

Université de Montréal

**Réponse hépatique au glucagon à la suite d'un l'entraînement en endurance
chez des animaux sains et diabétiques**

par

Réjean DROUIN

Département de kinésiologie

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

Avril 2005

Réjean Drouin[©], 2005



GV

201

U54

2005

V.003

6

6

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**Réponse hépatique au glucagon à la suite d'un l'entraînement en endurance
chez des animaux sains et diabétiques**

présentée par

Réjean DROUIN

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Directeur..... François Péronnet
Co-directeur..... Carole Lavoie
Président rapporteur..... Yvan Girardin
Membre interne..... Jean-Marc Lavoie
Membre externe..... Pascal Imbeault
Représentant de la FES..... Marielle Ledoux

Thèse acceptée le: 1

SOMMAIRE

La présente thèse fait suite aux travaux accomplis lors de ma maîtrise où il avait été observé une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon chez des sujets entraînés en endurance (triathlètes) comparativement à des sujets sédentaires (Drouin et al. 1998). Cette augmentation de la sensibilité hépatique se traduisait par une augmentation de la PHG induite par le glucagon, au repos, chez les sujets entraînés en endurance comparativement à des sujets sédentaires. Cette thèse présente donc trois études chez le rat, qui poursuivent l'analyse de ce phénomène. De plus, sachant que chez les sujets diabétiques de type 1, la sensibilité du foie au glucagon est diminuée, nous voulions vérifier si un entraînement en endurance peut rétablir cette baisse de sensibilité chez l'animal diabétique traité à l'insuline, et si oui, la caractériser.

Dans deux des études de cette thèse, nous avons utilisé un système de perfusion du foie *in situ* afin d'évaluer l'effet de l'entraînement en endurance (nage : 3 heures/jour, 5 jours/semaine, 10 semaines) sur la production hépatique de glucose induite par le glucagon chez des rats sains et diabétiques (par injection de streptozotocine) traités à l'insuline (Iletin II NPH), à jeun et nourris. La première étude nous a permis d'établir que chez le rat sain, tout comme chez l'homme, l'entraînement en endurance augmente la réponse globale de la production hépatique de glucose sous stimulation au glucagon. De plus, cette étude indique que la glycogénolyse (rats nourris) ainsi que la néoglucogénèse (rats à jeun) sont impliqués

dans cette réponse accrue. Cependant, chez les rats diabétiques traités à l'insuline, les résultats de notre 2^{ième} étude permettent de conclure que l'entraînement en endurance régularise, sans l'augmenter, la réponse de la glycogénolyse, mais augmente la réponse de la néoglucogenèse sous stimulation au glucagon. De plus, contrairement à une étude antérieure (Légaré et al. 2001) où une augmentation du nombre de récepteurs au glucagon était observée à la suite d'un entraînement en endurance chez le rat, aucune modification des propriétés de liaison du récepteur au glucagon n'était observée chez les rats diabétiques à la suite d'un entraînement en endurance.

Selon la première étude présentée dans cette thèse, l'augmentation de la production hépatique de glucose sous stimulation est indépendante de la quantité de glycogène hépatique disponible malgré une plus grande participation de la glycogénolyse. Ceci suggère qu'il existe une composante indépendante de la quantité de glycogène dans l'augmentation du taux de la glycogénolyse sous stimulation au glucagon. Le concept de fraction (soluble et insoluble au traitement à l'acide) et de structure, basé sur le nombre de bouts non-réducteurs de la particule (Serafini et Alemany (1987)) de glycogène sont présentés dans cette dernière étude. En effet, les résultats de cette étude indiquent que l'entraînement en endurance modifie de façon opposée au diabète les fractions du glycogène hépatique (augmente la quantité de glycogène de la fraction résistante à l'acide), modifie la structure de la particule de glycogène mais n'a aucun effet supplémentaire, autre que le diabète, sur la structure du glycogène chez les animaux diabétiques.

Mots clés: ratio insuline:glucagon, entraînement en endurance, glycogénolyse, néoglucogenèse, diabète de type 1 , traitement à l'insuline, glycogène, foie.

SUMMARY

The studies presented in this thesis stem from those conducted during my M.Sc. program which showed that endurance training increases the liver sensitivity to glucagon: the increased glucagon-induced liver glucose production was larger in trained than in untrained subjects (Drouin et al. 1998). This PhD thesis includes three studies, which further investigate this phenomenon in healthy rats as well as in diabetic rats. The sensitivity of the liver to glucagon is decreased in type 1 diabetes. We hypothesized that endurance training could reestablish the liver sensitivity to glucagon in diabetic rats.

An *in situ* liver perfusion system was used in order to assess the effect of endurance training (swimming; 3 hours, 5 days/week for 10 weeks) on glucagon-induced liver glucose production in healthy rats as well as in insulin-treated diabetic rats (streptozotocin). The results indicate that, in healthy rats, endurance training increased the glucagon-induced liver glucose production, and that the response of both glycogenolysis (fed rats) as well as gluconeogenesis (fasted rats) to glucagon were increased. Furthermore, in insulin-treated diabetic rats, the results showed that endurance only increase the response of gluconeogenesis. In contrast to previous results from Légaré et al. 2001 showing that endurance training increased the density of glucagon receptor density in liver membranes from healthy rats, no significant effect of endurance training was observed on glucagon receptor density in liver of diabetic rats. Furthermore, we also investigate the effect of endurance training on the

fractions of liver glycogen stores (acid labile and acid resistant fractions) and on the fine structure of liver glycogen molecule based on the model suggested by Serafini and Alemany (1987) from the number of non-reducing end in the molecule. The results show that endurance training favour the more dynamic glycogen subfraction (acid resistant) in healthy animals but not in diabetic animals and modified fine structure (increased branching) in healthy animal, while having no supplementary effect, other than diabetes *per se*, in diabetic animals.

Key words: insulin to glucagon ratio, endurance training, glycogenolysis, gluconeogenesis, type 1 diabetes, insuline treatment, glycogen, liver

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	III
SUMMARY	VI
TABLE DES MATIÈRES.....	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGNETS ET ABRÉVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS.....	XV
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE	1
Introduction	2
Présentation de la revue de littérature	14
Entraînement en endurance et production hépatique de glucose induite par le glucagon.....	14
Diabète de type 1 et production hépatique de glucose induite par le glucagon ...	21
Le récepteur au glucagon	23
Le glycogène hépatique.....	35
La structure du glycogène hépatique.....	35
Les modèles conceptuels du glycogène	36
Le principe d'hétérogénéité du glycogène.....	39
L'optimisation de la molécule de glycogène	51
Le glycogène hépatique et l'entraînement en endurance.....	53
Le glycogène hépatique et le diabète de type 1	54
CHAPITRE 2: ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	72
Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats	73

Production hépatique de glucose induite par le glucagon chez des rats diabétiques traités à l'insuline et entraînés en endurance	99
Changes in liver glycogen subfractions and structure following endurance training in healthy and diabetic animals.....	136
CHAPITRE 3: DISCUSSION.....	166
CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	176
BIBLIOGRAPHIE	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Effet de l'entraînement en endurance sur la glucagonémie lors d'un exercice d'intensité modérée.	31
Tableau 2. Effet de l'entraînement en endurance sur l'insulinémie lors d'un exercice d'intensité modérée.	32
Tableau 3. Effet de l'entraînement en endurance sur la glycémie lors d'un exercice d'intensité modérée.	33
Tableau 4. Effet des différents régulateurs identifiés sur les récepteurs du glucagon	34
Tableau 5. Variation de la densité de la particule de glycogène et le nombre total d'unités glucose disponibles (Gpt) sans débranchement, avec un degré de branchement ($r=2$) et le nombre de tiers (t) de la particule.	62
Tableau 6. Proportion relative de glycogène (animaux nourris = 100%) selon la grosseur de la molécule.....	63
Tableau 7. Distribution tissulaire des composantes du système de synthèse du glycogène.	64
Tableau 8. Contenu relatif en glycogène soluble et insoluble au traitement à l'acide lors de la resynthèse de glycogène, à la suite d'une dégradation causée par l'exercice, sous condition de diète à contenu élevé et faible en glucides.....	65
Tableau 9. Catabolisme des fractions de glycogène résistantes (R) et solubles (S) au traitement à l'acide dans le muscle squelettique chez l'homme.....	66

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Le glucagon et ses acides aminés.	8
Figure 2. Le récepteur du glucagon et ses 7 domaines transmembranaires.	9
Figure 3. Sommaire des mécanismes d'action du glucagon dans l'augmentation de la PHG.	10
Figure 4. Augmentation de la glycémie au repos sous stimulation au glucagon chez des sujets entraînés et sédentaires. Tirée de Drouin et al. 1998.	11
Figure 5. Augmentation de la production hépatique de glucose au repos sous stimulation au glucagon chez des sujets entraînés et sédentaires. Tirée de Drouin et al. 1998.	12
Figure 6. Augmentation de la production hépatique de glucose sous stimulation au glucagon chez des sujets sains et diabétiques traités à l'insuline. Tirée de Orskov et al. 199 e 1.	13
Figure 7. Granule de glycogène.	56
Figure 8. Rosette de glycogène avec particules α , β et γ	57
Figure 9. Modèle théorique de l'association de la granule de glycogène (ou glycosome) et des enzymes associées à son métabolisme.	58
Figure 10. Liens α -1-4 et α -1-6 de la particule de glycogène.	59
Figure 11. Molécule de glycogène selon le modèle élaboré par Whelan.	60
Figure 12. Formation du macroglycogène via le proglycogène.	61

Figure 13a. Particule de 20-30 nm dans le cytosol.....	67
Figure 13b. Particules- β du glycogène.....	68
Figure 14a. Identification du glycosome.....	69
Figure 14b. Identification du glycosome.	70
Figure 15. Identification des desmoglycosomes.....	71

LISTE DES SIGNETS ET ABRÉVIATIONS

^3H -glucose : glucose marqué au tritium sur les 6 carbones

%B: pourcentage de branchement

AMP: adénosine monophosphate

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

ATP: adénosine tri-phosphate

C¹⁴: carbone 14

C_A: nombre de chaînes

Ca²⁺: calcium

D-[6,6²H]-glucose: glucose marqué au deutérium sur les carbones en position 6

Db1 : diabète de type 1

Db2 : diabète de type 2

G-1-P: glucose-1-phosphate

G-6-P: glucose-6-phosphate

G-6-Pase: glucose-6-phosphatase

gc: unité glucose par chaîne

Gphase a: glycogène phosphorylase a

Gphase b: glycogène phosphorylase b

G_{PT}: nombre d'unités glucose directement disponible à la glycogène phosphorylase

G_T: nombre total d'unités glucose

IMP: inosine mono phosphate

IP₃: inositol triphosphate

K_m: constante d'affinité

M: nombre d'unités glucose total dans la particule de glycogène

ME: microscope électronique

Mg²⁺: manganèse

Mn²⁺: magnésium

N: nombre de liens 1-6 dans le tier externe

PA-TSC-SP: periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate

PHG : production hépatique de glucose

Pi: phosphate inorganique

PIP₂: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

r: degré de branchement

R: rayon

Rgn: nombre de bouts non-réducteurs

SRIF: somatostatine

t: nombre de tiers

TCA: tricarboxylic acid cycle

U/Pb: ratio isotopique uranium/plomb

UDPG: uridine diphosphate glucose

UDP-glucose: uridine diphosphate glucose

UTP: uridine triphosphate

VO₂max: consommation maximale d'oxygène

Vs: volume

REMERCIEMENTS

Je désire exprimer ma plus grande gratitude envers Carole Lavoie qui depuis des années a guidé mes travaux et m'a partagé sa passion de la science et de la vie en générale. Merci pour les sacrifices, le dévouement et pour la confiance.

Je remercie également François Péronnet pour son apport judicieux, sa disponibilité et son dévouement tout au long de ce projet.

Un merci tout particulier à Martin Milot pour ses nombreux sacrifices, sa passion et son amitié. Je remercie également tous ceux qui de près ou de loin ont participé à ces travaux; Rollande Caron, Annie Légaré, Valérie Beaulieu, Geneviève Landry, Geneviève Picard et Mélanie Genest. Merci également à Marie Kougioumoustakis pour son apport. Merci pour votre travail mais surtout pour votre support et amitié.

J'aimerais également exprimer toute ma reconnaissance aux Drs François Parent et Jacinthe Larouche pour leur écoute, leur dévotion et leur professionnalisme. Sans eux, cette belle aventure aurait été impossible.

Merci à ma famille et amis pour leur encouragement et leur présence. Merci de m'être resté fidèle malgré mes longues périodes d'absences.

Finalement, je tiens à remercier Geneviève pour son dévouement, ses encouragements et sa présence tout au long de mon cheminement professionnel et personnel. Merci d'être mon rayon de soleil quotidien.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE

Introduction

Le glucagon est un peptide de 29 acides aminés (Figure 1) dérivant du proglucagon qui s'exprime dans plusieurs tissus tels le cerveau, le pancréas et les intestins. Le glucagon agit via un récepteur spécifique de 485 acides aminés (Figure 2). Des récepteurs au glucagon se retrouvent aux niveaux du foie, du cerveau, du pancréas, des reins et du tissu adipeux (Burcelin et al. 1996, Christophe 1996). Le glucagon est relâché d'une façon pulsative dans la circulation, par les cellules alpha du pancréas, lorsque la glycémie est faible (Opara et al. 1988). La fonction première du glucagon est donc de stimuler la production hépatique de glucose (PHG) et ainsi augmenter la glycémie via la stimulation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse et l'inhibition de la glycolyse (Figure 3) (Jiang & Zhag 2003). Il est bien connu aujourd'hui, *in vivo* et *in vitro*, que le glucagon stimule directement la PHG via l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse dans la stimulation de foie intact (Beuer & Jungermann 1990, Doi et al. 2001, Ikeda et al. 1989) et dans les cultures d'hépatocytes (Marks & Botelho 1986, Weigle & Goodner 1986, Weigle et al. 1984). Le glucagon est donc l'hormone majeure de contre-régulation travaillant contre l'action de l'insuline dans le maintien de la glycémie. En effet, l'administration exogène de glucagon augmente la concentration de glucose dans le sang chez l'animal (Myers et al. 1991, Young et al. 1993) et l'homme (Freychet et al. 1988, Hvidberg et al. 1994, Lins et al. 1983) nourris et à jeun. De plus, en accord avec son rôle

d'hormone de contre-régulation, le glucagon augmente la concentration de glucose sanguin en réponse à une hypoglycémie induite par l'insuline (Freychet et al. 1988). En fait, le glucagon est utilisé cliniquement pour traiter les hypoglycémies chez l'homme (Carstens & Andersen 1994, Freychet et al. 1988, Haymond & Schreiner 2001).

Aujourd'hui, le mode d'action du glucagon est très bien connu (Jiang & Zhang 2003) et il serait superflu ici de le décrire. Cependant, lors de ma maîtrise sous la supervision de Jean-Louis Chiasson (Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Montréal) et Carole Lavoie (Université du Québec à Trois-Rivières), nous avons développé une nouvelle plate-forme de recherche concernant le glucagon dont proviennent les travaux de la présente thèse.

Les expérimentations effectuées lors de ma maîtrise ont permis de conclure que l'entraînement en endurance augmente au repos la sensibilité du foie au glucagon chez l'homme sain (Drouin et al. 1998). Plus spécifiquement, nous avons montré que l'infusion de glucagon au repos résulte en une plus grande augmentation de la PHG chez des sujets entraînés en endurance comparativement aux sujets sédentaires. Dans cette étude, nous avons mesuré l'effet du glucagon sur la PHG en utilisant le D-[6,6²H]-glucose chez des sujets entraînés (triathlètes; VO_{2max} de $65,9 \pm 1,6$ ml $O_2 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$; n=8) et sédentaires (VO_{2max} de $46,8 \pm 0,6$ ml $O_2 \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$; n=8). Les sécrétions endogènes d'insuline et de glucagon étaient supprimées par l'infusion de somatostatine (SRIF). La SRIF (450 ug/h) et l'insuline ($0,15$ mU $\cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$) étaient infusées de façon continue durant la période d'étude de 4 heures. Durant les

deux premières heures de l'étude, la glycémie était maintenue à 5 mmol/l par une infusion de glucose à débit variable. Pendant les deux dernières heures, l'infusion de glucose était maintenue à débit fixe et le glucagon infusé à $1,5 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Durant cette période de l'étude, la glucagonémie et l'insulinémie étaient constantes à 138 ± 3 versus $145 \pm 2 \text{ ng/l}$ et à 95 ± 4 versus $96 \pm 1 \text{ pmol/l}$ chez les sujets entraînés et non-entraînés, respectivement. Sous la stimulation du glucagon, la glycémie (Figure 4) augmentait à $11,4 \pm 1,1 \text{ mmol/l}$ chez les sujets entraînés, comparativement à $8,9 \pm 0,8 \text{ mmol/l}$ chez les sujets sédentaires ($P < 0,05$). Parallèlement, la PHG (Figure 5) durant la première heure d'infusion du glucagon augmentait de $15,6 \pm 2,8 \text{ umol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets entraînés, comparativement à $7,1 \pm 1,7 \text{ umol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets sédentaires ($P < 0,05$). Durant la deuxième heure, une plus faible augmentation de la PHG était observée soit $7,0 \pm 2,7 \text{ umol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ et $4,9 \pm 1,4 \text{ umol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ chez les sujets entraînés et sédentaires, respectivement. En conclusion, ces observations indiquent que l'entraînement en endurance est associé à une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon chez l'homme sain. Cette étude était donc la première à montrer directement une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon à la suite d'un l'entraînement en endurance.

Lors de la publication de notre étude mère (Drouin et al. 1998), les mécanismes d'action responsables de l'augmentation de la sensibilité du foie au glucagon étaient inconnus. Entre autres, on ne pouvait, par la technique utilisée à l'époque, déterminer la proportion de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse dans cette PHG accrue, induite par le glucagon, chez les sujets entraînés. Cependant,

parmi les mécanismes proposés, la modulation des propriétés de liaison du récepteur au glucagon et l'augmentation de la quantité de glycogène hépatique étaient envisagés comme des éléments pouvant être modifiés par l'entraînement en endurance et responsables des changements de la réponse de la PHG sous stimulation au glucagon.

Aujourd'hui, on retrouve quelques études traitant de la modulation de la sensibilité du foie au glucagon dans différentes situations physiologiques *in vivo*. Par exemple : 1) une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon est notée à la suite d'un entraînement en endurance chez l'homme (Drouin et al. 1998), chez le rat (Podolin et al. 2001, Légaré et al. 2001), 2) à la suite d'un exercice aigu (Bonjron et al. 2002), 3) à la suite de l'infusion d'insuline Lispro chez des sujets Db1 (Launay et al. 1998) et chez des sujets Db2 (Nielsen et al. 1997) ou 4) à la suite d'un traitement aux corticostéroïdes (Dirlewanger et al. 2000). Au contraire, Orskov et al. (1991) ont montré que lorsque la PHG est stimulée avec une combinaison d'insuline ($0,15 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) et de glucagon ($1,5 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), les sujets diabétiques traités à l'insuline possèdent une diminution de la sensibilité du foie au glucagon, c'est-à-dire, une diminution de la PHG sous stimulation au glucagon. De plus, lorsque mesurée avec du ^3H -glucose, cette réponse était irrégulière dans le temps. En effet, la PHG (Figure 6) sous stimulation au glucagon augmentait lentement de $2,1 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ durant la première heure de l'infusion au glucagon pour se stabiliser à $2,4 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ tandis que chez les sujets non-diabétiques, la PHG augmentait

rapidement pour atteindre $3,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ pour les deux premières heures et par la suite revenir dans la troisième heure de stimulation à $2,9 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Les résultats obtenus dans les différentes études (Drouin et al. 1998, Podolin et al. 2001, Bonjron et al. 2002, Launay et al. 1998, Nielsen et al. 1997, Dirlewanger et al. 2000, Orskov et al. 1991, Légaré et al. 2001) indiquent bien que la sensibilité du foie peut être modulée sous différentes situations physiologiques et cette modulation résulte en d'importantes modifications de la capacité du foie à produire du glucose sur demande. De plus, certaines situations physiologiques entraînent des effets opposés. Par exemple, comme mentionné précédemment, l'entraînement en endurance est en mesure d'augmenter la sensibilité du foie au glucagon (Drouin et al. 1998), tandis qu'à l'inverse, cette même sensibilité est diminuée chez des sujets diabétiques traités à l'insuline (Orskov et al. 1991) rendant les sujets diabétiques plus susceptibles et vulnérables aux épisodes hypoglycémiques. La question devient alors inévitable : est-ce que l'entraînement en endurance pourrait corriger la sensibilité du foie au glucagon chez des sujets diabétiques insulino-traités ?

Les objectifs des travaux associés à cette thèse étaient donc : 1) de caractériser, à l'aide d'un modèle *in situ* de perfusion de foie, les mécanismes responsables de l'augmentation de la sensibilité du foie au glucagon avec l'entraînement chez l'animal sain, 2) de déterminer si l'entraînement en endurance augmente la sensibilité du foie au glucagon, toujours avec l'utilisation d'un modèle *in situ* de perfusion de foie, chez des animaux diabétiques traités à l'insuline et 3)

suggérer des mécanismes d'action possibles, expliquant cette augmentation accrue de la PHG, s'il y a lieu, sous stimulation au glucagon chez des animaux sains et diabétiques.

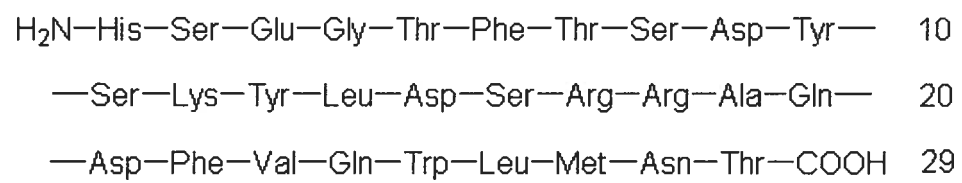


Figure 1. Le glucagon et ses acides aminés.

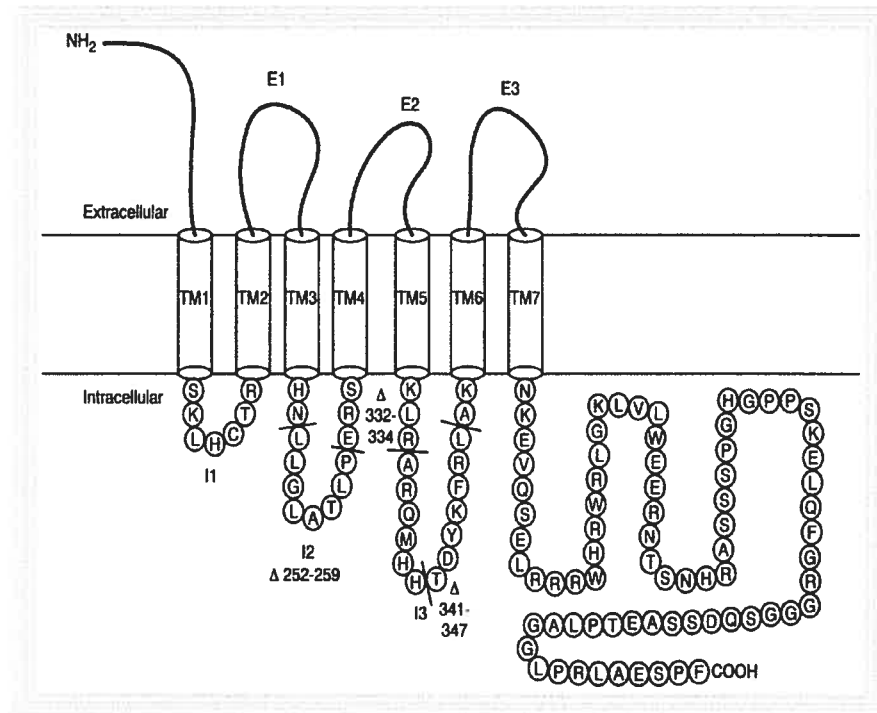


Figure 2. Le récepteur du glucagon et ses 7 domaines transmembranaires.

Tirée de The Rockefeller University, Laboratory of Molecular Biology and Biochemistry.

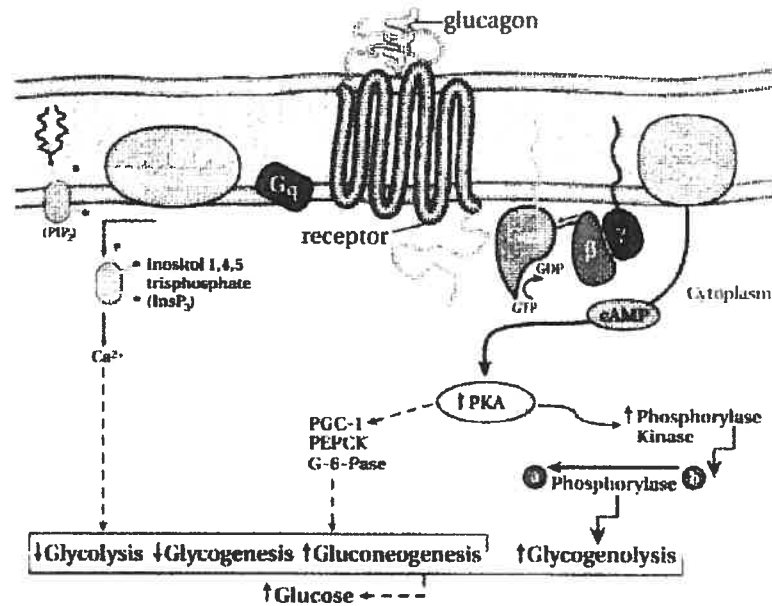


Figure 3. Sommaire des mécanismes d'action du glucagon dans l'augmentation de la PHG.

Le glucagon active la dégradation du glycogène via une voie AMPc-dépendante et une voie AMPc-indépendante (via l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+}). Tirée de Jiang & Zhag 2003.

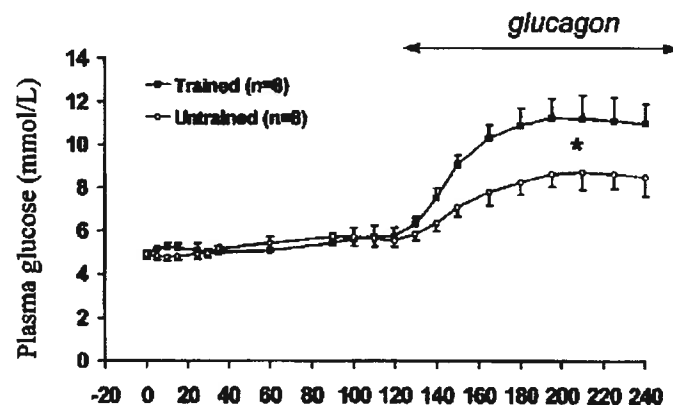


Figure 4. Augmentation de la glycémie au repos sous stimulation au glucagon chez des sujets entraînés et sédentaires. Tirée de Drouin et al. 1998.

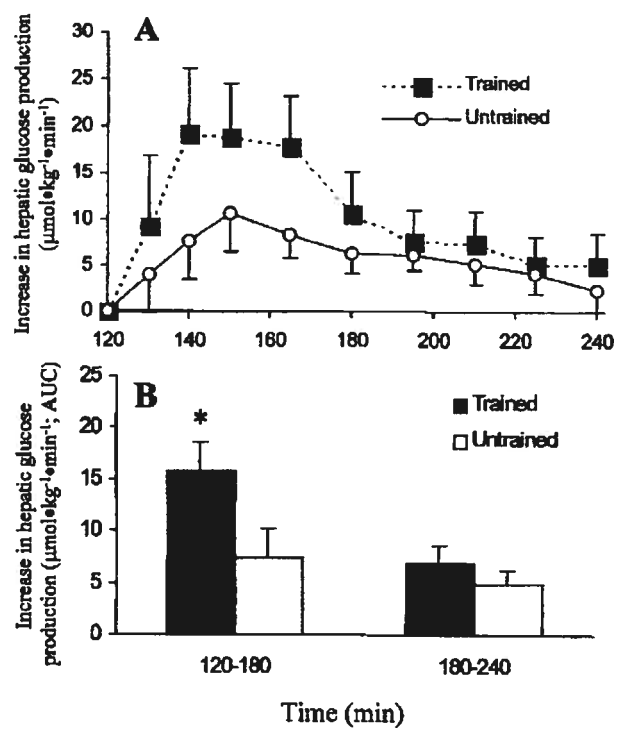


Figure 5. Augmentation de la production hépatique de glucose au repos sous stimulation au glucagon chez des sujets entraînés et sédentaires. Tirée de Drouin et al.

1998.

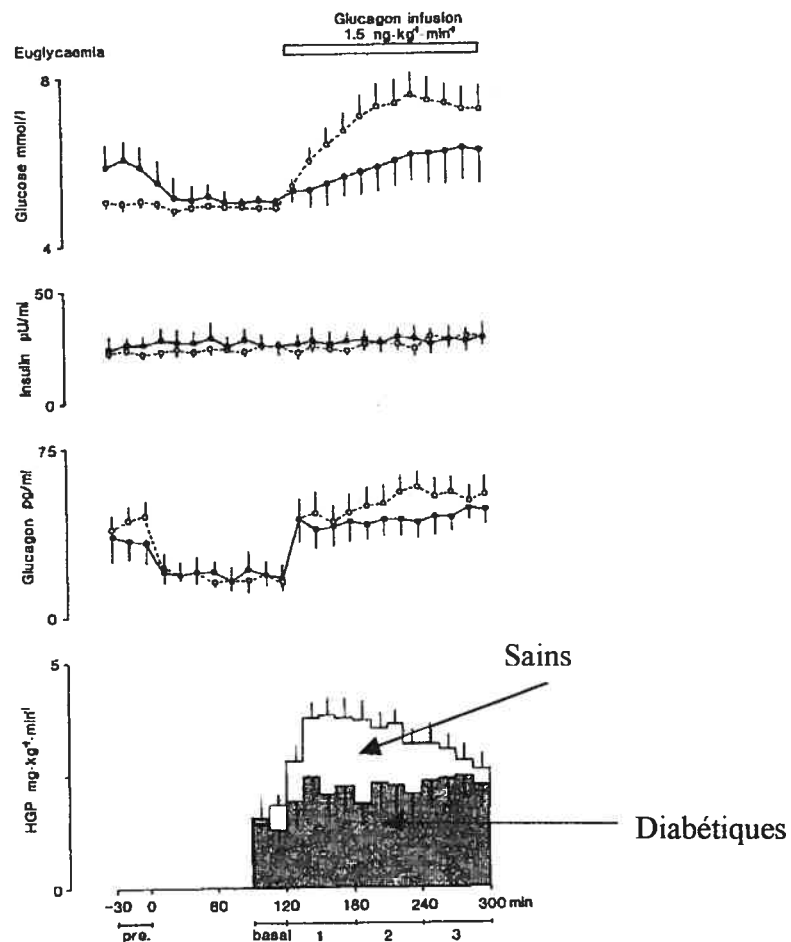


Figure 6. Augmentation de la production hépatique de glucose sous stimulation au glucagon chez des sujets sains et diabétiques traités à l'insuline. Tirée de Orskov et al. 1991.

Présentation de la revue de littérature

La revue de littérature se divise en deux grandes sections. La première section est consacrée à l'effet spécifique de l'entraînement en endurance sur la PHG via le glucagon dans une population saine et diabétique. Les différents mécanismes d'action de la stimulation de la PHG via le glucagon étant bien connus et ayant été largement décrits dans mon mémoire (Drouin 1997) et dans un récent article (Jiang & Zhag 2003), ils ne seront pas revus dans cette section. L'accent ne sera donc mis que sur les modifications qu'apporte spécifiquement l'entraînement en endurance et le Db1 sur la PHG induite par le glucagon ainsi que sur les propriétés de liaison du récepteur au glucagon. La deuxième section est consacrée à l'un des mécanismes susceptibles d'augmenter la disponibilité du glycogène à la suite de l'entraînement en endurance, soit la structure et différents paramètres de l'hétérogénéité du glycogène hépatique. Pour bien comprendre la problématique, un bref retour historique de la découverte du glycogène est fait et les différents concepts aujourd'hui reconnus entourant le glycogène sont exposés et critiqués.

Entraînement en endurance et production hépatique de glucose induite par le glucagon

Dans l'ensemble, l'entraînement en endurance induit une diminution du taux de renouvellement du glucose circulant à l'exercice (Bergman et al. 2000, Bergman et al. 1999, Coggan et al. 1995, Coggan et al. 1990) et la demande périphérique est amoindrie (Bergman et al. 2000, Bergman et al. 1999, Coggan et al. 1995, Coggan et al. 1990, Mendehhall et al. 1994). Un des principaux mécanismes proposés pour expliquer la baisse de la PHG induite par l'entraînement lors d'un exercice est l'atténuation de la réponse hormonale.

L'activité physique d'intensité modérée est associée à une augmentation de la concentration sanguine de glucagon (Böttger et al. 1972, Galbo et al. 1976, Bell et al. 1984, Bergman et al. 1999, Lavoie et al. 1997a et b). Cette augmentation permet de stimuler la PHG de façon parallèle à l'utilisation périphérique de glucose et ainsi maintenir la glycémie relativement stable lors d'une activité physique d'intensité modérée (Felig et al. 1975, Felig et al. 1979, Wasserman et al. 1991). Suite à un entraînement en endurance, il est aujourd'hui bien connu, que les variations hormonales provoquées par l'exercice sont amoindries (Coggan et al. 1997, Coggan & William 1997). Par exemple, pour une intensité donnée d'activité physique, la chute insulinémique est moindre (Bergman et al. 1999, Hartley et al. 1972, Gyntelberg et al. 1977, Winder et al. 1979, Koivisto et al. 1982, Coggan et al. 1990, Coggan et al. 1995, Mendehhall et al. 1994) et inversement, l'augmentation de la concentration plasmatique de glucagon est diminuée (Bergman et al. 1999, Bloom et al. 1976, Gyntelberg et al. 1977, Winder et al. 1979, Koivisto et al. 1982, Coggan et al. 1990, Coggan et al. 1995, Mendehhall et al. 1994). Et de ce fait, le rapport

insuline/glucagon qui est un régulateur important de la PHG, est plus élevé chez des sujets entraînés (Bergman et al. 1999).

Le Tableau 1 retrace les différentes études répertoriées sur l'effet de l'entraînement en endurance sur la concentration plasmatique de glucagon lors de l'activité physique.

Dans l'étude de Bloom et al. (1976), une différence significative est observée au niveau de la concentration plasmatique de glucagon à l'exercice chez des sujets sédentaires et entraînés. Bloom et al. (1976) notent une diminution de la glucagonémie suite à l'initiation de l'activité physique. L'activité choisie est réalisée à 60% du $VO_2\text{max}$, la baisse de la glucagonémie était de 14% chez des sujets non-entraînés comparativement à 35% chez des sujets entraînés. Ceci montre donc néanmoins, que les sujets entraînés à l'exercice possèdent une plus faible concentration plasmatique de glucagon. Les études de Koivisto et al. (1982), Mendenhall et al. (1994) et Coggan et al. (1990) démontrent des résultats du même ordre. Dans les premières 60 minutes de l'activité physique d'intensité modérée, la glucagonémie demeure relativement constante, tandis que lors de la deuxième heure, elle augmente d'environ 25% chez des sujets non-entraînés et d'environ 8% chez des sujets entraînés. Ces résultats confirment que lors d'une activité physique de même intensité relative (Winder et al. 1979), les sujets entraînés ont une augmentation moindre de la glucagonémie que les sujets non-entraînés. De plus, ces études montrent également une plus faible diminution de l'insulinémie lors de l'activité physique (Tableau 2) chez des sujets entraînés. En effet, lors d'une activité physique

d'intensité modérée (120 minutes), une chute moyenne de l'insulinémie d'environ 60% était observée chez les sujets non-entraînés comparativement à environ 43% chez les sujets entraînés, soit une différence approximative de 23%. Donc, si les sujets entraînés lors d'une activité physique ont une plus faible diminution de l'insulinémie et une plus faible augmentation de la glucagonémie, cela amène donc une augmentation du rapport insuline/glucagon. Ceci est clairement démontré dans l'étude de Bergman et al. (1999) où le ratio insuline/glucagon diminue d'environ 50% chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires. Théoriquement, cet environnement hormonal favorise une plus faible augmentation de la PHG avec possibilité de baisse de la glycémie. Toutefois, ce n'est pas le cas. En effet, l'ensemble de ces études démontre une stabilité glycémique supérieure chez les sujets entraînés (Tableau 3). Par exemple, Koivisto et al. (1982) dénotent une chute de la glycémie 60% inférieure chez les sujets entraînés comparativement aux sujets non-entraînés. Également, après 12 semaines d'entraînement, Mendenhall et al (1994) observent une chute glycémique de 3% comparativement à 16% à 120 minutes chez les sujets entraînés et non-entraînés, respectivement.

Une question se pose donc : Comment expliquer le maintien de l'homéostasie du glucose en présence d'une moins grande augmentation de la glucagonémie face à une plus faible diminution de la concentration plasmatique d'insuline lors d'une activité physique chez des sujets entraînés en endurance ?

