

INFLUENCE DE L'INSULINE ET DU GLUCAGON SUR LA SYNTHÈSE DU GLYCOGÈNE HÉPATIQUE

par

J. BERTHET*, P. JACQUES, H. G. HERST** ET C. DE DUVE

Laboratoire de Chimie Physiologique, Université de Louvain (Belgique)

INTRODUCTION

Entre les années 1923 et 1930, CARL et GERTY CORI ont consacré une série imposante de travaux à l'action de l'insuline sur le taux de glycogène hépatique. On leur doit plusieurs observations importantes, notamment une démonstration claire des influences exercées directement et indirectement par les variations glycémiques sur l'élaboration du glycogène dans le foie. Leurs conclusions se résument dans ces trois phrases, extraites de la remarquable revue d'ensemble publiée par CARL CORI¹ en 1931: "a continuous supply of insulin by the pancreas is essential for the preservation of hepatic glycogen"; "the insulin supplied by the animal's own pancreas establishes optimal conditions for glycogen deposition in the liver, so that a further supply of insulin in the form of an injection cannot accelerate this process"; "intensification of the normal insulin effect leads to a shift or transfer in the disposal of sugar from the liver to the muscles".

Seule cette troisième conclusion fut retenue par la plupart des auteurs, qui l'étiendirent erronément aux effets physiologiques de l'insuline. Certains faits expérimentaux plaident d'ailleurs dans ce sens. BRIDGE², notamment, observa que l'injection continue de petites doses d'insuline à des lapins maintenus en hyperglycémie par l'administration de glucose, produit une augmentation du taux de glycogène musculaire, et une diminution correspondante du glycogène hépatique.

Cette distinction paradoxale entre insuline endogène et exogène a été expliquée en 1945 par l'identification du glucagon dans l'insuline utilisée par BRIDGE et dans la plupart des insulines commerciales^{3,4,5,6}. Il devenait dès lors important de réexaminer la question en évitant les deux causes d'erreurs qui avaient vicié la plupart des expériences antérieures, notamment les variations excessives du taux glycémique et la présence de glucagon dans l'insuline. De telles expériences, effectuées sur des lapins insulinisés maintenus en isoglycémie par une injection continue de glucose, ont montré une augmentation significative du taux de glycogène hépatique sous l'influence de l'insuline^{7,8,9}.

Actuellement, cependant, l'action hépatique de l'insuline est de nouveau mise en doute^{10,11,12}. On fait remarquer notamment qu'un effet de l'insuline sur la synthèse de glycogène, si facile à mettre en évidence sur le muscle, n'a jamais pu être démontré sur le tissu hépatique isolé. La plus récente de ces tentatives est celle de

* Chercheur agréé de l'Institut Interuniversitaire de Sciences Nucléaires.

** Associé du Fonds National de la Recherche Scientifique.

HASTINGS et de ses collaborateurs, qui après avoir obtenu quelques résultats positifs¹³, n'ont pu les reproduire¹².

Ces faits nous ont conduits à réétudier le problème, *in vitro* et *in vivo*, nous servant à cet effet du glucose marqué au ¹⁴C. Nous avons opéré sur des lapins, utilisant par ailleurs pour les essais *in vitro* les conditions d'incubation recommandées par HASTINGS et collaborateurs¹³ dans leur premier travail sur tranches de foie de rat. Nos expériences ont porté également sur l'effet du glucagon. Elles ont déjà fait l'objet de communications préliminaires^{14,15} et d'une discussion plus générale présentée à un récent symposium⁹.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1. Préparation des tranches de foie

Des lapins adultes sont nourris de betteraves fourragères pendant une semaine au moins avant l'expérience. Ils reçoivent alors 200 mg de nembutal par voie intraveineuse et sont immédiatement saignés par section des vaisseaux du cou. On prélève rapidement le lobe gauche du foie et on le refroidit en l'agitant pendant 5 minutes dans une solution glacée de NaCl 0.1 M + KCl 0.05 M. On le divise ensuite en blocs d'environ 1 cm³ de section, que l'on conserve à froid sur un papier-filtre imbibé de la solution isotonique. Les meilleurs blocs sont alors débités en tranches aussi comparables que possible, dont le poids varie entre 40 et 60 mg d'après les expériences. On emploie la technique à main libre de DEURSCH¹⁶, en prenant le maximum de précautions pour éviter de léser ou de réchauffer le tissu. Au fur et à mesure qu'on les prépare, les tranches sont pesées à la balance à torsion et étalées sur un papier-filtre humidifié par la solution isotonique et conservé à froid en espace clos. On élimine au cours de cette préparation les tranches porteuses de lésions visibles ou traversées par de gros vaisseaux.

