l'IRC pouvait accentuer la résistance à l'insuline, initialement présente chez ce modèle animal, à un tel point de surpasser les capacités sécrétoires du pancréas menant ainsi ultimement au diabète.

Les résultats du *GTT* témoignent d'une défaillance du métabolisme du glucose chez les rats *Zucker* ayant subi une néphrectomie. En effet, bien que la résistance à l'insuline soit une caractéristique commune de ce modèle animal, l'IRC semble aggraver l'intolérance au glucose. Nonobstant la différence du fonds génétique, les rats *Zucker* atteints d'IRC

démontrent des valeurs glycémiques supérieures au cours de l'expérience (**Figure 2.4A.**) comparativement aux rats *Sprague-Dawley* (CD). Aucune différence significative n'a été constatée en ce qui a trait aux insulinémies malgré qu'il y ait une tendance à ce que la courbe d'insuline chez les rats atteints d'IRC soit plus importante (**Figure 2.4B.**). Une diminution de l'appétit telle qu'observée chez nos rats en IRC (poids nettement inférieur à ce qu'il devrait habituellement correspondre à leur âge) pourrait réduire la progression de l'hyperinsulinémie des rats *Zucker* par restriction calorique (la viabilité des cellules  $\beta$  est mieux conservée)(82, 241, 242). Une diminution de la sécrétion compensatoire d'insuline pourrait alors expliquer les valeurs glycémiques plus importantes chez les rats *Zucker* atteints d'insuffisance rénale au cours du *GTT*. De plus, cette restriction calorique pourrait minimiser le stress au niveau pancréatique (moins grande déplétion des cellules  $\beta$ ) prévenant ainsi la progression vers un diabète(82).

La présence de glycosurie, soulignant une sérieuse élévation de la glycémie et/ou d'une défaillance de la réabsorption du glucose au niveau rénal, est utilisée comme référence dans le monitorat du diabète(243). Tous les animaux ont néanmoins été caractérisés par l'absence de glycosurie ne suggérant pas pour autant l'absence d'une progression vers le diabète. En effet, une diminution importante du DFG augmente le seuil auquel la glycémie favorise la glycosurie(33). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression protéique du SGLT2 en IRC, telle que constatée chez les rats CD, et qui pourrait également avoir lieu chez les rats *Zucker*, repousse aussi l'arrivée d'une glycosurie(33, 243). Ce transporteur de glucose, responsable de la majorité de la réabsorption du glucose, favorise la glycosurie lorsque son expression se voit diminuée comme en instance de *glycosurie rénale familiale*(220) et de diabète de type

*MODY(244)*, ou via l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs du SGLT2 comme le T-1095, la sergliflozine et la remogliflozine(182).

L'évaluation de la glycémie a par ailleurs permis l'obtention de résultats forts intéressants. Outre la présence d'une glycémie à jeun légèrement plus importante chez les *Zucker* atteints d'IRC (**Tableau III**), aucune évolution de l'hyperglycémie n'a eu lieu (*résultats non présentés*), cependant, deux d'entre eux ont présenté des glycémies drastiquement élevées au moment du sacrifice (28,8 et 27,2mmol/L).

De plus, sachant que l'hyperglycémie est également associée à la pathogenèse des complications diabétiques vasculaires (e.g. rétinopathie, néphropathie et athérosclérose)(245), les reins ont été récoltés suite au sacrifice afin d'évaluer si la néphropathie diabétique (DN) y était présente. Malgré que les études histologiques n'aient émis aucun résultat concluant, l'évaluation de l'expression protéique des transporteurs de glucose chez les rats CD ont rapporté une élévation significative du GLUT1 en IRC; chaînon qui relie l'hyperglycémie à la DN(12). Il serait intéressant d'étudier l'expression des transporteurs de glucose chez les rats *Zucker* afin d'évaluer si l'IRC mène à une plus grande variation de leurs expressions comparativement à celle observée chez les rats CD. Si en effet l'IRC affecte davantage l'expression des transporteurs de glucose chez les rats *Zucker*, ces modulations plus importantes pourraient favoriser l'arrivée ou l'apparition du diabète.

L'impact de l'IRC sur un modèle animal prédisposé au diabète semble suggérer son arrivée imminente, malgré l'ambiguïté de certains résultats. L'absence d'une sécrétion compensatoire

d'insuline en IRC pourrait être à l'origine de l'intolérance au glucose plus sévère chez les rats *Zucker* comparativement aux rats CD; signe pouvant suggérer la progression vers un diabète. Une évaluation plus exhaustive des paramètres pancréatiques (insulinémie et GLUT2) serait de mise afin de voir une meilleure détérioration du contrôle glycémique.

### **3.9 Études futures**

#### ***Jamais deux sans trois?***

Les études moléculaires tiennent généralement le GLUT4 responsable de la résistance à l'insuline. En effet, la diminution de transport de glucose dans les tissus insulino-dépendants suite à une stimulation à l'insuline reflète un défaut d'expression, de translocation et/ou d'activité du GLUT4(148, 178-180). Nos études ont jusqu'ici démontré que la résistance à l'insuline en IRC, démontrée par le *GTT* et les études de transport, pouvait être causée par une diminution de l'expression du GLUT4. Un défaut de translocation pourrait néanmoins expliquer pourquoi certains groupes de recherche observent une diminution du transport de glucose malgré l'absence de variation de l'expression du GLUT4 en IRC(141, 206). La translocation reste alors un paramètre important à considérer et pourrait contribuer davantage à la présence de résistance à l'insuline en IRC. Comme études futures, l'expression du GLUT4 dans les différents compartiments cellulaires des cellules de tissus périphériques devrait être mesurée en condition basale et en présence d'insuline afin d'évaluer s'il y a un défaut de sa translocation en IRC. De plus, il serait intéressant de mesurer s'il y a modulation de l'expression de certains éléments moléculaires de la signalisation de l'insuline responsables du cheminement du GLUT4 à la membrane plasmique en IRC tout comme l'Akt et le niveau de phosphorylation de certains de ses résidus (S473 et T308)(246).