Il est reconnu depuis longtemps que l'entraînement en endurance diminue l'utilisation du glucose lors d'un exercice sous-maximal (Bergman et al. 2000, Bergman et al. 1999, Coggan et al. 1999, Coggan et al. 1995, Coggan et al. 1990,

Mendehhall et al. 1994). Cette diminution est reliée à une réduction de la dépendance des tissus périphériques au glucose (Bergman et al. 2000, Bergman et al. 1999, Coggan et al. 1999, Coggan et al. 1995, Coggan et al. 1990, Mendehhall et al. 1994) parallèlement à une augmentation de l'utilisation des lipides (Henriksson 1977, Hultman 1995, Kiens et al. 1993, Montain et al. 1991, Wolfe et al. 1990). De plus, l'entraînement en endurance diminue la PHG à l'exercice (réduction de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse). Ceci est probablement dû à l'altération hormonale, c'est-à-dire, une moins grande augmentation de la glucagonémie parallèlement à une plus faible chute de l'insuline chez les sujets entraînés à l'exercice. Le groupe de Coggan a donc suggéré qu'une modification de la sensibilité hépatique aux hormones glucorégulatrices en réponse à l'entraînement pourrait en partie expliquer la diminution de l'apparition de glucose chez des sujets entraînés (Coggan et al. 1997, Coggan et al. 1995, Mendehhall et al. 1994). Cependant, pour que cette hypothèse soit valide, l'entraînement devrait théoriquement induire une augmentation de la sensibilité du foie à l'insuline et une diminution de la sensibilité au glucagon. Il existe une littérature abondante (Dela et al. 1999, Kemppainen et al. 2003, Henriksen et al. 2002, Becker-Zimmermann et al. 1982, Berger et al. 1979, 1982, Cortez et al. 1991, Hevener et al. 2000, Saengsirisuwan et al. 2002, Steen et al. 1999) qui montre que l'entraînement améliore la tolérance au glucose en conséquence d'une augmentation de la sensibilité périphérique à l'insuline. Ce qui va dans le sens contraire des propos de l'équipe de Coggan qui suggèrait une diminution de la sensibilité à l'insuline. Au niveau hépatique, il y a deux études concernant la sensibilité du foie à l'insuline (Mondon et al. 1980, Bonen et al. 1986). Chez des

animaux entraînés, en utilisant une technique de perfusion de foie, Mondon et al. (1980) ont observé une diminution de la sensibilité du foie à l'insuline mesurée par une diminution de 50% de la captation hépatique de glucose au repos. Cependant, Bonen et al (1986), n'ont observé aucune modification de la liaison de l'insuline des cellules hépatiques suivant 6 semaines d'entraînement chez le rat.

En ce qui concerne la sensibilité du foie au glucagon, nous nous sommes intéressés à ce sujet il y a déjà quelques années (Drouin et al. 1998). Comme mentionné précédemment, nous avons observé que l'entraînement en endurance provoque une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon et non une diminution comme semblait le suggérer l'équipe de Coggan. De plus, une étude de Bonjorn et al. (2002), a suggéré une augmentation de la sensibilité du foie au glucagon à l'exercice aigu. Cependant, l'interprétation de leurs résultats est limitée à la situation d'hyperglucagonémie. Il est possible que l'utilisation d'une concentration physiologique de glucagon aurait permis de conclure différemment.

Comme mentionné auparavant, le glucagon peut augmenter la PHG via l'activation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse. Il existe certaines données permettant de croire à une plus grande participation de la glycogénolyse de la PHG accrue sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. Certaines études indiquent que l'entraînement en endurance augmente l'activité de la glycogène phosphorylase musculaire (Saitoh et al. 1992, James et al. 1984). Cependant, certains ont montré le contraire (van Breda et al. 1993, Campbell et al. 1989). Au niveau du foie, les données sont moins abondantes. Selon Galbo et al. (1979), l'entraînement en endurance ou l'exercice chronique augmente l'activité de la

glycogène synthétase et diminue l'activité de la glycogène phosphorylase. Ce qui va à l'encontre d'une disponibilité accrue au glycogène en cas de besoin mais explique en partie la tolérance accrue au glucose à la suite de l'entraînement en endurance (Galbo et al. 1979) ou l'effet protecteur de l'entraînement en endurance sur les réserves de glycogène hépatique (Bladwin et al. 1975). Cependant, aucune de ces études ne démontre ce qui se passe au niveau de l'activité de la glycogène synthétase et la glycogène phosphorylase dans le cas où le foie est stimulé au glucagon. Des résultats qui nous permettent de croire que la réponse glycogénolytique peut être augmentée à la suite d'un entraînement en endurance proviennent de l'étude que nous avons effectuée chez des sujets entraînés en endurance (Drouin et al. 1998). En effet, sous stimulation au glucagon, la réponse initiale (Figures 4 et 5) était très rapide et suggérait ainsi la participation de la dégradation du glycogène à l'augmentation de la PHG.

En ce qui concerne la néoglucogenèse, il est bien connu que l'entraînement en endurance augmente la participation de celle-ci au maintien de la glycémie lors d'un exercice d'intensité modérée (Burelle et al. 2001, Turcotte & Brooks 1990, Donovan & Sumida 1990) et au repos (Bergman et al. 2000). Cependant, ces études étaient effectuées en absence de stimulation hormonale. L'effet moyen du glucagon sur la néoglucogenèse est paradoxal, considérant que le glucagon est connu pour moduler la transcription et l'activation des enzymes hépatiques de la néoglucogenèse telle la phosphoénolpyruvate carboxylase, la pyruvate kinase, la glucokinase et la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (Exton 1987, Kraus-Friedman & Feng 1996, Pilkis et al. 1988, Pilkis & Granner 1992). Ce paradoxe peut être

expliqué par le fait que le glucagon a peu à faire avec la mobilisation des substrats de la néoglucogenèse à partir des muscles et des lipides. Certaines informations sont cependant disponibles en ce qui concerne les mécanismes par lesquels l'entraînement affecte la régulation hormonale de la néoglucogenèse. Entre autre, Podolin et al. (1994), ont montré, par l'utilisation de tranches de foie incubées, que l'entraînement en endurance augmentait la sensibilité hépatique à la noradrénaline et au glucagon. Plus récemment, des données préliminaires de Cheeks et al. (1996), suggèrent que suite à l'entraînement en endurance, la néoglucogenèse était augmentée de 3,5 fois à la suite d'un entraînement en endurance. Toutefois, dans cette étude une quantité appréciable d'adrénaline (2,0 nmol/l) et de noradrénaline (3,0 nmol/l) était également ajoutée au glucagon pour stimuler la PHG.

Diabète de type 1 et production hépatique de glucose induite par le glucagon

Les sujets Db1 sous mauvais contrôle présentent une diminution de la quantité de glycogène hépatique (Hwang 1995, Bischof 2001) ce qui pourrait diminuer la réponse de la PHG face à une période d'hypoglycémie. De plus, une modification de l'expression de la glycogène phosphorylase et synthétase se retrouvent chez les sujets ou animaux avec Db1 ou dans le Db1 (Chan et al. 1975). Cependant, le contenu en glycogène (Bischof 2001), ainsi que la glycogène phosphatase et synthétase (Rao 1995, Krammer 1999) peuvent être restaurés avec un traitement optimal à l'insuline. L'effet aigu de l'insuline s'exerce par la diminution de l'activité de la protéine kinase

A avec ou sans changement du niveau d'AMPc (Siddle et al. 1973, Gabbay & Lardy 1984), une diminution de la glycogène kinase-3 (Cross 1994), et de la protéine kinase C (Pugazhenthii et al. 1990), et une activation de la protéine phosphatase-1 (Ortmeyer 1998). Tous ces changements résultent en une augmentation de l'activité de la glycogène synthétase parallèlement à une diminution de l'activité de la forme active de la glycogène phosphorylase. Les effets nets du traitement chronique à l'insuline sont comparables aux effets aigus sur les activités de la glycogène synthétase et phosphorylase. Cependant, l'insuline peut également entraîner une diminution de l'activité totale de la phosphorylase (Khandelwal et al. 1977, Bahnak & Gold 1982, Roesler & Kandelwal 1987, Lavoie L & Van de werve 1991, Pugazhenthii & Kandelwal 1990). La diminution de l'activité totale de la phosphorylase est principalement due à la diminution du niveau protéique de l'enzyme (Roesler & Kandelwal 1987, Rulfs et al. 1989), et probablement à la diminution de sa synthèse (Rulfs et al. 1989) ou à l'instabilité de son ARNm (Rao et al. 1995).

Le traitement à l'insuline ne semble pas tout régler. En effet, l'hyperinsulinémie relative ou absolue est la cause initiale de l'hypoglycémie chez les sujets diabétiques traités à l'insuline. De plus, depuis les recommandations du *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT 1993), les périodes hypoglycémiques augmentent en fréquence parallèlement à la popularité grandissante du traitement plus intensif à l'insuline (DCCT 1993, Bolli 1999, Cryer 1999, 2000, 2003). Parmi les facteurs importants de contre-régulation lors d'une période d'hypoglycémie, se retrouve la sécrétion du glucagon (Cryer 1982, 2000, Gerich 1980) et d'épinéphrine (Shamoon 1981, Rizza 1980, Saccà 1980) qui stimulent la

PHG. Malgré qu'une déficience au niveau de la sécrétion de glucagon et d'épinéphrine existe chez les sujets Db1 (Cryer 1985,1986), la déficience de la réponse contre-régulatrice est principalement reliée à la déficience du glucagon à stimuler la PHG (Bolli 1990, Cryer 2003). La capacité du glucagon à augmenter la PHG est bien caractérisée autant chez le rat (Wan 2000), le chien (Dobbins 1991, Lussier 1986) que chez l'homme (Gerich 1988). Cependant, Orskov et al. (1991), ont montré que lorsque stimulés au glucagon, les sujets diabétiques traités à l'insuline ont une PHG anormale i.e. diminuée et irrégulière. Ces résultats pourraient en partie expliquer la prédisposition aux hypoglycémies rapportée par plusieurs (DCCT 1993, Bolli 1999, Cryer 1999, 2000, 2003).

Cependant, qu'en est-il de l'entraînement en endurance ? Nous savons que l'entraînement en endurance possède plusieurs effets positifs sur la régulation glycémique chez les sujets diabétiques traités à l'insuline (Fisher et al. 1997, Mosher et al. 1998, Landt et al. 1985, Stratton et al. 1987). Sachant, que l'entraînement en endurance augmente la sensibilité du foie au glucagon chez des sujets sains, est-ce que ce même type d'entraînement pourrait, chez des sujets diabétiques traités à l'insuline, avoir le même effet, et ainsi pour une plus faible concentration plasmatique de glucagon avoir un effet accru ? et ainsi augmenter le pouvoir de protection contre les hypoglycémies ?

Le récepteur au glucagon

Pour initier son action, le glucagon se lie à son récepteur membranaire spécifique. Le récepteur du glucagon est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Christophe 1995, Jelinek et al. 1993). Cette famille compte plus de 1000 récepteurs différents dont le premier fut cloné il y a à peine une décennie (Kolakowski 1994). Une structure comprenant sept domaines transmembranaires et une capacité à recruter et réguler l'activité intracellulaire des protéines G hétérotrimériques sont les caractéristiques communes des récepteurs associés à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Nakamura et Redbell 1991). Le récepteur du glucagon consiste en une protéine intégrale de la membrane plasmique d'un poids moléculaire d'environ 55 kDa. La chaîne d'acides aminés du récepteur au glucagon comporte sept tronçons de 20-25 résidus hydrophobes chacun formant une hélice alpha transmembraniare (Böhm et al. 1997) (Figure 2). De plus, le récepteur du glucagon est constitué d'un segment extracellulaire N-terminal, de trois boucles extracellulaires, de trois boucles intracellulaires et d'un segment intracellulaire C-terminal. Il est principalement exprimé dans les hépatocytes mais est aussi présent dans d'autres tissus soit : le cœur, le pancréas, les reins, le cerveau, l'estomac, les intestins et certains adipocytes (Christophe 1995, Yamato et al. 1997).

Jusqu'au début des années 1990, certains chercheurs dont Walkelam et al. (1986) et Petersen et Bear (1986) suggéraient l'existence de deux types de récepteurs distincts du glucagon : GR-1 et GR-2. Selon ces derniers, le récepteur GR-1 était associé au second messager inositol 1,4,5-tris-phosphate qui entraîne la libération de

calcium de la lumière du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme cellulaire, tandis que le récepteur GR-2 était associé au second messenger AMP cyclique. Aujourd'hui, les techniques de clonage ont permis de démontrer l'existence d'un seul récepteur du glucagon chez l'homme (MacNeil et al. 1994) et chez le rat (Jelinek et al. 1993). Ces études ont montré que la stimulation au glucagon des cellules BHK (baby hamster kidney) contenant un plasmide codant pour le gène récepteur du glucagon provoquait un accroissement à la fois de la concentration d'AMP cyclique et du Ca^{2+} intracellulaire, via L'IP3 (Hansen et al. 1998). Le récepteur du glucagon transmet donc ses signaux intracellulaires via deux seconds messagers soit : l'AMP 3'-5'-cyclique et l'inisitol 1,4,5 trisphosphate, ces évènements se déroulant par l'entremise de protéines G distinctes (Christophe 1995, Jelinek et al. 1993, Li et al. 1997). De plus, il a été démontré par Hansen et al. (1998) que les récepteurs du glucagon ont la capacité de se lier à de multiples protéines G, confirmant l'activation de deux voies de signalisation distinctes pour le même récepteur. Les mécanismes précis de l'activation demeurent à être investigué.

Trois techniques existent pour caractériser les récepteurs hépatiques du glucagon soit: les épreuves fonctionnelles de radioliation (Frandsen et col. 1985), la quantification de l'ARN messenger (Bustin 2000; Yamato et al. 1997; Nishimura et al. 1996) avec hybridation *in situ*, immunobuvardage de type Northern et l'étude du gène par clonage et séquençage (Jelinek et al. 1993; Portois et al. 1999). L'étude du gène a permis de déterminer la structure (Unson et al. 1995; Chicchi et al. 1997; Cypess et al. 1999) et la séquence (Geiger et al. 2000) du récepteur hépatique du glucagon ainsi que d'établir une homologie de 83 % entre le gène du récepteur du glucagon chez

l'homme et chez le rat (Jelinek et al. 1993; MacNeil et col. 1994). La quantification de l'ARN messenger est utilisée afin de mesurer la capacité de transcription du gène en réaction à une substance chimique ou un ou plusieurs stimuli (Bustin 2000). Les épreuves fonctionnelles de radioliation sont utilisées pour détecter, doser et caractériser les récepteurs du glucagon afin d'obtenir la densité (Bmax) et l'affinité (KD). Elles constituent donc les premiers tests à effectuer lors de l'étude de la régulation d'un récepteur. Leur principe consiste à mesurer la capacité qu'a le glucagon radioactif à se fixer aux membranes plasmiques purifiées de foie contenant les récepteurs du glucagon (Lodish et al. 1997).

La fixation du glucagon :



est représentée par l'équation suivante :

$$KD = \frac{[R][G]}{[RG]}$$

dans lesquelles [R] et [G] représentent les concentrations respectives du récepteur libre et du glucagon (ligand) et [RG] la concentration du complexe R•G.

La constante de dissociation du complexe R•G, c'est-à-dire le KD, est une mesure de l'affinité du récepteur envers son ligand. Ainsi, plus la valeur du KD est

faible, plus l'affinité du récepteur à l'endroit de son ligand est élevée. De plus, la valeur du KD représente la concentration de glucagon nécessaire pour occuper la moitié des récepteurs présents. Dans la littérature, les renseignements disponibles concernant les propriétés des récepteurs chez les rats sains indiquent que l'affinité (KD) du récepteur pour le glucagon se situe entre 0,1 et 1,2 nM et le nombre maximal de récepteurs se situe entre 1,8 et 3,0 pmol/mg de protéines (Desbuquois et Authier 1989; Lipson et al. 1988; Rojas et Birnhaumer 1985).

Les mécanismes exacts impliqués dans les divers processus de régulation du récepteur du glucagon demeurent pour le moment non définis. Diverses études ont été réalisées dans le but d'identifier des régulateurs potentiels. Elles ont été menées à des niveaux différents soit au niveau du gène (Portois et al. 1999; Svoboda et al. 1999), de l'expression de l'ARN messager (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et al. 1995; Burcelin et al. 1998; Krones et al. 1998) et de l'expression des récepteurs dans les préparations de membranes plasmiques de foie (Bhathena et al. 1978 ; Dighe et al. 1984) et/ou à la surface des hépatocytes isolés (Abrahamsen et al. 1995). Suite à ces études, quelques régulateurs ont été identifiés tels le glucose (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et al. 1995; Burcelin et al. 1998; Krones et al. 1998; Portois et al. 1999; Svoboda et al. 1999), l'AMP cyclique (Abrahamsen et Nishimura 1995; Abrahamsen et al. 1995), le glucagon (Bhathena et al. 1978; Dighe et al. 1984) et l'oxygène (Krones et al. 1998).

Ainsi, il a été démontré qu'une élévation de la concentration de glucose avait pour conséquence une augmentation dose-dépendante de l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon (Abrahamsen et al. 1995; Burcelin et al. 1998;

Krones et al. 1998). Ces résultats ont été confirmés par la découverte de Portois et collaborateurs (1999) d'un élément de réponse au glucose dans le promoteur du gène du récepteur du glucagon. Parmi les autres régulateurs cités ci-dessus, il y a l'AMP cyclique ou toutes substances capables d'augmenter ou de diminuer la concentration d'AMP cyclique. Les études effectuées par Abrahamsen et collaborateurs (1995a et b) au niveau des récepteurs hépatiques du glucagon montrent que lorsque les hépatocytes sont incubés en présence de forskolin (un activateur direct de l'adénylate cyclase) ou d'IBMX (inhibiteur de l'activité de la phosphodiesterase), l'expression de l'ARN messager diminue respectivement de 50 et 25 %. Le nombre de récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes passe quant à lui de $1,0 \times 10^5$ /cellule à $3,5 \times 10^4$ /cellule causant une diminution de 65 %. Ainsi donc, toute élévation de la concentration d'AMP cyclique abaisse à la fois l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon et des récepteurs à la surface des hépatocytes. L'oxygène est un autre des régulateurs identifiés. L'étude effectuée par Krones et collaborateurs (1999) montre que lorsque des hépatocytes isolés sont incubés en présence à la fois d'une concentration croissante de glucose (5 à 50 mM) et d'une concentration d'oxygène périportale (16 % O₂) ou périvéneuse (8 % O₂), l'augmentation de l'expression de l'ARN messager du récepteur du glucagon ne se produit qu'en présence d'une concentration artérielle d'oxygène (16 % O₂). Ils ont donc conclu que l'induction du gène du récepteur du glucagon était O₂-dépendante. Le dernier des régulateurs identifiés n'est nul autre que le glucagon pancréatique. Ainsi, une augmentation de la concentration de glucagon allant jusqu'à l'hyperglucagonémie a été associée à une diminution de l'expression des récepteurs hépatiques du glucagon à

la surface des hépatocytes (Bathena et col. 1978) et dans les préparations de membranes plasmiques (Dighe et al. 1984). L'hyperglucagonémie a été induite par l'injection d'un bolus de glucagon deux fois par jour durant une période de sept jours ou par injection de streptozotocine afin de créer une condition pathologique de diabète de type 1. Dans les deux cas, l'hyperglucagonémie a provoqué une diminution respective de 31 et 40 % du nombre de récepteurs du glucagon.

L'entraînement en endurance, autant chez les humains que chez les animaux, induit de multiples changements, et ce, à plusieurs niveaux dans l'organisme (Duan et Winder 1994, Duclos et al. 2001; Giada et al. 1998; Phillips et al. 1996 ; Richter et al. 1998 ; Wittert et al. 1996 ; Wilmore et al. 2001). En dépit de toutes ces études, peu de changements ont été identifiés au niveau des récepteurs. Un des exemples de changement au niveau des récepteurs par l'entraînement en endurance est l'étude de Saborido et col. (1995) montrant une augmentation du nombre de récepteurs de la dihydropyridine dans les muscles à fibres lentes (\uparrow 42 %) et dans les fibres rapides (\uparrow 60 %) sans changement d'affinité. Ce récepteur joue un rôle crucial comme déclencheur de la sortie du calcium du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation du nombre de récepteurs de la dihydropéridine pourrait donc jouer un rôle important dans l'adaptation des muscles squelettiques à accroître leur activité contractile. Un autre exemple est celui de l'étude de Werle et al. (1990) où le nombre de récepteurs bêta₁ et bêta₂-adrénergiques diminue de 13 % dans les muscles cardiaques suite à un entraînement en endurance sans toutefois modifier l'affinité. La stimulation des récepteurs bêta-adrénergiques cardiaques résulte en des effets chronotrope et

inotrope. Ainsi, la diminution du nombre de ces récepteurs pourrait être un des mécanismes expliquant la diminution de fréquence cardiaque au repos retrouvée chez les athlètes. Ces études, ainsi que celles répertoriées dans le tableau 4, montrent que l'entraînement en endurance peut réguler positivement ou négativement un récepteur donné. Bien que peu d'études soient encore disponibles, il est clair que l'exercice chronique entraîne des modifications au niveau des propriétés de certains récepteurs de l'organisme.

Récemment, notre équipe (Légaré et al. 2001) s'est penché sur l'effet de l'entraînement en endurance sur les caractéristiques de liaison du récepteur au glucagon chez l'animal sain. Cette étude nous a permis d'observer une augmentation de la densité ($3,09 \pm 0,12$ et $4,28 \pm 0,12$ pmol/mg de protéines chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) du récepteur au glucagon dans le foie d'animaux entraînés sans aucune modification au niveau de l'affinité ($0,57 \pm 0,06$ et $0,77 \pm 0,09$ nM chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) de celui-ci. Ces résultats expliquent en partie seulement l'augmentation de la PHG sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance chez l'animal sain. En effet, la glycogénolyse ainsi que la néoglucogénèse peuvent tous les deux tirer profit d'une augmentation de la densité des récepteurs au glucagon.

	Exercice	Δ glucagonémie (pré et post-exercice)	
		Sédentaires	Entraînés
Gyntelberg et al. 1977	60 min, 60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	↑92%	↑16%*
Bloom et al. 1976	60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	↓14%	↓35%**
Koivisto et al. 1982	180 min 40% VO ₂ max (entr. :6 sem)	Cte (60 min) ↑23% (120 min) ↑130% (180 min)	Cte (60 min) ↑7% (120 min)* ↑7% (180 min)*
Coggan et al. 1990	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)		-40% vs sédentaires*
Mendenhall et al. 1994	120 min 60%VO ₂ max (entr. : 10 jrs/12 sem)	Cte (60 min) ↑30% (120 min)	Cte ↑9%*
Coggan et al. 1995	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)	Cte (60 min) ↑25% (120 min)	Cte ↑8%*

Tableau 1. Effet de l'entraînement en endurance sur la glucagonémie lors d'un exercice d'intensité modérée.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

	Exercice	Δ insulinémie (pré et post-exercice)	
		Sédentaires	Entraînés
Gyntelberg et al. 1977	60 min, 60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	↓84%	↓63%*
Bloom et al. 1976	60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	↓50%	Cte*
Koivisto et al. 1982	180 min 40% VO ₂ max (entr. :6 sem)	↓25 % (60 min) ↓25% (120 min) ↓30% (180 min)	↓25 (60 min) ↓37 (120 min) ↓43(180 min)
Coggan et al. 1990	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)		+22% vs sédentaires*
Mendenhall et al. 1994	120 min 60%VO ₂ max (entr. : 10 jrs/12 sem)	Cte (60 min) ↓70% (120 min)	Cte ↓40%*
Coggan et al. 1995	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)	Cte (60 min) ↓66% (120 min)	Cte ↓33%*

Tableau 2. Effet de l'entraînement en endurance sur l'insulinémie lors d'un exercice d'intensité modérée.

* $P < 0,05$.

	Exercice	Δ glycémie (pré et post-exercice)	
		Sédentaires	Entraînés
Gyntelberg et al. 1977	60 min, 60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	↓6%	↑17%*
Bloom et al. 1976	60% VO ₂ max (entr. :10 sem)	Cte	↑25%*
Koivisto et al. 1982	180 min 40% VO ₂ max (entr. :6 sem)	↓20%	↓12%*
Coggan et al. 1990	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)	Cte	Cte
Mendenhall et al. 1994	120 min 60%VO ₂ max (entr. : 10 jrs/12 sem)	↓11% (60 min) ↓16% (120 min)	↓5% (60 min) ↓3% (120 min)**
Coggan et al. 1995	120 min 60% VO ₂ max (entr. :12 sem)	↓11% (60 min) ↓15% (120 min)	↓2% (60 min) ↓7% (120 min)

Tableau 3. Effet de l'entraînement en endurance sur la glycémie lors d'un exercice d'intensité modérée.

* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$

Régulateurs	Auteurs	Type d'étude	Effets sur les récepteurs du glucagon
↑ Glucose	Abrahamsen et al. 1995	<i>In vitro</i>	↑ dose-dépendante de l'ARNm
	Burcelin et al. 1998	<i>In vitro</i>	
	Krones et al. 1998	<i>In vitro</i>	
	Portois et al. 1999	<i>In vitro</i>	
↑ AMPc	Abrahamsen et al. 1995	<i>In vitro</i>	↓ 50 % de l'ARNm ↓ 65 % du nombre de récepteurs/cellule
	Bhathena et al. 1978	<i>In vivo</i>	↓ 42 % du nombre de récepteurs par cellule (rats diabétiques)
↑ Glucagon	Burcelin et al. 1998	<i>In vivo</i>	↓ 34 % du nombre de récepteurs par cellule (injection de glucagon) ↑ 250 % de l'ARNm du RG (rats diabétiques, après 19 jours sans insuline)
	Dighe et al. 1984	<i>In vivo</i>	↓ 40 % du nombre de récepteurs par mg de protéines (rats diabétiques)
	Krones et al. 1999	<i>In vitro</i>	↑ ARNm en présence [O ₂ -périportale] (16 %) et non [O ₂ -périvéneuse](8 %)

Tableau 4. Effet des différents régulateurs identifiés sur les récepteurs du glucagon

Tiré de Légaré (2001).

Le glycogène hépatique

Cette deuxième partie de la revue de littérature traite du glycogène hépatique, mais plus particulièrement des aspects caractérisant son hétérogénéité cellulaire. La formation et la dégradation d'une particule de glycogène étant des phénomènes largement décrits dans les livres de références, ils ne seront pas revus ici. Cependant, la structure du glycogène ainsi que les différentes théories aujourd'hui reconnues concernant l'hétérogénéité du glycogène et le rôle de cette hétérogénéité dans le métabolisme du glycogène seront documentés. Cette revue nous permettra de mieux comprendre l'influence que peut jouer le glycogène sur son utilisation et son entreposage.

La structure du glycogène hépatique

Dans le foie, le glycogène est entreposé sous forme de granules cytoplasmiques (Figure 7). Drochman (2001), identifiait trois structures distinctes dans le foie : les particules α , β et γ (Figure 8). Selon ces observations, les particules α représentent les rosettes typiques au foie, les particules β représentent des unités sphériques de 20 à 30 nm formant les rosettes α . Les particules γ sont identifiées comme des sous-unités des particules α et β . Ces granules sont composées de chaînes de plusieurs unités de glucose mais également des enzymes impliquées dans

la synthèse et la dégradation de cette granule ainsi que d'enzymes régulant ces processus. Scott et Still (1968) proposaient que cette granule de glycogène ne représentait pas une granule statique mais bien une organelle dynamique. Meyer, il y a plus de 60 ans, (Gunja-Smith 1970) proposa que cette granule forme une unité indépendante et fonctionnelle composée des protéines (glycogénine, glycogène synthétase, glycogène phosphorylase, phosphorylase kinase et phosphatase) impliquées dans son métabolisme (Figure 9). Cette théorie soulevait la possibilité que la particule de glycogène puisse être régulée régionalement ou même individuellement. Cette unité fut plus tard identifiée par microscopie électronique et nommée glycosome (Rybicka 1996). Aujourd'hui, le terme glycosome est repris pour définir un organisme sans bagage génétique mais où la glycolyse prédomine, d'où son nom. Donc, le glycogène n'est pas qu'un amalgame d'unités glucose mais bien une unité indépendante et fonctionnelle et tout comme d'autres organelles intracellulaires non-membranaires, elle est associée aux protéines responsables de son métabolisme.

Les modèles conceptuels du glycogène

La particule de glycogène est composée de deux types de liens glycolytiques; les liens α -1-4 et α -1-6 (Figure 10). Les liens α -1-4 (entre le carbone numéro 1 et 4 de deux molécules de glucose) qui réunissent les unités glucose sont responsables de leur alignement et représentent 93% de la totalité des liens, tandis que les liens α -1-6

forment les branches et ne totalisent que 7% de la totalité des liens (Newsholme 1983). Les liens α -1-4 sont formés à partir de la glycogène synthétase tandis que les liens α -1-6 sont formés à partir de l'enzyme amylo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglycosylase (enzyme de branchement).

Bien que plusieurs détails concernant la structure fine de la molécule de glycogène restent encore inconnus, l'information disponible aujourd'hui permet de proposer un modèle de la structure du glycogène. Le modèle proposé par Whelan (Gunja-Smith 1970, 1971) principalement basé sur la dégradation enzymatique de la molécule de glycogène est aujourd'hui encore accepté (Goldsmith et al. 1982). Selon ce modèle, la molécule de glycogène se compose de deux types de chaînes : les chaînes B qui sont branchées et les chaînes A qui ne le sont pas (Figure 11). Le branchement des chaînes B est distribué de façon uniforme de telle manière que chaque chaîne B possède un maximum de deux branches (degré de branchement égale à 2 (Goldsmith et al. 1982)). De plus, il y a quatre unités glucose entre chaque branche et une queue à la suite du deuxième branchement. Les chaînes A et B sont de longueur uniforme et composées d'environ 13 unités de glucose. La molécule de glycogène est donc sphérique et organisée en tiers concentriques; tous les tiers ayant une longueur de 1,9 nm. Il y a 12 tiers pour une particule β pour un rayon de 21 nm. Toutes les chaînes A se retrouvent donc dans le tiers externe de la molécule. Avec un degré de branchement de deux, le nombre de chaînes dans n'importe quel tiers est deux fois plus élevé que dans le tiers précédent. Théoriquement, un glycosome mature (développé à sa capacité maximale) a un diamètre de 42 nm avec 55 000

unités glucose et possède une masse moléculaire de 10^7 Da et une masse molaire d'environ 162 g/mol.

Plus récemment, et à partir des lois immuables de synthèse et de dégradation du glycogène, Meléndez-Hevia et collaborateurs (1993) ont développé un modèle permettant de décrire quantitativement différents paramètres de la particule de glycogène. Les équations décrivant le modèle sont basées sur trois paramètres soit : 1) le degré de branchement (r) de 2 (Goldsmith et al. 1982), 2) le nombre de tiers et finalement 3) le nombre d'unités glucose par chaîne. Le degré de branchement de la molécule de glycogène ne peut, selon Melendez-Hevia et al. (1993), être plus élevé que deux car théoriquement, ceci entraînerait la formation d'une molécule trop dense qui empêcherait ainsi la glycogène phosphorylase de se lier à la molécule de glycogène (Tableau 5). En effet, la glycogène phosphorylase a besoin d'un espace suffisant au niveau de ses sites de liaison avec le glycogène

Le modèle de Meléndez-Hevia et al. (1993) nous permet donc de déterminer : 1) le nombre de chaînes externes de la particule (C_A), 2) le nombre total d'unités glucose de la particule (G_T), 3) le nombre d'unités glucose directement disponible à la glycogène phosphorylase (G_{PT}) et 4) le volume (V_S) de la particule. Les équations proposées par Meléndez-Hevia et al. (1993) sont les suivantes :

$$C_A = r^{-1} \quad (1)$$

$$G_T = g_c \cdot 1-r^2/1-r \quad (2)$$

$$G_{PT} = C_A \cdot (g_c-4) \quad (3)$$

$$V_s = 4/3 \pi \cdot r^3 \cdot (0,12g_c + 0,35)^3 \quad (4)$$

Les différents modèles conceptuels nous permettent donc, selon les lois naturelles de la formation et la dégradation de la particule de glycogène, de visualiser et prédire le comportement de la particule de glycogène dans différentes situations physiologiques.

Le principe d'hétérogénéité du glycogène

Au cours des années, les différentes investigations sur les mécanismes d'entreposage et de dégradation du glycogène apprirent aux chercheurs que la molécule de glycogène est très hétérogène dans sa forme et sa distribution, autant dans une même cellule (Alonso 1995) qu'entre différents tissus (Calder 1986, Geddes 1977, Geddes 1994). Dès 1857, Claude Bernard (Bernard 1857) reconnut l'hétérogénéité du glycogène hépatique. Ces observations initiaient d'intenses interrogations concernant la relation du glycogène avec son environnement. Des interrogations qui se poursuivent encore aujourd'hui.

Plusieurs dimensions de l'hétérogénéité du glycogène motivent les chercheurs. Certains s'attardent à la solubilité du glycogène (Willstätler 1934), à la liaison du glycogène avec certaines protéines (Lomako 1991, Adamo et al. 1998, Shearer & Graham 2002), au poids moléculaire du glycogène (Calder 1991, Geddes

1977,1994, Calder & Geddes 1992, Geddes & Stratton 1977, Frieden 1985, 1989, Marchand 2002) tandis que d'autres se penchent sur la localisation du glycogène dans la cellule ainsi qu'à sa relation avec d'autres structures intra-cellulaires (Rybicka 1996). Certains de ces concepts sont ici exposés et critiqués.

Le lyo- & desmoglycogène

Dans la tentative d'isoler le glycogène sous sa forme la plus pure, il se révéla que l'extraction par l'eau ou l'acide trichloroacétique (TCA) produisait moins de glycogène que l'extraction alcaline (Willstätler 1934). Dès lors, Willstätler (1934) introduisait les termes *lyoglycogène*, pour le glycogène facilement extrait et soluble par le TCA, et *desmoglycogène*, pour le glycogène résistant et insoluble à l'extraction par le TCA. À cette époque, les investigateurs proposaient que le lyo- et le desmoglycogène se différenciaient par leur contenu respectif en protéines. Le lyoglycogène étant soluble en absence de protéines tandis que le desmoglycogène résistait grâce à son association avec certaines protéines. Aujourd'hui, nous savons que le glycogène sous forme de granule est associé aux enzymes responsables de son métabolisme. De plus, selon Willstätter et Rohdwalter (1934), la proportion de ces deux fractions de glycogène dans le foie dépend du statut physiologique de l'animal. Chez un animal bien nourri, la majorité du glycogène hépatique se retrouve sous forme de lyoglycogène, tandis qu'à la suite d'un jeûne, le glycogène hépatique se compose majoritairement de desmoglycogène (Willstätter et Rohdwalter 1934). Ces deux fractions possèdent des caractéristiques particulières. Entre autres, il est possible

d'observer un échange de glycogène entre les deux fractions à la suite de divers événements tels le jeûne, l'injection d'adrénaline et de thyroxine, l'adrénalectomie, l'hypophysectomie et le travail musculaire (voir références de Roe et al. 1961). La présence de deux fractions distinctes du glycogène semble avoir un impact physiologique en ce qui a trait à son entreposage et son utilisation. Cette interprétation du glycogène a été abandonnée à la suite d'une publication de Roe et al (1961) démontrant qu'avec un traitement plus sévère du glycogène, la différence entre les deux fractions n'existe plus.

Le glycogène selon sa taille, sa masse et sa localisation dans la cellule.

Depuis longtemps, il est aussi reconnu que le glycogène existe sous un large éventail de tailles et que son métabolisme en dépend (Geddes 1985, Calder 1991, Marchand et al. 2002, Geddes et Stratton 1977, Calder et Geddes 1992). Par exemple, selon Geddes et Statton (1977), la resynthèse du glycogène, suivant un jeûne, est un processus non-homogène et dépendant du poids moléculaire de la particule. De plus, Calder et Geddes (1992) suggèrent que le jeûne affecte autant le glycogène de masse supérieure ($>250 \times 10^6$ Da) que celui de masse inférieure ($<250 \times 10^6$ Da). Approximativement 95% du glycogène de masse supérieure et 98% du glycogène de masse inférieure est mobilisé lors d'un jeûne résultant ainsi en une proportion équivalente des deux fractions à la suite d'un jeûne. Cependant, lors de la resynthèse, le glycogène de masse supérieure est initialement favorisé (Tableau 5). En plus de

s'intéresser à la masse du glycogène, Calder et Geddes (1992) s'intéressent à la localisation du glycogène dans la cellule. Leurs premières observations démontraient que le glycogène de masse moléculaire supérieure est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et que le glycogène de masse moléculaire inférieure au niveau du réticulum endoplasmique lisse. Or, ceci indique donc que la resynthèse initiale du glycogène se fait dans la région du réticulum endoplasmique rugueux tandis que la synthèse tardive pour le glycogène de masse moléculaire inférieure se fait au niveau du réticulum endoplasmique lisse (Calder & Geddes 1992). D'autres travaux, cette fois-ci de Frieden et al. (1985,1989) appuient ceux de Calder & Geddes (1992). Selon eux, dans le muscle, le glycogène se localise à 5 endroits différents (Friden et al. 1989) et l'exercice de différentes intensités favoriserait de façon spécifique l'utilisation de glycogène selon sa localisation ou le type de fibre musculaire (Friden et al. 1985). Plus récemment, et également dans le muscle, Marchand et al. (2002), ont confirmé une compartimentation du glycogène.

En résumé, les résultats de Calder et Geddes (1992) appuyés par ceux d'autres groupes de recherche (Chee et Geddes 1977, Geddes 1985, Frieden et al. 1985, 1989, Marchand et al. 2002) démontrent qu'il existe non seulement une variété de grosseur de particule de glycogène, mais que leur métabolisme dépend de leur situation dans la cellule ou de leur association avec différentes structures de la cellule.