2. Incubation et fixation

Les tranches sont incubées à 37° dans le milieu B de HASTINGS et collaborateurs¹³ et agitées pendant 30 minutes à une vitesse de 120 oscillations par minutes. Le milieu B est composé de KHCO₃ 0.04 M, NaCl 0.07 M, MgCl₂ 0.02 M et CaCl₂ 0.01 M, en équilibre avec une atmosphère comprenant 95 % d'O₂ et 5 % de CO₂. Le pH, proche de 7.7 est abaissé en présence de tissu hépatique, de 0.1 à 0.3 unités selon le nombre de tranches ajoutées. Dans la plupart des cas, le milieu contient en outre du glucose uniformément marqué par du ¹⁴C, à raison de 0.1 à 1 μ c/ml selon les expériences. L'insuline et le glucagon sont ajoutés aux doses respectives de 40 et 20 μ g/ml. Les essais individuels portent le plus souvent sur 2 tranches, incubées dans 2 à 2.5 ml de milieu, ou sur un multiple de ces valeurs.

Dans les expériences où seul le glycogène est dosé, l'incubation est faite à l'appareil de DUBNOFF¹⁷. On fixe en ajoutant du KOH jusqu'à concentration 3.6 N et on digère le tissu en chauffant au bain-marie. Dans les cas où les dosages portent en outre sur le glucose et d'autres produits*, les tranches sont incubées dans des tubes de POTTER ET ELEVHJEM¹⁸ ou dans des fioles coniques, et fixées par la chaleur ou par l'addition de H₂SO₄ jusqu'à concentration 0.1 N. Après homogénéisation du tissu, on traite une partie de la suspension par le mélange Ba(OH)₂-ZnSO₄ pour dosage du glucose, une autre par le KOH 3.6 N à chaud, pour isolement ultérieur du glycogène.

3. Expériences *in vivo*

Ces expériences sont effectuées sur des lapins à l'aide de la technique de compensation de BOUCKAERT, DE NAYER ET KREKELS¹⁹, en utilisant pour les injections continues une seringue dont le piston est animé d'un mouvement uniforme par un moteur synchrone, le débit étant de 15 ml/heure. Au cours de l'expérience, on prélève régulièrement 0.2 ml de sang que l'on fixe au mélange Ba(OH)₂-ZnSO₄ pour dosage de la glycémie et de la radioactivité sanguine. On termine par l'injection intra-veineuse de 200 mg de Nembutal, on prélève le foie aussi rapidement que possible et on le disperse au Waring blender dans du KOH 3.6 N. On pèse après dispersion et on chauffe au bain-marie pour isoler ultérieurement le glycogène.

4. Techniques analytiques

Le glucose est dosé par la méthode de NELSON²⁰, le glycogène par celle de GOOD, KRAMER ET SOMOGYI²¹.

* Dans un certain nombre de ces expériences, des tranches ont également été incubées en présence de fructose-¹⁴C ou d'un mélange des deux sucres et on a isolé le CO₂, les acides gras et le cholestérol. Les résultats obtenus feront l'objet d'une publication ultérieure.

La radioactivité du glucose est mesurée directement ou après conversion en osazone. Dans le premier cas, on étale 0.2 ml du filtrat Ba/Zn sur une assiette métallique et on sèche sur une plaque chauffante à 60°. L'étalement est uniformisé par un disque de papier pelure (lens-paper). Dans le second, une partie du filtrat est additionnée de 5 mg de glucose servant d'entraineur, et traitée durant 90 minutes à 100° par 300 micromoles de chlorhydrate de phénylhydrazine en tampon acétique M pH 4.6. La phénylglucosazone formée est séparée par filtration, recristallisée dans l'alcool et recueillie finalement sur un disque de papier-filtre. Après mesure de la radioactivité, on dissout l'osazone dans l'alcool absolu et on détermine la concentration de cette solution au spectrophotomètre de Beckman à 390 m μ ($\epsilon_{390} = 2.08 \cdot 10^7 \text{ cm}^2 \text{ mole}^{-1}$). On obtient ainsi la radioactivité spécifique de l'osazone, dont on déduit celle du glucose en tenant compte de la quantité d'entraineur ajoutée.

Le glycogène isolé pour les mesures de radioactivité subit une deuxième précipitation alcoolique en milieu acide ($H_2SO_4 0.7 N$), destinée à éliminer plus complètement certaines impuretés, notamment les hexoses-phosphates. L'efficacité de ce procédé a été vérifiée en opérant en présence de glucose-6-phosphate marqué par du ^{32}P . Le glycogène est encore reprécipité deux fois en milieu neutre, puis repris dans du NaCl 0.03 M et la solution obtenue est clarifiée par centrifugation*. La radioactivité spécifique du glycogène est mesurée soit directement par la méthode du lens-paper, soit après hydrolyse et conversion du glucose en osazone.