#### 4. CONCLUSION

La modulation de l'expression des transporteurs de glucose en IRC ont permis jusqu'ici de témoigner d'une défaillance indéniable de l'homéostasie du glucose telle qu'observée par les valeurs obtenues lors du *GTT*. En effet, l'augmentation de la surface sous la courbe de glycémie en fonction du temps (accentuation de l'hyperglycémie) chez les rats urémiques peut s'expliquer par la variation de l'expression de ces transporteurs en IRC. La diminution de l'expression du GLUT4 dans les tissus périphériques des rats atteints d'IRC, qui en soit est associée à une résistance à l'insuline, entraîne une diminution de l'apport en glucose dans les tissus périphériques favorisant une hyperglycémie. De plus, l'augmentation de l'expression protéique de la majorité des transporteurs de glucose au niveau rénal en IRC favorise également une hyperglycémie qui en soit affecte l'expression du GLUT4 (↓) contribuant davantage à la résistance à l'insuline. Au niveau hépatique, l'augmentation de l'expression protéique du GLUT2 en IRC indique une intolérance au glucose, soit une combinaison entre une résistance à l'insuline et un défaut de sa sécrétion. L'ensemble de des résultats du *GTT* démontrent alors que l'IRC entraîne une résistance à l'insuline qui s'explique par la modulation des transporteurs de glucose.

Bien que plusieurs organes participent à l'homéostasie du glucose, une attention particulière a été portée aux muscles squelettiques étant donné qu'ils représentent la cible primordiale de la résistance à l'insuline en IRC. Nos résultats démontrent la présence d'une diminution du transport de glucose en IRC qui pourrait, en partie, être expliquée par la réduction significative de l'expression totale du GLUT4, unique transporteur de glucose sensible à l'insuline dans ce tissu. Des études supplémentaires sont néanmoins requises afin d'évaluer si la translocation du

GLUT4 est affectée par l'IRC ce qui pourrait également contribuer à cette diminution du transport de glucose.

Les résultats issus du *GTT* et des études de transport démontrent la présence d'une résistance à l'insuline en IRC pouvant s'expliquer par une modulation de l'expression des transporteurs de glucose, particulièrement celle du GLUT4. Plusieurs facteurs omniprésents en IRC affectent le métabolisme du glucose dont la PTH. Nos études ont démontré que l'ablation des glandes parathyroïdes améliorait partiellement l'intolérance au glucose, qui caractérise les rats urémiques, sans pour autant la corriger. Malgré que l'interaction NPX-PTX ne soit pas significative, la PTX favorise néanmoins une augmentation significative de l'expression protéique du GLUT4 au niveau musculaire. Bien que la résistance à l'insuline est une maladie multifactorielle, dont plusieurs éléments en IRC pourrait y contribuer, la PTH pourrait participer de manière importante, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour émettre quelconque conclusion.

Plusieurs caractéristiques métaboliques de l'IRC partagent des similitudes avec le pré-diabète. Nos études, effectuées sur des rats obèses *Zucker*, modèle animal prédisposé au diabète, ont démontré que l'IRC pouvait possiblement mener au développement du diabète par leurs importantes intolérances au glucose et glycémies. Une étude approfondie des transporteurs de glucose est néanmoins suggérée afin d'évaluer si leurs modulations concordent avec les résultats précédents. La progression de l'insulinémie serait également de mise afin d'évaluer si la sécrétion pancréatique s'affaiblit par l'IRC au point de mener au diabète.

## **5. LIMITES DU MODÈLE DE NÉPHRECTOMIE**

La néphrectomie 5/6<sup>e</sup> peut être à l'origine d'une multitude de complications retrouvées en insuffisance rénale chronique, maladie qu'elle tente de reproduire de manière chirurgicale(125, 126, 158, 247). La présence de ces désordres métaboliques (anémie, acidose métabolique, déficience en vitamine D active et hyperparathyroïdie secondaire) joue un rôle important dans l'apparition et la progression de la résistance à l'insuline (109, 119) où leur correction permet d'améliorer sa sensibilité(29, 113-115). Le contrôle étroit de plusieurs paramètres métaboliques dont l'hématocrite, le  $\text{HCO}_3^-$ , la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  et la PTH devient alors un obstacle majeur pour évaluer exclusivement la relation entre l'IRC, les transporteurs de glucose et la résistance à l'insuline.

La néphrectomie participe aussi à l'augmentation de la pression artérielle des animaux(248); facteur également impliqué dans la modulation de la sensibilité à l'insuline(249). En effet, certains facteurs du système RAAS, dont l'Angiotensin II, augmentent à la suite d'une néphrectomie(250) où ce dernier peut induire une modulation dans l'expression de transporteurs de glucose(218, 251, 252) favorisant ainsi un déséquilibre dans l'homéostasie du glucose.

Il devient alors fastidieux d'évaluer si l'expression des transporteurs de glucose, qui mène ultimement à la résistance à l'insuline, est affectée uniquement par l'IRC, par les désordres métaboliques qui lui sont associés ou par l'hypertension, tous étant induits par la néphrectomie.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298(17):2038-47.
2. Abboud H, Henrich WL. Clinical practice. Stage IV chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2010;362(1):56-65.
3. Cibulka R, Racek J. Metabolic disorders in patients with chronic kidney failure. *Physiol Res*. 2007;56(6):697-705.
4. Arora P, Vasa P, Brenner D, Iglar K, McFarlane P, Morrison H, et al. Prevalence estimates of chronic kidney disease in Canada: results of a nationally representative survey. *CMAJ*. 2013;185(9):E417-23.
5. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int*. 2005;67(6):2089-100.
6. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
7. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
8. Stigant C, Stevens L, Levin A. Nephrology: 4. Strategies for the care of adults with chronic kidney disease. *CMAJ*. 2003;168(12):1553-60.
9. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2007;49(2 Suppl 2):S12-154.
10. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8 Suppl 3):S241-5.
11. Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(2):69-84.
12. Mogyorosi A, Ziyadeh FN. GLUT1 and TGF-beta: the link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(12):2827-9.
13. Ruilope LM, Salvetti A, Jamerson K, Hansson L, Warnold I, Wedel H, et al. Renal function and intensive lowering of blood pressure in hypertensive participants of the hypertension optimal treatment (HOT) study. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(2):218-25.
14. Ravera M, Re M, Deferrari L, Vettoretti S, Deferrari G. Importance of blood pressure control in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4 Suppl 2):S98-103.
15. Abrass CK. Overview: obesity: what does it have to do with kidney disease? *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2768-72.
16. Tozawa M, Iseki K, Iseki C, Oshiro S, Ikemiya Y, Takishita S. Influence of smoking and obesity on the development of proteinuria. *Kidney Int*. 2002;62(3):956-62.
17. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyren O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(6):1695-702.
18. Praga M. Obesity--a neglected culprit in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(7):1157-9.
19. Kasiske BL, O'Donnell MP, Cleary MP, Keane WF. Treatment of hyperlipidemia reduces glomerular injury in obese Zucker rats. *Kidney Int*. 1988;33(3):667-72.
20. Manolescu B, Stoian I, Atanasiu V, Busu C, Lupescu O. Review article: The role of adipose tissue in uraemia-related insulin resistance. *Nephrology*. 2008;13(7):622-8.