Le pro- & macroglycogène

La plus récente appellation pour définir le glycogène fut introduite par Lomako et collègues (1991). Ces derniers présentent le proglycogène comme une forme intermédiaire (plus petite que la fraction mature) de la synthèse et de la dégradation de la molécule de glycogène complète (macromolécule) pouvant être métabolisée comme entité indépendante (Lomako 1991). Selon Lomako et al. (1991), le glycogène musculaire se compose d'une fraction de 400 kDa constituant 15% du glycogène total. Dans le muscle, la particularité du proglycogène est que l'addition du glucose se fait à partir d'une forme distincte de la glycogène synthétase. En effet, à la glycogénine (Mr 37 kDa) s'attachent des unités glucose à partir de l'UDP pour former une chaîne de 7 à 11 unités glucose. Ceci forme donc la base i.e. initiateur à la formation du proglycogène. À partir de cette base, les unités de glucose sont additionnées selon l'activité d'une synthétase propre au proglycogène jusqu'à ce que la molécule atteigne un poids moléculaire d'environ 400 kDa (8 tiers). En fait, jusqu'à ce que la forme classique de la glycogène synthétase s'active pour compléter l'addition de glucose au proglycogène pour former une molécule mature ou macroglycogène de masse moléculaire maximale de 10^7 kDa (Figure 12). En résumé, ce qui distingue le proglycogène du macroglycogène est l'activation d'une synthétase proglycogénique distincte de la glycogène synthétase classique soit, selon Lomako et al. (1991), la synthétase macroglycogène.

La situation est quelque peu différente dans le foie. En effet, dans le foie, le glycogène se présente comme de grosses particules gonflées ayant une masse

moléculaire très supérieure au glycogène musculaire. Comparativement aux muscles, le glycogène hépatique contient en proportion par rapport au poids beaucoup moins de glycogénine (Smythe 1989), donc la proportion de proglycogène est de 3% seulement et la présence de synthétase proglycogénique est indétectable (Lomako 1993). Les différences tissulaires en proglycogène sont exposées dans le Tableau 7.

Différentes propriétés sont attribuées aux fractions pro- et macroglycogène. Par exemple, la synthèse du glycogène, à la suite de la dégradation par l'exercice, est également fonction des fractions pro- et macroglycogène et de l'apport externe de glucides (Adamo et al. 1998). En effet, selon Adamo et al. (1998), lorsqu'une diète élevée en glucides est administrée aux sujets à la suite d'un exercice, la resynthèse favorise la fraction macroglycogène (Tableau 8). Cependant, lorsque la diète faible en glucides est administrée, la synthèse de glycogène favorise la fraction proglycogène. De la même façon, les deux fractions pro- et macroglycogène sont dégradées à un rythme différent (Shearer et Graham 2002). En règle générale, le proglycogène représente une fraction plus dynamique étant dégradé plus rapidement que le macroglycogène (Tableau 9).

Il y a cependant certaines ambiguïtés concernant les travaux de l'équipe de Graham (Adamo et al. 1998, Shearer et Graham 2002). En effet, ces derniers (Adamo et al. 1998, Shearer et Graham 2002) ont isolé la fraction proglycogène avec une technique différente de celle proposée par Lomako et al. (1991). Pour ce faire, ils ont isolé le proglycogène avec une technique de précipitation à l'acide (TCA) basée sur les travaux de Lomako et al. (1991) suggérant deux fractions de glycogène,

soit une fraction insoluble au traitement à l'acide (le proglycogène) et une fraction soluble au traitement à l'acide (le macroglycogène). Ces deux fractions font évidemment référence aux fractions desmo- et lyoglycogène préalablement présentées comme étant des fractions du glycogène insoluble et soluble au traitement à l'acide (TCA), respectivement (Willstätler 1934).

Quelques indices semblent suggérer que l'extraction à l'acide n'isole pas de façon particulière le pro- et le macroglycogène tel que défini par Lomako et al. (1991) soulevant ainsi certains doutes sur l'interprétation de l'équipe de Graham sur le glycogène. En effet, l'utilisation de cette technique au niveau du foie montre un rapport d'environ 50/50 de glycogène insoluble et soluble au traitement à l'acide. Ceci est très loin des données d'Alonso et al. (1995), démontrant une proportion de 3% seulement de proglycogène dans le foie. Cette différence vient du fait que dans le foie, la glycogénine ne fait pas partie intégrante de la particule de glycogène. Elle peut se détacher pour former une autre particule. Un autre indice que le traitement à l'acide ne divise pas le pro- du macroglycogène vient de l'équipe de Graham elle-même. Récemment, Marchand et al. (2002) en sont venus à la conclusion que le proglycogène n'était pas une entité distincte. C'est-à-dire que le glycogène se distribue selon un large éventail de grosseurs de particules allant de dimension inférieure à la limite supérieure de dimension du proglycogène (30 nm) et de dimension inférieure à la dimension maximale du macroglycogène (42 nm). Ceci suggère que le pro- et le macroglycogène ne représentent pas des entités particulières comme le suggérait Lomako et al. (1991). Ces allégations naissent du fait que, selon

l'équipe de Graham, ce qui différencie le pro- du macroglycogène est la dimension de la particule (proglycogène < 400kDa < macroglycogène) ou sa proportion relative en protéines et non de l'activité glycogène synthétase propre au proglycogène (Lomako et al. 1991). De plus, une étude du groupe de Hansen *et al.* (2000) a suscité une interrogation. Cette étude visait à évaluer si la quantité ou l'activité de la glycogénine devenait un facteur déterminant dans l'atteinte du niveau maximum de glycogène dans le muscle squelettique de rat. Selon la théorie proposée par Alonso *et al.* (1995), le proglycogène correspond à un intermédiaire stable conduisant à la formation du macroglycogène et ne semble jamais dégradé jusqu'au niveau de la glycogénine. Cependant, l'étude de Hansen *et al.* (2000) démontre que le nombre de molécules de glycogénine demeure constant, ce qui implique que la taille des molécules de proglycogène augmente avec la quantité de glycogène. À ce stade, il nous est donc permis de penser que le proglycogène n'est pas une fraction distincte du glycogène. De même, au niveau technique, ceci laisse supposer que la séparation par l'acide isole des glycosomes de tailles différentes selon leur attachement (desmoglycosomes) ou non (lyoglycosomes) aux composantes intracellulaires.

Comme on peut le voir, il reste encore beaucoup d'ambiguïtés concernant l'interprétation de l'hétérogénéité du glycogène. La prochaine section propose une alternative très attrayante qui éclaircit les ambiguïtés précédemment soulevées.

Le Glycosome

Dans les années 1950 et 1960, des expérimentations utilisant le C^{14} établissaient que le glycogène hépatique et musculaire se dégradent et se synthétisent de façon continue, attribuant ainsi un aspect dynamique au glycogène (Stetten & Stetten 1960). L'association du glycogène avec la glycogène synthétase (Leloir & Goldemberg 1960) et la glycogène phosphorylase était plus tard démontrée (Meyer 1970). Meyer et al. (1970) proposaient que l'association du glycogène et de ces enzymes forme un complexe indépendant et fonctionnel. Ce qui confirmait ce que Lazarow et al (1942) avait proposé quelques décennies auparavant, soit que les particules de glycogène contiennent une petite quantité de protéines, et que ces dernières peuvent être d'une importance capitale dans le maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurelle de la particule. Les mécanismes impliqués dans l'initiation et la continuation de la synthèse et la dégradation du glycogène, la translocation d'enzymes (synthétase et enzyme de branchement) et de branches de glucose d'une région à une autre de l'arbre du glycogène, indiquent bien que l'unité fonctionnelle formée du glycogène et de ses enzymes représentent un organel complexe : le *glycosome* (Scott & Still 1968).

Le glycosome représente donc l'unité fonctionnelle que forme le glycogène et les enzymes associées directement à son métabolisme (Meyer 1970, Rybicka 1979, 1981, 1996). Comme illustré dans le *Molecular Biology of the Cell* (Alberts 1994) (Figure 7), le glycosome apparaît comme une sphère de diamètre variable (20 à 30 nm) composée d'unités glucose et de protéines telles que : la glycogène synthétase, l'amylo-(1,4→1,6)-transglycosylase, la glycogénine, la glycogène phosphorylase,

l'amylo-1,6-glucosidase, les protéines de ciblage et la phosphorylase kinase. Rybicka, à la fin des années 1970, confirmait la morphologie du glycosome par microscopie électronique (ME) (Rybicka 1979), ce qui venait appuyer les études antérieures démontrant la solide liaison du glycogène à ces enzymes impliquées dans son métabolisme (Meyer 1970). Or, bien qu'il soit reconnu depuis plus de vingt ans (Rybicka 1979, 1981, 1996), ce complexe n'est encore aujourd'hui que très peu étudié. En effet, malgré l'importance de la structure de la situation dans la cellule (ou compartimentation) et de l'association du glycogène avec les enzymes impliquées dans son métabolisme soient reconnues, la majorité des études concernant le glycogène et son utilisation ne portent que sur l'aspect quantitatif du glycogène, négligeant ainsi l'aspect qualitatif.

Rybicka a démontré l'existence du glycosome en marquant les protéines des granules de glycogène avec du U/Pb. Rybicka (1977, 1979) observait des granules constituées de glycogène liées avec des protéines (Figure 13a et 13b). Suite à un traitement à l'acide, ces granules se désintégraient, provoquant ainsi l'agrégation désordonnée de glycogène (Figure 14a et 14b). Ceci confirmait donc que le glycogène lié à ces enzymes forme un organel indépendant et sensible au pH.

Les premières études d'isolation du glycogène démontraient que seule une partie du glycogène pouvait être extraite par hydrolyse, l'autre restant non-extraite, même après une hydrolyse de 21 jours consécutifs (Pflüger 1905). La partie non-extraite était alors considérée comme étant liée à des protéines dans le tissu, tandis que la partie du glycogène extraite comme étant libre. De ces propriétés, Willstätter & Rohewald introduisaient les termes lyoglycogène pour la fraction soluble et

desmoglycogène pour la fraction non-soluble, par hydrolyse et TCA (Willstätler 1934). De la même façon, une telle hétérogénéité au niveau des glycosomes est aujourd'hui reconnue. En effet, le traitement à l'acide détruit les glycosomes libres (lyoglycosomes) laissant intacts les glycosomes liés aux différentes organites intra-cellulaires (desmoglycosomes). Rybicka (1979, 1981, 1996) a démontré ceci par la technique de double marquage. Le double marquage au PA-TSC-SP et au U/Pb révèle, dans le muscle, que les glycosomes attachés à la membrane du reticulum sarcoplasmique résistent lorsque le tissu est traité à l'uranyl acétate (Rybicka 1979 et 1981) (Figure 15). Rybicka (1979 et 1981) démontrait également que le glycosome dans la cellule musculaire peut s'attacher à plusieurs autres organites intra-cellulaires comme les myofibrilles et les mitochondries, le sarcolemme, l'appareil de Golgi, les polyribosomes et le reticulum sarcoplasmique. L'association des glycosomes avec d'autres structures intra-cellulaires expliquerait entre autre la présence de glycogène synthétase et phosphorylase dans le reticulum endoplasmique lisse (Margolis 1979). Donc, le traitement à l'acide d'un tissu permet d'isoler les deux fractions de glycosomes contenant du glycogène, soit les desmoglycosomes (ou anciennement le desmoglycogène) qui résistent au traitement et les lyoglycosomes (ou lyoglycogène) qui lui sont totalement vulnérables. Or, vraisemblablement, le traitement à l'acide qui sépare les glycosomes suivit du dosage du glycogène peut donc nous informer sur la quantité de glycogène associée à l'une ou l'autre des fractions.

Les deux fractions de glycosomes possèdent différentes caractéristiques. En effet, le glycogène contenu dans les desmoglycosomes forment des particules plus petites ayant des longueurs de chaînes extérieures inférieures au glycogène contenu

dans les lyoglycosomes (Calder 1986). De plus, la fraction desmoglycosome possède une activité supérieure de la glycogène phosphorylase (Stetten 1958). Les desmoglycosomes sont aussi en mesure de résister à plusieurs éléments qui détruisent les lyoglycosomes. Outre le TCA, l'uranyl acétate, l'acide périodique et les desmoglycosomes résistent à l'action des enzymes glycolytiques (Rosati 1967). Les desmoglycosomes semblent également résister à l'administration aiguë d'adrénaline et à la stimulation électrique des muscles, deux éléments qui provoquent la destruction des lyoglycosomes (Smythe 1990). Ces propriétés se rapprochent beaucoup des propriétés de la fraction proglycogène identifiée par l'équipe de Graham (2002).

Cette interprétation du glycogène expliquerait, entre autre, pourquoi l'équipe de Graham observait dans le muscle une grande quantité de proglycogène (40%) comparativement au 15% proposé par Lomako et al. (1991) et pourquoi près de 50% de proglycogène dans le foie avec l'isolation par traitement à l'acide est obtenu, lorsque le proglycogène ne représente que 3% du glycogène total dans le foie (Alonso et al 1995). De plus, la théorie du glycosome concorde avec la récente affirmation de l'équipe de Graham (Marchand et al. 2002) qui, contrairement au propos de Lomako et al (1991), suggérait que le proglycogène ne représente pas une unité distincte du glycogène (< 400 kDa) et que la distribution du glycogène dans le muscle joue un rôle important dans son métabolisme.

Beaucoup d'aspects sur l'hétérogénéité du glycogène demeurent à clarifier et demanderont encore abondamment d'énergie et de temps. Pour cette raison, et avec

l'information que nous possédons aujourd'hui, l'appellation glycogène soluble (lyoglycogène, macroglycogène, lyoglycosomes) et insoluble (desmoglycogène, proglycogène, desmoglycosomes) à l'acide sera ici utilisée pour définir les différentes fractions du glycogène dans la cellule hépatique. De plus, on connaît peu de chose sur l'effet du diabète et de l'entraînement en endurance sur la compartimentation lyo et desmoglycosome.

L'optimisation de la molécule de glycogène

L'optimisation *in vivo* du design de la molécule de glycogène dans le métabolisme de la cellule est nécessaire à la garantie d'une bonne relation structure-fonction. La première caractéristique importante de l'optimisation du glycogène est que le glycogène est un polymère, ce qui représente une façon efficace d'entreposer de l'énergie dans le cytoplasme sans toutefois augmenter son osmolarité (Ovadi 1991). Il est évalué que la quantité totale de glucose entreposée dans les hépatocytes est l'équivalent de 400 mM alors que la concentration de glycogène est d'environ 0,01 μ M (Harris 1992). La deuxième caractéristique importante démontrant l'efficacité du glycogène à remplir son rôle consiste en son branchement. Le nombre de bouts non-réducteurs doit être supérieur au nombre de sites actif de la glycogène phosphorylase afin d'augmenter la capacité de l'enzyme à s'attacher à la molécule. Il s'avère évident, que le stockage du glycogène, c'est-à-dire son branchement, permet

une augmentation de l'efficacité de ce dernier. En effet, l'augmentation du branchement et conséquemment du nombre de bouts non-réducteurs, permet d'accroître le nombre de points d'attaque de la glycogène phosphorylase (Newsholme et al. 1983) en permettant la dégradation simultanée de plusieurs chaînes. Ceci, sans à avoir à débrancher et réassocier l'enzyme et les unités glucose entre les cycles catalytiques. Ceci devient l'équivalent de l'augmentation de la concentration du substrat.

L'importance de l'optimisation de la particule de glycogène se révèle par des situations où une dissension entre la structure de glycogène et son utilisation est observée. C'est le cas dans la maladie de Andersen (défiance en amylo-(1,4→1,6)-transglycosylase). Dans cette pathologie, la concentration de glycogène hépatique est normale mais les chaînes de glucose sont très longues résultant d'une défiance en amylo-1,6-glucosidase. Ceci résulte donc, en une diminution de la solubilité du glycogène (Voet & Voet 1995). Ce dernier cas est cependant extrême. Des cas moins extrêmes démontrent également l'importance de la structure dans l'utilisation du glycogène. En effet, Roesler et Khandelwal (1986), observaient chez la souris diabétique, une altération au niveau du branchement de la particule de glycogène qui modifie l'activité de la glycogène phosphorylase et ainsi diminue la glycogénolyse. Une section de la présente thèse est consacrée aux modifications de la structure du glycogène associées au diabète.

Selon les différentes théories sur l'hétérogénéité du glycogène, il apparaît évident que certaines fractions s'avèrent plus disponibles que d'autres. Par exemple,

le fait que les fractions insolubles au traitement à l'acide, donc résistant, se dégradent plus rapidement que les fractions solubles (Adamo et al. 1998). Il pourrait être avantageux d'entreposer une plus grande proportion de ces fractions insolubles, et évidemment de glucose associé à cette fraction, afin de faciliter la contribution de la glycogénolyse au maintien glycémique.

À la lumière de ces résultats, il est donc possible d'envisager que dans certaines situations physiologiques (déficience en enzyme, diabète, jeûne) où l'utilisation du glycogène est diminuée par sa structure et sa distribution dans la cellule, d'autres situations physiologiques (entraînement, administration exogène d'insuline), pourraient au contraire optimiser la structure du glycogène et ainsi faciliter son utilisation.

Le glycogène hépatique et l'entraînement en endurance

Au niveau hépatique, l'effet de l'entraînement en endurance sur la quantité de glycogène est encore aujourd'hui débattu. En effet, selon certains (Fitts 1975, James 1984) l'entraînement en endurance n'a aucun effet sur la quantité du glycogène hépatique, tandis que selon d'autres (Galbo 1979, Baldwin 1975), l'entraînement en endurance augmente la concentration hépatique en glycogène.

En ce qui concerne l'effet de l'entraînement en endurance sur la structure du glycogène hépatique, la littérature est très limitée. En effet, malgré l'importance du glycogène hépatique dans le maintien de la glycémie, et malgré l'importance de la

structure de glycogène dans son utilisation, aucune étude ne s'est penchée directement sur l'effet de l'entraînement en endurance sur la structure, l'hétérogénéité ou la compartimentation du glycogène hépatique. Cependant, au niveau musculaire, Taylor et al. (1974ab), ont montré une augmentation de l'activité de l'amylo-(1,4→1,6)-transglycosylase et de l'amylo-1,6-glucosidase, ce qui de façon indirecte propose une modification de la structure de glycogène avec l'entraînement en endurance. De la même façon, au niveau de foie, l'entraînement en endurance augmente (Galbo 1977) ou non (James 1984) l'activité d'enzyme importante dans la synthèse du glycogène, soit la synthétase. Or, ces indices indirectes supposent une modification de la structure du glycogène avec l'entraînement en endurance. En ce qui concerne le fractionnement du glycogène, c'est-à-dire, aux fractions lyo- et desmoglycosomes, aucune donnée n'est présentement disponible.

Le glycogène hépatique et le diabète de type 1

L'intégration des nouveaux concepts quant à l'hétérogénéité et la structure du glycogène est limité dans le diabète. Le diabète de type 1, induit via la streptozotocine ou apparaissant spontanément (souris db/db), provoque une modification de la structure du glycogène hépatique (Roesler 1986, Stearns 1977). Spécifiquement, une diminution du volume de la particule de glycogène est observée conséquemment à une diminution de la longueur moyenne des chaînes (14 ± 1 et 11 ± 0.3 unités glucose, chez la souris saine et diabétique, respectivement), une diminution

de la longueur des chaînes extérieures et intérieures comparativement aux souris saines. Ces variations de la structure du glycogène seraient selon Roesler et Kandelwal (Roesler 1990, Kandelwal 1977) le résultat d'une altération du taux de renouvellement du glycogène chez la souris diabétique non-traitée. Concernant la compartimentation du glycogène, aucune donnée n'est aujourd'hui disponible.

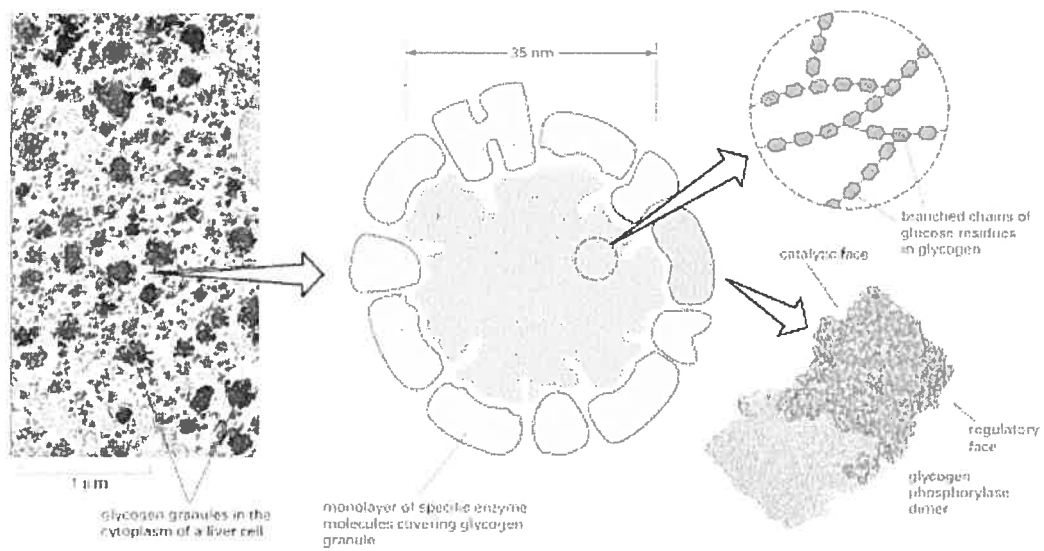


Figure 7. Granule de glycogène.

Tirée de *Molecular Biology of the Cell*, B. Alberts et al., Garland Publishing In., New York & London, 3^e ed, 1994, p.660.

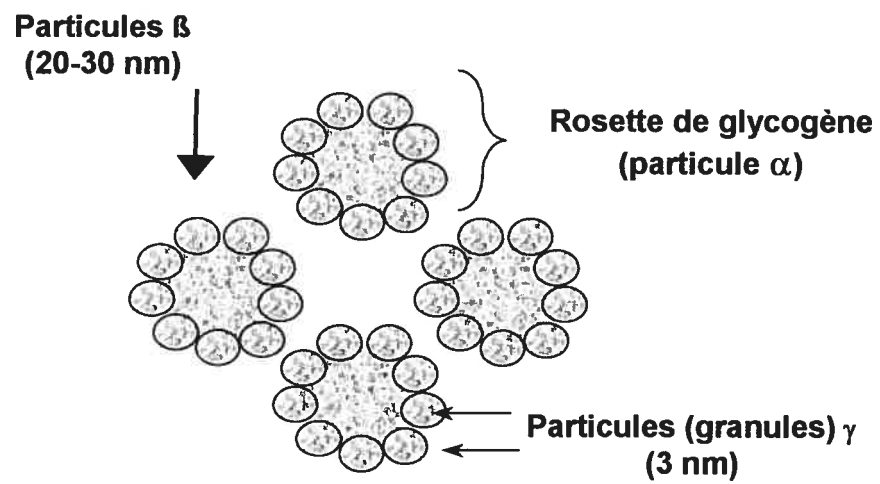


Figure 8. Rosette de glycogène avec particules α , β et γ .

Adaptée de Drochmans, 1962.

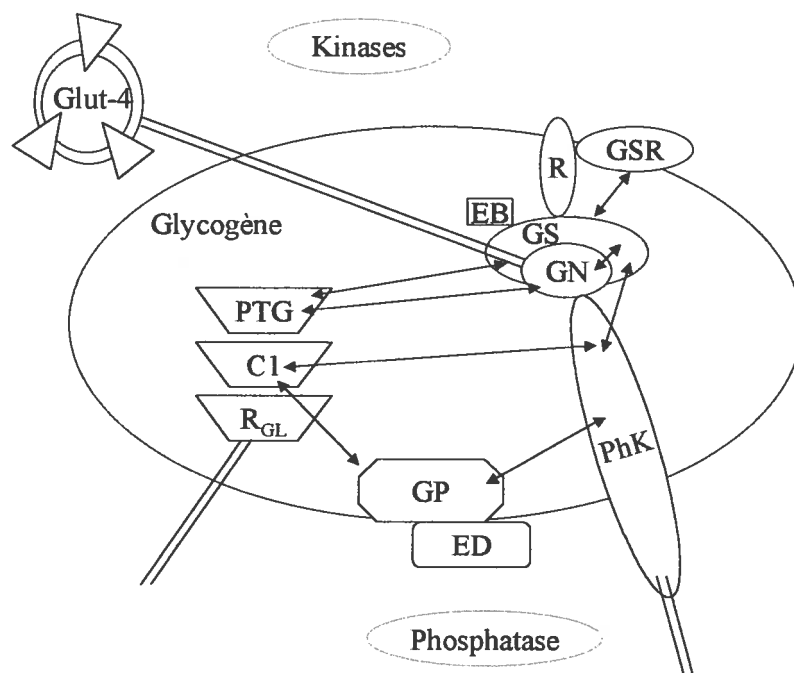


Figure 9. Modèle théorique de l'association de la granule de glycogène (ou glycosome) et des enzymes associées à son métabolisme.

L'interaction entre les protéines est indiquée par les doubles flèches. GS-glycogène synthétase; EB-enzyme de branchement; GN-glycogénine; GP-glycogène phosphorylase; ED-enzyme de débranchement; C1- unité catalytique phosphatase de type 1; R_{GL}-unité de ciblage de glycogène (*glycogen targeting subunit*); PTG-protéine de ciblage; GSR-unité régulatrice kinase de la glycogène synthétase; R-unité kinase de la protéine de ciblage; PhK-phosphorylase kinase Adaptée de Roach et al.,1998.

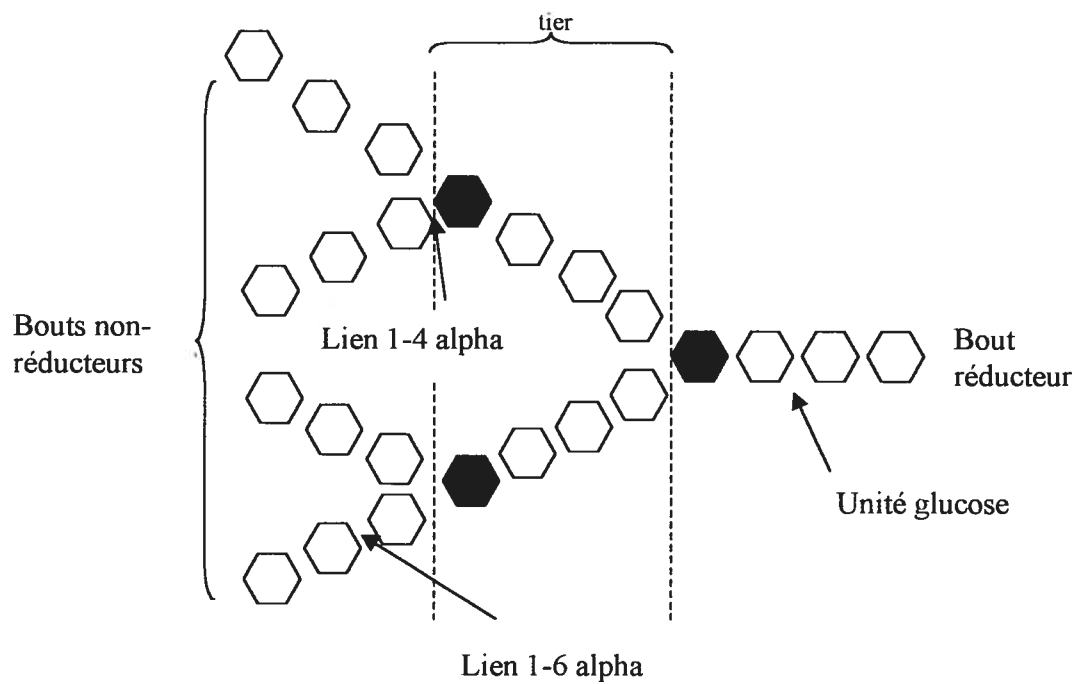


Figure 10. Liens α -1-4 et α -1-6 de la particule de glycogène.

Adaptée de Biochemistry, 5^{ième} édition, Lubert Stryer, WH Freeman & Co. 2002.

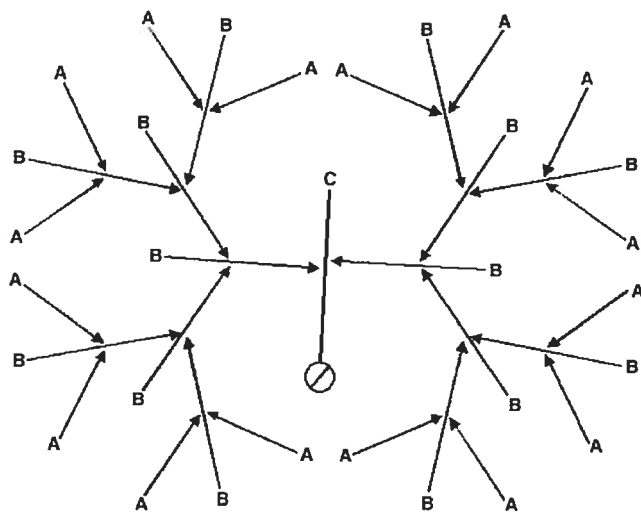


Figure 11. Molécule de glycogène selon le modèle élaboré par Whelan.

Adaptée de Gunja-Smith (1970).

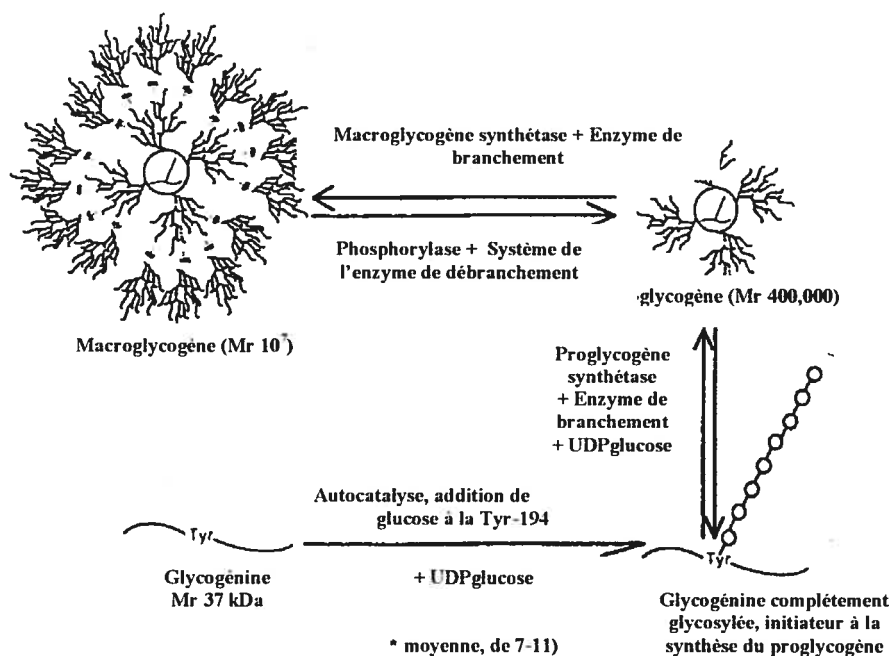


Figure 12. Formation du macroglycogène via le proglycogène.

Dans le muscle, la particularité du proglycogène est que l'addition du glucose se fait à partir d'une forme distincte de la glycogène synthétase. En effet, à la glycogénine (Mr 37 kDa) s'attache des unités glucose à partir de l'UDP pour former une chaîne de 7 à 11 unités glucose. Ceci forme donc la base i.e. initiateur du proglycogène. À partir de cette base, les unités de glucose sont additionnées selon l'activité d'une synthétase propre au proglycogène jusqu'à ce que la molécule atteigne un poids moléculaire d'environ 400 kDa (8 tiers). En fait, jusqu'à ce que la forme classique de la glycogène synthétase s'active pour compléter l'addition de glucose au proglycogène pour former une molécule mature ou macroglycogène de masse moléculaire maximale de 10^7 kDa. Adaptée de Alonso et al. (1995).

<i>t</i>	<i>r</i> =1		<i>r</i> =2		<i>r</i> =3		<i>r</i> =4	
	Densité	Gpt	Densité	Gpt	Densité	Gpt	Densité	Gpt
3	11.6	9	27	36	50	81	81	144
4	7.9	9	30	72	79	243	169	576
5	5.7	9	36	144	139	729	392	2304
6	4.3	9	46	288	264	2187	988	91216
7	3.4	9	62	576	530	6561	2649	36864
8	2.7	9	87	1152	1118	19683	7444	147456
9	2.2	9	127	2304	2444	59049		
10	1.9	9	191	4608	5510	177147		
11	1.6	9	294	9216	12733	531441		
12	1.4	9	<u>463</u>	<u>18432</u>				
13	1.2	9	741	36864				
14	1.0	9	1206	73728				

Tableau 5. Variation de la densité de la particule de glycogène et le nombre total d'unités glucose disponibles (Gpt) sans débranchement, avec un degré de branchement ($r=2$) et le nombre de tiers (t) de la particule.

Une forme sphérique est supposée. La densité est arbitraire et le Gpt est calculé assumant une longueur de chaîne de 13 unités glucose. Les nombres soulignés correspondent aux valeurs cellulaires ($r=2$). Dans les colonnes où le $r > 2$ les valeurs avec une densité équivalent à la densité cellulaire sont en gras. Adaptée de Meléndez-Hevia et al. (1993).

Temps de resynthèse (heures)	Contenu relatif de glycogène selon la grosseur de la particule	
	<250 x 10 ⁶ Da	>250 x 10 ⁶ Da
	0	1,6 ± 0,2* (41%)
0,5	2,9 ± 0,2* (30%)	6,8 ± 0,3* (70%)
4	16,2 ± 1,1* (32%)	33,9 ± 1,3 (68%)
13	61,8 ± 3,1 (45%)	74,6 ± 4,4* (55%)
24	94,9 ± 1,0*(58%)	69,7 ± 4,3*(42%)
48	64,2 ± 1,2 (63%)	38,0 ± 2,4 (37%)
Nourris	64,7 ± 0,9 2 (65%)	35,3 ± 1,2 2 (35%)

Tableau 6. Proportion relative de glycogène (animaux nourris = 100%) selon la grosseur de la molécule.

Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM. *P < 0.001. Adapté de Calder & Geddes 1992.

	Foie	Muscle	Coeur
Glycogénine (mg/g de tissu)	0,0025	0,045	0,31
Glycogène total (mg/g de tissu)	95	12,8	5,9
Proglycogène (%)	3	15	50
Ratio macro:proglycogène (%)	---	18:82	4:96
Proglycogène synthétase (pmol glucose/mg protéines)	0	23,8	7,6
Macroglycogène synthétase (unités/mg protéines)	2-6	10-32	5-15

^a Animaux nourris au repos.

Tableau 7. Distribution tissulaire des composantes du système de synthèse du glycogène.

Tiré de Alonso et al. 1995.

Temps de resynthèse (heures)	Soluble	Insoluble
Diète forte en glucides		
0	13	87
4	15 ^a	85
24	31 ^{ab}	69
48	40 ^{ab}	60 ^{abc}
Diète faible en glucides		
0	11	89
4	12	88
24	15	85 ^{ab}
48	21	79 ^{ab}

Tableau 8. Contenu relatif en glycogène soluble et insoluble au traitement à l'acide lors de la resynthèse de glycogène, à la suite d'une dégradation causée par l'exercice, sous condition de diète à contenu élevé et faible en glucides.

Les valeurs sont exprimées selon le pourcentage relatif de chacune des fractions. *P < 0.05 vs ^a0 heure, ^b4 heures, et ^c24 heures. Adapté de Adamo et al. 1998.

Auteurs	Exercice	Temps	Résultats
Gaitanos et al. (1993)	Ergocycle (12,1 W/kg)	6 s	I.48 mmol/unités glucose/kg ps II.65% R, 35% S.
Bogdanis et al. (1998)	Ergocycle (9.9 W/kg)	20 s	I. 74 mmol/unités glucose/kg ps II. 84% R, 16% S.
Bogdanis et al. (1995)	Ergocycle (9,2 W/kg)	30 s	I.102 mmol/unités glucose/kg ps II. 84% R, 16% S.
Nevill et al. (1989)	Tapis roulant (5.8 W/kg)	30 s	I.91 mmol/unités glucose/kg ps II. 75% R, 25% S.
Cheetham et al. (1986)	Tapis roulant (6 W/kg)	30 s	I. 69 mmol/unités glucose/kg ps II. 80% R, 20% S.
Asp et al. (1999)	Course (marathon)	187 min	I.317 mmol/unités glucose/kg ps II. 44% R, 56% S.
Shearer et al. (2001)	Ergocycle (4.8 W/kg, 130% VO ₂ max)	90 s x 2	I. 214 (HL) et 108 (LL) (bouts 1 + 2) mmol/unités glucose/kg ps II. HL-Bout 1: 67% R, 33% S, Bout 2: 70% R, 30% S. LL-Bout-1: 60% R, 40% S, Bout 2: 56% R, 44% S.
Graham et al. (2001)	Ergocycle (100% VO ₂ max)	45 min	I. 121, 98 et 5 mmol/unités glucose/ kg ps II. 1-3 min 56% R, 44% S 2-4 min 67% R, 33 S et 3-3 min 100% R, 0% S.
Graham et al. (2001)	Ergocycle (70% VO ₂ max)	45 min	I. 73.5 et 152,5 mmol/unités glucose /kg ps II. 10 min 59% R, 41% S et 45 min 48% R, 52% S.
Graham et al. (2001)	Ergocycle (85% VO ₂ max)	Exh.	I. 126 et 256 mmol/unités glucose/ kg ps, 10 min et Épuisement. II. 10 min-82% R, 18% S, exh-70% R. 30% S.

Tableau 9. Catabolisme des fractions de glycogène résistantes (R) et solubles (S) au traitement à l'acide dans le muscle squelettique chez l'homme.

Adapté de Shearer & Graham 2002.