La répartition du ^{14}C dans le glycogène formé aux dépens de glucose-1- ^{14}C est déterminée selon la méthode décrite par HERZ²².

Toutes les mesures de radioactivité sont effectuées à l'aide d'un compteur à fenêtre mince ayant une efficacité de 8.3 %. Elles sont ramenées ensuite à leur valeur en couche infiniment mince à l'aide de courbes d'étalonnage établies pour les différentes formes de dosage utilisées.

5. Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique. Le glucose uniformément marqué provient du Radiochemical Centre d'Amersham et ne contient pas d'impuretés décelables par chromatographie-autoradiographie. Le glucose-1- ^{14}C , fourni par le même centre, a été purifié par chromatographie et débarrassé notamment de sorbitol-1- ^{14}C .

L'insuline, fournie par la firme NOVO, est un échantillon cristallisé, entièrement dépourvu de facteur hyperglycémiant. Comme source de glucagon nous utilisons un produit purifié titrant 40 % de l'activité du glucagon cristallisé (LILLY 280-108 B-284).

RÉSULTATS

1. Expériences sur tranches de foie

Le Tableau I réunit l'ensemble des résultats que nous avons obtenus sur la synthèse de glycogène aux dépens de glucose par des tranches de foie de lapin. L'étude statistique de ces résultats figure au Tableau II. Dans ces tableaux, toutes les valeurs de glycogène sont exprimées en mg de glucose. Pour effectuer cette transformation dans le cas du glycogène radioactif, on s'est servi de la radioactivité spécifique moyenne du glucose lorsqu'elle était connue et de sa valeur initiale dans le cas contraire. Ce dernier procédé se justifie en première approximation, car la radioactivité spécifique du glucose ne subit pas de changement très important au cours de l'incubation.

Influence des conditions d'incubation. En accord avec les résultats obtenus dans les mêmes conditions sur foie de rat par HASTINGS et collaborateurs²³, nous observons une assez grande variabilité dans le comportement du glycogène hépatique au cours de l'incubation. Les accroissements sont rares et il semble se produire le plus souvent une légère chute du taux de glycogène. Celle-ci, comme le montre le Tableau III, s'accompagne d'une production de glucose très faible, du moins lorsque ce sucre est présent en quantité suffisante dans le milieu extérieur. Les mesures de radioactivité montrent d'autre part qu'une certaine activité synthétique se superpose à la glycogénolyse.

* Les débris insolubles présents dans cette solution peuvent retenir du glycogène par adsorption. Le NaCl en facilite l'élution sans cependant la rendre complète. Les solutions obtenues ne peuvent donc servir qu'au dosage de la radioactivité spécifique. Celle-ci, multipliée par le taux de glycogène déterminé indépendamment, donne la radioactivité totale.

TABLEAU I
SYNTHÈSE DE GLYCOGÈNE AUX DÉPENS DE GLUCOSE PAR LES TRANCHES DE FOIE ISOLÉES

Expér.*	N° des **	Glycogène initial mg/18	Δ Glycogène, après incubation, mg/18		Glycogène radioactif formé, mg/18	
			Insuline	Glicagon	Insuline	Glicagon
1	1.2	66.6	— 3.9	— 2.0	0.05	0.06
2	1.2	9.8	— 2.0	— 1.0	0.05	0.08
3	1.3	57.7	— 5.7	— 1.7	0.14	0.18
4	1	124.0	— 18.0	— 15.0	0.44	0.60
5	1	47.0	— 1.0	— 7.0	0.84	0.18
6a	1.4	44.8	— 7.7	— 4.7	— 16.3 (— 11.7)	0.03 (0.03)
6b	1.4	46.9	— 0.6	— 8.8 (— 11.4)	0.13	0.04 (0.03)
7a	5	3.9	+ 0.5	+ 1.1	0.18	0.43
7b	5	2.7	+ 2.1	+ 2.0	1.00	0.95
8a		27.3	— 6.2	— 5.3	0.95	0.89
8b		32.0	— 11.3	— 10.0	0.98	1.30
9a		20.9	— 2.0	— 0.5	0.96	1.20
9b		20.8	— 2.7	— 0.9	0.40	0.40
10a		105.3	+ 0.5	— 0.6	0.40	0.40
10b		102.8	— 2.3	— 6.7	0.32	0.35
11a		103.0	+ 1.0	+ 3.0	0.54	0.76
11b		109.0	— 2.0	— 1.0	0.34	0.37
12a		66.0	+ 2.5	— 1.7	0.20	0.28
12b		53.5	— 3.1	— 0.4	0.26	0.27
13	6	79.3	— 0.9	— 1.4	— 11.4	1.28
14	7	110.0	+ 12.0	+ 20.0	0.89	0.82
15		76.0	+ 6.0	+ 12.0 (+ 4.0)	+ 3.0	0.60 (0.31)
					0.33	0.07

* Les numéros désignent des animaux différents. Les suffixes *a* et *b* se réfèrent à des séries indépendantes effectuées successivement sur des échantillons différents du même foie. On commence par couper les tranches de la série *a* et on les met à incuber immédiatement. On prépare ensuite celles de la série *b* et on met en route cette seconde expérience environ 30 minutes après la première.