21. Thomas R, Kanso A, Sedor JR. Chronic kidney disease and its complications. *Prim Care*. 2008;35(2):329-44, vii.
22. Wanic-Kossowska M, Kazmierski M, Pawliczak E, Kobelski M. [Combined therapy with L-carnitine and erythropoietin of anemia in chronic kidney failure patients undergoing hemodialysis]. *Pol Arch Med Wewn*. 2007;117(1-2):14-9.
23. Kletzmayer J, Mayer G, Legenstein E, Heinz-Peer G, Leitha T, Horl WH, et al. Anemia and carnitine supplementation in hemodialyzed patients. *Kidney Int Suppl*. 1999;69:S93-106.
24. Goodman WG. Medical management of secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 Suppl 3:iii2-8.
25. Kraut JA, Kurtz I. Metabolic acidosis of CKD: diagnosis, clinical characteristics, and treatment. *Am J Kidney Dis*. 2005;45(6):978-93.
26. Warnock DG. Uremic acidosis. *Kidney Int*. 1988;34(2):278-87.
27. Ortega LM, Arora S. Metabolic acidosis and progression of chronic kidney disease: incidence, pathogenesis, and therapeutic options. *Nefrologia*. 2012;32(6):724-30.
28. Franch HA, Raissi S, Wang X, Zheng B, Bailey JL, Price SR. Acidosis impairs insulin receptor substrate-1-associated phosphoinositide 3-kinase signaling in muscle cells: consequences on proteolysis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287(4):F700-6.
29. Kovesdy CP. Metabolic acidosis and kidney disease: does bicarbonate therapy slow the progression of CKD? *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(8):3056-62.
30. Saltiel AR. Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J Clin Invest*. 2000;106(2):163-4.
31. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414(6865):799-806.
32. Sinacore DR, Gulve EA. The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy. *Phys Ther*. 1993;73(12):878-91.
33. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2011(120):S1-6.
34. Bjorntorp P, Sjostrom L. Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism: clinical and experimental*. 1978;27(12 Suppl 2):1853-65.
35. Gerich JE. Control of glycaemia. *Bailliere's clinical endocrinology and metabolism*. 1993;7(3):551-86.
36. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*. 2006;444(7121):847-53.
37. Kim SH. Measurement of insulin action: a tribute to Sir Harold Himsworth. *Diabet Med*. 2011;28(12):1487-93.
38. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocrine reviews*. 2000;21(6):585-618.
39. Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2003;27 Suppl 3:S6-11.

40. Campbell RK. Type 2 diabetes: where we are today: an overview of disease burden, current treatments, and treatment strategies. *Journal of the American Pharmacists Association* : JAPhA. 2009;49 Suppl 1:S3-9.
41. Ward WK, Beard JC, Halter JB, Pfeifer MA, Porte D, Jr. Pathophysiology of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 1984;7(5):491-502.
42. Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, Flier JS. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest*. 1983;71(6):1581-7.
43. Fink RI, Kolterman OG, Griffin J, Olefsky JM. Mechanisms of insulin resistance in aging. *J Clin Invest*. 1983;71(6):1523-35.
44. Massry SG, Fadda GZ, Zhou XJ, Chandrasoma P, Cheng L, Filburn CR. Impaired insulin secretion of aging: role of renal failure and hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 1991;40(4):662-7.
45. Gong Z, Muzumdar RH. Pancreatic function, type 2 diabetes, and metabolism in aging. *International journal of endocrinology*. 2012;2012:320482.
46. Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence. *Popul Health Metr*. 2010;8:29.
47. O'Rahilly S. Science, medicine, and the future. Non-insulin dependent diabetes mellitus: the gathering storm. *BMJ*. 1997;314(7085):955-9.
48. Perseghin G. Viewpoints on the way to a consensus session: where does insulin resistance start? The liver. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S164-7.
49. Sinert R, Finkelstein D, Pius M, Baron BJ, Adar E, Rizzo P, et al. The effect of non-insulin dependent diabetes mellitus on uncontrolled hemorrhage in a rodent model. *Resuscitation*. 2005;66(1):83-90.
50. Walcher D, Marx N. Insulin resistance and cardiovascular disease: the role of PPARgamma activators beyond their anti-diabetic action. *Diab Vasc Dis Res*. 2004;1(2):76-81.
51. Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Tahara H, Koyama H, Ishimura E, et al. Insulin resistance as an independent predictor of cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(7):1894-900.
52. Rutter MK, Meigs JB, Sullivan LM, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 2005;54(11):3252-7.
53. Dickinson S, Colagiuri S, Faramus E, Petocz P, Brand-Miller JC. Postprandial hyperglycemia and insulin sensitivity differ among lean young adults of different ethnicities. *The Journal of nutrition*. 2002;132(9):2574-9.
54. Tataranni PA. Pathophysiology of obesity-induced insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2002;6(2-3):27-32.
55. Nawano M, Oku A, Ueta K, Umebayashi I, Ishirahara T, Arakawa K, et al. Hyperglycemia contributes insulin resistance in hepatic and adipose tissue but not skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;278(3):E535-43.
56. Unger RH, Grundy S. Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia*. 1985;28(3):119-21.