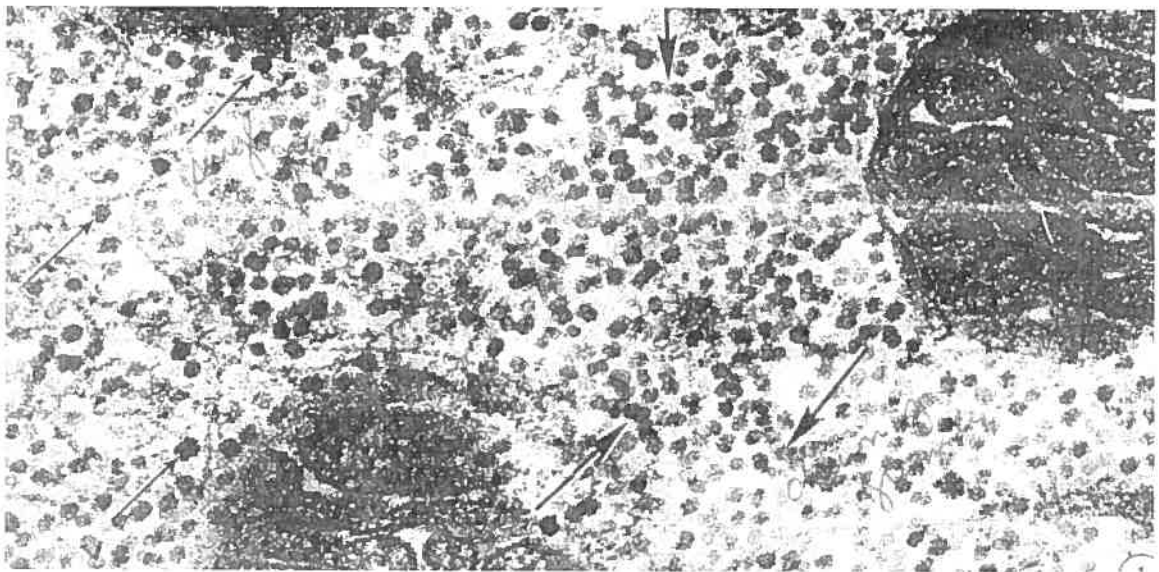


Figure 13a. Particule de 20-30 nm dans le cytosol.

À noter les granules simples (petites flèches) et les chaînes de granules (grosses flèches). Marqué au U/Pb. X 120 000. Tirée de Rybicka 1996.

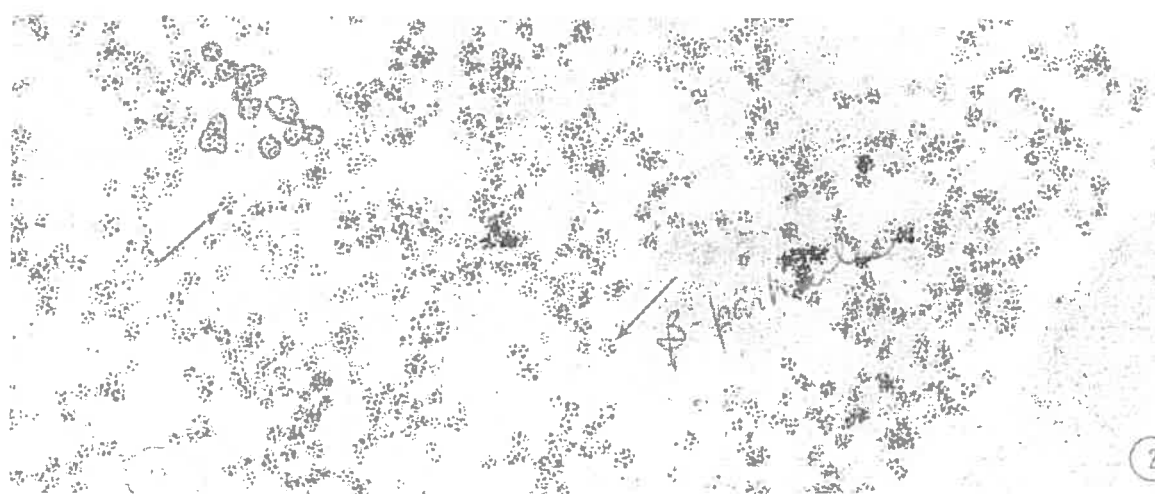


Figure 13b. Particules- β du glycogène.

Particules- β du glycogène composées de particules- γ de 2-3 nm dans le cytosol.
Marqué au PA-TSC-SP. X 120 000. Tirée de Rybicka 1996.



Figure 14a. Identification du glycosome.

Espace vide dans le cytosol démontre des taches irrégulières (blanches); quelques granules sont attachées à la membrane du RS (petites flèches). Marqué au U/Pb. X 120 000. Tirée de Rybicka 1996.

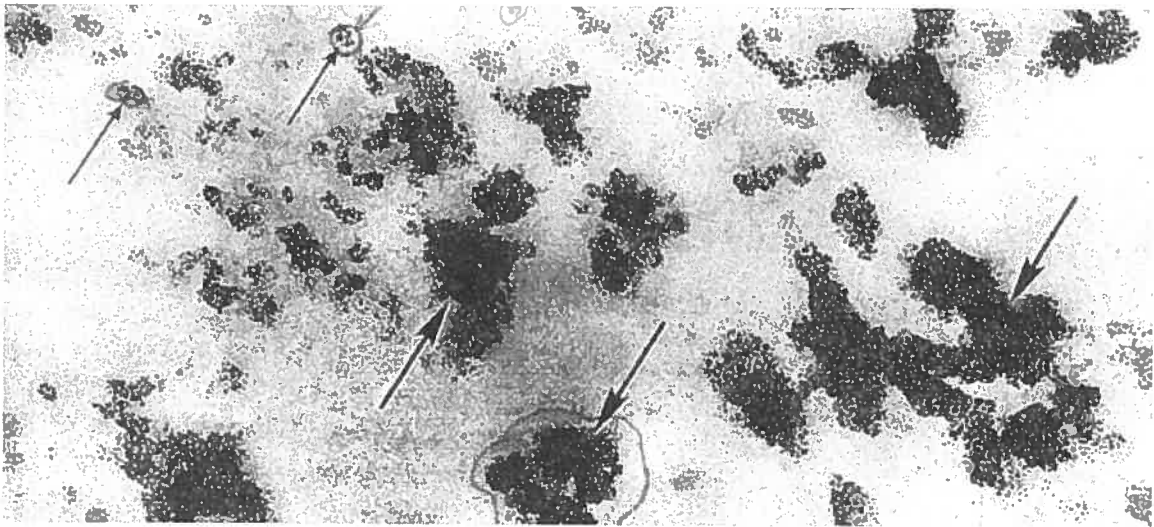


Figure 14b. Identification du glycosome.

Particules- γ agrégées en larges amas qui correspondent aux taches irrégulières de la figure 14a. Marqué au PA-TSC-SP. X 120 000. Tirée de Rybicka 1996.

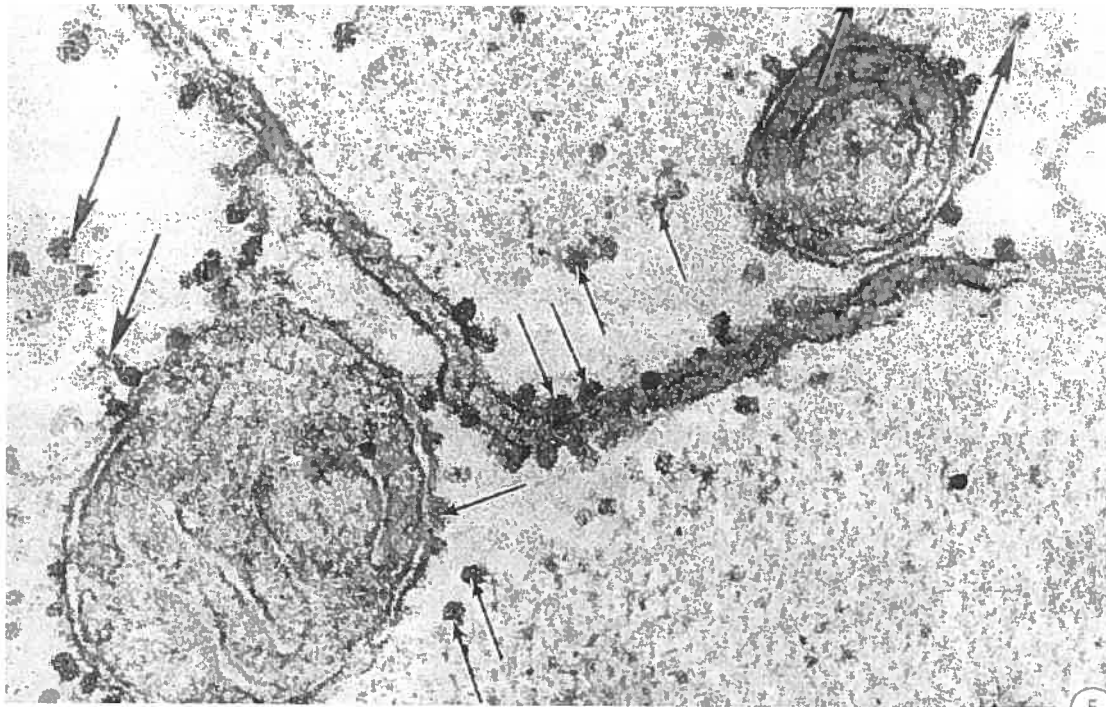


Figure 15. Identification des desmoglycosomes.

Glycosomes intacts démontrant un attachement aux mitochondries et aux citernes du RS dans le muscle (petites flèches) et aux protéines associées aux mitochondries (flèches larges). Les espaces libres démontrent que les glycosomes libres ont été détruits. Les tissus ont été traités en bloc avec de l'uranyl acetate et marqués en double avec du PA-TSC-SP et U/Pb. X 12 000. Tirée de Rybicka 1996.

CHAPITRE 2: ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats

RÉJEAN DROUIN¹, GENEVIÈVE ROBERT¹, MARTIN MILOT², DENIS
MASSICOTTE³, FRANÇOIS PÉRONNET¹, AND CAROLE LAVOIE²

From the ¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, PQ,
Canada H2W 1T8, ²Département des sciences de l'activité physique, Université du
Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, PQ, Canada G9A 5H7, and ³Département
de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal (Québec), H3C
3P8, Canada

Abbreviated title: Glucose output from perfused liver in trained rats

This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering
Research Council of Canada, and the Fonds pour la Formation des Chercheurs et
l'Aide à la Recherche (FCAR), Government of Quebec.

Corresponding author and reprints request:

Carole Lavoie, PhD; Département des Sciences de l'activité physique,
Université du Québec à Trois-Rivières, CP 500
Trois-Rivières, PQ, Canada, G9A 5H7

Tel.: (819) 376-5011 (3767) - Fax: (819) 376-5092 - e-mail: XXXXXXXXXX

ABSTRACT

The effect of endurance swim training (3-hour per day, 5 days/week, for 10 weeks) on glucose production (HGP) in liver perfused *in situ* for 60 min with glucagon and insulin, was studied in Sprague-Dawley rats. The experiments were performed in fed rats, and in rats fasted for 24 hours, but with lactate (8 mmol/l) added to the perfusion medium. No difference was obtained with liver glycogen content in trained and untrained animals in both nutritional conditions, but glycogen content was lower with fasting. Glucagon increased HGP in the four experimental groups, but the increases were more rapid and pronounced in trained than in untrained rats, in both fed and fasted states. Peak HGP values ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of liver WW) were higher in trained fed (2.24 ± 0.20 vs 1.78 ± 0.17 in untrained rats) than in trained fasted rats (1.03 ± 0.08 vs 0.68 ± 0.07 in untrained rats). When compared to untrained rats, the total amount of glucose released by the liver in response to glucagon in trained rats was ~30 % higher in the fed state, and ~45 % larger in the fasted state. These results suggest that endurance training not only increase basal gluconeogenesis but also increases the response of both glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon.

Key words: insulin-to-glucagon ratio, endurance training, glycogenolysis, gluconeogenesis

INTRODUCTION

SEVERAL STUDIES have shown that glucagon stimulates both liver glycogenolysis and gluconeogenesis (1-4), although glucose production from glycogenolysis is larger than that from gluconeogenesis upon stimulation with glucagon (1,3,4,5).

Hepatic glucose production (HGP) increases in response to prolonged exercise in humans (6,7) and rats (8,11) and appears to be primarily controlled by a reduction in the insulin-to-glucagon ratio (I/G) (10-13). Following endurance training, plasma glucose homeostasis during exercise is improved in spite of a higher I/G, both in humans (14-17) and rats (8,18,19), and this is mainly due to an increase in HGP (18,19). These observations are in line with data from Cheeks et al. (20), Podolin et al. (21) and Drouin et al. (22) indicating a higher HGP in response to glucagon in trained than untrained rats (20,21) and humans (22). Drouin et al. (22) have reported, at rest, following an 8-hour fast, a higher HGP within 10 min following initiation of glucagon infusion in trained than in untrained subjects. As for the preliminary report by Cheeks et al. (20), these authors observed a larger HGP from liver perfused *in situ* when stimulated with counterregulatory hormones including glucagon, and a mixture of glucose precursors, in trained than untrained fasted rats. Finally, Podolin et al. (21) reported a higher gluconeogenic capacity from lactate in liver slices from trained than untrained rats when incubated with glucagon. Recent data also show a higher density (24) and affinity (25) of glucagon receptors in plasma membranes isolated from hepatocytes in trained rats.

The purpose of the present experiment was to compare HGP from liver perfused *in situ* with glucagon in untrained and endurance swim trained rats. HGP under glucagon stimulation was measured in fed rats, with large glycogen stores, and in rats fasted for 24 hours, with very low glycogen stores but perfused with lactate as a glucose precursor. Depletion of liver glycogen stores with a 24-hr fasting period minimises HGP from glycogenolysis and, thus, allows to specifically observe HGP from gluconeogenesis (2,18,25,26). In contrast, in fed rats, with high liver glycogen stores, HGP is mainly due to glycogenolysis (2,27). We hypothesized that HGP during glucagon infusion will be higher in trained than in untrained rats both in fed and fasted conditions.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The experiment was conducted on male Sprague-Dawley rats (Anilab, Ste-Foy, Québec, Canada), which were kept in individual cages at 20 °C and 55 % relative humidity with a 12-h light/12-h dark cycle, in a facility that met the Canadian Council on Animal Care guidelines. They had free access to a standard rat chow, and tap water *ad libitum*. The Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières approved the protocol.

Training and experimental groups

The animals were randomly assigned to either the untrained or endurance-trained group. Trained animals swam in 60 x 90 cm tanks filled with 50 cm of water at 37 °C under constant supervision to prevent underwater swimming. The duration of each training session was progressively increased to three hours over the first two weeks. For the following eight weeks, the rats trained between 8:00 and 11:00 AM, five days per week. The animals assigned to the untrained group were handled daily.

The experiments were conducted between 8:00 and 11:00 AM, 48 h following the last bout of exercise for the trained group, either after an overnight with free access to food and water (fed animals), or after a 24-h fast with only access to tap water (fasted animals). Trained and untrained animals were randomly assigned to the fed (trained, n = 8; untrained, n = 8) or fasted groups (trained, n = 9, untrained, n = 9).

Liver perfusion

The animals were anesthetized with sodium pentobarbitate (50 mg/kg BW i.p.). The *rectus femoris* (right leg) was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for subsequent analysis. The portal vein and the inferior vena cava, as well as the bile duct were, then, cannulated (Johnson & Johnson Medical Inc., Arlington, TX) (28). The liver was perfused *in situ* at 8 ml•min⁻¹•100 g⁻¹ BW (Minipuls 3, Mandel Scientific Company Ltd. Guelph, Ont. Canada) (28) in single pass using Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) saturated with an oxygen/carbon dioxide mixture (95/5 %), albumin (2 %) and glucose (5 mmol/l) at 37 °C. To prevent lactate

appearance in the influent perfusate, no erythrocytes were added to the perfusion medium (28,29). However, in the fasted group, lactate (8 mmol/l) was added to the perfusate as a glucose precursor. When the flow through the liver had been established, the animal was sacrificed by sectioning the aorta.

Following a 40-min washout period, a small sample of the left lobe of the liver was removed for the measurement of glycogen content (5-10 mg in order to limit injury to the organ). The liver was, then, stimulated for 60 min with a combination of insulin and glucagon (Harvard Apparatus 22, St-Laurent, Quebec, Canada; Insulin and glucagon kindly provided by Eli Lilly, Mississauga, Ontario, Canada). The concentration of insulin and glucagon in the perfusate were 45.7 ± 2.2 pmol/l and 63.7 ± 3.1 pg/ml, respectively (radioimmunoassays : KTSP #11001 from Immunocorp, Québec, Canada and KGNDI double antibody from Inter-medico, Markham, Ontario, Canada). No liver damage occurred over the period of perfusion, as evidenced by steady bile flow (gravimetry; range 0.33 ± 0.03 to 0.76 ± 0.05 mg•min⁻¹•g of liver⁻¹), and by the low alanine aminotransferase concentration (range 1.2 ± 0.4 to 3.3 ± 1.1 U/l; threshold concentration for tissue damage >100 U/l (28)) in the effluent of the perfused liver (28,30). In addition, pH values (Accumet pHmeter 910, Fischer Scientific, Nepean, Ontario, Canada) of the effluent perfusate remained close to 7.4 in the four experimental conditions (fasting state: 7.36 ± 0.02 and 7.38 ± 0.01 and fed state: 7.37 ± 0.03 and 7.38 ± 0.01 in the untrained and trained groups, respectively). At the end of perfusion, the liver was quickly removed, weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for subsequent analysis.

Measurements

Glucose, lactate and alanine aminotransferase concentration (spectrophotometric assays, Sigma Diagnostics, St-Louis, MO) were measured in blood withdrawn from the vena cava before initiating the perfusion, and in the effluent from the perfused liver at regular intervals during the course of perfusion. Liver glycogen content was measured following acid hydrolysis according to the method described by Passoneau and Lauderdale (31). The activity of citrate synthase, as a marker of the training status, was determined in the *rectus femoris*, according to Srere (32).

Liver net glucose or lactate release ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of liver wet weight) was computed as the product of the perfusion rate ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}$ of liver⁻¹) by the glucose or lactate concentration gradient across the liver (portal vein vs vena cava) in $\mu\text{mol/ml}$.

Statistics

Data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The main effects of time and treatments (fed vs fasted, and trained vs untrained) as well as time-treatment interactions were tested by analysis of variance with repeated-measures over time. Newman Keuls post-hoc tests were used to identify the location of significant differences ($P \leq 0.05$) when the analysis of variance yielded a significant F ratio.

RESULTS

Body and liver weights

At the time of experiment, body mass was not significantly different between trained (fed: 447 ± 11 g; fasted: 442 ± 11 g) and untrained animals (fed: 453 ± 17 g; fasted: 420 ± 10 g), and was not significantly modified by the overnight fast. Liver mass were not significantly different in trained and untrained rats but was significantly lower in fasted rats (2.79 ± 0.05 % vs 3.62 ± 0.13 % body mass, $P < 0.05$). Citrate synthase activity in the *rectus femoris* was not modified by the overnight fast, but was 36 % higher in trained than in untrained rats (27.9 ± 1.6 vs 20.5 ± 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, $P \leq 0.05$). Basal liver glycogen content before initiation of perfusion with glucagon was not significantly different in trained and untrained fed rats, but was much higher in fed than fasted rats (Table 1).

Hepatic glucose production

Basal HGP before initiation of perfusion with glucagon was much higher in fed than fasted rats, but no significant difference was observed between trained and untrained rats, in fed (0.42 ± 0.10 and 0.63 ± 0.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of liver WW in trained and untrained rats, respectively) as well as in fasting state (0.24 ± 0.10 and 0.09 ± 0.05 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of liver WW in trained and untrained rats, respectively, Figure 1). Glucagon significantly increased HGP in the four experimental groups (Figure 1) but the increase was more pronounced in trained than in untrained rats. In

addition, when compared to untrained rats, the increase in HGP upon stimulation with glucagon occurred more quickly in fed and fasted trained rats (fed: 5 min vs 15 min; fasted: 5 min vs 10 min). Peak HGP values were higher in fed than in fasted rats, and were higher in trained than in untrained rats in both fed and fasted conditions (Figure 1).

Over the 60 min of perfusion with glucagon, the total amount of glucose released by the liver, computed from the area under the curve of HGP (Figure 2a), was significantly higher in trained than in untrained rats both fed (+31 %: 112.1 ± 7.1 vs 85.9 ± 12.2 $\mu\text{mol/g}$ of liver WW) and fasted (+46 %: 50.8 ± 4.4 vs 34.7 ± 3.6 $\mu\text{mol/g}$ of liver WW, Figure 2b). In addition, the total amount of glucose released from the liver over the 60-min period of perfusion with glucagon, both in untrained and trained rats, was ~60% higher in fed (34.7 ± 3.6 vs 85.9 ± 12.2 $\mu\text{mol/g}$ of liver WW) than fasted in rats (50.8 ± 4.4 vs 112.1 ± 7.1 $\mu\text{mol/g}$ of liver WW). At the end of the period of stimulation with glucagon, liver glycogen content was much lower in fed trained than untrained rats (Table 1). Changes in glycogen content in liver from fasted rats, if any, over the period of stimulation with glucagon, were closed to the limit of detection of the method (~ 25 $\mu\text{mol glycosyl units/g}$ of liver DW).

Lactate extraction

In fasted animals, the mean lactate extraction across the liver during glucagon stimulation was significantly 30 % ($P < 0.005$) higher in trained than untrained rats (2.69 ± 0.14 vs 2.06 ± 0.13 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of liver WW, respectively).

DISCUSSION

Results from the present study indicate that, when compared to untrained rats, the increase in HGP in response to glucagon is higher from liver from endurance-trained rats, in fasted as well as in fed states. These observations suggest that endurance training increases the response of both liver glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon.

There are only a limited number of studies describing possible changes in the response of HGP to glucagon with endurance training. Drouin et al. (22) have shown that when the secretion of endogenous insulin and glucagon were suppressed by somatostatin, HGP in response to insulin and glucagon infusion at rest ($I/G = 2.4-2.7$) was 53 % higher in endurance-trained than untrained subjects following a 8-hour fast. Preliminary data from Cheeks et al. (20), using liver perfused *in situ*, indicate that gluconeogenesis from various glucose precursors was respectively 1.2, 1.9 and 3.5 times higher upon stimulation with glucagon at increasing concentration (50, 500 and 5,000 pmol/l, respectively), infused along with norepinephrine (3.0 nmol/l), and epinephrine (2.0 nmol/l) in liver from endurance-trained rats, following a 24-hour fast. Finally Podolin et al. (21) have reported that gluconeogenic capacity from lactate was increased by 47% in response to glucagon (10^{-7} M) in liver slices from endurance trained rats.

In the present study, the livers were perfused with insulin and glucagon at concentrations within the physiologic range (33), with an I/G ratio of 2.9 ± 0.1 , or ~30 % the basal values observed in untrained and trained fed animals (23). With

similar value of I/G (~2.4; glucagon concentration = 88 pg/ml), Shiota et al. (33) have reported a net 2.2 fold increase in HGP in perfused liver from untrained fed rats, with peak values 30 min following the onset of glucagon administration. Results reported in the present study are well in line with these findings with a ~2.5 fold increase in HGP upon stimulation with glucagon, in fed untrained rats. The response of HGP was rapid (peak HGP at $1.78 \pm 0.17 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of liver at min 35) but was not sustained over the entire period of glucagon stimulation, and was associated with a marked 29 % decrease in liver glycogen content. In contrast, in untrained animals fasted for 24 h and, accordingly, with very small liver glycogen stores, administration of glucagon resulted in a slow increase in HGP which leveled-off at 15 min and remained sustained thereafter. The cumulative glucose output, computed from the total area under the curve of HGP in untrained fasted animals, was $35 \pm 4 \mu\text{mol}$ glucose/g of liver WW over the 60-min period of stimulation with glucagon (Figure 2b, lower panel). This value is more than twice larger than the amount of glucose present under the form of glycogen (Table 1) at the beginning of the experiment ($51 \pm 16 \mu\text{mol}$ glycosyl units/g of liver DW or $<15 \pm 4 \mu\text{mol}$ glycosyl units/g of liver WW (34)). These observations confirm that glycogenolysis and gluconeogenesis were the main source of glucose released in fed and fast animals, respectively, under stimulation with glucagon.

As for the effect of the ten-week endurance swim-training program on the stimulation of HGP by glucagon, observations made in fed rats indicate that when compared to untrained rats, HGP was faster and higher in trained rats upon

stimulation with glucagon. As expected, this was associated with a larger decline in liver glycogen content (66 % vs 28 % in the untrained group). The overall glucose release (Figure 2, upper panel) and liver glycogen breakdown (Table 1) in response to glucagon were, respectively, 31 % and 38 % higher in fed trained than untrained animals. Cherrington et al. (35) in anaesthetised dogs, and Vissing et al. (36) in exercising rats, have shown that liver glycogen breakdown upon stimulation with glucagon (35) or in response to exercise (36), was increased when liver glycogen content was increased. However, this mechanism cannot account for the observation made in the present experiment in fed rats, since the initial liver glycogen content was similar in untrained and trained animals. The larger glycogen breakdown observed in liver from trained than untrained rats, although the initial glycogen contents were similar in both groups, indicates that liver glycogenolysis was more responsive to glucagon following endurance training.

When livers from trained fasted animals were stimulated with glucagon, the total increase in HGP was 46 % larger than from liver from their untrained counterparts. This was associated with a 30 % significant larger lactate uptake. As discussed previously for the untrained animals, the very small glycogen content (Table 1) at the beginning of stimulation with glucagon cannot account for the large HGP observed in trained animals ($39 \pm 10 \mu\text{mol glucose/g}$ of liver DW or $<11 \pm 3 \mu\text{mol glycosyl units/g}$ of liver WW (34)). The larger HGP observed in trained than untrained animals, thus, confirms that endurance training increases the response of liver gluconeogenesis to glucagon as already suggested in a preliminary report by

Cheeks et al. (20) using perfused liver, and by data from Podolin et al. (21) using incubated liver slices.

Liver glucose output has been shown to be larger during exercise after endurance training (18,19) and this could be due to a higher response of the liver to glucagon. Recently, Bergman et al. (37) reported a two-fold increase in gluconeogenesis from lactate in fasted humans at rest after a 9-week endurance training (37). In addition, several authors have shown that endurance training increases gluconeogenesis in perfused liver or isolated hepatocytes from various glucose precursors without any hormonal stimulation (19,25,38,39). However, except for the studies by Podolin et al. (20) and Cheeks et al. (21), we are not aware of any data concerning the respective changes in the response of liver glycogenolysis and/or gluconeogenesis to glucagon following endurance training. Results from the present experiment confirm that endurance training not only increases basal gluconeogenesis but also basal glycogenolysis, and the response of both gluconeogenesis and glycogenolysis to glucagon.

The precise mechanisms by which endurance training increases HGP from glycogenolysis and gluconeogenesis both in the basal state and upon stimulation with glucagon remains to be determined. Except for the report by Galbo et al. (40) of a reduction in liver glycogen phosphorylase activity, there is paucity of data concerning possible changes in key enzymes regulating liver glycogenolysis following endurance training. As for gluconeogenesis, several studies have failed to show any increase in the activity of key enzymes regulating this pathway (38,39,41,42). However, Burelle et al. (38) have shown that an increased capacity of alanine transport, and an

increased transamination of alanine into pyruvate in isolated hepatocytes, could be responsible for the larger basal gluconeogenic flux observed from alanine in endurance-trained rats. As for the effect of glucagon, data from Légaré et al. (23) and Podolin et al. (24) indicate, respectively, a 39 % higher density and a twofold greater affinity of glucagon receptors in plasma membranes purified from liver in trained than untrained rats. These changes in glucagon receptors are well within the range of those observed in the present experiment for HGP in response to glucagon following swim-training, both in the fed and fasted states. It could, thus, be suggested that the increase response of both liver glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon following endurance training could be mainly due to the increased density and affinity of glucagon receptors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Mrs Rollande Caron of the Animal Care Unit of Université du Québec à Trois-Rivières, and to Eli Lilly Canada for kindly providing the glucagon. This study was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Government of Quebec.

Réjean Drouin was a recipient of a doctoral scholarship from the Fonds FCAR.

REFERENCES

1. Cherrington DA, Williams PE, Shulman GI, Lacy WW: Differential time course of glucagon's effect on glycogenolysis and gluconeogenesis in the conscious dog. *Diabetes* 30:180-187,1981.
2. Beuers U, Jungermann K: Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to basal, glucagon- and nerve stimulation-dependent glucose output in the perfused liver from fed and fasted rats. *Biochem Int* 21:405-415,1990.
3. Stevenson RW, Steiner KE, Davis MA, Hendrick GK, Williams PE, Lacy WW, Brown L, Donahue P, Lacy PB, Cherrington DA: Similar dose responsiveness of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis to glucagon in vivo. *Diabetes* 36:382-389, 1987.
4. Chhiber VL, Soriano C, Tayek JA: Effects of low-dose and high-dose glucagon on glucose production and gluconeogenesis in humans. *Metabolism* 49: 39-46,2000.
5. Magnusson I, Rothman DL, Gerard DP, Katz LD, Shulman GI: Contribution of hepatic glycogenolysis to glucose production in humans in response to a physiological increase in plasma glucagon concentration. *Diabetes*. 44:185-189,1995.

6. Ahlborg G, Felig P, Hagenfeldt L, Hendler R, Wahren J: Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest* 53: 1080-1090,1974.
7. Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H, Chiasson JL: Glucose metabolism during exercise in man: the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 26-35,1997.
8. Galbo H, Richter EA, Holst JJ, Christensen NJ; Diminished hormonal responses to exercise in trained rats. *J Appl Physiol* 43 : 953-958,1977.
9. Wiersma MM, Vissing J, Steffens AB, Galbo H: Effects of glucose infusion on hormone secretion and hepatic glucose production during heavy exercise. *Am J Physiol* 265 : R1333-1338,1993.
10. Fradkin J, Shamoon H, Felig P, Sherwin RS: Evidence for an important role of changes in, rather than absolute concentrations of glucagon in the regulation of glucose production in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 698-703,1980.
11. Issekutz B, Vranic M: Role of glucagon in regulation of glucose production in exercising dogs. *Am J Physiol* 238 : E13-E20,1980.

12. Wasserman DH, Spalding JA, Lacy DB, Colburn CA, Goldstein RE, Cherrington AD: Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol* 66: 318-322,1989.
13. Wasserman, DH, O'Doherty RM, Zinker BA: Role of endocrine pancreas in control of fuel metabolism by the liver during exercise. *Int J Obes* 196:S22-S30, 1995.
14. Bloom SR, Johnson RH, Park DM, Rennie MJ, Sulaiman WR: Differences in the metabolic and hormonal response to exercise between racing cyclists and untrained individuals *J Physiol* 258:1-18,1976.
15. Coggan AR, Swanson SC, Mendenhall LA, Habash DL, Kien CL: Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* 268:E375-E383,1995.
16. Gyntelberg F, Rennie MJ, Hickson RC, Holloszy JO: Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise. *J Appl Physiol* 43 :302-305,1977.
17. Brooks GA, Donovan CM: Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am J Physiol* 244: E505-E512,1983.

18. Donovan CM, Sumida KD: Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am J Physiol* 258:R770-R776,1990.
19. Donovan CM, Sumida KD: Training enhanced hepatic gluconeogenesis: the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 29: 628-634,1997.
20. Cheeks AM, Hevener AH, Donovan CM: Enhanced hepatic gluconeogenic response to elevations in glucagon with endurance training. *Med Sports Sci* 28: S58,1996 (Abstract).
21. Podolin DA, Gleeson TT, Mazzeo RS: Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis: influence of age and training. *Am J Physiol* 270:R365-R372,1996.
22. Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, Chiasson JL: Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol* 274 :E23-E28,1998.
23. Légaré A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Péronnet F, Massicotte G, Lavoie C: Increased density of glucagon receptors in liver from endurance trained rats. *Am J Physiol* 280: E193-E196,2001.

24. Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS, Roth DA: Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol* 281:E516-E523,2001.
25. Sumida KD, Urdiales JH, Donovan CM: Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J Appl Physiol* 74 : 782-787,1993.
26. Winder WW, Beattie MA, Holman RT: Endurance training attenuates stress hormone responses to exercise in fasted rats. *Am J Physiol.* 243:R179-R184, 1982.
27. Borba-Murad GR, de Souza HM, Lopes G, Ferreira EB, Dambroso D, Bazotte RB: Changes in glycemia induced by exercise in rats: contribution of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 102:113-123,1998.
28. Gores GJ, Gregory J, Kost LJ, La Russo FN: The isolated perfused rat liver: Conceptual and practical considerations. *Hepatology* 6: 511-517,1986.
29. Ceddia RB, Lopes G, Souza HM, Borba-Murad GR, William WN Jr, Bazotte RB, Curi R: Acute effects of leptin on glucose metabolism of *in situ* rats perfused livers and isolated hepatocytes. *Int J Obesity* 23:1207-1212,1999.

30. Bell R, Shiel AG, Dolan P, Mears DC, Woodman K: The evaluation of the isolated perfused liver as a model for the assessment of liver preservation. *Aust N Z J Surg* 63:44-52,1993.
31. Passoneau JV, Lauderdale VR: A comparison of three methods of glycogen measurements in tissues. *Analytical Biochemistry* 60: 405-412,1974.
32. Srere PA: Citrate Synthase. *Methods Enzymol* 13:3-5,1969.
33. Shiota MR, Green RC, Colburn G, Mitchell G, Cherrington AD: Inability of hyperglycemia to counter the ability of glucagon to increase net glucose output and activate glycogen phosphorylase in the perfused rat liver. *Metabolism* 45: 481-485,1996.
34. Ali AM, Roussouw HC, Silove M, Walt JG: Development of an improved technique for the perfusion of the isolated caudal lobe of sheep liver. *Exp Physiol* 85:469-478, 2000.
35. Cherrington AD, Diamond MD, Green DR, William PE: Evidence for intra-hepatic contribution to the waning effect of glucagon on glucose production in the conscious dog. *Diabetes* 31: 917-922,1982.

36. Vissing J, Wallace JL, Galbo H: Effect of liver glycogen content on glucose production in running rats. *J Appl Physiol* 66: 318-322,1989.
37. Bergman BC, Homing MA, Casazza GA, Wolfel EE, Butterfield GE, Brooks GA: Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am J Physiol* 278:E244-E251,2000.
38. Burelle Y, Fillipi C, Péronnet F, Leverve X: Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am J Physiol* 278: E35-E42,2000.
39. Sumida KD, Urdiales JH, Donovan CM: Enhanced hepatic gluconeogenesis capacity for selected precursors after endurance training. *J Appl Physiol* 79: 1883-1888,1995.
40. Galbo H, Saugmann P, Richter EA: Increased hepatic glycogen synthetase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol Scand* 107:269-272,1979.
41. Horn DB, Podolin DA, Friedman JE, Scholnick DA, Mazzeo RS: Alterations in key gluconeogenic regulators with age and endurance training. *Metabolism* 46: 414-419, 1997.

42. Huston RL, Weiser PC, Dohm GL, Askew EW, Boyd JB: Effects of training, exercise and diet on muscle glycolysis and liver gluconeogenesis. *Life Sci* 17:369-376,1975.

Figure legends:

Figure 1. Glucose production in response to glucagon in perfused liver from trained and untrained, fed or fasted rats. Values are means \pm SEM. Glucagon significantly increased hepatic glucose production (HGP) in all groups; the values observed in trained rats are significantly higher than those observed in untrained rats, in both conditions; the values observed in fed rats are significantly higher than those observed in fasted rats in both untrained and trained conditions (main effects; $P < 0.05$).

Figure 2. Total glucose production computed from area under the curve (AUC) in response to glucagon in perfused liver from trained and untrained, fed (upper panel) or fasted (lower panel) rats. Values are means \pm SEM; significantly higher than fasted rats (a), and untrained rats (b) ($P < 0.05$).

Table 1. Liver glycogen content (μmol glycosyl units/g of liver DW) before and after stimulation with glucagon in untrained and trained fed and fasted rats. Values are mean \pm SEM.

	Untrained		Trained	
	Fed	Fasted	Fed	Fasted
Before	737 \pm 39	51 \pm 16 ^b	832 \pm 39	39 \pm 10 ^b
After	527 \pm 52 ^a	ND	208 \pm 86 ^{a,c}	ND

Significantly different from before (a), from fed rats (b), and from untrained rats (c), $P < 0.05$.