** 1. Radioactivité mesurée sur la phénylglycosazone préparée aux dépens du glycogène.

2. Moyennes de 3 déterminations. Expériences effectuées sans addition de glucose au milieu. Dans toutes les autres expériences, le glucose est présent dans le milieu à la concentration de 2 mg/ml.

3. Moyennes de 2 déterminations.

4. Entre parenthèses, résultats obtenus en présence d'adrénaline, 40 µg/ml.

5. Animal ayant reçu un régime de verdure au lieu de bettéraves.

6. Foie très gras et hypertrophique.

7. Entre parenthèses, résultats obtenus en présence d'insuline inactivée par un traitement de 3 heures à 37° dans du KOH 0.1 N, puis neutralisée et dialysée.

Dans les expériences 1 et 2, où le glucose a été omis du milieu d'incubation, la synthèse de glycogène radioactif est nettement plus faible (Tableau I), la formation de glucose notablement plus élevée (Tableau III), qu'en présence de sucre. Ces faits suggèrent qu'une augmentation de la concentration en glucose stimule la formation du glycogène ou inhibe sa dégradation. Cet effet est clairement établi par les données du Tableau IV, qui réunit les résultats d'essais comparatifs où des tranches du même foie ont été incubées en l'absence et en présence de glucose ajouté. Il convient de noter que la concentration en glucose n'est jamais nulle dans ces expériences. Par suite du glucose présent initialement dans les tranches, elle est en moyenne de 0.3 mg/ml dans le premier cas et de 2.3 mg/ml dans le second.

TABLEAU II
ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS DU TABLEAU I

	Δ Glycogène total	Δ Glycogène radioactif
Effet de l'incubation sans hormones, mg/g	- - 1.9 ± 1.3	+ 0.51 ± 0.085
Effet de l'insuline*, mg/g	+ 1.14 ± 0.7	+ 0.093 ± 0.026
P	< 0.20	< 0.01
Effet de l'insuline*, %		+ 31.2 ± 8.6
P		< 0.01
Effet du glucagon*, mg/g	- 4.86 ± 1.64	- 0.25 ± 0.12
P	< 0.05	< 0.10
Effet du glucagon*, %		- 67.7 ± 5.7
P		< 0.001

* Différence par rapport au témoin incubé sans hormones.

TABLEAU III
PRODUCTION DE GLUCOSE PAR LES TRANCHES DE FOIE

Expérience	Glucose ajouté au milieu mg/ml	Glucose produit, mg/g		
		-	Insuline	Glucagon
1	-	+ 6.1	+ 5.9	+ 10.1
2	-	+ 2.0	+ 2.2	+ 5.1
12a	2	+ 0.8	+ 0.3	+ 3.5
12b	2	+ 1.3	+ 0.7	+ 2.6
13	2	- 1.0	+ 0.1	+ 8.3

Influences hormonales. Comme le montrent les Tableaux I et II, la synthèse de glycogène est stimulée d'une manière significative par l'insuline et fortement inhibée par le glucagon. L'existence de ces effets est déjà suggérée par les dosages chimiques et est clairement mise en évidence par les mesures de radioactivité. On note que l'insuline inactivée par un traitement alcalin est sans effet (exp. 15) et que l'adrénaline a la même action que le glucagon (exp. 6a et 6b).

Etant donné les théories qui sont proposées actuellement pour expliquer l'action de l'insuline sur le tissu musculaire, nous avons essayé de vérifier l'existence éven-

TABLEAU IV

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE SUR LE TAUX DE GLYCOGÈNE DES TRANCHES DE FOIE

Expérience	Glycogène après incubation, mg/g		
	Sans glucose	Avec glucose*	Difference
7a	3.4	4.4	+ 1.0
7b	2.7	4.8	+ 2.1
8a	19.4	21.1	+ 1.7
8b	16.9	20.7	+ 3.8
9a	16.6	18.9	+ 2.3
9b	16.6	18.1	+ 1.5
Effet du glucose, mg/g		+ 2.1 ± 0.15	
P		< 0.01	

* 2 mg/ml.

tuelle d'un effet de cette hormone sur la pénétration du glucose à l'intérieur des cellules hépatiques. Dans ce but, des tranches de foie sont incubées en présence de glucose-¹⁴C, dans nos conditions habituelles, retirées du milieu après des temps variables, séchées rapidement entre deux feuilles de papier-filtre, pesées et fixées au mélange Ba(OH)₂-ZnSO₄. On fixe également une portion du milieu d'incubation et on dose le glucose total et radioactif des filtrats. Des tranches témoins sont traitées identiquement après avoir été trempées un instant dans du milieu glacé.