57. Dubois M, Vacher P, Roger B, Huyghe D, Vandewalle B, Kerr-Conte J, et al. Glucotoxicity inhibits late steps of insulin exocytosis. *Endocrinology*. 2007;148(4):1605-14.
58. Rossetti L, Shulman GI, Zawalich W, DeFronzo RA. Effect of chronic hyperglycemia on in vivo insulin secretion in partially pancreatectomized rats. *J Clin Invest*. 1987;80(4):1037-44.
59. Leahy JL, Cooper HE, Deal DA, Weir GC. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion. A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. *J Clin Invest*. 1986;77(3):908-15.
60. Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest*. 1987;79(5):1510-5.
61. Yki-Jarvinen H, Helve E, Koivisto VA. Hyperglycemia decreases glucose uptake in type I diabetes. *Diabetes*. 1987;36(8):892-6.
62. Rossetti L. Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale*. 1995;18(4):255-60.
63. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. *Diabetes Care*. 1990;13(6):610-30.
64. Del Prato S. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. *Diabet Med*. 2009;26(12):1185-92.
65. Poyntout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocrine reviews*. 2008;29(3):351-66.
66. Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, et al. N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(4):E744-53.
67. Dokken BB, Saengsirisuwan V, Kim JS, Teachey MK, Henriksen EJ. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(3):E615-21.
68. Maddux BA, See W, Lawrence JC, Jr., Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*. 2001;50(2):404-10.
69. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52(1):1-8.
70. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*. 2006;113(15):1888-904.
71. Garg R, Chaudhuri A, Munschauer F, Dandona P. Hyperglycemia, insulin, and acute ischemic stroke: a mechanistic justification for a trial of insulin infusion therapy. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2006;37(1):267-73.
72. James DE, Burleigh KM, Storlien LH, Bennett SP, Kraegen EW. Heterogeneity of insulin action in muscle: influence of blood flow. *Am J Physiol*. 1986;251(4 Pt 1):E422-30.
73. Dimitrakoudis D, Vranic M, Klip A. Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *J Am Soc Nephrol*. 1992;3(5):1078-91.

74. Marette A, Dimitrakoudis D, Shi Q, Rodgers CD, Klip A, Vranic M. Glucose rapidly decreases plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Endocrine*. 1999;10(1):13-8.
75. Hager SR, Jochen AL, Kalkhoff RK. Insulin resistance in normal rats infused with glucose for 72 h. *Am J Physiol*. 1991;260(3 Pt 1):E353-62.
76. Hager SR, Pastorek D, Jochen AL, Meier D. Divergence between GLUT4 mRNA and protein abundance in skeletal muscle of insulin resistant rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;181(1):240-5.
77. Davidson MB, Bouch C, Venkatesan N, Karjala RG. Impaired glucose transport in skeletal muscle but normal GLUT-4 tissue distribution in glucose-infused rats. *Am J Physiol*. 1994;267(6 Pt 1):E808-13.
78. Hidaka H, Nagulesparan M, Klimes I, Clark R, Sasaki H, Aronoff SL, et al. Improvement of insulin secretion but not insulin resistance after short term control of plasma glucose in obese type II diabetics. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(2):217-22.
79. Kay JP, Alemzadeh R, Langley G, D'Angelo L, Smith P, Holshouser S. Beneficial effects of metformin in normoglycemic morbidly obese adolescents. *Metabolism: clinical and experimental*. 2001;50(12):1457-61.
80. Chiarelli F, Marcovecchio ML. Insulin resistance and obesity in childhood. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2008;159 Suppl 1:S67-74.
81. Li SQ, Zhou Y, Wang Y, Liu Y, Geng DH, Liu JG. Upregulation of IRS-1 expression in Goto-Kakizaki rats following Roux-en-Y gastric bypass surgery: resolution of type 2 diabetes? *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2011;225(3):179-86.
82. Ohneda M, Inman LR, Unger RH. Caloric restriction in obese pre-diabetic rats prevents beta-cell depletion, loss of beta-cell GLUT 2 and glucose incompetence. *Diabetologia*. 1995;38(2):173-9.
83. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes & development*. 2007;21(12):1443-55.
84. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes*. 2011;60(10):2441-9.
85. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106(4):473-81.
86. Iozzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? *The adipose tissue*. *Diabetes Care*. 2009;32 Suppl 2:S168-73.
87. Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2005;26(2):19-39.
88. Shafir E, Ziv E. A useful list of spontaneously arising animal models of obesity and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1450-2.
89. Koch C, Augustine RA, Steger J, Ganjam GK, Benzler J, Pracht C, et al. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *J Neurosci*. 2010;30(48):16180-7.
90. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension*. 2005;45(5):828-33.
91. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.

92. Hauner H, Petruschke T, Russ M, Rohrig K, Eckel J. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia*. 1995;38(7):764-71.
93. DeFronzo RA, Andres R, Edgar P, Walker WG. Carbohydrate metabolism in uremia: a review. *Medicine (Baltimore)*. 1973;52(5):469-81.
94. Mak RH. Carbohydrate metabolism in uremia. *Pediatr Nephrol*. 1989;3(2):201-8.
95. Alvestrand A. Carbohydrate and insulin metabolism in renal failure. *Kidney Int Suppl*. 1997;62:S48-52.
96. DeFronzo RA, Alvestrand A, Smith D, Hendler R, Hendler E, Wahren J. Insulin resistance in uremia. *J Clin Invest*. 1981;67(2):563-8.
97. Hung AM, Ikizler TA. Factors determining insulin resistance in chronic hemodialysis patients. *Contributions to nephrology*. 2011;171:127-34.
98. Shishido S, Sato H, Asanuma H, Shindo M, Hataya H, Ishikura K, et al. Unexpectedly high prevalence of pretransplant abnormal glucose tolerance in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2006;10(1):67-73.
99. Basturk T, Unsal A. What is the frequency of carbohydrate metabolism disorder in CKD? *J Ren Care*. 2012;38(1):15-21.
100. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009;2(5-6):231-7.
101. Gerich JE. Glycemic control in the metabolic syndrome and implications in preventing cardiovascular disease. *Metabolic syndrome and related disorders*. 2006;4(4):315-27.
102. Kurella M, Lo JC, Chertow GM. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):2134-40.
103. Kubo M, Kiyohara Y, Kato I, Iwamoto H, Nakayama K, Hirakata H, et al. Effect of hyperinsulinemia on renal function in a general Japanese population: the Hisayama study. *Kidney Int*. 1999;55(6):2450-6.
104. Sowers JR. Metabolic risk factors and renal disease. *Kidney Int*. 2007;71(8):719-20.
105. Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4 Suppl 2):S81-5.
106. Parvanova AI, Trevisan R, Iliev IP, Dimitrov BD, Vedovato M, Tiengo A, et al. Insulin resistance and microalbuminuria: a cross-sectional, case-control study of 158 patients with type 2 diabetes and different degrees of urinary albumin excretion. *Diabetes*. 2006;55(5):1456-62.
107. Liao MT, Sung CC, Hung KC, Wu CC, Lo L, Lu KC. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:691369.
108. Viswanathan V, Tilak P, Meerza R, Kumpatla S. Insulin resistance at different stages of diabetic kidney disease in India. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2010;58:612-5.
109. Sit D, Kadiroglu AK, Kayabasi H, Yilmaz ME. The prevalence of insulin resistance in nondiabetic nonobese patients with chronic kidney disease. *Adv Ther*. 2006;23(6):988-98.
110. Siew ED, Ikizler TA. Determinants of insulin resistance and its effects on protein metabolism in patients with advanced chronic kidney disease. *Contributions to nephrology*. 2008;161:138-44.
111. Gupta D, Misra M. Metabolic derangements seen in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients. *Contributions to nephrology*. 2011;171:113-9.