Figure 1

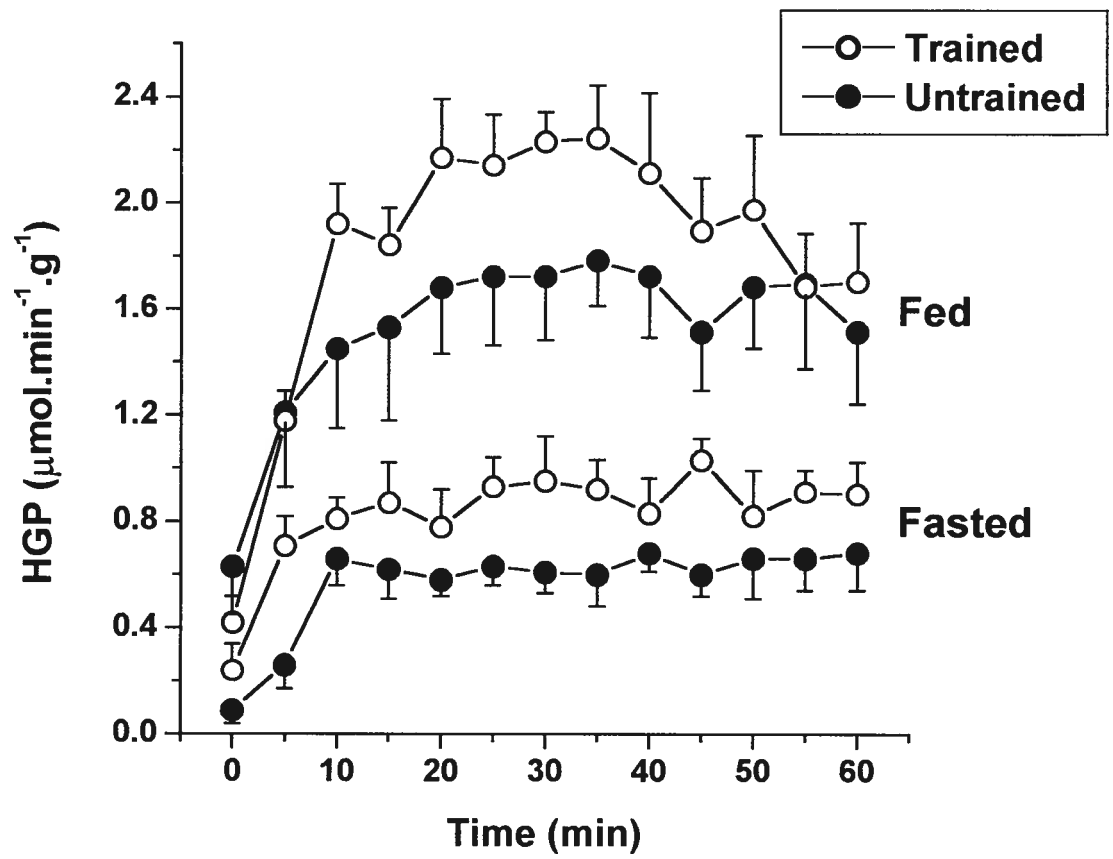
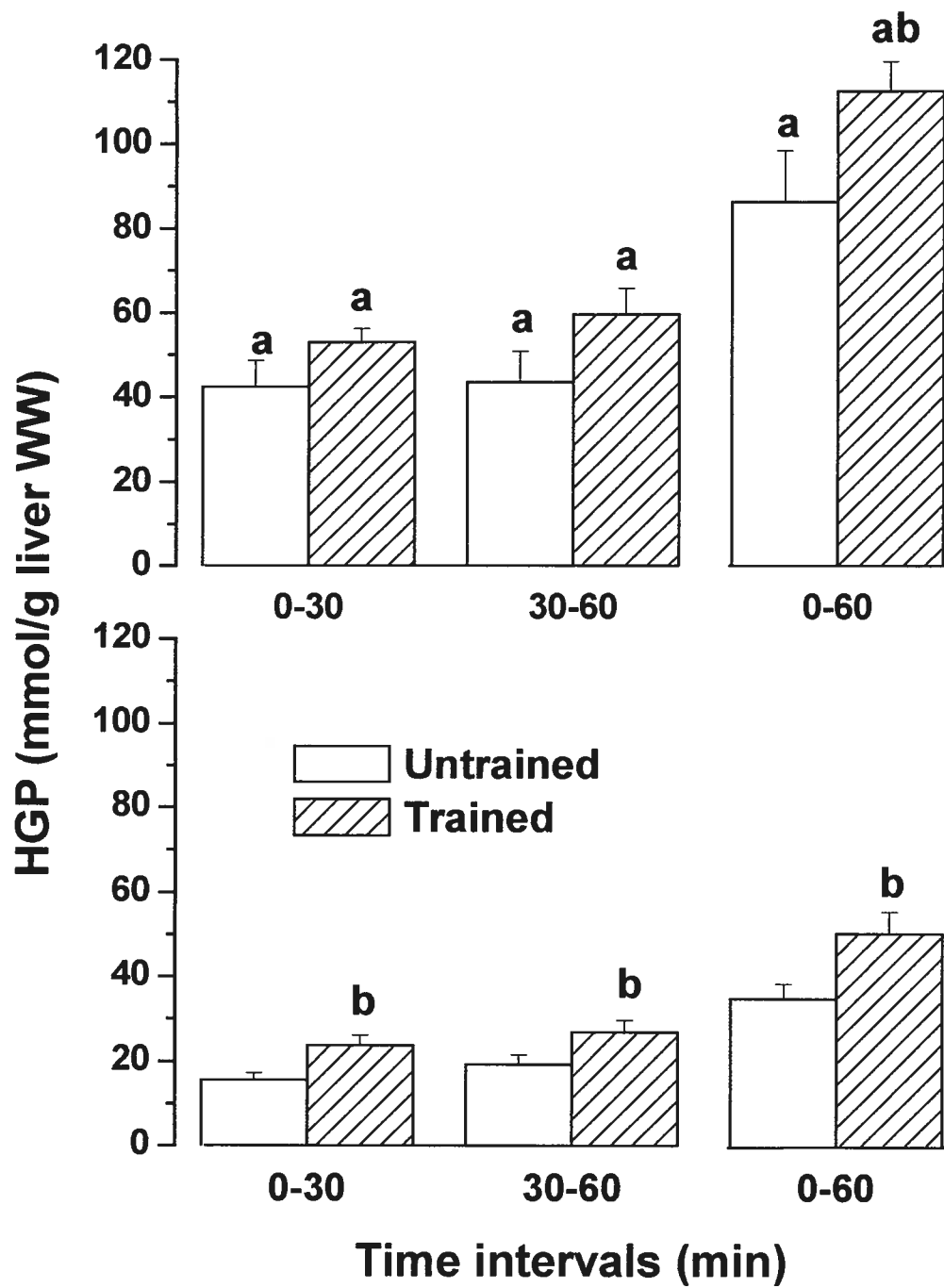


Figure 2



*Production hépatique de glucose induite par le glucagon chez des rats diabétiques
traités à l'insuline et entraînés en endurance*

¹Réjean Drouin, ¹Geneviève Robert, ²Martin Milot, ³Denis Massicotte, ¹François
Péronnet et ²Carole Lavoie

¹Département de kinésiologie, Université de Montréal
Montréal (Québec), H3C 3J7, Canada

²Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Trois-
Rivières, Trois-Rivières (Québec), G9A 5H7, Canada

³Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal
(Québec), H3C 3P9, Canada

Rapport de Recherche

2004-03-05

Résumé

L'effet de l'entraînement en endurance (3 heures/jour, 5 jours/semaine, 10 semaines) sur les propriétés de liaison des récepteurs au glucagon ainsi que sur la production hépatique de glucose (PHG) de foie de rats diabétiques, traités à l'insuline, perfusé *in situ* pendant 60 minutes avec du glucagon et de l'insuline était étudié chez des rats Sprague-Dawley. Le diabète était induit par injection intra-péritonéale de streptozotocine (80 mg/kg). Le foie de rats nourris et à jeun (24 heures) avec l'addition de lactate dans le perfusat (8 mmol/l) était perfusé. Avant le début de la stimulation au glucagon, aucune différence significative n'était observée concernant les concentrations hépatiques de glycogène, mais les concentrations étaient supérieures chez les animaux nourris. La stimulation au glucagon augmentait la PHG dans les 4 groupes expérimentaux. Cependant, la PHG était supérieure chez les animaux diabétiques à jeun entraînés comparativement aux animaux diabétiques à jeun et sédentaires, tandis qu'aucune différence significative n'était observée entre les animaux nourris entraînés et sédentaires. De plus, aucune différence significative n'était observée concernant les propriétés de liaison de récepteur au glucagon (densité et affinité) entre les deux groupes expérimentaux. Ces résultats suggèrent que l'entraînement en endurance augmente le taux de la néoglucogenèse induite par le glucagon, sans modifier le taux de la glycolyse chez les rats diabétiques traités à l'insuline. De plus, chez cette population, l'entraînement en endurance n'a pas modifié les propriétés de liaisons du récepteur au glucagon.

Introduction

Les recommandations à la suite de la publication du *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (1993) et de l'*Association canadienne du diabète* (Miltzer 1998) préconisent un traitement plus intensif à l'insuline chez les sujets diabétiques de type 1. Cependant, ces recommandations plus strictes ne sont pas sans augmenter la fréquence des hypoglycémies (DCCT 1993, Bolli 1999, Cryer 1999, 2000, Miltzer 1998) ce qui est, selon certains chercheurs, dû à une faiblesse contre-régulatoire observée chez les sujets diabétiques sous traitement plus intensif à l'insuline (Amiel 1988, Simonson 1985). Les principaux mécanismes de contre-régulation sont la sécrétion de glucagon (Cryer 1982, 2000,2003, Gerich 1980) et d'adrénaline (Shamoon 1981, Rizza 1980, Saccà 1980), qui tous deux stimulent la production hépatique de glucose (PHG) limitant aussi les périodes d'hypoglycémie. Or, bien que l'absence de glucagon et la diminution de la sécrétion d'adrénaline sont toutes deux observées chez les sujets diabétiques traités à l'insuline (Cryer 1985, 1986), la déficience de la réponse contre-régulatoire communément observée chez les sujets traités intensivement à l'insuline semblerait résulter majoritairement de la défaillance du glucagon à stimuler la PHG (Bolli 1990, Cryer 2003).

L'habileté physiologique du glucagon à stimuler la PHG et à prévenir les hypoglycémies chez le sujet sain et diabétique (Gerich 1988), chez le chien (Dobbin 1991, Lussier 1986) et le rat (Wan 2000, Brand 1995) est bien caractérisée. Cependant, Orskov et al. (1991) ont démontré que lorsque stimulés au glucagon à une

concentration physiologique, les sujets diabétiques, traités à l'insuline, ont une capacité globale diminuée de la PHG se traduisant par une réponse irrégulière et plus faible. Cette irrégularité augmente ainsi la prédisposition aux hypoglycémies des sujets diabétiques traités à l'insuline. Au contraire, en utilisant un protocole basé sur celui de Orskov et al. (1991), nous avons montré chez l'homme et le rat entraînés en endurance, une augmentation de la PHG induite par le glucagon au repos (Drouin et al. 1998, 2004). La caractérisation de l'effet de l'entraînement en endurance par une technique de perfusion de foie *in situ* chez le rat a montré que l'entraînement en endurance augmente les réponses glycogénolytique et néogluco-génique sous stimulation au glucagon (Drouin et al. 2004). De plus, des résultats récents de notre laboratoire indiquent que l'augmentation de la sensibilité du foie au glucagon provient en partie de l'augmentation de la densité des récepteurs au glucagon (Légaré et al. 2001).

L'entraînement en endurance augmente la sensibilité du foie au glucagon et celle-ci est diminuée chez les sujets diabétiques traités à l'insuline. À notre connaissance, il n'existe aucune donnée concernant l'effet de l'entraînement en endurance sur la sensibilité du foie au glucagon chez l'homme ou l'animal diabétique de type 1 traité à l'insuline. Le but de la présente étude était donc de documenter l'effet de l'entraînement en endurance sur la réponse hépatique au glucagon chez des animaux diabétiques traités à l'insuline. Spécifiquement, en utilisant un système de perfusion de foie *in situ*, nous avons mesuré la PHG induite par le glucagon suivant l'entraînement en endurance chez des rats diabétiques traités à l'insuline à jeun et

nourris. De plus, l'effet de l'entraînement en endurance a été mesuré sur les propriétés de liaison du récepteur au glucagon chez des animaux diabétiques traités à l'insuline.

Méthodologie

Animaux

Des rats mâles Wistar (Charles River, Canada) étaient isolés dans des cages individuelles sous une température constante de 20°C et à une humidité relative de 55% sous un cycle jour/nuit de 12 heures dans un établissement respectant les normes du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA). Le protocole de recherche a été approuvé par le Comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Chez les animaux sains, le diabète était induit par l'injection (80 mg/kg de poids corporel) intra-péritonéale de streptozotocine (Sigma Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), fraîchement dissout dans 10 mmol/L de tampon citrate (pH 4.5) avant l'utilisation. Afin d'éviter les hypoglycémies, une solution de dextrose (10%) était disponible pour les animaux durant une période de 48 heures suivant l'injection de la streptozotocine. Après cette période, la glycémie (Precision QID, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) des rats ainsi que le niveau de corps cétoniques (Chemstrip UGK, Roche Diagnostic, Laval QC, Canada) étaient évalués

quotidiennement. Une glycémie de plus de 15 mmol/L accompagnée d'une apparition de corps cétonique confirmaient la présence du diabète. Une semaine après l'injection de streptozotocine, la glycémie était normalisée via l'administration sous-cutanée d'insuline (Iletin II NPH, Eli Lilly Canada) deux fois par jour (8h00 et 20h00). Après une semaine de traitement à l'insuline, les animaux diabétiques étaient aléatoirement affectés au groupe sédentaire ou entraîné. Le besoin quotidien en insuline était ajusté selon le poids corporel (Figure 1) et la glycémie au moment de l'injection (Figure 2). Les animaux diabétiques entraînés demandaient moins d'insuline que les animaux diabétiques sédentaires.

Entraînement

L'entraînement consistait à des périodes de nage de 3 heures, 5 jours par semaine pendant 10 semaines. Les deux premières semaines consistaient en une période d'adaptation où l'animal était amené à nager progressivement jusqu'à 3 heures par jour. Pendant les huit semaines suivantes, les rats nageaient de 8h00 à 11h00. Les animaux sédentaires étaient manipulés quotidiennement. L'expérimentation se déroulait entre 8h00 et 11h00, soit 48 heures après la dernière séance d'exercice, suivant une nuit de jeûne ou une nuit de libre accès à la nourriture (nourris). Dans les deux conditions, la dernière injection d'insuline était administrée 12 heures avant la perfusion du foie (20h00).

Perfusion du foie

Au moment de l'étude, les animaux étaient anesthésiés avec du pentobarbitale (50 mg/kg ip). Une portion du lobe gauche du foie ainsi que le *rectus femoris* (patte droite) étaient prélevés et congelés dans l'azote liquide pour analyse. La veine porte, la veine cave inférieure (au niveau rénal) ainsi que le canal biliaire étaient canulés (catéter IV, Jonhson & Jonhson Medical Inc. Arlington, TX). Par la suite, le foie était perfusé *in situ* à un taux de $6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Minipuls 3, Mandel Scientific Compagny Ltd) (Gores 1986) avec une solution Krebs (37°C, pH 7.4) oxygénée (95% O₂ : 5% CO₂) contenant de l'albumine (2%) et du glucose (5 mmol/L) pour une période de lavage de 40 minutes. Afin de prévenir l'apparition de lactate dans le perfusat influent, la solution était dépourvue d'érythrocytes (Gores 1986, Nemezc 1999). Cependant, pour les groupes à jeun, du lactate (8 mmol/L) était ajouté au perfusat comme précurseur de glucose. Une fois la perfusion bien établie, l'animal était sacrifié par sectionnement de l'aorte.

Suivant la période de 40 minutes de lavage, le foie était alors stimulé pendant 60 minutes avec une combinaison d'insuline et de glucagon (50 pmol/L et 70 pg/ml, respectivement, gracieuseté d'Eli Lilly, Mississauga, ON, Canada : Harvard Apparatus 22). Aucun dommage au foie n'était enregistré comme le démontrait la production constante de bile ainsi que la stabilité du pH du perfusat à la sortie du foie (Accumet pH Meter 910, Fisher Scientific) (Gores 1986) (Table 1). À la fin de la perfusion, le foie était extrait et rapidement déposé dans l'azote liquide, pesé et entreposé à -80°C pour des analyses futures.

Récepteurs et radioliation

Un groupe d'animaux (sédentaires et entraînés) était anesthésié avec du pentobarbital (50 mg/kg i.p.) suivant une nuit de libre accès à la nourriture, 48 heures suivant la dernière séance d'exercice pour les animaux entraînés et 12 heures après la dernière dose d'insuline. Les membranes plasmiques hépatiques étaient préparées selon la procédure développée par Persson & Jergil (1992) et décrite en détail dans l'étude de Légaré et al. (2001).

Mesures

Les concentrations de glucose, de lactate (spectrophotométrie, Sigma Diagnostics, St-Louis, MO), d'insuline et de glucagon (essais radio immunologiques; Medicorp Montréal, Québec Canada; et Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, respectivement) étaient mesurées dans le sang prélevé à partir de la veine cave inférieure avant le début de la perfusion et dans le perfusat avant son entrée dans le foie à des intervalles réguliers. Le contenu en glycogène du foie était évalué par hydrolyse à l'acide selon une méthode développée par Passoneau et Lauderdale (1974). L'activité de la citrate synthétase était mesurée dans le *rectus femoris* selon la technique de Srere (1969).

La captation ou le relâchement par le foie de métabolites ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie) était calculé comme le produit du taux de perfusion ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie) par le

gradient de concentration du métabolite en aval et en amont du foie (veine porte et veine cave) ($\mu\text{mol/ml}$).

Statistiques

Les résultats sont présentés selon la moyenne \pm erreur standard de la moyenne. La comparaison entre deux groupes était effectuée par l'application du test-*t* du Student et le taux de signification était établi à $P \leq 0.05$. L'effet principal du temps et des traitements (nourris vs à jeun, et entraînés vs sédentaires) ainsi que l'interaction temps-traitement ont été évalués par analyse de variance avec mesures répétées dans le temps. Un test post-hoc Newman Keuls a été utilisé pour identifier la localisation des différences significatives ($P \leq 0.05$) lorsque l'analyse de variance résultait en un ratio F significatif.

Résultats

L'entraînement en endurance combiné avec le traitement à l'insuline résultaient en un poids corporel inférieur (432 ± 7 vs 498 ± 9 g chez les animaux entraînés et sédentaires, respectivement, $P < 0,05$). La progression du poids corporel en cours d'expérimentation était également modifiée par l'entraînement en endurance (Figure 1). Les animaux sédentaires atteignaient un poids corporel supérieur, et ce, à partir de la sixième semaine de traitement ($P < 0,05$). De plus, pour atteindre une glycémie normale (~ 9 mmol/L, Figure 2), les animaux entraînés nécessitaient une quantité

moins d'insuline ($6,7 \pm 0,3$ et $9,4 \pm 0,2$ U/kg chez les animaux entraînés et sédentaires, respectivement, $P < 0,05$, Figure 1). L'activité de la citrate synthétase dans le *rectus femoris* n'était pas modifiée par le jeûne, mais était 14% supérieure chez les animaux entraînés comparativement aux animaux sédentaires ($29,4 \pm 2,6$ vs $25,3 \pm 1,9$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie, $P < 0,05$). De plus, le traitement à l'insuline a permis de rétablir le contenu hépatique en glycogène dans les deux groupes (841 ± 68 et 1335 ± 210 μmol unités glucose/ g poids sec de foie chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement, $P < 0,05$).

Chez les animaux nourris, la sortie de glucose avant la stimulation au glucagon était significativement supérieure ($P < 0,05$) chez les animaux entraînés (Figure 3). De plus, en cours de perfusion, la sortie de glucose était supérieure chez les animaux nourris comparativement aux animaux à jeun (Figure 3). L'infusion du glucagon augmentait la production hépatique de glucose (PHG) dans les quatre groupes (Figure 3). Dans les deux conditions nutritionnelles, nourris et à jeun, l'augmentation de la PHG était plus rapide chez les animaux entraînés. Cependant, les valeurs maximales étaient supérieures chez les animaux nourris ($3,92 \pm 0,29$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie à 60 minutes vs $2,71 \pm 0,31$ chez les animaux sédentaires) comparativement aux animaux à jeun ($1,27 \pm 0,29$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie à 45 minutes chez les animaux entraînés vs $0,79 \pm 0,21$ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie à 50 minutes chez les animaux sédentaires).

Durant les 30 premières minutes de perfusion avec le glucagon, la quantité totale de glucose relâchée par le foie, calculée selon l'aire sous la courbe de PHG à partir de la valeur de base avant la stimulation au glucagon (Tableau 4), n'était pas significativement différente entre les animaux entraînés ($37,8 \pm 3,8 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie) et sédentaires ($24,8 \pm 8,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie). De plus, aucune différence significative était observée pour les 30 minutes suivantes ou pour la totalité de la période de stimulation au glucagon ($57,2 \pm 15,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie et $48,7 \pm 16,4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie chez les animaux nourris entraînés et sédentaires, respectivement). Au contraire, chez les animaux à jeun, la quantité totale de glucose relâchée par le foie était supérieure ($P < 0,05$) chez les animaux entraînés lors des 30 premières minutes ($13,5 \pm 3,9$ vs $2,4 \pm 2,3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie, chez les animaux entraînés et sédentaires, respectivement) (Tableau 4).

La variation de la concentration de glycogène hépatique des rats à jeun était sous le seuil de détection ($\sim 10 \mu\text{mol}$ d'unités glucose/ g poids humide). Pour les animaux nourris, la réduction de la quantité de glycogène hépatique à la fin de la période de perfusion avec le glucagon était supérieure, mais non significative, chez les animaux entraînés ($115 \pm 25 \mu\text{mol}$ unités glucose/ g poids humide) et sédentaires ($73 \pm 20 \mu\text{mol}$ unités glucose/ g poids humide) (Tableau 2).

Chez les rats à jeun, la concentration de lactate dans le perfusé entrant dans le foie était similaire chez les rats sédentaires et entraînés ($8,95 \pm 0,37 \text{ mmol/L}$).

L'extraction de lactate par le foie était également similaire entre les deux groupes (Tableau 2).

En ce qui concerne les propriétés de liaison du récepteur au glucagon (Tableau 3), aucune différence significative n'était observée pour le Bmax ($3,38 \pm 0,48$ et $4,87 \pm 1,44$, chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) et le Kd ($1,02 \pm 0,10$ et $0,91 \pm 0,10$, chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement).

Discussion

Les résultats de cette étude montrent que chez les rats diabétiques traités à l'insuline, normoglycémiques, le foie des rats, entraînés et nourris lorsque perfusé *in situ* avec du glucagon, répond d'une façon plus régulière que celui des rats sédentaires. De plus, la PHG de rats diabétiques entraînés et à jeun était plus prononcée que celle des rats diabétiques traités à l'insuline, sédentaires et à jeun. Ces observations suggèrent que l'entraînement en endurance chez des rats diabétiques traités à l'insuline régularise la réponse glycogénolytique et augmente la réponse de la néoglucogenèse, sans toutefois, modifier significativement les propriétés de liaison du récepteur au glucagon.

Les concentrations sanguines de glucagon ($76,1 \pm 7,1$ et $65,2 \pm 5,5$ pg/ml chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) et d'insuline ($32,5 \pm 8,0$ et $31,8 \pm 2,8$ pg/ml chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) étaient similaires entre les groupes entraînés et sédentaires à la fin de la période de 10 semaines d'entraînement. Donc, ce qui était étudié sous perfusion était l'effet d'une stimulation au glucagon à une concentration équivalente à celle observée dans la dernière semaine d'entraînement.

Il y a peu d'études concernant le possible changement de sensibilité du foie au glucagon avec l'entraînement en endurance ou le diabète. À la suite d'un

entraînement en endurance, Drouin et al. (1998) ont montré que lorsque la sécrétion endogène d'insuline et de glucagon était supprimée avec la somatostatine, la PHG en réponse à une combinaison d'insuline et de glucagon (I/G: 2,4-2,7) était 53% supérieure chez les sujets entraînés en endurance comparativement aux sujets sédentaires ($15,8 \pm 2,8$ vs $7,4 \pm 1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivement). De plus, afin de caractériser l'effet de l'entraînement en endurance sur la PHG induite par le glucagon, en utilisant un système de perfusion du foie *in situ*, similaire à la présente étude, Drouin et al. (2004) ont observé, chez l'animal sain entraîné en endurance, une augmentation de la glycogénolyse de 23% ($112,1 \pm 7,1$ vs $85,9 \pm 12,2 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de foie, chez les animaux entraînés et sédentaires, respectivement) et de la néoglucogenèse de 32% ($50,8 \pm 4,4$ vs $34,7 \pm 3,6 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de foie, chez les animaux entraînés et sédentaires, respectivement) sous stimulation au glucagon (I/G: $2,9 \pm 0,1$). Dans le même sens, Cheeks et al. (1996), en utilisant un système de perfusion du foie, indiquaient que la néoglucogenèse à partir du lactate augmentait jusqu'à 350% sous stimulation avec une combinaison de glucagon (50 à 5000 pmol/L), de noradrénaline (3,0 nmol/L) et d'adrénaline (2,0 nmol/L) dans le foie de rats entraînés en endurance.

Avec le diabète traité à l'insuline, il n'y a aucune donnée sur l'effet de l'entraînement en endurance sur l'augmentation de la PHG sous stimulation au glucagon. Cependant, Orskov et al (1991) ont montré que sous stimulation au glucagon, à des concentrations physiologiques, les sujets diabétiques traités à l'insuline possédaient

une réponse globale diminuée et irrégulière de la PHG dans le temps, comparativement aux sujets témoins.

Dans la présente étude, le foie des animaux des différents groupes était perfusé avec une combinaison d'insuline et de glucagon dans les concentrations physiologiques (48 ± 2 pmol/L et 67 ± 14 pg/ml, respectivement) (Miethke 1985), résultant en un ratio I/G de 2,55. En utilisant des valeurs similaires, (glucagon : 88 pg/ml; I/G = 2,4) dans la perfusion de foie d'animaux sédentaires, Shiota et al. (1996) ont rapporté une nette augmentation de ~ 50% du relâchement de glucose par le foie, avec des valeurs maximales atteintes à 25 minutes. De plus, en utilisant des ratio I/G de 2,9, Drouin et al. (2004) ont démontré une augmentation de la glycogénolyse (23%) ainsi que de la néoglucogenèse (32%) en réponse au glucagon chez des rats sains. Les résultats de cette étude correspondent à ceux de la présente étude. En effet, chez les animaux diabétiques sédentaires et nourris, la stimulation au glucagon résultait à une lente augmentation de la PHG atteignant rapidement un maximum ($2,71 \pm 0,31 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ à 20 minutes) mais qui était progressivement atténuée. De plus, cette PHG était associée avec une diminution du contenu en glycogène (52%). Au contraire, chez les animaux diabétiques sédentaires et à jeun, avec une quantité négligeable de glycogène hépatique, la réponse au glucagon était plus faible, atteignant $0,79 \pm 0,21 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ à 20 minutes. Néanmoins, contrairement à la réponse de la PHG au glucagon chez les animaux diabétiques et nourris qui diminuait rapidement après l'atteinte du maximum, celle des animaux à jeun demeurait soutenue dans la totalité

de la période de stimulation. Ces observations chez les rats diabétiques, nourris et à jeun suggèrent que dans le foie d'animaux nourris avec une large quantité de glycogène, le glucagon stimule principalement la dégradation du glycogène, tandis que chez les animaux à jeun, avec peu de glycogène hépatique, le glucagon stimule principalement la néoglucogenèse, et ce, même chez les animaux diabétiques. Donc, l'effet spécifique du glucagon sur la glycolyse et la néoglucogenèse peut être distingué, si non, complètement séparé en utilisant respectivement, des animaux diabétiques nourris avec de grandes quantités de glycogène hépatique et des animaux diabétiques à jeun avec de très petites quantités de glycogène hépatique.

Les observations chez les rats diabétiques et nourris indiquaient que la PHG avant la stimulation au glucagon était supérieure chez les animaux diabétiques entraînés (2,1 et 1,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, chez les animaux diabétiques entraînés et sédentaires, respectivement) (Figure 3). Conséquemment, lorsque le foie de ces animaux était perfusé avec le glucagon, il en résultait en une plus grande production absolue de glucose (Figure 3). Cependant, lorsque cette production de base était prise en considération, pour le calcul de l'Aire sous la courbe, la PHG (aire sous la courbe) était alors similaire entre les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés sous stimulation au glucagon (Figure 4). Cette PHG similaire entre les deux groupes était associée avec à même dégradation de glycogène chez les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés. Lorsque le foie des animaux diabétiques entraînés et à jeun était stimulé au glucagon en présence de lactate, l'augmentation de la sortie de

glucose pour les 30 premières minutes était également plus rapide et supérieure que chez les animaux diabétiques sédentaires. Chez les animaux diabétiques entraînés, la sortie de glucose diminuait quelque peu pour se stabiliser, tandis que chez les animaux diabétiques sédentaires, le foie avait tendance à extraire du glucose (comme le démontre la balance négative de production de glucose par le foie). Cette plus grande PHG chez les animaux entraînés était associée avec une légère augmentation, toutefois non significative, de la captation de lactate par le foie chez les animaux diabétiques entraînés.

Lorsque les valeurs obtenues lors de notre étude sur les animaux sains, nourris, à jeun et perfusés au glucagon sont comparé (Drouin et al. 2004), nous pouvons affirmer que les animaux nourris, sains, sédentaires et entraînés ($84,0 \pm 12,6$ et $112,1 \pm 7,1$ $\mu\text{mol/g}$ de foie, respectivement) ont produit plus de glucose sous perfusion au glucagon que les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés ($48,7 \pm 16,4$ et $57,2 \pm 15,4$ $\mu\text{mol/g}$ de foie, respectivement). En général, chez les animaux sains, la PHG augmentait et se stabilisait dans le temps, tandis que chez les animaux diabétiques, la PHG demeurait irrégulière. La PHG chez les animaux diabétiques et sédentaires était irrégulière dans le temps, tandis que chez les animaux diabétiques et entraînés une PHG maximale était observée dès 15 minutes suivant le début de la stimulation au glucagon. Par la suite, celle-ci diminuait progressivement. Les mécanismes qui expliquent cette irrégularité est encore inconnus. Néanmoins, nous pouvons affirmer que la défaillance de la PHG chez les animaux diabétiques est indépendante de la

quantité de glycogène retrouvée dans le foie au début de la perfusion, car chez les animaux diabétiques, les concentrations de glycogène hépatique (149 ± 26 et 156 ± 33 $\mu\text{mol d'unités glucose/g}$ de foie humide, chez les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés, respectivement) étaient comparables aux concentrations retrouvées chez les animaux sains (205 ± 11 et 231 ± 11 $\mu\text{mol d'unités glucose/g}$ de foie humide, chez les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés, respectivement). Chez les animaux à jeun, le même phénomène est observé. C'est-à-dire que chez les animaux sains, la PHG augmente et se stabilise dans le temps, tandis que chez les animaux diabétiques, mis-à-part une légère augmentation chez les animaux diabétiques entraînés où l'on observe une augmentation dans les premières minutes, la PHG induite par le glucagon et le lactate reste relativement stable dans le temps. Les données recueillies aujourd'hui ne nous permettent pas d'émettre une hypothèse sur le fait que les dynamiques de PHG chez les animaux sains sont différentes des animaux diabétiques. Cependant, comparativement aux animaux sains, sédentaires et entraînés ($K_d : 0,57 \pm 0,06$ et $0,77 \pm 0,06$, respectivement), l'affinité des récepteurs au glucagon est supérieure chez les animaux diabétiques, sédentaires et entraînés ($K_d : 1,02 \pm 0,10$ et $0,91 \pm 0,10$, respectivement), ce qui pourrait suggérer une diminution de l'affinité du récepteur au glucagon chez les animaux diabétiques.

Les mécanismes par lequel l'entraînement en endurance et le diabète modifient la PHG induite par le glucagon reste à être déterminé. La présente étude démontre que la réponse néoglucogénique et non la réponse glycogénolytique induite par le

glucagon est augmentée à la suite d'un entraînement en endurance chez des animaux diabétiques, traités à l'insuline. À l'opposé, nous avons démontré récemment (Drouin et al. 2004) que l'entraînement en endurance chez des animaux sains augmentait la réponse néoglucogénique (45%) et glycogénolytique (30%) induite par le glucagon. De plus, à la suite d'un entraînement en endurance, nous avons observé (Légaré et al. 2001) une augmentation de la densité des récepteurs au glucagon, ce qui peut expliquer l'augmentation simultanée de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse induite par le glucagon à la suite d'un entraînement en endurance chez des animaux sains. Cependant, chez les animaux diabétiques, l'entraînement en endurance n'augmente pas, de façon significative, la densité des récepteurs au glucagon (Tableau 4).

Les sujets diabétiques de type 1, avec un moins bon contrôle de leur glycémie, ont une réduction de leur concentration hépatique en glycogène (Hwang 1995, Bischof 2001). La réduction de la quantité de glycogène hépatique pourrait diminuer la possibilité de produire du glucose en période d'hypoglycémie chez ces sujets. De plus, des modifications au niveau de l'expression (transcription, traduction, stabilité de l'ARNm et renouvellement protéique) de la glycogène phosphorylase et synthétase ont aussi été observées dans le cas du diabète de type 1 (Miller et al. 1981, Langdon et Curnow 1983). Cependant, le contenu hépatique en glycogène (Bischof 2001), en glycogène phosphorylase et synthétase (Rao 1995, Krammer 1999) peuvent être restaurés avec le traitement à l'insuline chez l'animal diabétique. Dans la présente étude, le traitement à l'insuline a permis de rétablir la concentration hépatique en

glycogène chez les animaux diabétiques (841 ± 49 et 1337 ± 208 μmol unités glucose/g poids sec de foie, chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) pour atteindre des valeurs retrouvées chez les animaux sains (947 ± 49 μmol unités glucose/g poids sec de foie) (Drouin et al. 2004). De plus, l'entraînement en endurance a permis d'augmenter le contenu hépatique en glycogène chez les animaux diabétiques comparativement aux animaux sédentaires. L'augmentation du contenu hépatique en glycogène avec l'entraînement en endurance correspond aux données de Baldwin et al. (1975) et Galbo et al. (1979) mais est en désaccord avec les données de Drouin et al. (2004), Fitts et al. (1975) et James et al. (1984) qui n'ont observé aucune différence significative du contenu hépatique en glycogène chez des animaux sains. Cependant, bien que la PHG totale de glucose était similaire chez les animaux diabétiques et nourris, la PHG induite par le glucagon chez les animaux entraînés s'avérait plus régulière dans le temps. Cette irrégularité de la PHG induite par le glucagon associée au diabète a déjà été notée par Orskov et al. (1991). Or, bien que l'entraînement n'a aucun effet sur la quantité de glucose produite par le foie des animaux diabétiques traités à l'insuline et nourris, l'entraînement en endurance régularise la PHG et pourrait devenir un moyen défenseur et accessible pour ainsi faciliter la protection des hypoglycémies.

La réponse néoglucogénique est diminuée chez le sujet traité intensivement à l'insuline (Caprio 1992, Landau 1995) mais augmente chez l'animal sain avec l'entraînement en endurance à partir des précurseurs avec ou sans glucagon (Sumida

1993, 1995, Drouin et al. 2004, Cheeks et al. 1996). En ce qui concerne l'effet de l'entraînement en endurance sur la néoglucogénèse, plusieurs auteurs ont montré que l'entraînement en endurance augmente la réponse néoglucogénique à partir du lactate (Sumida et al. 1993, Donovan & Sumida 1997, Podolin et al. 1994), de l'alanine (Sumida et al. 1995, Burelle et al. 2000) sous perfusion du foie (Sumida et al. 1993, 1995, Donovan & Sumida 1997) ou des hépatocytes isolés (Burelle et al. 2000, Podolin et al. 1994). Chez les animaux sous mauvais contrôle glycémique, les enzymes néoglucogéniques sont sur-exprimées, cependant, l'activité de la PEPCK, le niveau protéinique ainsi que l'ARNm retournent à un niveau normal avec le traitement à l'insuline (Krammer 1999).

En conclusion, chez l'animal diabétique traité à l'insuline, l'entraînement en endurance régularise la réponse glycogénolytique et la réponse néoglucogénique induite par le glucagon, respectivement. Cependant, contrairement aux animaux sains, l'entraînement en endurance ne modifie pas de façon significative les propriétés de liaison du récepteur au glucagon limitant ainsi son implication dans la régularisation et l'augmentation de la réponse glycogénolytique et la réponse néoglucogénique induite par le glucagon, respectivement. D'autres mécanismes d'action doivent donc être mis en évidence pour expliquer ces phénomènes.

Références

Amiel P, Sherwin R, Simonson D, and Tamborlane. Effect of intensive insulin therapy on glycemic thresholds for counterregulatory hormone release. *Diabetes* 37: 901-907, 1988.

Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW and Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. *Pflugers Arch* 354: 203-212, 1975.

Bischof MG, Krssak M, Krebs M, Bernroider E, Stingl H, Waldhäusl W, and Roden M. Effects of short-term improvement of insulin treatment and glycemia on hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* 50: 392-398, 2001.

Bolli GB. From physiology of glucose counterregulation to prevention of hypoglycaemia in type 1 diabetes mellitus. *Diab Nutr Metab* 3: 333-349, 1990.

Bolli GB. How to ameliorate the problem of hypoglycaemia in intensive as well as nonintensive treatment of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22 (Suppl.2):B43-B52, 1999.

Brand CL, Jorgensen PN, Knigge U, Warberg J, Svendsen I, Kristensen JS, and Holst JJ. Role of glucagon in maintenance of euglycemia in fed and fast rats. *Am J Physiol* 269: E469-E477, 1995.

Burelle Y, Fillipe C, Peronnet F, Leverve X. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am J Physiol* 278: E35-E42, 2000.

Caprio S, Napoli R, Sacca L, Tamborlane WV, and Sherwin RS. Impaired stimulation of gluconeogenesis during prolonged hypoglycemia in intensively treated insulin-dependant diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 1076-80, 1992.

Cheeks AM, Hevener AH, and Donovan CM. Enhanced hepatic gluconeogenic response to elevations in glucagon with endurance training. *Med. Sports Sci.* Vol.28 no.5 p: S58, 1996 (Abstract).

Cryer PE and Gerich JE. Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 313:232-241, 1985

Cryer PE, White NH, and Santiago JV. The relevance of glucose counterregulatory systems to patients with insulin-dependent diabetes. *Endocr Rev* 7:131-139, 1986.

Cryer PE. Editorial: Are gender differences in the responses to hypoglycemia relevant to iatrogenic hypoglycemia in type 1 diabetes ? *J Clin Endo Metab.* 85: 2145-2147, 2000.

Cryer PE. Hypoglycemia glucose counterregulation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *J Lab Clin Med* 99: 451-456, 1982.

Cryer PE. Hypoglycemia is a limiting factor in the management of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 15: 42-46, 1999.

Cryer PE, Davis SN et Shamooh H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26 : 1902-1912, 2003.

Dobbins RL, Connolly CC, Neal DW, Palladino LJ, Parlow AF, Cherrington AD. Role of glucagon in countering hypoglycemia induced by insulin infusion in dogs. *Am J Physiol* 261: E773-E781, 1991.

Donovan CM et Sumida KD. Training enhanced hepatic gluconeogenesis : the importance for glucose homeostasis during exercise. *Med Sci Sports Exerc* 29: 628-34, 1997.

Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D, and Chiasson JL. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am.J.Physiol.* 274 (Endocrinol. Metab.37): E23-E28, 1998.

Drouin R, Robert G, Milot M, Massicotte D, Péronnet F et Lavoie C. Swim training increases glucose output from liver perfused *in situ* with glucagons in fed and fasted rats.. *Metabolism* 53 : 1027-1031, 2004.

Fitts RH, Booth FW, Winder WW et Holloszy JO. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am J Physiol.* 228: 1029-1033, 1975.

Galbo H, Saugmann P and Richter EA. Increased hepatic glycogen synthetase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol Scand* 107: 269-272, 1979.

Gerich JE, Cryer PE and Rizza RA. Hormonal mechanisms in acute glucose counterregulation: the relative roles of glucagons epinephrine, norepinephrine, growth hormone and cortisol. *Metab Clin Exp* 29: 1164-1175, 1980.

Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 1608-1617,1988.

Gores GJ, Kost LJ, LaRusso NF. The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology* 6: 511-7, 1986.

Hwang JH, Perseghin G, Rothman DL, Cline GW, Magnusson I, Petersen KF, and Shulman GI. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion: a ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest* 95: 783-787,1995.

James DE, Kraegen EW. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 52 : 276-81,1984.

Kramer KL, Giffin BF, Fox JW, and Drake RL. Insulin replacement therapy in diabetic rats using an osmotic pump normalizes expression of enzymes key to hepatic carbohydrate metabolism. *Arch Biochem Biophys* 368 : 291-297, 1999.

Landau BR, Chandramouli V, Schumann WC, Ekberg K, Kumaran K, Kalhan SC, and Wahren J. Estimation of krebs cycle activity and contributions of gluconeogenesis to hepatic glucose production in fasting healthy subjects and IDDM patients. *Diabetologia* 38 : 831-838,1995.

Légaré A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Péronnet F, Massicotte G, and Lavoie C. Increased density of glucagon receptors in liver from endurance trained rats. *Am.J.Physiol.* 280: E193-196,2001.

Lussier B, Vranic M, Kovacevic N, and Hetenyi G Jr. Glucoregulation in alloxan-diabetic dogs. *Metabolism* 35 : 18-24, 1986.

Meltzer S, Leiter L, Daneman D, Gerstein HC, Lau D, Ludwig S, Yale JF, Zinman B, et Lillie D. 1998 Clinical practice guidelines for management of diabetes in Canada. Canadian Diabetes Association. *CMAJ* 159 Suppl 8 : S1-29, 1998.

Miethke H, Wittig B, Nath A, et al. Metabolic zonation in liver of diabetic rats. Zonal distribution of phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate kinase, glucose-6-phosphatase and succinate dehydrogenase. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 366: 493-501, 1985.

Nemecz M, Preininger K, Englisch R, Furnsinn C, Schneider B, Waldhausl W, Roden M. Acute effect of leptin on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Hepatology* 29:166-72, 1999.

O'Brien RM, and Granner DK. Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J* 278: 609-619, 1991.

Orskov L, Alberti KGMM, Mengel A, Moller N, Pedersen O, Rasmussen O, Seefeldt T, and Schmitz O. Decreased hepatic glucagon response in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 521-526, 1991.

Passoneau JV, Lauderdale VR: A comparison of three methods of glycogen measurements in tissues. *Analytical Biochemistry* 60: 405-412, 1974.

Persson A et Jergil B. Purification of plasma membranes by aqueous two-phase affinity partitioning. *Anal Biochem* 204 : 131-6, 1992.

Podolin DA, Pagliassotti MJ, Gleeson TT and Mazzeo RS. Influence of endurance training on the age-related decline in hepatic glycogenesis. *Mech Ageing Dev* 75: 81-93, 1994.

Rao PV, Pugazhenti S, and Khandelwal. The effect of streptozotocin-induced diabetes and insulin supplementation on expression of the glycogen phosphorylase gene in rat liver. *J Biol Chem* 270 : 24955-24960, 1995.

Rizza RA, Cryer PE, Haymond MW, and Gerich JE. Adrenergic mechanisms for the effects of epinephrine on glucose production and clearance in man. *J Clin Invest* 65:682-689, 1980.

Saccà L, Morrone G, Cicala M, Corso G, and Ungaro B. Influence of epinephrine, norepinephrine, and isoproterenol on glucose homeostasis in normal man. *J Clin Invest Metab* 50: 680-684, 1980.

Shamoon HR, Hendler R, and Sherwin R. Synergistic interactions among antiinsulin hormones in the pathogenesis of stress hyperglycemia in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 1235-1241, 1981.

Shiota MR, Green RC, Colburn G, Mitchell G, Cherrington AD. Inability of hyperglycemia to counter the ability of glucagon to increase net glucose output and activate glycogen phosphorylase in the perfused rat liver. *Metabolism* 45 : 481-485,1996.

Simonson D, Tamborlane W, DeFronzo R, and Sherwin R. Intensive insulin therapy reduces the counterregulatory hormone responses to hypoglycemia in patients with type I diabetes. *Ann. Intern. Med.* 103: 184-190,1985.

Srere PA: Citrate Synthase. *Methods Enzymol* 13:3-5,1969.

Sumida KD, Urdiales JH, and Donovan CM. Enhanced gluconeogenesis from lactate in perfused livers after endurance training. *J.Appl.Physiol.* 74 : 782-787,1993.

Sumida KD, Urdiales JH, and Donovan CM. Enhanced hepatic gluconeogenesis capacity for selected precursors after endurance training. *J.Appl.Physiol.* 79: 1883-1888,1995.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The Effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 329: 977-986,1993.

Wan CK, Giacca A, Matsuhisa M, El-Bahrani B, Lam L, Rodgers C and Shi ZQ. Increased responses of glucagons and glucose production to hypoglycemia with intraperitoneal versus subcutaneous insulin treatment. *Metabolism* 49 : 984-989, 2000.

Légende des figures et tableaux

Tableau 1. La production de bile par le foie et le pH de perfusat au début et à la fin de la période de 60 minutes de perfusion au glucagon chez des animaux diabétiques traités à l'insuline. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard.^a significativement différent du début de la stimulation au glucagon ($P < 0.05$).^b significativement différent des animaux nourris ($P < 0.05$).

Tableau 2. La concentration de glycogène dans le foie (μmol d'unités glucosyl / g poids humide) avant et après la stimulation au glucagon chez les animaux diabétiques traités à l'insuline, nourris et à jeun, et la balance du lactate lors de la perfusion au glucagon. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard.

Tableau 3. Propriétés de liaison du récepteur au glucagon chez des animaux diabétiques traités à l'insuline, sédentaires et entraînés. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard.

Tableau 4. PHG totale des rats diabétiques à jeun, sédentaires et entraînés. La sortie nette de glucose sous stimulation au glucagon ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie) était calculée à partir du produit du taux de la perfusion ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de foie) par le gradient de concentration de glucose à l'entrée et à la sortie du foie ($\mu\text{mol}/\text{ml}$) moins la sortie nette de glucose avant la stimulation au glucagon. Les valeurs sont exprimées en

moyennes \pm erreur standard. *Valeurs significativement différentes des valeurs observées chez les animaux sédentaires ($P < 0.05$).

Figure 1. Variation du poids corporel (○ et ● chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) et dose d'insuline (△ et ▲ chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) pour la totalité des 10 semaines de traitement à l'insuline. L'insuline était administrée par injection sous-cutanée deux fois par jour. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard.

Figure 2. Concentration plasmatique hebdomadaire de glucose chez les animaux diabétiques, sédentaires (○) et entraînés (●) pour la totalité des 10 semaines de traitement à l'insuline. Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard

Figure 3. Modification de la PHG en réponse au glucagon chez les animaux nourris sédentaires (○) et entraînés (●) et à jeun sédentaires (△) et entraînés (▲). Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm erreur standard.*Valeurs significativement différentes des valeurs observées chez les animaux sédentaires ($P < 0.05$).

Tableau 1

	Sédentaires		Entraînés	
	Nourris	À jeun	Nourris	À jeun
Production de bile ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de foie $^{-1}$)				
Début	0,76 \pm 0,05	0,57 \pm 0,03 ^b	0,84 \pm 0,03	0,59 \pm 0,03 ^b
Fin	0,70 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02 ^{ab}	0,68 \pm 0,08	0,36 \pm 0,02 ^{ab}
pH				
Début	7,43 \pm 0,02	7,42 \pm 0,02	7,39 \pm 0,01	7,39 \pm 0,01
Fin	7,39 \pm 0,01	7,37 \pm 0,01	7,41 \pm 0,02	7,38 \pm 0,02

Tableau 2

	Groupes	
	Nourris	À jeun
Avant stimulation	Sédentaires 156 \pm 33	Entraînés 149 \pm 26
Après stimulation	73 \pm 20	115 \pm 25 ^a
Captation de lactate ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}$ de foie $^{-1}$)	0,67 \pm 0,52	0,97 \pm 0,49

Tableau 3

	Sédentaires	Entraînés
Bmax (pmol/mg de protéines)	3,38 \pm 0,48	4,87 \pm 1,44
Kd (nM)	1,02 \pm 0,10	0,91 \pm 0,10

Tableau 4

PHG ($\mu\text{mol/g}$ de foie)	Groupes	
	Sédentaires	Nourris
		Entraînés
0-30 minutes	24,8 \pm 8,4	37,8 \pm 3,8
30-60 minutes	23,9 \pm 9,7	19,4 \pm 13,3
Total	48,7 \pm 16,4	57,2 \pm 15,4
		À jeun
0-30 minutes	2,4 \pm 2,3	13,5 \pm 3,9 ^a
30-60 minutes	-4,8 \pm 3,5	3,4 \pm 6,5
Total	-2,4 \pm 4,9	16,9 \pm 9,5 ^a

Figure 1

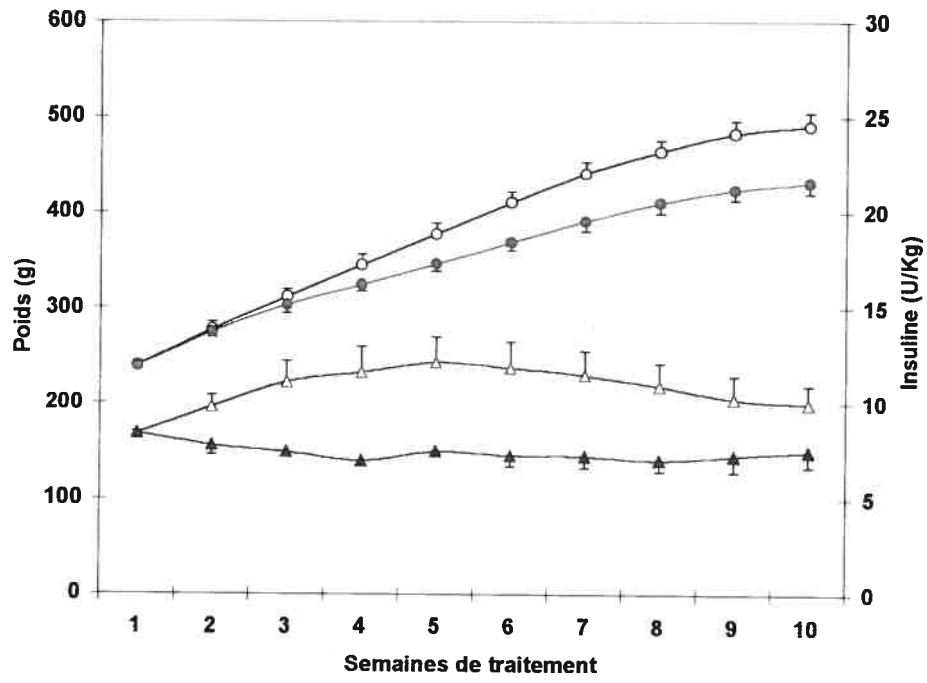


Figure 2

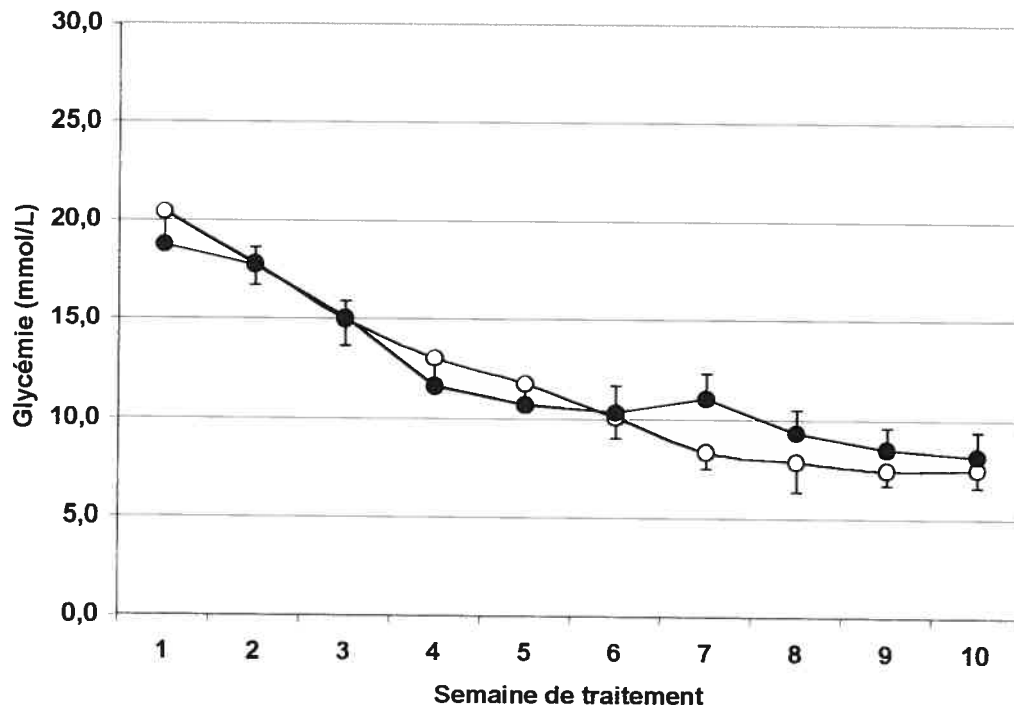
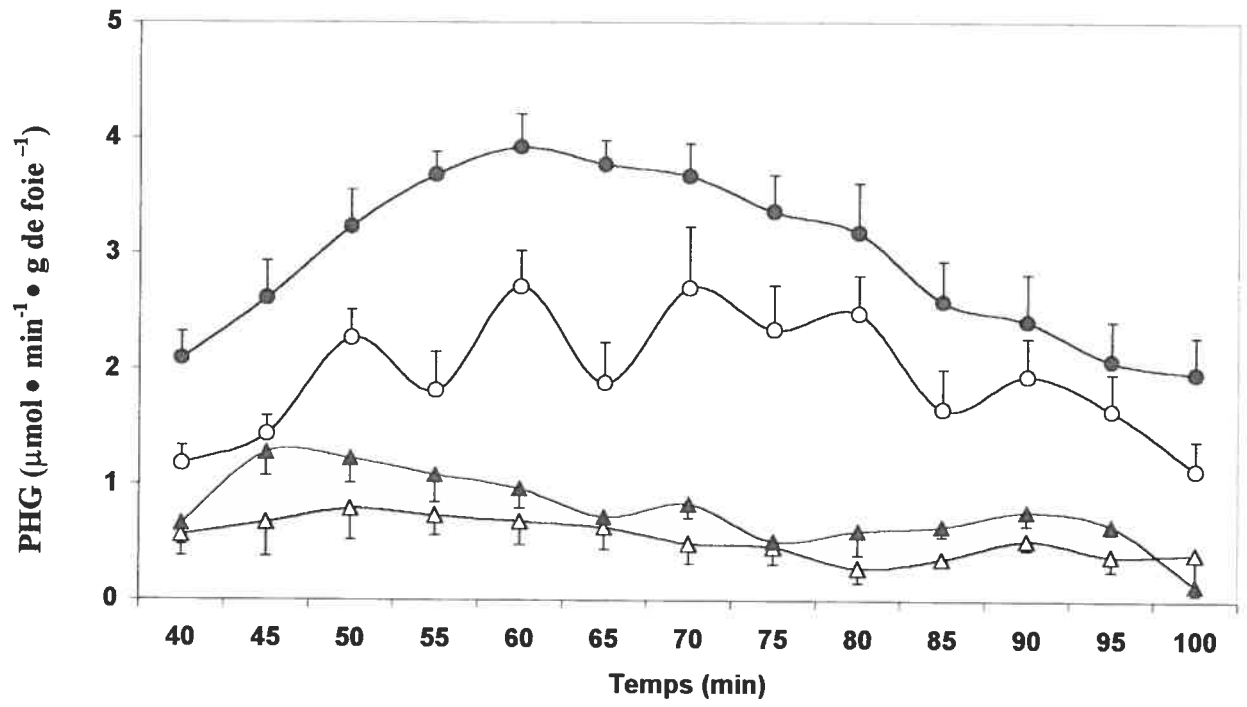


Figure 3



Changes in liver glycogen subfractions and structure following endurance training in healthy and diabetic animals

R. DROUIN¹, G.ROBERT¹, M. MILOT², D. MASSICOTTE³, F. PÉRONNET¹,
AND C. LAVOIE²

¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, H3C 3J7, Québec,
Canada

²Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Trois-
Rivières, Trois-Rivières, G9A 5H7, Québec, Canada

³Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal,
Montréal, H3C 3P8, Québec, Canada

Corresponding should be addressed to:

Carole Lavoie, PhD.

Département des sciences de l'activité physique,

Université du Québec à Trois-Rivières, CP 500

Trois-Rivières (Québec)

Canada, G9A 5H7

Tel.: (819) 376-5011 (3767)

Fax: (819) 376-5092

e-mail: XXXXXXXXXX

ABSTRACTS

R. DROUIN¹, G.ROBERT¹, M. MILOT², D. MASSICOTTE³, F. PÉRONNET¹, AND C. LAVOIE². Changes in liver glycogen subfractions and structure following endurance training in healthy and diabetic animals. ¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec. ²Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec. ³Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec.

The content of glycogen associated with the acid resistant (AR) and acid labile (AL) fractions of glycosomes and the fine structure of glycogen were described in liver from swim trained (3 hours, 5 days/week for 10 weeks) and untrained healthy and insulin-treated (Iletin II NPH) diabetic rats (streptozotocin; 80 mg/kg BW). Total glycogen content as well as the content of glycogen associated to both fractions were similar between healthy and diabetic untrained rats. However, endurance training increased, in liver, AR fraction of glycogen in healthy rats, while in insulin-treated diabetic rats, both total and AL glycogen content were increased. As for the structure of the glycogen particle, induction of diabetes and endurance training in healthy rats decreased the radius and the chain length and increased the number of tiers and number of non-reducing ends of the particle ($P < 0.05$). However, endurance training in diabetic animal had no effect on fine glycogen structure. In conclusion, endurance

training favoured opposite subfractions compartmentation in healthy and diabetic animal and modified fine structure in healthy animal, while having no supplementary effect, other than diabetes *per se*, in diabetic animals.

R. DROUIN¹, G.ROBERT¹, M. MILOT², D. MASSICOTTE³, F. PÉRONNET¹, AND C. LAVOIE². Changes in liver glycogen subfractions and structure following endurance training in healthy and diabetic animals. ¹Département de kinésiologie, Université de Montréal, Montréal, Québec. ²Département des sciences de l'activité physique, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec. ³Département de kinanthropologie, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec.

Le contenu en glycogène de la fraction résistante (AR) ou non (AL) au traitement à l'acide ainsi que la structure fine de la particule de glycogène sont décrits dans le foie de rats Sprague-Dawley entraînés (nage : 3 heures 5 jours/semaines pour 10 semaines) sains et diabétiques (streptozotocine; 80 mg/kg poids corporel) traités à l'insuline (Iletin II NPH). Le contenu total en glycogène, ainsi que le contenu de glycogène associé aux deux fractions étaient similaires entre les rats sédentaires sains et diabétiques. Cependant, l'entraînement en endurance augmentait le contenu en glycogène associé à la fraction AR chez les rats sains tandis que chez les rats diabétiques, l'entraînement augmente le contenu total ainsi que le contenu de glycogène associé à la fraction AL ($P < 0.05$). Concernant la structure, l'induction du diabète ainsi que l'entraînement chez les rats sains, diminuaient le rayon, la longueur

des chaînes tout en augmentant le nombre de tiers et le nombre d'extrémités non-réductrices ($P < 0.05$). Cependant, l'entraînement chez les animaux diabétiques n'avait aucun effet sur la structure de la particule. En conclusion, l'entraînement en endurance modifie de façon opposée les fractions du glycogène hépatique, modifie la structure de la particule mais n'a aucun effet supplémentaire, autre que le diabète, sur la structure du glycogène chez les animaux diabétiques.

Keywords: type 1 diabetes, endurance training, glycogen structure, glycosomes, lyoglycosomes, desmoglycosomes, swimming exercise program, liver, carbohydrate metabolism.

INTRODUCTION

Glycogen particle has to be designed in accordance with its metabolic function as a very effective fuel store allowing quick release of large amounts of glucose (Mélendez-Hévia et al. 1993). The particles and the enzymes involved in glycogen metabolism are associated under the form of functional units of 20-30 nm named glycosomes which are either free or bound to various cell structures (Rybicka 1996, Wilstätter and Rohdwal 1934). The two fractions, can be identified by electron microscopy (Rybicka 1996). Moreover, they can also be separated on the basis of their difference in resistance to acid hydrolysis (Rybicka 1996), the free fraction being more labile, and the fraction bound to cell structures being more resistant. Glycogen particles can also vary in size, number of tiers, number of external chains, degree of branching, and average length between branching (Meléndez et al. 1998, Meléndez-Hévia et al. 1993). Glycogen stores are, thus, heterogeneous within a tissue (Alonso et al. 1995) and from tissue to tissue (Calder et al. 1986, Geddes and Stratton 1977, Geddes and Chow 1994, Iwamasa et al. 1982, James and Kraegan 1984).

The functional significance of the two subfractions of glycogen stores, and of differences in the fine structure of glycogen particles remains to be established. However, the acid resistant fraction or desmoglycosome could be metabolically more active than the acid labile fraction or lyoglycosome (Calder et al. 1986, Stetten et al. 1958). For example, the acid resistant fraction of muscle glycogen appears to be preferentially broken down during exercise, and preferentially resynthesized in the recovery period following exercise (see Shearer and Graham 2002 for review). As for

the structure of the glycogen particle, according to the model of Meléndez-Hevia et al. (1993), an increase in percent branching and a reduction in the average chain length, for a given number of glycosyl residues, reduce the size of the particle, and increase the number of glycosyl residues at the distal end of the external tier, which could favor the access of glycogen phosphorylase to its substrate. Also, the characteristics of glycogen particles can be modified under different nutritional states (Iwamasa et al. 1982 , James and Kraegan 1984, Konishi and Fuwa 1983). Indeed, the average chain length in liver glycogen particles is shorter in fed than fasted rats (Konishi and Fuwa 1983). Differences in glycogen particle have also been identified with pathological situations, such as diabetes. The average chain length in liver glycogen particles is shorter in genetic and streptozotocin-induced diabetic than in control mice (Roesler and Khandelwal 1986, Stearns and Benzo 1977). Untreated genetic and streptozotocin-induced diabetic mice, are characterised by a more branched liver glycogen structure resulting from lower average chain lengths, at both the level of exterior and interior chain lengths (Roesler and Khandelwal 1986). This increased branching pattern, has been attributed to increased glycogen turnover rate found in the liver of untreated diabetic rats. Although, in diabetes, insulin treatment nearly restores hepatic glycogen content (Kandelwal et al. 1977, Margolis et al. 1985) no data appears to be available on possible changes in liver glycogen structure and subfractions in relation with insulin treatment. Furthermore, when liver and skeletal muscle glycogen are compared, liver glycogen particles are larger and more branched than muscle glycogen particles (Iwamasa 1982),

The effect of endurance training on total liver glycogen content remains a matter of debate. Some authors observed an increased content (Galbo et al. 1979, Baldwin et al. 1975) while others showed no increased (Fitts et al. 1975, James and Kraegan 1984), with endurance training. As for the effect of endurance training on liver glycogen structure, no direct evidence are currently available. However, in skeletal muscle, Taylor et al (1974) have reported up to a 1.8X fold increase in the activity of glycogen branching enzyme with endurance training which could lead to a modification in glycogen structure. However, no data appears to be available on possible changes in liver glycogen subfractions with training.

The purpose of the present study was to describe the effect of endurance training on the acid resistant (AR) and acid labile (AL) subfractions of liver glycogen, and on the structure of liver glycogen particles in healthy and diabetic rats, based on determination of the number of non-reducing ends in the particle (Serafini and Alemany 1987), and the model of the glycogen particle suggested by Meléndez-Hevia et al. (1993). Endurance training increases liver glucose output in response to exercise (Brooks and Donovan 1983, Donovan and Sumida 1990, Galbo et al. 1977, Winder 1985), and in response to glucagon (Drouin et al. 1998, Drouin et al. 2004). In contrast, glucose output is decreased upon glucagon stimulation in insulin treated diabetic subjects (Ørskov et al. 1991). We hypothesised that these phenomena could be associated, in parts, with changes in the subfractions of glycogen stores and in the structure of glycogen particles favoring glycogen breakdown.

METHODS

The experiment was conducted on male Sprague-Dawley rats (n =44, Charles River, St-Hyacinthe, Québec, Canada) kept in individual cage at 20 °C and 55 % relative humidity, with a 12-h light/12-h dark cycle, in a facility that met the Canadian Council on Animal Care guidelines. They had access to a standard rat chow, and tap water *ad libitum*. The Animal Care Committee of the Université du Québec à Trois-Rivières approved the protocol.

The animals were randomly assigned to either control (**H**) or diabetic (**D**) group. Diabetes was induced with a single dose of intraperitoneal injection of streptozotocin (80 mg/kg BW, Sigma Diagnostics, St-Louis, MO) freshly dissolved in 10 mmol/L citrate buffer [pH 4.5] immediately before use. In order to avoid low blood glucose, a 10% dextrose solution was made available for a period of 48 hours. A blood glucose level over 15 mmol/L with ketone bodies detection confirmed the induction of diabetes. For the duration of the experimentation, blood glucose level (Precision QID, Abott. Laboratories Abott Park, IL) and the level urinary ketone bodies (Chemstrip UGK, Roche Diagnostic, Laval, Qc, Canada) were monitored every day.. Seven days following diabetes induction, blood glucose levels were normalised by insulin (Iletin II NPH, kindly provided by Eli Lilly Canada, Mississauga, Ontario, Canada) bid (8:00 AM and 8:00 PM).

After 1 week of insulin treatment for the diabetic animals, healthy and diabetic animals (H and D) were randomly assigned to an untrained (HUT, n = 11 and DUT, n = 11) or an endurance-trained group (HT, n = 11 and DT, n = 11). Trained animals

swam in 60 x 90 cm tanks filled with 50 cm of water at 37 °C under constant supervision to prevent underwater swimming. The duration of each training session was progressively increased to three hours over the first two weeks. For the following eight weeks, the rats trained between 8:00 and 11:00 AM, five days per week. The animals assigned to the untrained group (HUT and DUT) were handled daily. For the diabetic groups, insulin requirement was adjusted according to daily body weight and blood glucose level and attained 30% lower values for trained diabetic animals (6.7 ± 0.3 U/kg BW vs 9.5 ± 0.2 U/kg BW, $P < 0.05$).

Animals were sacrificed and tissue samples were removed between 8:00 AM and 11:00 AM, following an overnight free access to food and water, 48 hours after the last exercise bout for the trained groups and 12 hours after the last insulin dose for the diabetic group at 8:00 PM. The animals were anaesthetised with sodium pentobarbitate (50 mg/kg BW, i.p.), the abdomen was open along the mid line, and the muscles of the left thigh were exposed. The liver and the *rectus femoris* on the left leg were quickly removed and frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C for subsequent analysis. The animals were, then, sacrificed by sectioning the aorta. The activity of citrate synthase, as a marker of the training status, was determined in the *rectus femoris*, according to Srere (1969).

For the purification of liver glycogen, frozen pieces of liver were powdered and digested with potassium hydroxide (Serafini and Alemany 1987), and glycogen was precipitated twice with ethanol as described by Good et al. (1933). The final precipitate was dissolved in distilled water, and used for the measurement of

glycogen content and of the degree of branching in the glycogen particle. Glycogen content was determined following acid hydrolysis (Passoneau and Lauderdale 1974) from the amount of glucose released measured using a hexokinase/glucose-6-phosphatase commercial kit (Sigma Diagnostic, St-Louis, MO). The acid labile and acid resistant fractions were separated using perchloric acid from freeze-dried liver sample (Adamo and Graham 1998), and the glycogen content of each fraction was determined as indicated above following acid hydrolysis (Passoneau and Lauderdale 1974).

The structure of the glycogen particle was described according to the model suggested by Serafini and Alemany (1987), based on the percentage of glycosyl residues in non-reducing ends (i.e., percentage of distal glycosyl residues in the external tier of the particle), a degree of branching of two (Goldsmith et al. 1982), and a large number of glycosyl residues in the glycogen particle (M) (Geddes and Stratton 1977). As depicted in figure 3 according to this model, if the percentage of glycosyl residues engaged in non-reducing ends in the external tier of the particle is known (R_{gn} , %), the number of alpha 1-6 bonds in the external tier of the particle is

$$N = (R_{gn} \bullet M) / (2 \bullet 100)$$

The number of branching in the particle is, then,

$$B = N + N/2 + N/4 + N/8 \dots + N/N$$

which is equal to $2N-1$, or for any practical purpose $2N$, since M and, thus, N are large. The percent branching (i.e., the percentage of alpha 1-6 bonds) in the particle is:

$$\% B = [(2N / M)] \bullet 100$$

which, by substitution, simplifies in

$$\% B = Rgn$$

As for the number of tiers in the particle, it is equal to (Serafini and Alemany 1987):

$$T = \log 2N / \log 2$$

While the chain length defined as the number of glycosyl residues between two consecutive alpha 1-6 bonds, is:

$$Gc = M / 2N$$

$$Gc = M / [2 (Rgn \bullet M) / 2]$$

$$Gc = 1 / Rgn$$

It should be recognized that the values computed for the number of tiers, the number of branching, and the number of non-reducing ends in the particle, depend on the value chosen for M. In contrast, the value computed for the percentage of non-reducing ends, the percent branching, and the number of glycosyl residues in a segment, are independent of M. Also, for a given value of M, and, thus, of T, the radius of the glycogen particle could be estimated, according to Meléndez-Hevia et al. (1993), as

$$R \text{ (nm)} = T \bullet (0.12 Gc + 0.35)$$

The volume of the glycogen particle is thus:

$$V \text{ (nm}^3\text{)} = 4/3 \pi R^3$$

The value of Rgn was determined in an aliquot of the aqueous glycogen solution by measuring a) the total amount of glucose present (mmol), following complete acid

hydrolysis as indicated above (Passoneau and Lauderdale 1974); and b) the amount of glycosyl residues in non-reducing ends (mmol) using neutral periodate oxidation (Serafini and Alemany 1987) followed by determination of the amount of formic acid (mmol/L) evolved with formic acid dehydrogenase (Xygen Diagnostic, Ontario, Canada). Based upon Serafini and Alemany (1987) work, it is assumed that 1 mmol of formic acid is evolved per 1 mmol of glycosyl residues in non-reducing ends (Serafini and Alemany 1987). The percent branching (% B), and the number of glycosyl residues in a segment (Gc) were, then, computed as indicated above. Finally, the number of tiers in a particle, and the radius and volume of the particle were computed, assuming an average mass of 1.62×10^6 g for a glycogen particle (10^4 glycosyl residues/particle) (Geddes and Stratton 1977).

Statistical Analysis

Statistical comparisons were performed using one-way analysis of variance. Newman Keuls post-hoc tests were used to identify the location of significant differences ($P \leq 0.05$) when the analysis of variance yield a significant F ratio.

RESULTS

Body mass at the time of sacrifice was similar in both groups (441 ± 9 g and 452 ± 13 g in untrained and trained H rats, respectively) and was higher in D untrained rats (473 ± 12 g and 434 ± 7 g in untrained and trained rats, respectively). Citrate synthase activity in the *rectus femoris* was significantly 36 % and 27 % higher

in H and D trained rats (27.9 ± 1.6 vs $20.5 \pm 12.5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ and 32.6 ± 2.8 vs $25.7 \pm 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ in H and D trained rats respectively).

Total liver glycogen content was not significantly modified following endurance training in H animals, however, the percentage of glycogen in the acid resistant and acid labile fractions, were slightly but significantly higher and lower, respectively, in endurance trained vs. untrained healthy rats (Table 1). Though, total liver glycogen content and glycogen associated to the acid labile fractions were increased following endurance training in D animals, no significant differences in the percentage of glycogen within the acid resistant and acid labile fractions was observed (Table 1).

When compared to control values in sedentary H animals, induction of diabetes and insulin treatment considerably decreased the radius, the chain length of the glycogen particle while having the opposite effect on the number of tiers, the non-reducing ends and the percent of branching. However, although not significant *due to wide variation*, the volume of the glycogen particle appeared much smaller with diabetes (Table 1).

In healthy group (H), the percentage of glycosyl residues in non-reducing ends, and the percent branching in the glycogen particle were significantly higher, while the number of glycosyl residues in a segment was significantly lower in liver from trained than untrained rats (Table 1). For a given number of glycosyl residues in the particle (10^4), these changes translated into a larger number of tiers, a larger percentage of branching and a larger number of non-reducing ends in the glycogen

particle. In contrast, the radius and volume of the particle were significantly reduced by 20% and 45%, respectively.

Endurance training decreased by 44% the glycogen particle volume in the diabetic animals in the same magnitude as reported for glycogen particle volume of healthy animals (Table 1). However, because of large SE associated with the particle volume of DUT, the reduction failed to achieve significance. Also, no significant difference was found with endurance training in liver glycogen of diabetic animals in the number of tiers and percentage of branching as well as the number of glucose units between two consecutive alpha 1-6 bonds (Table 1).

DISCUSSION

Adequate concentrations of circulating insulin are necessary for synthesis and maintenance of hepatic glycogen stores. In untreated type 1 diabetic animals, liver glycogen levels are usually very low (Roesler 1990). However, insulin treatment, can re-establish hepatic glycogen content (Bischoff et al. 2001) through restoration of synthetase a and synthetase phosphatase activities (Kandelwal 1977, Margolis 1985). In the present study, insulin treatment was able to restore blood glucose levels near control values (9-10 mmol/l,) within 5 weeks in both untrained and trained diabetic rats (10.3 ± 1.3 and 10.1 ± 1.0 mmol/L in trained and untrained rats, respectively). The glucose mean values reached 7.4 ± 0.8 mmol/L in control untrained and 7.5 ± 0.8 mmol/L in diabetic untrained animals by the time of the sacrifice, with no difference associated with endurance training. Also, insulin treatment re-established hepatic

glycogen content to a level equivalent to control values (>800 mmol glycosyl units/kg DW) in both trained and untrained diabetic rats. Furthermore, endurance-trained rats required 30% less insulin (6.7 ± 0.3 U/kg) in order to achieve normal glucose level compared to their untrained counterparts (9.5 ± 0.2 U/kg, $P < 0.05$).

Total liver glycogen content was not significantly different in trained and untrained control rats but increased significantly in trained diabetic animals compared to untrained diabetic animals. The effect of endurance training on total liver glycogen content remains a matter of debate: although, some authors have reported significantly higher liver glycogen content in rats following endurance training (Galbo et al. 1979, Baldwin et al. 1975). Our results are in line with data from several studies showing only small difference if any (Fitts et al. 1975, James and Kraegan 1984) between trained and untrained animals, either healthy or diabetic.

Liver glycogen fractions separated on their basis to resistance to acid hydrolysis were slightly but significantly different in trained than in untrained control rats, with a larger percentage of glycogen associated to the acid resistant fraction. In contrast, endurance training increased the absolute glycogen content associated with the acid labile fraction in insulin-treated diabetic rats. No difference between untrained diabetic and healthy animals was noticed at the level of glycogen compartmentation.

As for the fractions of glycogen stores, no data appear to be available on the effect of endurance training on liver glycogen, and the functional significance of these two fractions remains to be established. However, Calder and Geddes (1986) suggested that the acid resistant fraction could be metabolically more active. For example, data

from Stetten et al. (1958) showed that ^{14}C -glucose was incorporated more quickly in this fraction than in the acid labile fraction. Data reviewed recently by Shearer and Graham (2002) also suggest that the acid resistant fraction of muscle glycogen could be preferentially broken down during exercise, and preferentially resynthesized in the recovery period following exercise than the acid labile fraction. These consistent observations suggest that the turnover of the acid resistant fraction of glycogen stores could be more rapid than that of the acid labile fraction. In this perspective, the larger percentage of the acid resistant fraction of liver glycogen observed in the present experiment in trained than untrained healthy rat, could reflect and/or favor the higher turnover rate of liver glycogen stores associated with an endurance training regimen. Though, treated diabetic state failed to modified glycogen compartmentation in the liver, in insulin-treated diabetic rats, endurance training increased glycogen content but favoured the less metabolically active subfraction of glycogen (acid labile fraction or lyoglycosome fraction) and therefore could jeopardize its utilization.