La Fig. 1 illustre les résultats de deux expériences de ce genre, effectuées en présence de glucose à deux concentrations différentes. Comme les tranches ont initialement une teneur en glucose supérieure à celle du milieu, on peut suivre les échanges de glucose dans les deux sens. Malgré une certaine variabilité, due vraisemblablement à de petites différences dans l'efficacité du séchage, les résultats fournissent plusieurs renseignements intéressants. En premier lieu, on note que la pénétration du glucose semble se produire plus rapidement que sa sortie. La valeur d'équilibre est atteinte en 10 minutes dans le premier cas,

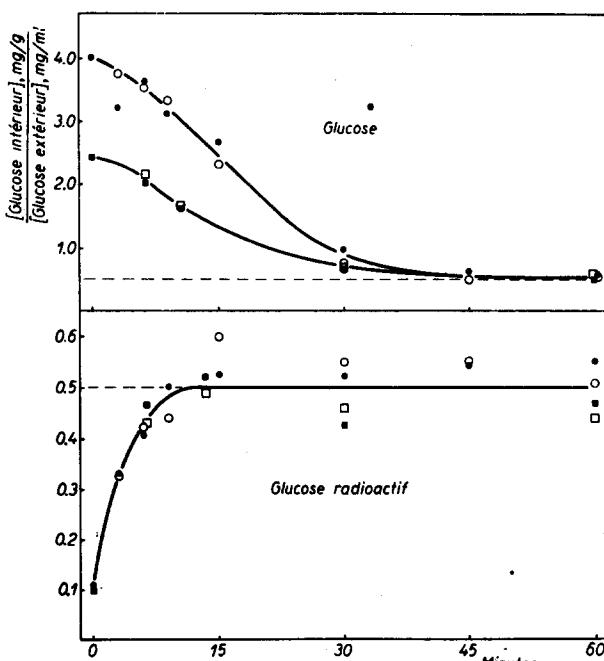


Fig. 1. Échanges de glucose entre les tranches de foie et le milieu extérieur. ■, □ : expérience 1, concentration en glucose du milieu : 2 mg/ml ●, ○ : expérience 2, concentration en glucose du milieu : 1 mg/ml ■, ● : sans insuline; □, ○ : avec insuline.

en 30 minutes ou plus dans le second. Cette différence est probablement plus apparente que réelle, car les tranches produisent un peu de glucose, ce qui ralentit la décharge. De toute façon, les deux courbes tendent vers une même valeur, qui caractérise l'espace glucose du tissu. Cette valeur se situe ici entre 0.45 et 0.55 ml/g. Ces limites pourraient être un peu trop élevées si la surface des tranches est restée contaminée d'une petite quantité de milieu. La possibilité d'une telle contamination est suggérée par le fait que les tranches témoins (point zéro du graphique), qui ont subi un contact extrêmement bref avec le milieu, ont déjà une teneur en glucose radioactif relativement élevée. On remarque enfin que l'insuline n'exerce d'effet significatif ni sur la valeur de l'espace glucose, ni sur la vitesse d'équilibration.

2. Expériences sur animaux intacts

Nous avons effectué quatre expériences parallèles, utilisant chaque fois deux lapins aussi comparables que possible. Dans trois cas, les animaux ont subi un jeûne préalable de 24 heures. L'expérience débute par une injection intra-veineuse de glucose-¹⁴C pur (carrier-free), à raison de 0.65 μ c/kg, destinée à porter le glucose du sang et des liquides extracellulaires à un certain taux de radioactivité. Après une période d'équilibration de 30 minutes, on administre par voie intraveineuse à un des animaux

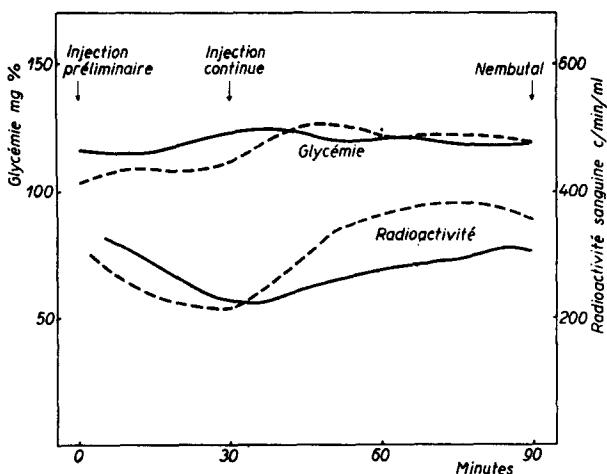


Fig. 2. Evolution de la glycémie et de la radioactivité sanguine des lapins traités au glucose-¹⁴C. Moyennes de 4 animaux. Pour les conditions expérimentales, voir texte. — : animaux témoins; - - - : animaux insulinités.