112. Lai HL, Kartal J, Mitsnefes M. Hyperinsulinemia in pediatric patients with chronic kidney disease: the role of tumor necrosis factor-alpha. *Pediatr Nephrol.* 2007;22(10):1751-6.
113. Mak RH. Correction of anemia by erythropoietin reverses insulin resistance and hyperinsulinemia in uremia. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 2):F839-44.
114. Kautzky-Willer A, Pacini G, Barnas U, Ludvik B, Streli C, Graf H, et al. Intravenous calcitriol normalizes insulin sensitivity in uremic patients. *Kidney Int.* 1995;47(1):200-6.
115. Mak RH. Amelioration of hypertension and insulin resistance by 1,25-dihydroxycholecalciferol in hemodialysis patients. *Pediatr Nephrol.* 1992;6(4):345-8.
116. Kobayashi S, Maesato K, Moriya H, Ohtake T, Ikeda T. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(2):275-80.
117. Watanabe H, Miyamoto Y, Otagiri M, Maruyama T. Update on the pharmacokinetics and redox properties of protein-bound uremic toxins. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2011;100(9):3682-95.
118. Mak RH. Insulin and its role in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(3):355-62.
119. Nigwekar SU, Thadhani RI. Shining light on vitamin D trials in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013;83(2):198-200.
120. Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, et al. Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int.* 1998;53(5):1343-7.
121. Dzurik R, Spustova V, Janekova K. The prevalence of insulin resistance in kidney disease patients before the development of renal failure. *Nephron.* 1995;69(3):281-5.
122. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):2034-47.
123. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S112-9.
124. Pham H, Utzschneider KM, de Boer IH. Measurement of insulin resistance in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(6):640-6.
125. Akmal M, Massry SG, Goldstein DA, Fanti P, Weisz A, DeFronzo RA. Role of parathyroid hormone in the glucose intolerance of chronic renal failure. *J Clin Invest.* 1985;75(3):1037-44.
126. Fadda GZ, Akmal M, Premdas FH, Lipson LG, Massry SG. Insulin release from pancreatic islets: effects of CRF and excess PTH. *Kidney Int.* 1988;33(6):1066-72.
127. Massry SG. Sequence of cellular events in pancreatic islets leading to impaired insulin secretion in chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2011;21(1):92-9.
128. Mak RH, Turner C, Haycock GB, Chantler C. Secondary hyperparathyroidism and glucose intolerance in children with uremia. *Kidney Int Suppl.* 1983;16:S128-33.
129. Niemczyk S, Niemczyk L, Romejko-Ciepielewska K. Basic endocrinological disorders in chronic renal failure. *Endokrynol Pol.* 2012;63(3):250-7.
130. Mehta RL. Glycemic control and critical illness: is the kidney involved? *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(10):2623-7.
131. Schmitz O. Peripheral and hepatic resistance to insulin and hepatic resistance to glucagon in uraemic subjects. Studies at physiologic and supraphysiologic hormone levels. *Acta endocrinologica.* 1988;118(1):125-34.

132. Capaldo B, Cianciaruso B, Napoli R, Andreucci V, Kopple JD, Sacca L. Role of the splanchnic tissues in the pathogenesis of altered carbohydrate metabolism in patients with chronic renal failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70(1):127-33.
133. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):134-41.
134. Heimbürger O, Lonnqvist F, Danielsson A, Nordenstrom J, Stenvinkel P. Serum immunoreactive leptin concentration and its relation to the body fat content in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8(9):1423-30.
135. Axelsson J, Rashid Qureshi A, Suliman ME, Honda H, Pecoits-Filho R, Heimbürger O, et al. Truncal fat mass as a contributor to inflammation in end-stage renal disease. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;80(5):1222-9.
136. Marette A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5(4):377-83.
137. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* 1999;103(2):253-9.
138. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, et al. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999;48(6):1270-4.
139. Fiaschi E, Campanacci L, Guarnieri GF, Faccini L, Bellini G, Carretta R, et al. Muscle glucose content and hexokinase activity in patients with chronic uremia. *Kidney Int Suppl.* 1975(3):341-4.
140. Cecchin F, Ittoop O, Sinha MK, Caro JF. Insulin resistance in uremia: insulin receptor kinase activity in liver and muscle from chronic uremic rats. *Am J Physiol.* 1988;254(4 Pt 1):E394-401.
141. Friedman JE, Dohm GL, Elton CW, Rovira A, Chen JJ, Leggett-Frazier N, et al. Muscle insulin resistance in uremic humans: glucose transport, glucose transporters, and insulin receptors. *Am J Physiol.* 1991;261(1 Pt 1):E87-94.
142. Mak RH, Bettinelli A, Turner C, Haycock GB, Chantler C. The influence of hyperparathyroidism on glucose metabolism in uremia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985;60(2):229-33.
143. Mak RH, Turner C, Thompson T, Haycock G, Chantler C. The effect of a low protein diet with amino acid/keto acid supplements on glucose metabolism in children with uremia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;63(4):985-9.
144. Amendt P, Filler G. Glucose metabolism in children with renal failure: oral or intravenous glucose tolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2000;108(4):253-8.
145. Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, et al. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest.* 1996;97(12):2859-65.
146. Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 1999;341(4):240-6.
147. Ciaraldi TP, Abrams L, Nikoulina S, Mudaliar S, Henry RR. Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2820-7.

148. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest*. 1998;101(11):2377-86.
149. Kampmann U, Christensen B, Nielsen TS, Pedersen SB, Orskov L, Lund S, et al. GLUT4 and UBC9 protein expression is reduced in muscle from type 2 diabetic patients with severe insulin resistance. *PloS one*. 2011;6(11):e27854.
150. Furtado LM, Somwar R, Sweeney G, Niu W, Klip A. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol*. 2002;80(5):569-78.
151. Rabkin R, Unterhalter SA, Duckworth WC. Effect of prolonged uremia on insulin metabolism by isolated liver and muscle. *Kidney Int*. 1979;16(4):433-9.
152. Maloff BL, McCaleb ML, Lockwood DH. Cellular basis of insulin resistance in chronic uremia. *Am J Physiol*. 1983;245(2):E178-84.
153. Delmez JA, Rutherford WE, Klahr S, Blondin J. Studies on the role of the liver and splanchnic tissues in the production of carbohydrate intolerance in uremia. *Metabolism: clinical and experimental*. 1981;30(7):658-65.
154. Laouari D, Jurkowitz C, Burtin M, Bois B, Vassault A, Kleinknecht C. Uremia-induced disturbances in hepatic carbohydrate metabolism: enhancement by sucrose feeding. *Metabolism: clinical and experimental*. 1994;43(4):403-12.
155. Bakkour Z, Laouari D, Dautrey S, Yvert JP, Kleinknecht C. Accelerated glycogenolysis in uremia and under sucrose feeding: role of phosphorylase alpha regulators. *Am J Physiol*. 1997;273(1 Pt 1):E17-27.
156. Chang E, Donkin SS, Teegarden D. Parathyroid hormone suppresses insulin signaling in adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;307(1-2):77-82.
157. Reusch JE, Begum N, Sussman KE, Draznin B. Regulation of GLUT-4 phosphorylation by intracellular calcium in adipocytes. *Endocrinology*. 1991;129(6):3269-73.
158. Bailey JL, Wang X, England BK, Price SR, Ding X, Mitch WE. The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest*. 1996;97(6):1447-53.
159. Bailey JL, Zheng B, Hu Z, Price SR, Mitch WE. Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(5):1388-94.
160. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*. 1996;335(25):1897-905.
161. Price SR, Du JD, Bailey JL, Mitch WE. Molecular mechanisms regulating protein turnover in muscle. *Am J Kidney Dis*. 2001;37(1 Suppl 2):S112-4.
162. May RC, Clark AS, Goheer MA, Mitch WE. Specific defects in insulin-mediated muscle metabolism in acute uremia. *Kidney Int*. 1985;28(3):490-7.
163. Reyes M, Benet LZ. Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011;100(9):3831-42.
164. Mutsaers HA, van den Heuvel LP, Ringens LH, Dankers AC, Russel FG, Wetzels JF, et al. Uremic toxins inhibit transport by breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 4 at clinically relevant concentrations. *PloS one*. 2011;6(4):e18438.

165. Laouari D, Yang R, Veau C, Blanke I, Friedlander G. Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;280(4):F636-45.
166. Dreisbach AW, Lertora JJ. The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2008;4(8):1065-74.
167. Naud J, Laurin LP, Michaud J, Beauchemin S, Leblond FA, Pichette V. Effects of chronic renal failure on brain drug transporters in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2012;40(1):39-46.
168. Naud J, Michaud J, Beauchemin S, Hebert MJ, Roger M, Lefrancois S, et al. Effects of chronic renal failure on kidney drug transporters and cytochrome P450 in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(8):1363-9.
169. Naud J, Michaud J, Boisvert C, Desbiens K, Leblond FA, Mitchell A, et al. Down-regulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;320(3):978-85.
170. Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A, Pichette V. Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2008;36(1):124-8.
171. Nolin TD, Frye RF, Le P, Sadr H, Naud J, Leblond FA, et al. ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(10):2269-76.
172. Sun H, Frassetto L, Benet LZ. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;109(1-2):1-11.
173. Amato AA, Santos GM, Neves Fde A. Thyroid hormone action in chronic kidney disease. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2008;15(5):459-65.
174. Lim CF, Bernard BF, de Jong M, Docter R, Krenning EP, Hennemann G. A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of thyroxine hepatocyte transport in uremia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(2):318-24.
175. Guevin C, Michaud J, Naud J, Leblond FA, Pichette V. Down-regulation of hepatic cytochrome p450 in chronic renal failure: role of uremic mediators. *Br J Pharmacol*. 2002;137(7):1039-46.
176. Michaud J, Dube P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, et al. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol*. 2005;144(8):1067-77.
177. Michaud J, Nolin TD, Naud J, Dani M, Lafrance JP, Leblond FA, et al. Effect of hemodialysis on hepatic cytochrome P450 functional expression. *Journal of pharmacological sciences*. 2008;108(2):157-63.
178. Scheepers A, Joost HG, Schurmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2004;28(5):364-71.
179. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003;89(1):3-9.
180. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*. 2010;62(5):315-33.
181. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev*. 2011;91(2):733-94.
182. Mather A, Pollock C. Renal glucose transporters: novel targets for hyperglycemia management. *Nat Rev Nephrol*. 2010;6(5):307-11.