In the present experiment, the structure of the liver glycogen particle was described according to the model of Meléndez-Hevia et al. (1993), and Meléndez et al. (1998) on the basis of the number of non-reducing ends in the particle (Serafini and Alemany 1987). Since, these glycosyl residues at the distal end of the external tier are the actual substrates for glycogen phosphorylase, an increase in this percentage could favor the access of glycogen phosphorylase to its substrate. Thus, for a given amount of glycogen and a given activity of glycogen phosphorylase, glucose release from the particle could be increased (Meléndez-Hevia et al. 1993). In addition, an increase in this percentage indicates that the glycogen particle is more branched, with shorter

chains, and, for a given number of glycosyl residues in the particle, a higher number of tiers. According to the model of Meléndez-Hevia et al. (1993), this change results in a reduction of the size of the particle, which allows storing a given amount of glucose and energy in a smaller space. When compared to control values in untrained healthy animals, induction of diabetes and insulin treatment decreased considerably the particle radius and chain length (17.4 ± 0.6 nm and 12.0 ± 0.6 number of glycosyl units vs 13.2 ± 1.2 nm and 8.0 ± 1.3 number of glycosyl units in healthy and diabetic rats, respectively) while increasing by twofold the percentage of non-reducing ends and percentage of branching (8.4 ± 0.4 vs 17.8 ± 2.2 % of glycosyl residues in healthy and insulin-treated diabetic rats, respectively). The changes in the structure of glycogen associated with treated diabetes could reach a point where glycogen is too much branched and jeopardize enzyme interaction and therefore reduced breakdown.

Endurance training induced an increase in the number of non-reducing ends that results in a more branched and compact hepatic glycogen structure. This more branched structure also results from a decrease in number of glucose units per chain (12.0 ± 0.6 and 8.6 ± 1.1 in untrained and trained healthy rats, respectively, $P < 0.05$). However, endurance training had no significant effect on liver glycogen particle in diabetic animals, even though that volume is reduced by 45% with endurance training in diabetic animals.

Few data are available on changes in the structure of glycogen in the liver (Konishi and Fuwa 1983, Roesler and Kandelwal 1986, Stearns and Benzo 1977) and no data appear to be available concerning the possible effect of endurance training in both healthy and diabetic animals. Konishi and Fuwa (1983) have shown that the average chain length was 30% longer in liver glycogen from rats refeed following a 24-h fast than in rat fed *ad libitum*. In contrast, Roesler and Khandelwal (1986) have observed a shorter average chain length in db/db diabetic mice (11.0 ± 0.3 vs 14 ± 1 glucose units in healthy mice). Stearns and Benzo (1977) have also reported, using electron microscopy, that the average glycogen particles were smaller in streptozotocin-induced diabetic mice. Roesler and Khandelwal (1986), suggested that these changes could be associated with the increased liver glycogen turnover observed in diabetes mellitus. Results from the present experiment show that endurance training could also modify the structure of liver glycogen particle. The precise functional significance of these changes, if any, remains to be established. However, the reduction in the volume of the glycogen particle, in healthy animals, for a given number of glycosyl residues in the particle (or the larger number of glycosyl residues for a given size of the particle) is an advantage. This, in fact, increases the ability of the liver to store large amount of glucose in a given space, or similar amounts in a smaller space. Moreover, the increased percentage of non-reducing ends in the particle, is also an advantage when there is a need for releasing glucose from the glycogen particle, by increasing the amount of substrate available for glycogen phosphorylase, for a given amount of glycogen stored in the liver. However, endurance training did not modify, significantly, any of the structural parameters of the glycogen molecule in diabetic

rats since changes attained with insulin treatment could blunt the effect of endurance training. However, according to the volumes of the glycogen particle, volumes were highly heterogeneous in diabetic groups. This high heterogeneity of glycogen particles results failed to achieve significant difference, even if decrease by 44%, in glycogen structure of the glycogen particle between both untrained and trained diabetic animals. Thus, in insulin-treated diabetic rats, endurance training increased glycogen content, with a high content of glycogen in the acid labile fraction, without further affecting its structure.

In conclusion, together with the higher proportion of glycogen in the acid resistant fraction or desmoglycosome and the increased percentage of branching of the hepatic glycogen structure, the present experimentation shows an optimization of liver glycogen characteristics induced by endurance training which is in accordance with an increase hepatic glucose output under glucagon stimulation in healthy subjects (Drouin et al. 1998, Drouin 2003). In the same trend, the larger proportion of glycogen within acid labile fraction or lyoglycosome (less metabolically active) and the high heterogeneity of the particle structure in insulin-treated diabetic animals parallels the study of Ørskov et al. (1991) which demonstrated a sluggish and inappropriate hepatic glucose output under glucagon stimulation associated with diabetes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Mrs Rollande Caron of the Animal Care Unit of Université du Québec à Trois-Rivières, to Mrs Geneviève Robert for technical support and Eli Lilly Canada for kindly providing insulin Iletin II. This research was supported by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR), Government of Quebec, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian diabetes Association (CDA), Government of Canada. Réjean Drouin was a recipient of a doctoral scholarship from the Fonds FCAR.

REFERENCES

Adamo, K.B., and Graham, T.E. 1998. Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J. Appl. Physiol.* **84**:908-913.

Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, J. 1995. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**: 1126-1137.

Baldwin, K.M., Fitts, R.H., Booth, F.W., Winder, W.W., and Holloszy, J.O. 1975. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. *Pfluegers Arch.* **354**: 203-212.

Bischoff, M.G., Krssak, M., Krebs, M., Bernroider, E., Stingl, H., Waldhäusl, W., and Roden, M. 2001. Effect of short-term improvement of insulin treatment and glycemia on hepatic glycogen metabolism in type 1 diabetes. *Diabetes* **50**: 392-398.

Brooks G.A., and Donovan C.M. 1983. Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.* **244**: E505-E512.

Calder, P.C., and Geddes, R. 1986. Digestion of the protein associated with muscle and liver glycogen. *Carbohydrate Res.* **148**:173-177.

Calder, P.C., Geddes, R., and Leecht, H. 1986. The heterogeneity of the protein content of liver and muscle glycogen. *Glycoconjugate J.* **3**: 331-338.

Donovan, C.M., and Sumida, K.D. 1990. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am. J. Physiol.* **258**:R770-R776.

Drouin, R., Milot, M., Robert, G., Massicotte, D., Péronnet, F., and Lavoie, C. 2000. Hepatic glucagon sensitivity induced by endurance training: Effect mediated by increased glycogenolysis ? *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**: S224 #1061.

Drouin, R., Robert, G., Milot, M., Massicotte, D., Péronnet, F., and Lavoie, C. 2004. Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats. *Metabolism* **53**: 1027-1031.

Drouin, R., Lavoie, C., Bourque, J., Ducros, F., Poisson, D., and Chiasson, J.-L. 1998. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am. J. Physiol.* **274**: E23-E28.

Fitts, R.H., Booth, F.W., Winder, W.W., and Holloszy, J.O. 1975. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance and glycogen utilization. *Am. J. Physiol.* **228**: 1029-1033.

Galbo, H., Saugmann, P., and Richter, E.A. 1979. Increased hepatic glycogen synthase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol. Scand.* **107**: 269-272.

Galbo, H., Richter, E.A., Holst, J.J., and Christensen, N.J. 1977. Diminished hormonal responses to exercise in trained rats. *J. Appl. Physiol.* **43** : 953-958.

Geddes, R., and Stratton, G.C. 1977. Molecular and metabolic heterogeneity of liver glycogen. *Carbohydrate Res.* **57**: 291-299.

Geddes, R. and Chow, J.C. 1994. Differing patterns of carbohydrate metabolism in liver and muscle. *Carbohydrate Res.* **256**:139-147.

Goldsmith, E., Sprang, S., and Fletterick, R. 1982. Structure of maltoheptaose by difference Fournier methods and a model for glycogen. *J. Mol. Biol.* **156**: 411-427.

Good, C.A., Kramer, H., and Somogyi, M. 1933. The determination of glycogen *J. Biol. Chem.***100**: 485-491.

Iwamasa, T., Hamada, T., Fukuda, S., Ninomiya, N., and Takeuchi, T. 1982. Ultrastructural and physicochemical studies on glycogen macromolecules from ascites hepatoma AH-13 cells. *Acta Pathol. Jpn.* **32**: 461-471.

James, D.E., and Kraegen, E.N. 1984. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. *Eur. J. Appl. Physiol.* **52**: 276-281.

Kandelwal, R.L., Zinman S.M., and Zebrowski E.J. 1977. The effect of streptozotocin-induced diabetes and of insulin supplementation on glycogen metabolism in rat liver. *Biochem J* **168**: 541-548.

Konishi, Y. and Fuwa, H. 1983. Structural changes in rat liver glycogen during refeeding after fasting. *Agricult. Biol. Chem. (Jpn)*. **47**: 1049-1056.

Margolis, R.N., Selawry H.P., and Curnow, R.T. 1985. Regulation of hepatic glycogen metabolism: effects of diabetes, insulin infusion, and pancreatic islet transplantation. *Metabolism* **34**: 62-68.

Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J., and Cascante, M. 1998. Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophys. J.* **75**: 106-114.

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., and Shelton, D.E. 1993. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem. J.* **295**: 477-483.

Ørskov, L., Alberti, K.G., Mengel, A., Moller, N., Pedersen, O., Rasmussen, O., Seefeldt, T., and Schmitz O. 1991. Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 521-526.

Passoneau, J.V. and Lauderdale, V.R. 1974. A comparison of three methods of glycogen measurements in tissues. *Anal Biochem.* 60:405-412.

Roesler, W.J., and Khandelwal, R.L. 1986. Kinetic properties of glycogen synthase and phosphorylase and structural aspects of glycogen in the db/db mouse liver. *Diabetes* 35: 210-216.

Rybicka, K. 1996. Glycosomes-the organelles of glycogen metabolism. *Tissues & Cell* 28:253-263.

Serafini, M.T., and Alemany, M. 1987. A micromethod for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *J. Bioch. and Biophys. Methods* 15: 33-39.

Shearer, J., and Graham, T.E. 2002. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Can. J. Appl. Physiol.* 27:179-203.

Srere, P.A. 1969. Citrate Synthase. *Methods Enzymol.* 13:3-5.

Stearns, S.B. and Benzo, C.A. 1977. Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (db) and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Lab. Invest.* **13**: 180-187.

Stetten, M.R., Katzen, H. and Stetten, D. 1958. A comparison of the glycogen isolated by acid and alkaline procedure. *J. Biol. Chem.* **232**: 489.

Taylor, A.W., Stothart, J., Booth, M.A., Thayer, R., and Rao, S. 1974b. Human skeletal muscle glycogen branching enzyme activities with exercise and training. *Can. J. Physiol. Pharm.* **529**: 119-122.

Wilstätter, R., and Rohdwall, M. 1934. Über des Zustand des Glykogens in der Leben, in Muskel, und in Leukocyten. *Hoppe Seyler's Z. Physiolog Chemie* **225**: 103-124.

Winder, W.W. 1985. Regulation of hepatic glucose production during exercise *Exerc. Sport Sci. Rev.* **13**:1-31.

Figure 1. Weekly plasma glucose concentrations in untrained (○) and trained (●) animals over the 10 weeks insulin treatment. Blood was obtained via tail vein and glucose levels measured using a glucometer (Precision QID). Values are expressed as means \pm SE.

Figure 2. Glycogen structure with branched glycosyl units linked by alpha 1-4 bonds and branched by alpha 1-6 bonds.

Table 1. Liver glycogen characteristics following endurance training in healthy and diabetic animals. Values are expressed as means \pm SE. ^a $P < 0.05$ vs CUT and ^b $P < 0.05$ vs DUT.

Figure 1.

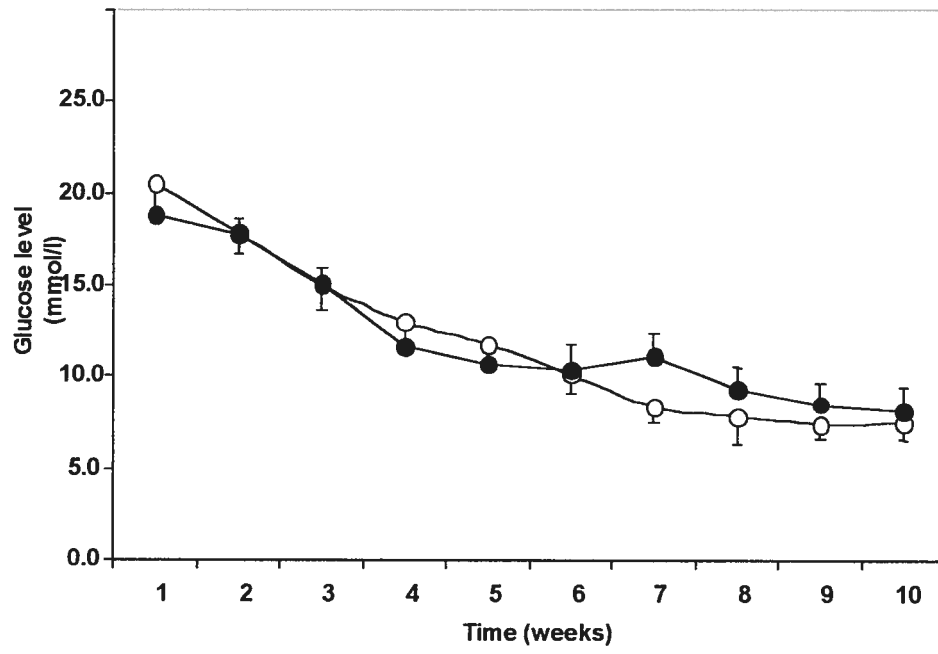


Table 1.

	HT	HT	DUT	DT
	(n=11)	(n=11)	(n=11)	(n=11)
Total glycogen	921 ± 48	1039 ± 51	841 ± 68	1335 ± 210 ^{ab}
Acid labile fraction (lyoglycosome)	549 ± 45	521 ± 38	479 ± 53	873 ± 167 ^{ab}
Acid resistant fraction (desmoglycosome)	59 ± 2	50 ± 2 ^a	56 ± 3	64 ± 2 ^b
	372 ± 11	518 ± 20 ^a	362 ± 61	463 ± 51
	41 ± 2	50 ± 2 ^a	44 ± 3	36 ± 2
Structure of the molecule				
Volume	22,380 ± 2250	12,400 ± 2250 ^a	17,790 ± 5915	9,945 ± 2495 ^a
Radius	17.4 ± 0.6	14.0 ± 1.1 ^a	13.2 ± 1.2 ^a	12.3 ± 1.0 ^a
Tiers	9.7 ± 0.1	10.2 ± 0.2 ^a	10.6 ± 0.2 ^a	10.6 ± 0.2 ^a
Chain length	12.0 ± 0.6	8.6 ± 1.1 ^a	8.0 ± 1.3 ^a	6.9 ± 1.0 ^a
Non-reducing ends & percent of branching	8.4 ± 0.6	12.4 ± 1.2 ^a	17.8 ± 2.2 ^a	17.3 ± 2.4 ^a

Assuming 10⁴ glycosyl residues/particle.

CHAPITRE 3: DISCUSSION

Les principaux thèmes de discussion ayant déjà été abordés dans les articles précédents, les conclusions de ces derniers ne seront donc pas répétées dans la présente section. Toutefois, certaines hypothèses ou spéculations qui n'ont pas été émises dans les articles seront avancées. Le but premier de la discussion est de proposer quelques hypothèses originales, basées sur des observations et des déductions, qui prises dans un ensemble, permettent d'expliquer la réponse hâtive (glycogénolyse-dépendante) de la PHG sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance.

L'étude qui a servi de tremplin à cette thèse (Drouin et al. 1998) nous a appris que l'entraînement en endurance augmente la PHG sous stimulation au glucagon et donc, augmente la sensibilité du foie au glucagon chez l'homme sain. Dans cette étude, la différence dans l'augmentation de la réponse de la PHG chez les sujets entraînés comparativement aux sujets sédentaires était hâtive (< 60 minutes). Cette réponse hâtive nous a permis d'émettre l'hypothèse que la glycogénolyse, au détriment de la néoglucogenèse, était favorisée sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. En effet, Magnusson et al. (1995) ont présenté des résultats démontrant que la glycogénolyse est responsable d'environ 95% de la PHG nette lors de la réponse initiale au glucagon. De plus, chez le chien, il a été observé que 85-90% de la PHG provenait de la glycogénolyse pour les 15 premières minutes de stimulation au glucagon contre seulement 43% à la 165^e minute (Cherrington et al. 1982). Cependant, jusqu'à aujourd'hui, aucune donnée n'existait concernant l'effet

de l'entraînement en endurance sur les proportions relatives de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse sous stimulation au glucagon. Les seules études qui nous permettent de croire que la glycogénolyse puisse être favorisée sous stimulation au glucagon, à la suite d'un entraînement en endurance, sont celles de Nieto et al. (1996), de Fitts et al. (1975) et de James & Kraegan (1984) traitant de l'augmentation de l'activité de l'AMPc (Nieto et al. 1996) et de la quantité accrue de glycogène hépatique (Fitts et al. 1975, James & Kraegan 1984), respectivement, à la suite d'un entraînement en endurance. Cependant, ces résultats n'écartent en rien le fait que la néoglucogenèse, au détriment de l'activité de la glycogénolyse à la suite d'un entraînement en endurance, pourrait être augmentée. En effet, une des études présentées dans cette thèse démontre que la glycogénolyse ainsi que la néoglucogenèse sont augmentées chez les animaux entraînés sains, comparativement aux animaux contrôles, sous stimulation au glucagon. Dans cette étude, la réponse hâtive chez les animaux entraînés, comparativement aux animaux contrôles, est due à une augmentation de la participation de la glycogénolyse (animaux nourris) tandis que la réponse tardive, à une augmentation de la réponse néoglucogénique (animaux à jeun). Ces données confirment que dans notre première étude (Drouin et al. 1998), la glycogénolyse contribuait plus à l'augmentation de la PHG chez les sujets entraînés.

À l'époque (Drouin et al. 1998), deux hypothèses avaient alors été retenues pour expliquer la réponse hâtive de la PHG sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. La première était que l'entraînement en endurance augmente le nombre et/ou l'affinité du récepteur au glucagon. Cette hypothèse était basée sur le fait que dans la totalité des cas où une hyperglucagonémie est présente,

soit chez le sujet diabétique de type 1 insulino-dépendent (Orskov et al. 1991), chez le sujet souffrant d'urémie (Schmitz 1988) et chez les souris obèses ob/ob (Yen 1980), la sensibilité du foie au glucagon y est diminuée probablement due à un phénomène de désensibilisation du récepteur au glucagon. Or, nous avons suggéré que l'entraînement en endurance qui diminue la concentration plasmatique de glucagon au repos chez l'homme (Bloom et al. 1976, Coggan et al. 1995, Gyntelberg et al. 1977, Drouin et al. 1998, Mendenhall et al. 1994) et le rat (Brooks et Donovan 1983, Donovan et Sumida 1997, Galbo et al. 1977) provoque l'effet inverse, soit une resensibilisation du récepteur au glucagon. Nous avons vérifié cette hypothèse (Légaré et al. 2001) et avons montré que l'entraînement en endurance chez le rat n'a aucun effet sur l'affinité du récepteur mais augmente de façon significative la densité des récepteurs au glucagon sur la cellule hépatique. Cette densité accrue du récepteur au glucagon peut largement expliquer la plus grande PHG sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. Cependant, cela n'explique pas entièrement la réponse hâtive de la PHG sous stimulation au glucagon (Drouin et al. 1998), car la glycolyse ainsi que la néoglucogenèse sont en mesure, tous les deux, de bénéficier d'une augmentation de la densité du nombre de récepteurs au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance.

La deuxième hypothèse lancée (Drouin et al. 1998) voulait que l'entraînement en endurance provoque une augmentation de la concentration hépatique de glycogène sachant que le taux de PHG sous stimulation au glucagon est en relation directe avec la concentration hépatique de glycogène (Vissing et al. 1989, Komjati et al. 1985). Cependant, au niveau du foie, l'augmentation de la concentration de glycogène à la

suite d'un entraînement en endurance est un fait encore controversé. Certains ont observé une augmentation de la quantité de glycogène hépatique à la suite d'un entraînement en endurance (Galbo et al. 1979, Baldwin et al. 1975) tandis que d'autres n'ont enregistré aucune différence (Fitts et al. 1975, James and Kraegan 1984). Malheureusement, lors de l'étude de Drouin et al. (1998), aucune donnée n'était disponible concernant la concentration initiale de glycogène chez les sujets sédentaires et entraînés. Toutefois, dans l'étude présentée dans cette thèse chez l'animal sain, l'entraînement en endurance n'augmente pas la quantité de glycogène disponible, bien que la participation de la glycogénolyse est augmentée lorsque stimulée par le glucagon.

L'explication la plus élémentaire pour expliquer l'augmentation de la participation de la glycogénolyse induite par le glucagon avec l'entraînement en endurance, indépendamment de la quantité de glycogène hépatique, serait que l'entraînement en endurance augmente l'activité d'une ou de plusieurs enzymes impliquées dans la dégradation du glycogène. Cependant, encore une fois, le peu de données répertoriées aujourd'hui semblent révéler l'inverse. Par exemple, Galbo et al. (1979) ont démontré une augmentation de l'activité de la glycogène synthétase parallèlement à une diminution de l'activité de la glycogène phosphorylase. Ces données confirment l'hypothèse du groupe de chercheurs qui affirment que l'entraînement en endurance augmente la concentration de glycogène hépatique, et protège les réserves de glycogène hépatique (Galbo et al. 1979, Baldwin et al. 1975). Cependant, nous présentons ici des résultats (Drouin et al. 2004) qui démontrent que sous stimulation au glucagon, à la suite d'un entraînement en endurance, l'activité et

la concentration de la glycogène phosphorylase sont augmentées. Ce qui supporte grandement une augmentation du taux glycolytique hépatique à la suite d'un entraînement en endurance.

Les résultats présentés dans cette thèse nous permettent d'émettre une nouvelle hypothèse, autre que celles élaborées dans notre étude initiale de 1998 sur l'augmentation de la réponse de la glycolyse induite par le glucagon suite à l'entraînement en endurance. Ce que nous proposons ici, c'est que le substrat de base, c'est-à-dire le glycogène, par ses caractéristiques intrinsèques, pourrait influencer sa disponibilité et ainsi participer à la réponse hâtive, dépendante de la glycolyse, de la PHG sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance.

Dans un premier temps, les résultats présentés dans cette thèse, sur l'hétérogénéité du glycogène chez les animaux sains et diabétiques, nous apprennent que l'entraînement en endurance augmente la proportion de glycogène associée à la fraction desmoglycosome, insoluble au traitement à l'acide (41 ± 2 vs 50 ± 2 %, chez les animaux sédentaires et entraînés, respectivement) comparativement à la fraction lyoglycosome, soluble à l'acide. Or, si on se rapporte à la littérature présentée dans cette thèse, la fraction du glycogène insoluble au traitement à l'acide possède une activité phosphorylase supérieure à la fraction soluble au traitement à l'acide (Stetten 1958, Rybika et al. 1996). De plus, des études de Shearer et al (2001) et de Graham et al. (2001) ont clairement démontrées, dans le muscle, que la fraction insoluble au traitement à l'acide est une fraction permettant au glycogène d'être plus accessible,

donc prête à être utilisée, contrairement à la fraction soluble au traitement à l'acide, qui elle, ne serait utilisée que dans les cas d'urgence. Selon eux, la fraction insoluble au traitement à l'acide est de façon préférentielle utilisée lorsque les concentrations de glycogène sont faibles ou normales mais lorsqu'il y a surcompensation de glycogène, la fraction soluble au traitement à l'acide du glycogène est préférée (Shearer et al. 2001, Graham et al. 2001). Cependant, aucune donnée n'est disponible en ce qui concerne l'utilisation de ces différentes fractions du glycogène dans le foie. De plus, dû au fait qu'il y ait échange de glycogène entre les deux fractions, c'est-à-dire, que la fraction soluble au traitement à l'acide du glycogène puisse devenir la fraction desmoglycosome et vice-et-versa, cela devient difficile d'affirmer avec certitude une plus grande participation d'une fraction ou d'une autre. Seule une technique de marquage isotopique du glycogène au sein des différentes fractions nous permettrait d'affirmer avec certitude l'utilisation accrue du glycogène dans l'une ou l'autre des fractions. Ce que n'a pas fait Shearer et al. (2001) et Graham et al. (2001). Donc, une plus grande proportion du glycogène contenu dans la fraction insoluble au traitement à l'acide pourrait en partie expliquer une plus grande participation de la glycolyse sous stimulation au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance.

La deuxième hypothèse que nous proposons est que la structure du glycogène peut également jouer un rôle régulateur sur son utilisation. Dans un des articles présentés ici, nous observons que le glycogène des animaux entraînés est d'un plus petit volume et plus branché avec des longueurs de chaînes inférieures au glycogène des animaux sédentaires. Ces résultats confirment une plus grande quantité de

glycogène associée à la fraction desmoglycogène insoluble au traitement à l'acide. En effet, Calder et al. (1986) ont démontré que le glycogène associé à la fraction insoluble au traitement à l'acide était formé de plus petites particules ayant des longueurs de chaînes extérieures inférieures au glycogène contenu dans la fraction soluble (Calder et al. 1986). Alors, comment de telles modifications pourraient éventuellement apporter une augmentation de l'utilisation du glycogène sous stimulation au glucagon ?

Selon Mélendez-Hevia et al. (1993), il existe une relation directe entre la structure du glycogène et son métabolisme. En résumé, pour le même nombre d'unités glucose, plus la molécule de glycogène est branchée, plus les unités glucose du dernier tiers sont accessibles à la glycogène phosphorylase et donc, plus rapidement la particule de glycogène peut fournir du glucose à la circulation sanguine. Cette hypothèse concorde avec les travaux de Galbo et al. (1979) qui ont démontré une plus grande activité de la glycogène synthétase à la suite d'un entraînement en endurance. En situation anabolique, il est vrai que l'activité de la synthétase est supérieure à l'activité de la phosphorylase (Galbo et al. 1979, Garrido et al. 1996). Ce qui pourrait en fait expliquer la différence de structure entre le glycogène des animaux sédentaires et entraînés. En effet, une activité accrue de la glycogène synthétase, parallèlement à une augmentation de l'activité de l'amylo-(1,4→1,6)-transglycosylase, démontre un effort supplémentaire de la particule de glycogène à former des branches, et ainsi, diminuer son volume (Meléndez et al. 1997). Ceci a pour conséquence d'augmenter, en situation catabolique, le nombre de

possibilités d'attachement de la glycogène phosphorylase sur cette même particule de glycogène. En situation catabolique, à notre connaissance il n'existe aucune littérature démontrant une augmentation de l'activité de la phosphorylase à la suite d'un entraînement en endurance dans le foie. Cependant, nous avons observé, à la fin de la période de stimulation au glucagon, que l'activité de la phosphorylase était supérieure dans le foie des animaux entraînés comparativement aux animaux sédentaires. Sachant que l'activité de la glycogène phosphorylase est proportionnelle à la PHG (Shiota et al. 1996), on peut supposer que, lors de la période de stimulation au glucagon, l'activité de la phosphorylase était supérieure chez les animaux entraînés. Donc, une modification de la structure du glycogène accompagnée d'une plus grande proportion de ce glycogène associée à la fraction insoluble, pourraient participer à l'augmentation de la contribution de la glycogénolyse sous stimulation au glucagon, observée à la suite d'un entraînement en endurance.

Pour que de telles hypothèses soient valables, elles doivent s'appliquer dans différentes situations physiologiques, comme le diabète. Pour ce qui est de la proportion de glycogène associé aux fractions solubles et insolubles, nous avons observé que le traitement à l'insuline permet de rétablir chez les animaux diabétiques les proportions aux valeurs des animaux contrôles sains et même supérieures chez les animaux entraînés. Cependant, l'entraînement en endurance chez les animaux diabétiques traités à l'insuline augmente la quantité de glycogène mais ne favorise pas la fraction insoluble à l'acide mais bien la fraction soluble à l'acide. Ce qui pourrait rejoindre les données de Graham et al (2001) et Shearer et al. (2001) dans le muscle démontrant que la surcompensation de glycogène favorise la fraction soluble

au traitement à l'acide. De plus, au niveau de la PHG sous stimulation au glucagon, l'étude que nous présentons ne démontre aucune différence significative entre les animaux diabétiques traités à l'insuline, sédentaires et entraînés, bien que la concentration de glycogène après entraînement soit significativement plus grande que chez les animaux entraînés. Donc, comme le suggère l'hypothèse proposée ci-haut, il semble bien que le glycogène emmagasiné dans la fraction insoluble (desmoglycosome) soit plus accessible. Ainsi, les animaux sains entraînés qui ont la plus grande proportion de cette fraction (comparativement aux autres groupes) se distinguent dans la contribution de la glycogénolyse, et ce, pour une même quantité de glycogène.

Pour la structure de la molécule, il semble que le traitement à l'insuline optimise déjà la structure en diminuant son volume et augmentant ainsi la quantité de glucose disponible à la glycogène phosphorylase. L'entraînement n'a donc pas modifié de façon supplémentaire la structure du glycogène. La structure est donc optimisée, ce qui pourrait entre autre expliquer la régularisation de la réponse de la glycogénolyse (forme de cloche) comparativement aux animaux sédentaires, sans toutefois, augmenter la participation de la glycogénolyse sous stimulation au glucagon.

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ensemble des études présentées dans cette thèse nous a permis de faire ressortir quelques mécanismes d'action, impliqués dans l'augmentation accrue de la PHG induite par le glucagon observées à la suite d'un entraînement en endurance. Nous avons développé cette plate-forme de recherche lors de ma maîtrise par la démonstration de l'augmentation de la sensibilité du foie au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance chez des sujets sains (Drouin et al. 1998). Cependant, à l'époque, aucun mécanisme d'action n'avait encore été identifié. La présente thèse nous a donc permis de faire ressortir quelques mécanismes d'actions.

L'entraînement en endurance à la nage, suivi de la perfusion du foie *in situ* des animaux sains, nous a permis de transposer chez l'animal les résultats obtenus initialement chez l'homme (Drouin et al. 1998). De ces expérimentations, il en ressort, qu'une augmentation du taux néoglucogénique induite par le glucagon participe à l'augmentation de la PHG accrue à la suite d'un entraînement en endurance chez l'animal sain. Ce qui ne représente pas une surprise du fait que plusieurs études ont démontré une activité accrue des hépatocytes à extraire des précurseurs de la néoglucogénèse et à produire de façon plus efficace du glucose (Burelle et al. 2001, Turcotte et Brooks 1990, Donovan et Sumida 1990), et ceci, en absence de glucagon toutefois. Cependant, ce qui est nouveau, c'est la participation accrue de la glycogénolyse dans la PHG induite par le glucagon à la suite d'un entraînement en endurance, puisque selon la littérature (Galbo et al. 1979, Baldwin et al. 1975), l'entraînement tend à favoriser davantage l'économie de glycogène et à

augmenter l'apport de la néoglucogénèse ou même de diminuer l'apport des glucides dans l'homoéostasie du glucose en situation catabolique. Aujourd'hui, il est difficile de spéculer sur un ou des facteurs responsables de l'augmentation du taux glycogénolytique et néoglucogénique induits par le glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. L'ARNm des différentes enzymes sera à évaluer à la suite d'un entraînement en endurance ainsi que sous la stimulation au glucagon.

L'augmentation de la densité du récepteur au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance chez des animaux sains est l'un des mécanismes impliqués dans cette augmentation accrue de la PHG induite par le glucagon à la suite d'un entraînement en endurance (Légaré et al. 2001). Cependant, aujourd'hui, il est difficile de spéculer sur le ou les mécanismes d'action impliqués dans l'augmentation de la densité du récepteur au glucagon à la suite d'un entraînement en endurance chez l'animal sain. Nous savons que l'expression de l'ARNm du récepteur au glucagon peut être augmentée *in vitro* par le glucose (Abrahamsen et al. 1995, Burecelin et al. 1998, Portois et al. 1999, Svoboda et al. 1999), l'AMPc (Abrahamsen et al. 1995), et l'oxygène (Krones et al. 1998) et diminuée par le glucagon (Authier 1992 et Bhathena 1978). Ces facteurs peuvent être modifiés à la suite d'un entraînement en endurance et pourraient ainsi modifier la densité du récepteur au glucagon.

La littérature reste encore incertaine sur l'interprétation de l'hétérogénéité du glycogène. Dans la présente thèse, nous avons proposé que le substrat de la glycogénolyse, soit le glycogène, peut avoir une certaine influence sur son utilisation et son entreposage. Ces hypothèses sont appuyées par des études récentes démontrant l'implication de la structure ou de l'hétérogénéité globale du glycogène sur son

métabolisme. Récemment, le concept de pro- et macroglycogène a fait surface (Lomako et al. 1990). Ces derniers présentaient le proglycogène comme une forme intermédiaire de la synthèse et de la dégradation de la molécule de glycogène se caractérisant par l'action d'une glycogène synthétase proglycogénique distincte de la glycogène synthétase classique. Ces travaux ont été repris, par la suite par, l'équipe de Graham (Adamo et al. 1998, Graham et al. 2001). Cependant, dans leurs études, l'isolation de la fraction de glycogène s'effectuait à partir d'une technique différente de celle de Lomako et al. (1990), soit une technique de précipitation à l'acide. Il a été démontré que cette technique, utilisée par Rybicka (1979,1981,1996), isole de façon spécifique le glycogène associé au desmo- et au lyoglycosome. Plus récemment, Shearer et Graham (2002) changeaient leur appellation et ramenaient un concept de Wilstätter et Rohdwalt (1934), soit le glycogène soluble et insoluble au traitement à l'acide. Dans la présente thèse, cette dernière appellation a été adoptée, afin d'éviter la confusion, au détriment de l'appellation lyo- et desmoglycosome, car la technique de précipitation à l'acide était utilisée. Il est donc évident qu'il reste beaucoup de travail pour atteindre un consensus parmi les différentes équipes de recherche.

L'implication de la structure du glycogène dans son utilisation est un concept original. Certaines études ont démontré que la structure peut être détériorée à la suite de bouleversements physiologiques, tel le diabète (Roesler et Khandelwal 1986). Mais à notre connaissance, l'étude présentée dans cette thèse est la seule qui démontre directement que la structure puisse être optimisée. L'intégration du concept du glycogène soluble ou insoluble au traitement à l'acide ainsi que celui de la structure se marient bien comme démontré dans cette étude. En effet, nous avons

observé que dans le cas des animaux sains et diabétiques, traités à l'insuline, l'entraînement en endurance favorise à la fois le stockage et l'utilisation du glycogène. Cependant, l'interaction entre les deux fractions (insolubles et solubles) ainsi que la structure fine du glycogène dans ces fractions restent à déterminer.

Les dernières recommandations du *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (1993) et de l'*Association canadienne du diabète* (Miltzer 2003) préconisent un traitement plus intensif à l'insuline chez les sujets diabétiques de type 1. Cependant, ces recommandations plus strictes ne sont pas sans augmenter la fréquence des hypoglycémies (DCCT 1993, Bolli 1999, Cryer 1999, 2000, Miltzer 1998), ce qui est, selon certains chercheurs, dû à une faiblesse contre-régulatoire observée chez les sujets diabétiques sous traitement plus intensif à l'insuline (Amiel 1988, Simonson 1985). Cette faiblesse a été démontrée par Orskov et al. (1991), où la sensibilité du foie au glucagon était diminuée chez des sujets diabétiques, traités à l'insuline. Sachant que l'entraînement en endurance augmente la sensibilité du foie au glucagon, il s'avérait donc important de vérifier si ce type d'intervention peut améliorer la sensibilité du foie au glucagon des sujets diabétiques traités à l'insuline et ainsi diminuer le risque d'hypoglycémie. Les études présentées dans cette thèse nous ont permis de démontrer que l'entraînement en endurance permet en effet d'augmenter la sensibilité du foie au glucagon. L'augmentation du taux néoglucogénique semble être un élément important. Cependant, même si l'entraînement en endurance n'a pas modifié la PHG globale, ce dernier la régularisait dans le temps. De plus, l'entraînement en endurance tendait, toutefois, sans différence significative, à augmenter, tout comme chez les animaux sains, la densité

des récepteurs au glucagon. La plus grande proportion de glycogène insoluble au traitement à l'acide est également un facteur qui a certainement influencé la modulation de la PHG induite par le glucagon à la suite d'un entraînement en endurance. Cependant, tout comme chez les animaux sains, beaucoup de paramètres restent encore à être évalués.

BIBLIOGRAPHIE

Abrahamsen N, Lundgren K et Nishimura E. Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP. *J Biol Chem* 270: 15853-15857, 1995.

Abrahamsen, N., et Nishimura, E. Regulation of glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger ribonucleic acid expression in cultured rat pancreatic islets by glucose, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and glucocorticoids. *Endocrinology*, 136:1572-1578. 1995.

Adamo KB et Graham TE. Comparaison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J. Appl. Physiol.* 84(3): 908-913, 1998.

Albert B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K et Watson JD. Molecular biology of the cell. Garland Publishing In., New York & London, 3e ed., 1994.

Alonso MD, Lomako J, Lomako WM et Whelan WJ. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J* 9: 1126-1137, 1995.

Authier F, Desbuquois B, et De Galle B. Ligand-mediated internalization of glucagon receptors in intact rat liver. *Endocrinology* 131: 447-457, 1992.

Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW et Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. *Pflugers Arch* 354: 203-212, 1975.

Bahnak BR et Gold AH. Effect of alloxan diabetes on the turnover of rat liver glycogen synthase: comparaison with liver phosphorylase. *J. Biol. Chem.* 257(15): 8775-80, 1982.

Becker-Zimmermann K, Berger M, Berchtold P, Gries FA, Herberg L, et Schwenen M. Treadmill training improves intravenous glucose tolerance and insulin sensitivity in fatty Zucker rats. *Diabetologia* 22: 468-474, 1982.

Bell PM, Henry RW, Buchanan KD et Alberti KG. The effect of starvation on the gastro-entero-pancreatic hormonal and metabolic responses to exercise. (GEP hormones in starvation and exercise). *Diabete Metab* 10: 194-198, 1984.

Berger M, Becker-Zimmermann K, et Herberg L. Physical training in insulin-resistant states. *Int J Obes.* 6 Suppl. 1 : 35-40, 1982.