que cas la radioactivité du glycogène hépatique a été convertie en mg/g à l'aide de la radioactivité spécifique moyenne du glucose sanguin durant la période d'injection. On note l'influence du jeûne sur la synthèse de glycogène hépatique, ainsi que l'effet caractéristique de l'insuline sur ce processus. Cet effet est surtout marqué chez les animaux à jeûn.

Devant ces résultats, il paraissait utile de vérifier si le glycogène radioactif synthétisé dans le foie sous l'influence de l'insuline provient bien directement du glucose sanguin, et non pas d'une manière indirecte par l'intermédiaire d'acide lactique ou

30 U.I. d'insuline, que l'on compense par une injection continue de glucose marqué, à la dose de 0.9 g* et 2 μ c par kg et par heure. L'animal témoin reçoit simultanément de la même manière 0.65 μ c par kg et par heure de glucose-¹⁴C pur. Comme le montre la Fig. 2, ces injections ont pour effet de maintenir dans les deux groupes d'animaux une glycémie et une radioactivité sanguine relativement constantes.

Les animaux sont sacrifiés après une heure de traitement. Le Tableau V résume les résultats obtenus. Dans cha-

* animal nourri a reçu 1 g de glucose par kg et par heure.

pyruvique formé dans les muscles. Dans ce but on a effectué l'expérience C à l'aide de glucose-1-¹⁴C et on a établi ensuite la répartition du ¹⁴C dans le glycogène hépatique et musculaire. Seul l'échantillon provenant du foie de l'animal insulinisé a pu être soumis à une analyse complète, la radioactivité des autres étant trop faible pour pouvoir être mesurée avec une précision suffisante. Les résultats obtenus, qui figurent au Tableau VI, montrent clairement que le glycogène hépatique formé sous l'influence de l'insuline provient directement du glucose sanguin.

TABLEAU V
INFLUENCE DE L'INSULINE SUR LA SYNTHÈSE DE GLYCOGÈNE HÉPATIQUE *in vivo*

Expér.	Jeûne	Glycémie moyenne mg%		Glycogène- ¹⁴ C hépatique, mg/g*	
		Témoin	Insuline	Témoin	Insuline
A	—	124	131	1.2	1.8
B	24 h	120	105	0.35	2.6
C	24 h	138	156	0.26	3.8
D	24 h	100	96	0.69	1.3
Moyennes (24 h à jeûn)		119	119	0.43	2.57
Effet de l'insuline		0		+ 2.14	
P**				< 0.05	

* Coups par minute par g de foie, divisés par la radioactivité spécifique moyenne du glucose circulant.

** Résultat d'une analyse de variance sur les 6 valeurs obtenues chez les animaux à jeûn, un degré de liberté étant attribué à l'effet de l'insuline, les 4 autres à la variance résiduelle.

TABLEAU VI
ANALYSE DU GLYCOGÈNE DE LAPINS TRAITÉS AU GLUCOSE-1-¹⁴C

	Animal témoin		Animal insulinisé	
	Muscle	Foie	Muscle	Foie
Activité spécifique c/min/mg de glycogène	0	3.5	4.5	73.3
Répartition du ¹⁴ C en %				
C ₁	—	74.5	98.5	84.5
C ₂	—	—	—	4.3
C ₃	—	—	—	0.7
C ₄	—	—	—	3.2
C ₅	—	—	—	3.2
C ₆	—	—	—	—
Récupération	—	—	—	95.9

DISCUSSION

Les résultats décrits dans ce travail apportent une nouvelle confirmation à l'existence d'une action favorable de l'insuline sur la synthèse de glycogène dans le foie. Cette action s'observe sur l'animal entier comme sur le tissu isolé, et semble mettre en jeu les mêmes phénomènes dans les deux cas. En effet elle concerne bien *in vivo* la transformation directe du glucose en glycogène, comme le montre l'expérience effectuée à l'aide de glucose-1-¹⁴C. D'autre part, elle ne s'observe plus *in vitro* avec une insuline privée de son action physiologique. Les résultats négatifs obtenus par RENOLD et

Bibliographie p. 200.

collaborateurs¹² pourraient être attribués à l'utilisation d'une espèce animale moins réceptive ou au mode de préparation des tranches, qui sont coupées au "Stadie-Riggs slicer" et conservées dans un milieu liquide glacé, ou encore à la durée de l'incubation, qui est trois fois plus longue. Ce dernier facteur pourrait avoir une grande importance, car nous avons observé dans des expériences récentes que la sensibilité à l'insuline est supprimée par une incubation des tranches pendant une demi-heure à 37°, même lorsque ce traitement ne diminue pas la capacité de synthétiser du glycogène.