183. Hardman TC, Dubrey SW. Development and potential role of type-2 sodium-glucose transporter inhibitors for management of type 2 diabetes. *Diabetes Ther.* 2011;2(3):133-45.
184. Dominguez JH, Camp K, Maianu L, Garvey WT. Glucose transporters of rat proximal tubule: differential expression and subcellular distribution. *Am J Physiol.* 1992;262(5 Pt 2):F807-12.
185. Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, Lund S, Moller DE, Flier JS, et al. Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes.* 1990;39(7):865-70.
186. Jacobs DB, Hayes GR, Truglia JA, Lockwood DH. Alterations of glucose transporter systems in insulin-resistant uremic rats. *Am J Physiol.* 1989;257(2 Pt 1):E193-7.
187. Szolkiewicz M, Sucajtys E, Wolyniec W, Rutkowski P, Stelmanska E, Korczynska J, et al. Mechanisms of enhanced carbohydrate and lipid metabolism in adipose tissue in uremia. *J Ren Nutr.* 2005;15(1):166-72.
188. Aksentijevic D, Bhandari S, Seymour AM. Insulin resistance and altered glucose transporter 4 expression in experimental uremia. *Kidney Int.* 2009;75(7):711-8.
189. Yu X, Fang Y, Ding X, Liu H, Zhu J, Zou J, et al. Transient hypoxia-inducible factor activation in rat renal ablation and reduced fibrosis with L-mimosine. *Nephrology.* 2012;17(1):58-67.
190. Takahashi K, Masuda S, Nakamura N, Saito H, Futami T, Doi T, et al. Upregulation of H(+)-peptide cotransporter PEPT2 in rat remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;281(6):F1109-16.
191. Nakamura N, Masuda S, Takahashi K, Saito H, Okuda M, Inui K. Decreased expression of glucose and peptide transporters in rat remnant kidney. *Drug metabolism and pharmacokinetics.* 2004;19(1):41-7.
192. Iglesias P, Diez JJ. Insulin therapy in renal disease. *Diabetes Obes Metab.* 2008;10(10):811-23.
193. Kato Y, Hayashi M, Ohno Y, Suzawa T, Sasaki T, Saruta T. Mild renal dysfunction is associated with insulin resistance in chronic glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 2000;54(5):366-73.
194. Chen J, Muntner P, Hamm LL, Fonseca V, Batuman V, Whelton PK, et al. Insulin resistance and risk of chronic kidney disease in nondiabetic US adults. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(2):469-77.
195. Mohteshamzadeh M, Wong C, Whitarcar R, Thomas S. Is there a link between insulin resistance and chronic kidney disease in men with treated hypertension? Analysis of 5-year data. *Am J Nephrol.* 2009;29(2):116-22.
196. Eldin WS, Ragheb A, Klassen J, Shoker A. Evidence for increased risk of prediabetes in the uremic patient. *Nephron Clinical practice.* 2008;108(1):c47-55.
197. Haviv YS, Sharkia M, Safadi R. Hypoglycemia in patients with renal failure. *Ren Fail.* 2000;22(2):219-23.
198. Michaud J, Naud J, Chouinard J, Desy F, Leblond FA, Desbiens K, et al. Role of parathyroid hormone in the downregulation of liver cytochrome P450 in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):3041-8.
199. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

200. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2008;294(1):E15-26.
201. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):470-512.
202. Andrikopoulos S, Blair AR, Deluca N, Fam BC, Proietto J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(6):E1323-32.
203. Marette A, Atgie C, Liu Z, Bukowiecki LJ, Klip A. Differential regulation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of a new model of type II diabetes. The obese SHR/N-cp rat. *Diabetes*. 1993;42(8):1195-201.
204. McCarthy AM, Elmendorf JS. GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res*. 2007;125(3):373-88.
205. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell metabolism*. 2007;5(4):237-52.
206. Dikow R, Wasserhess C, Zimmerer K, Kihm LP, Schaier M, Schwenger V, et al. Effect of insulin and glucose infusion on myocardial infarction size in uraemic rats. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(5):571-9.
207. Hardin DS, Dominguez JH, Garvey WT. Muscle group-specific regulation of GLUT 4 glucose transporters in control, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 1993;42(10):1310-5.
208. Gaster M, Poulsen P, Handberg A, Schroder HD, Beck-Nielsen H. Direct evidence of fiber type-dependent GLUT-4 expression in human skeletal muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2000;278(5):E910-6.
209. Garvey WT, Maianu L, Hancock JA, Golichowski AM, Baron A. Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin-resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes*. 1992;41(4):465-75.
210. Charron MJ, Katz EB, Olson AL. GLUT4 gene regulation and manipulation. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(6):3253-6.
211. Im SS, Kwon SK, Kim TH, Kim HI, Ahn YH. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. *IUBMB Life*. 2007;59(3):134-45.
212. Christen T, Sheikine Y, Rocha VZ, Hurwitz S, Goldfine AB, Di Carli M, et al. Increased glucose uptake in visceral versus subcutaneous adipose tissue revealed by PET imaging. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2010;3(8):843-51.
213. Marette A, Mauriege P, Marcotte B, Atgie C, Bouchard C, Theriault G, et al. Regional variation in adipose tissue insulin action and GLUT4 glucose transporter expression in severely obese premenopausal women. *Diabetologia*. 1997;40(5):590-8.
214. Maunoury R, Robine S, Pringault E, Leonard N, Gaillard JA, Louvard D. Developmental regulation of villin gene expression in the epithelial cell lineages of mouse digestive and urogenital tracts. *Development*. 1992;115(3):717-28.
215. Kaufman JM, DiMeola HJ, Siegel NJ, Lytton B, Kashgarian M, Hayslett JP. Compensatory adaptation of structure and function following progressive renal ablation. *Kidney international*. 1974;6(1):10-7.
216. DeFronzo RA, Davidson JA, Del Prato S. The role of the kidneys in glucose homeostasis: a new path towards normalizing glycaemia. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(1):5-14.