Berger M, Kemmer FW, Becker K, Herberg L, Schwenen M, Gjinavci A, et Berchtold P. Effect of physical training on glucose tolerance and on glucose metabolism of skeletal muscle in anesthetized normal rats. *Diabetologia* 16 : 179-184, 1979.

Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Lopaschuk GD, Casazza GA, Horning MA et Brooks GA. Muscle net glucose uptake and glucose kinetics after endurance training in men. *Am J Physiol* 277: E81-E92, 1999.

Bergman BC, Horning MA, Casazza GA, Wolfel EE, Butterfield GE et Brooks GA. Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E244-E251, 2000.

Bernard CI. Sul le mécanisme physiologique de la formation du sucre dans le foie. *Compt Rend Sci* 44: 578-586, 1857.

Beuers U et Jungermann K. Relative contribution of glycogenolysis and gluconeogenesis to basal, glucagon- and nerve stimulation-dependent glucose output in the perfused liver from fed and fasted rats. *Biochem Int* 21: 405-415, 1990.

Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S et Recant L. Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J Clin Invest* 61:1488-1497, 1978.

Bhathena SJ, Voyles NR, Smith S et Recant L. Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia. *J Clin Invest* 61: 1488-1497, 1978.

Bischof MG, Bernroider E, Ludwig C, Kurzemann S, Kletter K, Waldhausl W et Roden M. Effect of near physiologic insulin therapy on hypoglycemia counterregulation in type-1 diabetes. *Horm Res* 56: 151-158, 2001.

Bloom SR, Johnson RH, Park DM, Rennie MJ et Sulaiman WR. Differences in the metabolic and hormonal response to exercise between racing cyclists and untrained individuals. *J Physiol* 258: 1-18, 1976.

Böhm SK, Grady EF, et Bunnett NW Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322: 1-18, 1997.

Bolli GB et Perriello G. Impact of activated glucose counterregulation on insulin requirements in insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res Suppl* 24: 87-96, 1990.

Bolli GB et Fanelli CG. Physiology of glucose counterregulation to hypoglycemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 28: 467-93, 1999.

Bonen A, Clune PA et Tan MH. Chronic exercise increases insulin binding in muscles but not liver. *Am J Physiol* 251: E196-203, 1986.

Bonjorn VM, Latour MG, Belanger P et Lavoie JM. Influence of prior exercise and liver glycogen content on the sensitivity of the liver to glucagon. *J Appl Physiol* 92: 188-194, 2002.

Bottger I, Schlein EM, Faloona GR, Knochel JP et Unger RH. The effect of exercise on glucagon secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 117-125, 1972.

Brooks GD et Donovan CM. Effect of endurance training on glucose kinetics during exercise. *Am. J. Physiol.* 244 : E505-12, 1983.

Burcelin R, Katz EB et Charron MJ. Molecular and cellular aspects of the glucagon receptor: role in diabetes and metabolism. *Diabetes Metab* 22: 373-396, 1996.

Burcelin R, Mrejen C, Decaux JF, De Mouzon SH, Girard J et Charron MJ. In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism. *J Biol Chem* 273: 8088-8093, 1998.

Burelle Y, Fillipe C, Peronnet F, et Leverve X. Mechanisms of increased gluconeogenesis from alanine in rat isolated hepatocytes after endurance training. *Am J Physiol* 278: E35-E42, 2000.

Burelle Y, Massicotte D, Lussier M, Lavoie C, Hillaire-Marcel C et Peronnet F. Oxidation of [¹³C]glycerol ingested along with glucose during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 90: 1685-1690, 2001.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Mol. Endo* 25: 169-193, 2000.

Calder PC et Geddes R. Digestion of the protein associated with muscle and liver glycogens. *Carbohydr Res* 148: 173-177, 1986.

Calder PC et Geddes R. Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation. *Int J Biochem.*24: 71-77, 1992.

Calder PC. Glycogen structure and biogenesis. *Int J Biochem* 23: 1335-1352, 1991.

Campbell WW, Polansky MM, Bryden NA, Soares JHJr, et Anderson RA. Exercise training and dietary chromium effects on glycogen, glycogen synthase, phosphorylase and total protein in rats. *J Nutr* 119: 653-660, 1989.

Carstens S et Andersen I. [Intranasal glucagon in the treatment of hypoglycemia. A therapeutic possibility in the future]. *Ugeskr Laeger* 156: 4339-4342, 1994.

Chan TM, Young KM, Hutson NJ, Brumley FT et Exton JH. Hepatic metabolism of genetically diabetic (db/db) mice. I. Carbohydrate metabolism. *Am J Physiol* 229: 1702-1712, 1975.

Chee NP et Geddes R. The structure of liver glycogen. *FEBS Lett.* 73: 164-166, 1977.

Cherrington AD, Diamond MP, Green DR et Williams PE. Evidence for an intrahepatic contribution to the warning effect of glucagon on glucose production in the conscious dog. *Diabetes* 31: 917-922, 1982.

Chicchi GG, Graziano MP, Koch G, Hey P, Sullivan K, Vicario PP, et Cascieri MA. Alterations on receptor activation and divalent cation activation of agonist binding by deletion of intracellular domains of the glucagon receptor. *J Biol Chem* 272: 7765-7769, 1997.

Christophe J. Glucagon and its receptor in various tissues. *Ann N Y Acad Sci* 805: 31-42, 1996.

Christophe J. Glucagon receptors: from genetic structure and expression to effector coupling and biological responses. *Biochim. Biophys. Acta* 1241: 45-57, 1995.

Coggan AR, Kohrt WM, Spina RJ, Bier DM et Holloszy JO. Endurance training decreases plasma glucose turnover and oxidation during moderate-intensity exercise in men. *J Appl Physiol* 68: 990-996, 1990.

Coggan AR, Swanson SC, Mendenhall LA, Habash DL et Kien CL. Effect of endurance training on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during prolonged exercise in men. *Am J Physiol* 268: E375-E383, 1995.

Coggan AR. Plasma glucose metabolism during exercise: effect of endurance training in humans. *Med Sci Sports Exerc* 29: 620-627, 1997.

Cortez MY, Torgan CE, Brozinick JT Jr, et Ivy JL. Insulin resistance of obese Zucker rats exercise trained at two different intensities. *Am J Physiol* 261 : E613-E619, 1991.

Cross DA, Alessi DR, Vandenheede JR, McDowell HE, Hundal HS et Cohen P. The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* 303 (Pt 1): 21-26, 1994.

Cryer PE. Adrenergic mechanisms in glucose counterregulation in normal and diabetic man. *Cardiovasc Res* 16: 370-376, 1982.

Cryer PE et Gerich JE. Glucose counterregulation, hypoglycemia, and intensive insulin therapy in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 313: 232-241, 1985.

Cryer PE. Symptoms of hypoglycemia, thresholds for their occurrence, hypoglycemia unawareness. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 28: 495-500, 1999.

Cryer PE. Hypoglycemia is the limiting factor in the management of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 15: 42-46, 1999.

Cryer PE. Are gender differences in the responses to hypoglycemia relevant in iatrogenic hypoglycemia in type 1 diabetes ? *J Clin Endocrinol Metab.* 85: 2145-2147, 2000.

Cryer PE, White NH et Santiago JV. The relevance of glucose counterregulatory systems to patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Endocr Rev* 7: 131-139, 1986.

Cryer PE, Davis SN et Shamooh H. Hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26 : 1902-1912, 2003.

Cypess AM, Unson CG, Wu CR, et Sakmar TP. Two cytoplasmic loops of the glucagon receptor are required to elevate cAMP or intracellular calcium. *J Biol Chem* 274: 19455-19464, 1999.

Dela F, Mikines KJ, Larsen JJ et Galbo H. Glucose clearance in aged trained skeletal muscle during maximal insulin with superimposed exercise. *J Appl Physiol* 87: 2059-2067, 1999.

Desbuquois B et Authier, F. Récepteur du glucagon. *Ann. Endo. (Paris)* 50: 440-446, 1989.

Diabetes Control et Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986, 1993.

Dighe RR, Rojas FJ, Birnbaumer L et Garber AJ. Glucagon-stimulable adenylyl cyclase in rat liver. The impact of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 73: 1013-1023, 1984.

Dirlewanger M, Schneiter PH, Paquot N, Jequier E, Rey V et Tappy L. Effects of glucocorticoids on hepatic sensitivity to insulin and glucagon in man. *Clin Nutr* 19: 29-34, 2000.

Dobbins RL, Connolly CC, Neal DW, Palladino LJ, Parlow AF et Cherrington AD. Role of glucagon in countering hypoglycemia induced by insulin infusion in dogs. *Am J Physiol* 261: E773-E781, 1991.

Doi Y, Iwai M, Matsuura B et Onji M. Glucagon attenuates the action of insulin on glucose output in the liver of the Goto-Kakizaki rat perfused in situ. *Pflugers Arch* 442: 537-541, 2001.

Donovan CM et Sumida KD. Training improves glucose homeostasis in rats during exercise via glucose production. *Am J Physiol* 258: R770-R776, 1990.

Drochman P. Etude au microscope électronique de colorations négatives du glycogène particulaire. Morphologie du glycogène. *J Ultrastruct Res* 6: 141-163, 1962.

Drouin R, Lavoie C, Bourque J, Ducros F, Poisson D et Chiasson JL. Increased hepatic glucose production response to glucagon in trained subjects. *Am J Physiol* 274: E23-E28, 1998.

Drouin R, Robert G, Milot M, Massicotte D, Péronnet F et Lavoie C. Swim training increases glucose output from liver perfused in situ with glucagon in fed and fasted rats. *Metabolism* 53 (8): 1027-1031, 2004.

Duan C et Winder WW. Effect of endurance training on activators of glycolysis in muscle during exercise. *J Appl Physiol* 76 (2): 846-852, 1994.

Duclos M, Corcuff JB, Pehourcq F, et Tabarin A. Decreased pituitary sensitivity to glucocorticoids in endurance-trained men. *Eur J Endocrinol* 144 (4): 363-368, 2001.

Exton JH. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab Rev* 3: 163-183, 1987.

Felig P et Wahren J. Fuel homeostasis in exercise. *N Engl J Med* 293: 1078-1084, 1975.

Felig P et Wahren J. Role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production during exercise. *Diabetes* 28 Suppl 1: 71-75, 1979.

Fisher SJ, Lekas M, Shi ZQ, Bilinski D, Carvalho G, Giacca A, et Vranic M. Insulin-independent acute restoration of euglycemia normalizes the impaired glucose clearance during exercise in diabetic dogs. *Diabetes* 46: 1805-1812, 1997.

Fitts RH, Booth FW, Winder WW et Holloszy JO. Skeletal muscle respiratory capacity, endurance, and glycogen utilization. *Am J Physiol.* 228: 1029-1033, 1975.

Freychet L, Rizkalla SW, Desplanque N, Basdevant A, Zirinis P, Tchobroutsky G et Slama G. Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1: 1364-1366, 1988.

Frandsen EK, Thim L, Moody AJ, et Markussen J. Structure-function relationships in glucagon. Re-evaluation of glucagon-(1-21). *J Biol Chem* 260: 7581-7584, 1985.

Friden J, Seger J, et Ekblom B. Implementation of periodic acid-thiosemicarbazide-silver proteinate staining for ultrastructural assessment of muscle glycogen utilization during exercise. *Cell Tissue Res* 242: 229-232, 1985.

Friden J, Seger J, et Ekblom B. Topographical localization of muscle glycogen: an ultrahistochemical study in the human vastus lateralis. *Acta Physiol Scand* 135: 381-391, 1989.

Gabbay RA et Lardy HA. Site of insulin inhibition of cAMP-stimulated glycogenolysis. *J Biol Chem* 259: 6052-6055, 1984.

Galbo H et Holst JJ. The influence of glucagon on hepatic glycogen mobilization in exercising rats. *Pflugers Arch* 363: 49-53, 1976.

Galbo H, Richter EA, Holst JJ, Christensen NJ. Diminished hormonal responses to exercise in trained rats. *J Appl Physiol* 43:953-958, 1977.

Galbo H, Saugmann P et Richter EA. Increased hepatic glycogen synthetase and decreased phosphorylase in trained rats. *Acta Physiol Scand* 107: 269-272, 1979.

Garrido G, Guzman M et Odriozola JM. Effect of different types of high carbohydrate diets on glycogen metabolism in liver and skeletal muscle of endurance-trained rats. *Eur J Physiol Occup Physiol.* 74: 91-99, 1996.

Geddes R et Stratton GC. Molecular and metabolic heterogeneity of liver glycogen. *Carbohydr Res* 57: 291-299, 1977.

Geddes T et Taylor JA. Factors affecting the metabolic control of cytosolic and lysosomal glycogen levels in the liver. *Biosci Rep.* 5: 315-320, 1985.

Geddes R et Chow JC. Differing patterns of carbohydrate metabolism in liver and muscle. *Carbohydr Res* 256: 139-147, 1994.

Geiger A, Decaux JF, Burcelin R, Le Cam A, Salazar G, Charron MJ, Girard J, et Kervran A. Structural and functional characterizations of the 5'-flanking region of the mouse glucagon receptor gene: comparison with the rat gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 272: 912-921, 2000.

Gerich J, Cryer P et Rizza R. Hormonal mechanisms in acute glucose counterregulation: the relative roles of glucagon, epinephrine, norepinephrine, growth hormone, and cortisol. *Metabolism* 29: 1164-1175, 1980.

Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 1608-1617, 1988.

Giada F, Bertaglia E, De Piccoli B, Franceschi M, Sartori F, Raviele A, et Pascotto P. Cardiovascular adaptations to endurance training and detraining in young and older athletes. *Int J Cardiol* 65 (2): 149-155, 1998.

Goldsmith E, Sprang S et Fletterick R. Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen. *J Mol Biol* 156: 411-427, 1982.

Graham TE, Adamo KB, Shearer J, Marchand I, et Saltin B. Pro- and macroglycogenolysis: relationship with exercise intensity and duration. *J Appl Physiol*. 90: 873-879, 2001.

Gunja-Smith Z, Marshall JJ, Mercier C, Smith EE et Whelan WJ. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett* 12: 101-104, 1970.

Gyntelberg F, Rennie MJ, Hickson RC et Holloszy JO. Effect of training on the response of plasma glucagon to exercise. *J Appl Physiol* 43: 302-305, 1977.

Hansen LH, Gromada J, Bouchelouche P, Whitmore T, Jelinek L, Kindsvogel W et Nishimura E. Glucagon-mediated Ca^{2+} signaling in BHK cells expressing cloned human glucagon receptors. *Am J Physiol* 274: C1552-C1562, 1998.

Hansen BF, Derave W, Jensen P et Richter EA. No limiting role for glycogenin in determining maximal attainable glycogen levels in rat skeletal muscle. *Am j Physiol* 278: E398-E404, 2000.

Harris GS, Michalek SM, et Curtiss R 3rd. Cloning of a locus involved in *Streptococcus mutans* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. *Infect Immun.* 60 :3175-3185, 1992.

Hartley LH, Mason JW, Hogan RP, Jones LG, Kotchen TA, Mougey EH, Wherry FE, Pennington LL et Ricketts PT. Multiple hormonal responses to prolonged exercise in relation to physical training. *J Appl Physiol* 33: 607-610, 1972.

Haymond MW et Schreiner B. Mini-dose glucagon rescue for hypoglycemia in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24: 643-645, 2001.

Henriksson J. Training induced adaptation of skeletal muscle and metabolism during submaximal exercise. *J Physiol* 270: 661-675, 1977.

Henriksen EJ. Invited review: Effect of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J Appl Physiol.* 93 : 788-796, 2002.

Hevener AL, Reichart D, et Olefsky J. Exercise and thiazolidinedione therapy normalize insulin action the obese Zucker fatty rat. *Diabetes* 49 : 2154-2159, 2000.

Hultman E. Fuel selection, muscle fibre. *Proc Nutr Soc* 54: 107-121, 1995.

Hvidberg A, Djurup R et Hilsted J. Glucose recovery after intranasal glucagon during hypoglycaemia in man. *Eur J Clin Pharmacol* 46: 15-17, 1994.

Hwang JH, Perseghin G, Rothman DL, Cline GW, Magnusson I, Petersen KF et Shulman GI. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest* 95: 783-787, 1995.

Ikeda T, Hoshino T, Honda M, Takeuchi T, Mokuda O, Tominaga M et Mashiba H. Effect of glucagon on glucose output from bivascularly perfused rat liver. *Exp Clin Endocrinol* 94: 383-386, 1989.

James DE, et Kraegen EW. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 52:276-281,1984.

Jelinek LJ, Lok S, Rosenberg GB, Smith RA, Grant FJ, Biggs S, Bensch PA, Kuijper JL, Sheppard PO, et Sprecher CA. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* 259: 1614-1616, 1993.

Jiang G et Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E671-E678, 2003.

Kemppainen J, Stolen K, Kallioski KK, Salo T, Karanko H, Viljanen T, Airaksinen J, Nuutila P, et Knuuti J. Exercise training improves insulin stimulated skeletal muscle glucose uptake independent of changes in perfusion in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 9 : 286-295, 2003.

Khandelwal RL, Zinman SM et Zebrowski EJ. The effect of streptozotocin-induced diabetes and of insulin supplementation on glycogen metabolism in rat liver. *Biochem J* 168: 541-548, 1977.

Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ et Saltin B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol* 469: 459-478, 1993.

Kinnick TR, Yougblood EB, O'keefe MP, Saengsirisuwan V, Teachey MK, et Henriksen EJ. Modulation of insulin resistance and hypertension by voluntary exercise training in the TG(mREN2)27 rat. *J Appl Physiol* 93 : 805-812, 2002.

Koivisto V, Hendler R, Nadel E et Felig P. Influence of physical training on the fuel-hormone response to prolonged low intensity exercise. *Metabolism* 31: 192-197, 1982.

Kolakowski Jr LF. GCRDb : a G-protein-coupled receptor database. *Receptor Channels* 2: 1-7, 1994.

Kramer KL, Giffin BF, Fox JW et Drake RL. Insulin replacement therapy in diabetic rats using an osmotic pump normalizes expression of enzymes key to hepatic carbohydrate metabolism. *Arch Biochem Biophys* 368: 291-297, 1999.

Kraus-Friedmann N et Feng L. The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of gluconeogenesis. *Metabolism* 45: 389-403, 1996.

Krisman CR. A possible intermediate in the initiation of glycogen biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 46: 1206-1212, 1972.

Krones A, Kietzmann T et Jungermann K. Periportal localization of glucagon receptor mRNA in rat liver and regulation of its expression by glucose and oxygen in hepatocyte cultures. *FEBS Lett* 421: 136-140, 1998.

Landt KW, Campaigne BN, James FW, et Sperling MA. Effects of exercise training on insulin sensitivity in adolescents with type I diabetes. *Diabetes Care* 8: 461-465, 1985.

Langdon DR et Curnow RT. Impaired glycogenic substrate activation of glycogen synthase is associated with depressed synthase phosphatase activity in diabetes rat liver. *Diabetes* 32: 1134-1140, 1983.

Larner J. Mechanisms of regulation of glycogen synthesis and degradation. *Circ Res* 38: I2-I7, 1976.

- Launay B, Zinman B, Tildesley HD, Strack T et Chiasson JL.** Effect of continuous subcutaneous insulin infusion with lispro on hepatic responsiveness to glucagon in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 21: 1627-1631, 1998.
- Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H, et Chiasson J-L.** Glucose metabolism during exercise in man : the role of insulin and glucagon in the regulation of hepatic glucose production and gluconeogenesis. *Can J Physiol Pharm* 75 : 26-35, 1997.
- Lavoie C, Ducros F, Bourque J, Langelier H, et Chiasson J-L.** Glucose metabolism during exercise in man : the role of insulin in the regulation of glucose utilization. *Can J Physiol Pharm* 75 : 36-43, 1997.
- Lavoie L et van de Verve WG.** Hormone-stimulated glucose production from glycogen in hepatocytes from streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 40: 1031-1036, 1991.
- Lazarow A.** Particulate glycogen: a submicroscopic component of the guinea pig liver cell; its significance in glycogen storage and the regulation of blood sugar. *Anat Rec* 84: 31-50, 1942.
- Legare A, Drouin R, Milot M, Massicotte D, Peronnet F, Massicotte G et Lavoie C.** Increased density of glucagon receptors in liver from endurance-trained rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E193-E196, 2001.
- Leloir LF et Goldemberg SH,** Synthesis of glycogen from uridine diphosphate glucose in liver. *J Biol Chem* 235: 919-923, 1960.
- Li J, Larroca JN, Rodriguez-Gabin AG, et Charron MJ.** Expression and signal transduction of the glucagon receptor in BTC3 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1356: 229-236, 1997.
- Lipson KE, Kolhatkar AA, Maki RG, et Donner DB.** Divalent cations regulate glucagon binding. Evidence for actions on receptor-Ns complexes and on receptors uncoupled from Ns. *Biochemistry* 27: 1111-1116, 1988.
- Lins PE, Wajngot A, Adamson U, Vranic M et Efendic S.** Minimal increases in glucagon levels enhance glucose production in man with partial hypoinsulinemia. *Diabetes* 32: 633-636, 1983.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira & Darnel.** Biologie moléculaire de la cellule, DeBoeck Université, 859, 1997.

Lomako J, Lomako WM et Whelan WJ. The biogenesis of glycogen: nature of the carbohydrate in the protein primer. *Biochem Int* 21: 251-260, 1990.

Lomako J, Lomako WM et Whelan WJ. The nature of the primer for glycogen synthesis in muscle. *FEBS Lett* 268: 8-12, 1990.

Lomako J, Lomako WM, et Whelan WJ. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett* 279: 223-228, 1991

Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ, Dombro RS, Neary JT, et Norenberg MD. Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J* 7: 1386-1393, 1993.

Lussier B and Hetenyi G, Jr. The effect of insulin-induced hypoglycaemia on the secretion of glucagon and hepatic glucose production in pancreatectomized dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 64: 1440-1442, 1986.

MacNeil DJ, Occi JL, Hey PJ, Strader CD et Graziano MP. Cloning and expression of a human glucagon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198: 328-334, 1994.

Marchand I, Chorneyko K, Tarnopolsky M, Hamilton S, Shearer J, Potvin J et Graham TE. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J Appl Physiol* 93: 1598-1607, 2002.

Margolis RN, Cardell RR et Curnow RT. Association of glycogen synthase phosphatase and phosphorylase activities with membranes of hepatic smooth endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 83: 348-356, 1979.

Marks JS et Botelho LH. Synergistic inhibition of glucagon-induced effects on hepatic glucose metabolism in the presence of insulin and a cAMP antagonist. *J Biol Chem* 261: 15895-15899, 1986.

Melendez-Hevia E, Waddell TG et Shelton ED. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule. *Biochem J* 295 (Pt 2): 477-483, 1993.

Melendez R, Melendez-Hevia E et Cascante M. How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building. *J Mol Evol* 45: 446-455, 1997.

- Mendenhall LA, Swanson SC, Habash DL et Coggan AR.** Ten days of exercise training reduces glucose production and utilization during moderate-intensity exercise. *Am J Physiol* 266: E136-E143, 1994.
- Meyer F, Heilmeyer LMG Jr, Haschke RH, et Fischer EH.** Control of phosphorylase activity in muscle glycogen particle. I. Isolation and characterization of the protein-glycogen complex. *J Biol Chem* 245: 6642-6648, 1970.
- Miller TB Jr, Vicalvi JJ Jr et Garnache AK.** Alteration of hepatic glycogen synthase phosphatase activity by insulin deficiency. *Am J Physiol* 240: E539-E543, 1981.
- Montain SJ, Hopper MK, Coggan AR et Coyle EF.** Exercise metabolism at different time intervals after a meal. *J Appl Physiol* 70: 882-888, 1991.
- Mondon CE, Dolkas CB et Reaven GM.** Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rat at rest. *Am J Physiol* 239: E169-177, 1980.
- Mosher PE, Nash MS, Perry AC, LaPerriere AR, et Goldberg RB.** Aerobic circuit exercise training: effect on adolescents with well-controlled insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil* 79: 652-657, 1998.
- Myers SR, Diamond MP, Adkins-Marshall BA, Williams PE, Stinsen R et Cherrington AD.** Effects of small changes in glucagon on glucose production during a euglycemic, hyperinsulinemic clamp. *Metabolism* 40: 66-71, 1991.
- Nakamura SI, et Rodbell M.** Glucagon induces disaggregation of polymer-like structures of the α subunit of the stimulatory G protein in liver membranes. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7150-7154, 1991.
- Newsholme EA, Arch JR, Brooks B et Surholt B.** The role of substrate cycles in metabolic regulation. *Biochem Soc Trans* 11: 52-56, 1983.
- Nielsen MF, Wise S, Dinneen SF, Schwenk WF, Basu A et Rizza RA.** Assessment of hepatic sensitivity to glucagon in NIDDM: use as a tool to estimate the contribution of the indirect pathway to nocturnal glycogen synthesis. *Diabetes* 46: 2007-2016, 1997.
- Nieto JL, Diaz-Laviada I, Guillen A et Haro A.** Effect of endurance physical training on rat liver adenyl cyclase system. *Cell Signal* 8: 317-322, 1996.

Nishimura E, Abrahamsen N, Hansen LH, Lundgren K, et Madsen O. Regulation of glucagon receptor expression. *Acta Physiol Scand* 157: 329-332, 1996.

Opara EC, Atwater I et Go VL. Characterization and control of pulsatile secretion of insulin and glucagon. *Pancreas* 3: 484-487, 1988.

Orskov L, Alberti KG, Mengel A, Moller N, Pedersen O, Rasmussen O, Seefeldt T et Schmitz O. Decreased hepatic glucagon responses in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 34: 521-526, 1991.

Ortmeyer HK. Insulin increases liver protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2C activities in lean, young adults rhesus monkeys. *Horm Metab Res* 30: 705-710, 1998.

Ovadi J. Physiological significance of metabolic channelling. *J Theor Biol* 152: 1-22, 1991.

Petersen OH, et Bear C. Two glucagon transducing systems. *Nature* 323: 18, 1986.

Pflüger EFW. Das Glykogen und seine Beziehungen zur Zuckerkrankheit 2. Aufl., Verlag von Martin Hager, Bonn., 1905.

Phillips SM, Han XX, Green HJ, et Bonen A. Increments in skeletal muscle GLUT-1 and GLUT-4 after endurance training in humans. *Am J Physiol* 270: E456-E462, 1996.

Pilkis SJ, el Maghrabi MR et Claus TH. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem* 57: 755-783, 1988.

Pilkis SJ et Granner DK. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909, 1992.

Pitcher J, Smythe C et Cohen P. Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 176: 391-395, 1988.

Podolin DA, Pagliassotti MJ, Gleeson TT et Mazzeo RS. Influence of endurance training on the age-related decline in hepatic gluconeogenesis. *Mech Ageing Dev* 75: 81-93, 1994.

- Podolin DA, Wills BK, Wood IO, Lopez M, Mazzeo RS et Roth DA.** Attenuation of age-related declines in glucagon-mediated signal transduction in rat liver by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E516-E523, 2001.
- Portois L, Tastenoy M et Svoboda M.** Mutational analysis of the glucose regulatory element in the promoter of the glucagon receptor gene. *Ann N Y Acad Sci* 921: 148-156, 2000.
- Portois L, Maget B, Tastenoy M, Perret J et Svoboda M.** Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene. *J Biol Chem* 274: 8181-8190, 1999.
- Pugazhenth S, Mantha SV et Khandelwal RL.** Decrease of liver protein kinase C in streptozotocin-induced diabetic rats and restoration by vanadate treatment. *Biochem Int* 21: 651-657, 1990.
- Pugazhenth S et Khandelwal RL.** Insulinlike effects of vanadate on hepatic glycogen metabolism in nondiabetic and streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 39: 821-827, 1990.
- Rao PV, Pugazhenth S et Khandelwal RL.** The effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin supplementation on expression of the glycogen phosphorylase gene in rat liver. *J Biol Chem* 270: 24955-24960, 1995.
- Richter EA, Kristiansen S, Wojtaszewski J, Daugaard JR, Asp S, Hespel P, et Kiens B.** Training effects on muscle glucose transport during exercise. *Adv Exp Med Biol* 441:107-116, 1998.
- Rizza RA, Cryer PE, Haymond MW et Gerich JE.** Adrenergic mechanisms for the effects of epinephrine on glucose production and clearance in man. *J Clin Invest* 65: 682-689, 1980.
- Roach PJ, Cheng C, Huang D, Lin A, Mu J, Skurat AV, Wilson W et Zhai L.** Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9: 139-151, 1998.
- Roe JH, Bailey JM, Gray RR, Robinson JN.** Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J Biol Chem* 236:1244-1246, 1961.

- Roesler WJ, et Khandelwal RL.** Kinetic properties of glycogen synthase and phosphorylase and structural aspects of glycogen in the db/db mouse liver. *Diabetes* 35:210-6, 1986.
- Roesler WJ et Khandelwal RL.** Regulation of rat liver glycogen phosphorylase concentration by in vivo relative levels of glucagon and insulin. *Endocrinology* 121: 227-232, 1987.
- Roesler WJ, Pugazhenti S, et Khandelwal RL.** Hepatic glycogen metabolism in the db/db mouse. *Mol Cell Biochem.* 92:99-106, 1990.
- Rojas FJ et Birnhaumer L.** Regulation of glucagon receptor binding: Lack of effect of Mg and preferential role for GDP. *J Biol Chem* 260: 7829-7835, 1985.
- Rosati G.** Enzyme treatment of glycogen particles in rat liver and muscle. *J Ultrastruct Res* 18:444-455, 1967.
- Rulfs J, Jaspers SR, Garnache AK et Miller TB, Jr.** Phosphorylase synthesis in diabetic hepatocytes and cardiomyocytes. *Am J Physiol* 257: E74-E80, 1989.
- Rybicka E, Michalik D, Wisniewska K, Namysl E et Galinski J.** [Occurrence of rota-I adenoviruses in diarrhea states of children]. *Med Dosw Mikrobiol* 48: 177-181, 1996.
- Rybicka K.** Glycosomes (protein-glycogen complex) in the canine heart. Ultrastructure, histochemistry and changes induced by acidic treatment. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 30: 335-347, 1979.
- Rybicka K.** Simultaneous demonstration of glycogen and protein in glycosomes of cardiac tissue. *J Histochem Cytochem* 29: 4-8, 1981.
- Rybicka KK.** Glycosomes-the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28: 253-265, 1996.
- Saborido A, Molano F, Moro G, et Megias A.** Regulation of dihydropyridine receptor in skeletal and cardiac muscle by exercise training. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 429: 364-369, 1995.
- Saccà L, Morrone G, Cicala M, Corso G et Ungaro B.** Influence of epinephrine, norepinephrine, and isoproterenol on glucose homeostasis in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 680-684, 1980.

- Saengsirisuwan V, Perez FR, Kinnick TR, et Henriksen EJ.** Effect of exercise training and antioxidant R-ALA on glucose transport in insulin-sensitive rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 92 : 50-58, 2002.
- Saitoh S, Shimomura Y, Tasaki Y et Suzuki M.** Effect of short-term exercise training on muscle glycogen in resting conditions in rats fed a high fat diet. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 64: 62-67, 1992.
- Scott RB et Still WJS.** Glycogen in human peripheral blood leucocytes. II. The macromolecular state of leucocytes glycogen. *J Clin Invest* 47: 353-359, 1968.
- Serafini MT et Alemany M.** A micromethod for the enzymatic estimation of the degree of glycogen ramification. *J Biochem Biophys Methods* 15: 33-39, 1987.
- Shamoon H, Hendler R et Sherwin RS.** Synergistic interactions among antiinsulin hormones in the pathogenesis of stress hyperglycemia in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 52: 1235-1241, 1981.
- Shearer J et Graham TE.** New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen. *Can J Appl Physiol* 27: 179-203, 2002.
- Shearer J et Graham TE.** Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise. *Exerc Sport Sci Rev* 32: 120-126, 2004.
- Siddle K, Kane-Maguire B et Campbell AK.** The effects of glucagon and insulin on adenosine 3':5'-cyclic monophosphate concentrations in an organ culture of mature rat liver. *Biochem J* 132: 765-773, 1973.
- Smythe C, Caudwell FB, Ferguson M et Cohen P.** Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. *EMBO J* 7: 2681-2686, 1988.
- Smythe C, Villar-Palasi C et Cohen P.** Structural and functional studies on rabbit liver glycogenin. *Eur J Biochem* 183: 205-209, 1989.
- Smythe C, Watt P, et Cohen P.** Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur J Biochem* 189:199-204, 1990.
- Smythe C et Cohen P.** The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* 200: 625-631, 1991.

- Stearns SB, et Benzo CA.** Structural and chemical alterations associated with hepatic glycogen metabolism in genetically diabetic (db) and in streptozotocin-induced diabetic mice. *Lab Invest* 37: 180-187, 1977.
- Steen MS, Foianini KR, Yougblood EB, Kinnick TR, Jacob S, et Henriksen EJ.** Interaction of exercise training and ACE inhibition on insulin action in obese Zucker rats. *J Appl Physiol* 86 : 2044-2051, 1999.
- Stetten D Jr, et Stetten MR.** Glycogen metabolism. *Physiol Rev* 40: 505-537, 1960.
- Stetten MR, Katzen HM, et Stetten D Jr.** A comparison of the glycogens isolated by acid and alkaline procedures. *J Biol Chem* 232 :475-488, 1958.
- Stratton R, Wilson DP, Endres RK, et Goldstein DE.** Improved glycemic control after supervised 8-wk exercise program in insulin-dependent diabetic adolescents. *Diabetes Care* 10:589-593, 1987.
- Stryer L.** Biochemistry, 5th edition, WH Freeman & Co., New York, 2002.
- Svoboda M, Portois L et Malaisse WJ.** Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene. *Mol Genet Metab* 68: 258-267, 1999.
- Taylor AW, Stothart J, Booth MA, Thayer R, et Rao S.** Human skeletal muscle glycogen branching enzyme activities with exercise and training. *Can J Physiol Pharmacol* 52 :119-122, 1974.
- glucagon receptor gene. *Mol Genet Metab* 68: 258-267, 1999.
- Taylor AW, Stothart J, Booth MA, Thayer R, et Rao S.** Human skeletal muscle debranching enzyme activities with exercise and training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 33 :327-330, 1974.
- Turcotte LP et Brooks GA.** Effects of training on glucose metabolism of gluconeogenesis-inhibited short-term-fasted rats. *J Appl Physiol* 68: 944-954, 1990.
- Unson CG, Cypess AM, Kim HN, Goldsmith PK, Carruthers CJL, Merrifield RB, et Sakmar TP.** Characterization of deletion and truncation mutants of the rat glucagon receptor. *J Biol Chem* 270: 27720-27727, 1995.

- van Breda E, Keizer HA, Geurten P, van Kranenburg G, Menheere PP, Kuipers H, et Glatz JF.** Modulation of glycogen metabolism of rat skeletal muscles by endurance training and testosterone treatment. *Pflugers Arch* 424:294-300, 1993.
- Voet D et Voet JC.** Biochemistry 2nd edition, Wiley & Sons, Indianapolis, In, 1995.
- Wakelam MJ, Murphy GJ, Hrubby VJ, et Houslay MD.** Activation of two signal-transduction systems in hepatocytes by glucagon. *Nature* 323: 68-77, 1986.
- Wan CK, Giacca A, Matsuhisa M, El Bahrani B, Lam L, Rodgers C et Shi ZQ.** Increased responses of glucagon and glucose production to hypoglycemia with intraperitoneal versus subcutaneous insulin treatment. *Metabolism* 49: 984-989, 2000.
- Wasserman DH et Cherrington AD.** Hepatic fuel metabolism during muscular work: role and regulation. *Am J Physiol* 260: E811-E824, 1991.
- Weigle DS, Koerker DJ et Goodner CJ.** Pulsatile glucagon delivery enhances glucose production by perfused rat hepatocytes. *Am J Physiol* 247: E564-E568, 1984.
- Weigle DS et Goodner CJ.** Evidence that the physiological pulse frequency of glucagon secretion optimizes glucose production by perfused rat hepatocytes. *Endocrinology* 118: 1606-1613, 1986.
- Werle EO, Strobel G, et Weicker H.** Decrease in rat Beta₁ and Beta₂-adrenoceptors by training and endurance exercise. *Life Sciences* 46: 9-17, 1990.
- Whelan WJ.** Proceedings: Glycogen and starch: specific events in their biosynthesis and metabolic regulation. *J Biochem (Tokyo)* 79: 42P-43P, 1976.
- Whelan WJ.** The initiation of glycogen synthesis. *Bioessays* 5: 136-140, 1986.
- Winder WW, Hickson RC, Hagberg JM, Ehsani AA et McLane JA.** Training-induced changes in hormonal and metabolic responses to submaximal exercise. *J Appl Physiol* 46: 766-771, 1979.
- Wilmore JH, Stanforth PR, Gagnon J, Rice T, Mandel S, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, et Bouchard C.** Cardiac output and stroke volume changes with

endurance training: the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 33: 99-106, 2001.

Wilstätter R et Rohdwal M. Über des zustand des glycogen in der leben, in muskel, und in leukocyten. *Hoppe Seyler's Z Physiolog Chemie* 225: 103-124, 1934.

Wittert GA, Livesey JH, Espiner EA, et Donald RA. Adaptation of the hypothalamopituitary adrenal axis to chronic exercise stress in humans. *Med Sci Sports Exerc* 28: 1015-1019, 1996.

Wolfe RR, Klein S, Carraro F et Weber JM. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol* 258: E382-E389, 1990.

Yamato E, Ikegami H, Takekawa K, Fujisawa T, Nakagawa Y, Hamada Y, Ueda H, et Ogihara T. Tissue-specific and glucose-dependent expression of receptor genes for glucagon and glucagon-like peptide-1(GLP-1). *Horm Metab Res* 29: 56-59, 1997.

Young AA, Cooper GJ, Carlo P, Rink TJ et Wang MW. Response to intravenous injections of amylin and glucagon in fasted, fed, and hypoglycemic rats. *Am J Physiol* 264: E943-E950, 1993.