Examiné en valeur absolue, l'effet de l'insuline est relativement faible. C'est ainsi que le surcroît de glycogène hépatique stocké par les animaux à jeûn insulinités ne représente en moyenne que 7% de la dose de glucose injectée. La quantité totale de glucose utilisée par le foie sous l'influence de l'insuline pourrait cependant être nettement supérieure à ce chiffre, puisque le glycogène ne représente qu'un des produits du métabolisme glucosé. Bien qu'il s'agisse d'une expérience unique, il est intéressant de noter encore que la faculté glycogénosynthétique de l'animal nourri atteint presque celle des animaux insulinités, même en l'absence de tout apport extérieur d'insuline. Ce fait est probablement en rapport avec l'hypersécrétion d'insuline qui accompagne l'absorption alimentaire.

L'action de l'insuline sur le muscle est généralement attribuée à une accélération du processus, transport actif ou phosphorylation, par lequel le glucose extracellulaire pénètre dans le cycle des réactions métaboliques intracellulaires. Une théorie similaire pourrait expliquer l'effet observé sur le foie, et c'est pour distinguer entre les deux possibilités qu'elle propose que nous avons effectué les expériences décrites à la Fig. 1. Les résultats négatifs obtenus dans ces expériences ne permettent cependant pas d'écartier la théorie de perméabilité. En effet, la valeur d'environ 50% que nous trouvons pour l'espace de glucose du foie et qui est probablement surestimée, reste nettement inférieure au contenu en eau du tissu. Il semble donc exister une région de la cellule hépatique qui n'est pas accessible au glucose et dont la limite pourrait être le siège d'un phénomène de transfert sensible à l'insuline. L'hypothèse d'une action de cette hormone sur l'hexokinase hépatique rend compte tout aussi bien de nos résultats et l'on ne peut même pas exclure un effet direct sur la synthèse de glycogène. Pour distinguer entre ces diverses hypothèses, il serait nécessaire de disposer de données plus complètes sur les autres voies d'utilisation du glucose et sur le métabolisme de composés voisins, tels que le fructose. Ces données seront décrites dans une publication ultérieure.

Les mêmes difficultés compliquent l'interprétation des résultats obtenus avec le glucagon et l'adrénaline. Etant donné les travaux de SUTHERLAND ET CORI²⁴ qui ont localisé une action des agents glycogénolytiques au niveau de la réaction phosphorylasique, on est fort tenté de situer au même niveau l'effet observé dans nos expériences. On voit difficilement, cependant, comment l'augmentation de phosphorylase active mise en évidence par ces auteurs pourrait expliquer à elle seule une action s'exerçant uniquement dans le sens de la glycogénolyse. Il semble donc qu'un facteur de l'équilibre de la réaction phosphorylasique soit également affecté par le glucagon et l'adrénaline. De plus, on ne peut pas écarter l'hypothèse que les résultats que nous observons sur l'incorporation du glucose-¹⁴C dans le glycogène reflètent en partie une inhibition de l'utilisation du glucose.

Notons pour terminer que les modifications de glycogène total qui caractérisent
Bibliographie p. 200.

l'effet du glucagon comme celui de l'insuline (Tableau II) sont considérablement plus importantes que les variations de glycogène radioactif. Cette divergence est probablement due à la dilution du glucose-¹⁴C phosphorylé au contact des hexoses-phosphates intracellulaires. Si cette explication est exacte, on doit conclure que l'activité synthétique est notablement plus importante qu'il ne paraît, et, puisqu'elle va de pair avec une glycogénolyse au moins aussi marquée, que le glycogène tissulaire subit un remaniement considérable au cours de l'incubation.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été subsidié par l'Institut Interuniversitaire de Sciences Nucléaires, le Centre National de Recherches Enzymologiques et les Lilly Research Laboratories. Les auteurs tiennent à remercier Mr. G. HENNEMANNE pour sa participation à certaines des expériences décrites, les firmes Lilly et Novo pour leurs dons respectifs de glucagon et d'insuline.

RÉSUMÉ

1. On a étudié l'influence de l'insuline et du glucagon sur l'incorporation de glucose-¹⁴C dans le glycogène de tranches de foie de lapins nourris, incubées durant une demi-heure dans un milieu relativement carencé en potassium.

2. L'insuline exerce en moyenne une stimulation de 30 %, le glucagon une inhibition de 68 %, sur ce processus. Les deux effets sont statistiquement significatifs. Celui du glucagon est reproduit par l'adrénaline, celui de l'insuline est aboli par un traitement de l'hormone en milieu alcalin, qui supprime son activité physiologique.