217. Basile J. A new approach to glucose control in type 2 diabetes: the role of kidney sodium-glucose co-transporter 2 inhibition. *Postgraduate medicine*. 2011;123(4):38-45.
218. Gerich JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med*. 2010;27(2):136-42.
219. Marks J, Carvou NJ, Debnam ES, Srani SK, Unwin RJ. Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. *The Journal of physiology*. 2003;553(Pt 1):137-45.
220. Poudel RR. Renal glucose handling in diabetes and sodium glucose cotransporter 2 inhibition. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2013;17(4):588-93.
221. Hruska KA, Blondin J, Bass R, Santiago J, Thomas L, Altsheler P, et al. Effect of intact parathyroid hormone on hepatic glucose release in the dog. *J Clin Invest*. 1979;64(4):1016-23.
222. Moxley MA, Bell NH, Wagle SR, Allen DO, Ashmore J. Parathyroid hormone stimulation of glucose and urea production in isolated liver cells. *Am J Physiol*. 1974;227(5):1058-61.
223. Hems DA, Harmon CS, Whitton PD. Inhibition by parathyroid hormone of glycogen synthesis in the perfused rat liver. *FEBS letters*. 1975;58(1):167-9.
224. Bevilacqua S, Barrett E, Ferrannini E, Gusberg R, Stewart A, Richardson L, et al. Lack of effect of parathyroid hormone on hepatic glucose metabolism in the dog. *Metabolism: clinical and experimental*. 1981;30(5):469-75.
225. Mokuno T, Uchimura K, Hayashi R, Hayakawa N, Makino M, Nagata M, et al. Glucose transporter 2 concentrations in hyper- and hypothyroid rat livers. *The Journal of endocrinology*. 1999;160(2):285-9.
226. Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS. Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology*. 1994;135(2):649-54.
227. Kemp HF, Hundal HS, Taylor PM. Glucose transport correlates with GLUT2 abundance in rat liver during altered thyroid status. *Molecular and cellular endocrinology*. 1997;128(1-2):97-102.
228. Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, et al. GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American journal of pathology*. 2009;174(4):1544-52.
229. Nolte LA, Hansen PA, Chen MM, Schluter JM, Gulve EA, Holloszy JO. Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha does not affect insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Diabetes*. 1998;47(5):721-6.
230. Henriksen EJ, Holloszy JO. Effect of diffusion distance on measurement of rat skeletal muscle glucose transport in vitro. *Acta physiologica Scandinavica*. 1991;143(4):381-6.
231. Delp MD, Duan C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *Journal of applied physiology*. 1996;80(1):261-70.
232. Schmitz O, Alberti KG, Christensen NJ, Hasling C, Hjollund E, Beck-Nielsen H, et al. Aspects of glucose homeostasis in uremia as assessed by the hyperinsulinemic euglycemic clamp technique. *Metabolism: clinical and experimental*. 1985;34(5):465-73.
233. Stein PP, Hunt WA, Johnson CM, DeFronzo RA, Smith JD. Insulin resistance in uremia: an in vivo and in vitro study. *Metabolism: clinical and experimental*. 1989;38(6):562-7.

234. Kraus LM, Traxinger R, Kraus AP. Uremia and insulin resistance: N-carbamoyl-asparagine decreases insulin-sensitive glucose uptake in rat adipocytes. *Kidney Int.* 2004;65(3):881-7.
235. Hresko RC, Hruz PW. HIV protease inhibitors act as competitive inhibitors of the cytoplasmic glucose binding site of GLUTs with differing affinities for GLUT1 and GLUT4. *PLoS one.* 2011;6(9):e25237.
236. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *Aids.* 2002;16(6):859-63.
237. Siew ED, Ikizler TA. Insulin resistance and protein energy metabolism in patients with advanced chronic kidney disease. *Semin Dial.* 2010;23(4):378-82.
238. Simard E, Naud J, Michaud J, Leblond FA, Bonnardeaux A, Guillemette C, et al. Downregulation of hepatic acetylation of drugs in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(7):1352-9.
239. Chen SM, Young TK, Ho LT. Effects of parathyroid hormone infusion on glucose tolerance and glucose-stimulated insulin secretion in normal and uremic rats. *Diabetes research and clinical practice.* 1998;41(2):85-94.
240. Lu KC, Shieh SD, Lin SH, Chyr SH, Lin YF, Diang LK, et al. Hyperparathyroidism, glucose tolerance and platelet intracellular free calcium in chronic renal failure. *Q J Med.* 1994;87(6):359-65.
241. King PA, Horton ED, Hirshman MF, Horton ES. Insulin resistance in obese Zucker rat (fa/fa) skeletal muscle is associated with a failure of glucose transporter translocation. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1568-75.
242. Liu RH, Mizuta M, Kurose T, Matsukura S. Early events involved in the development of insulin resistance in Zucker fatty rat. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2002;26(3):318-26.
243. Cowart SL, Stachura ME. Glucosuria. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* 3rd ed. Boston 1990.
244. Stride A, Ellard S, Clark P, Shakespeare L, Salzmann M, Shepherd M, et al. Beta-cell dysfunction, insulin sensitivity, and glycosuria precede diabetes in hepatocyte nuclear factor-1alpha mutation carriers. *Diabetes Care.* 2005;28(7):1751-6.
245. Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care.* 1999;22 Suppl 2:B65-71.
246. Kachko I, Maissel A, Mazor L, Ben-Romano R, Watson RT, Hou JC, et al. Postreceptor adipocyte insulin resistance induced by nelfinavir is caused by insensitivity of PKB/Akt to phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *Endocrinology.* 2009;150(6):2618-26.
247. Wesson DE, Simoni J. Acid retention during kidney failure induces endothelin and aldosterone production which lead to progressive GFR decline, a situation ameliorated by alkali diet. *Kidney Int.* 2010;78(11):1128-35.
248. Gava AL, Freitas FP, Balarini CM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology.* 2012;4(3):167-73.
249. Salvetti A, Brogi G, Di Legge V, Bernini GP. The inter-relationship between insulin resistance and hypertension. *Drugs.* 1993;46 Suppl 2:149-59.

250. Vaziri ND, Bai Y, Ni Z, Quiroz Y, Pandian R, Rodriguez-Iturbe B. Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;323(1):85-93.
251. Csibi A, Communi D, Muller N, Bottari SP. Angiotensin II inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation and Akt activation through tyrosine nitration-dependent mechanisms. *PloS one*. 2010;5(4):e10070.
252. Collison M, James DJ, Graham D, Holman GD, Connell JM, Dominiczak AF, et al. Reduced insulin-stimulated GLUT4 bioavailability in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Diabetologia*. 2005;48(3):539-46.