3. Aucun effet de l'insuline n'a été observé *in vitro* sur les échanges de glucose entre la cellule hépatique et le milieu environnant, ni sur la grandeur de l'espace de glucose du tissu. Cet espace a été trouvé égal à 0.5 ml/g ou moins, soit une valeur nettement inférieure au contenu en eau du tissu hépatique.

4. Une augmentation significative de la synthèse de glycogène hépatique a également été observée chez des lapins insulinisés et maintenus en isoglycémie par l'injection intra-veineuse continue de glucose-¹⁴C. Le glycogène formé dans ces conditions dans le foie d'un animal traité au glucose-1-¹⁴C contenait la majorité du ¹⁴C dans le carbone 1 de ses unités glucosidiques.

SUMMARY

1. A study has been made of the influence of insulin and glucagon on the incorporation of ¹⁴C-glucose into the glycogen of slices of liver from fed rabbits, incubated for half-an-hour in a medium relatively deficient in potassium.

2. The insulin exerts on the average a stimulation of 30 %, the glucagon an inhibition of 68 %, on the process. These two effects are statistically significant. Adrenaline has the same effect as glucagon, while insulin is inactivated by alkaline treatment, which suppresses its physiological activity.

3. No effect of insulin *in vitro* on the interchange of glucose between the hepatic cells and the surrounding medium, or on the amount of glucose space in the tissue has been observed. This space has been found to be equivalent to 0.5 ml/g or less, a value distinctly lower than the water content of hepatic tissue.

4. A significant increase in the synthesis of hepatic glycogen has also been observed in rabbits treated with insulin and kept in a state of isoglycemia by continual intra-venous injection of ¹⁴C-glucose. The glycogen formed under these conditions in the liver of an animal treated with ¹⁴C-glucose contains the greater part of the ¹⁴C in the C-1 of its glucosidic units.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ C. F. CORI, *Physiol. Revs.*, 11 (1931) 143.
- ² E. M. BRIDGE, *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 62 (1938) 408.
- ³ C. DE DUVE, *Glucose, Insuline et Diabète*, Goemaere, Bruxelles; Masson et Cie, Paris, 1945, p. 307.
- ⁴ C. DE DUVE, H. G. HERST ET J. P. BOUCKAERT, *Arch. intern. pharmacodynamie*, 72 (1946) 45.
- ⁵ N. S. OLSEN ET J. R. KLEIN, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 66 (1947) 86.
- ⁶ E. W. SUTHERLAND ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 737.
- ⁷ C. LEGRAND, E. CARLIER, F. EDIERS ET A. NYS, *Arch. intern. pharmacodynamie*, 75 (1948) 432.
- ⁸ P. HOET ET J. TYBERGHEIN, *Arch. intern. pharmacodynamie*, 86 (1951) 236.
- ⁹ C. DE DUVE, *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, sous presse.
- ¹⁰ E. LUNDSGAARD, *Acta Physiol. Scand.*, 31 (1954) 215.
- ¹¹ S. LANG, M. S. GOLDSTEIN ET R. LEVINE, *Am. J. Physiol.*, 117 (1954) 447.
- ¹² A. E. RENOLD, A. B. HASTINGS, F. B. NESBETT ET J. ASHMORE, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 135.
- ¹³ A. B. HASTINGS, C. T. TENG, F. B. NESBETT ET A. E. RENOLD, *Federation Proc.*, 11 (1952) 227.
- ¹⁴ J. BERTHET, P. JACQUES, G. HENNEMANNE ET C. DE DUVE, *Arch. intern. physiol.*, 62 (1954) 282.
- ¹⁵ J. BERTHET ET P. JACQUES, *3ème Congr. intern. Biochim.*, Bruxelles, Rés. Communs., 1955, p. 66.
- ¹⁶ W. DEUTSCH, *J. Physiol.*, 87 (1936) 56 P.
- ¹⁷ J. W. DUBNOFF, *Arch. Biochem.*, 17 (1948) 327.
- ¹⁸ V. R. POTTER ET C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 495.
- ¹⁹ J. P. BOUCKAERT, P. P. DE NAYER ET R. KREKELS, *Arch. intern. physiol.*, 31 (1929) 180.
- ²⁰ N. NELSON, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 375.
- ²¹ C. A. GOOD, H. KRAMER ET M. SOMOGYI, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) 485.
- ²² H. G. HERST, *J. Biol. Chem.*, 214 (1955) 373.
- ²³ A. B. HASTINGS, C. T. TENG, F. B. NESBETT ET F. M. SINEX, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 69.
- ²⁴ E. W. SUTHERLAND ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 531.

Reçu le 17 novembre 1955