

ORIGINALS

Insulino-sécrétion étudiée sur le pancréas isolé et perfusé du rat

I. Synergie entre glucose et sulfamides hypoglycémiants

A. LOUBATIÈRES, M. M. MARIANI et J. CHAPAL

Faculté de Médecine, Institut de Biologie, Montpellier, France

Reçu le 24 novembre 1969

Insulin secretion as studied on isolated perfused rat pancreas

I. Synergism between glucose and hypoglycaemic sulphonamides

Summary. Our experiments carried out on the isolated perfused rat pancreas show that: 1. In the absence of glucose, the isolated perfused rat pancreas secretes only a very small amount of insulin; which is termed the basal secretion. — 2. When increasing concentrations of glucose are used, the insulin output rate increases as a function of the concentration of glucose (following a sigmoid-shaped curve). — 3. Tolbutamide alone without glucose slightly increases the basal insulin secretion rate. — 4. Tolbutamide potentiates the insulin secretory effects of increasing concentrations of glucose: in the presence of tolbutamide at 100 mg/l, the additional amount of secreted insulin rises as the glucose concentration rises, up to 2 g/l; at 3 g/l it decreases. — 5. At high concentrations (100 mg/l), the potentiating effect of tolbutamide on insulin secretion due to glucose (1.5 g/l) persists long after the termination of the sulphonamide infusion. At a lower concentration (5 mg/l) it ceases when the sulphonamide infusion is stopped. — 6. Glibenclamide (at low dosage: 1 µg/l) not only potentiates the action of glucose, but also prolongs its stimulating action on the beta cell, even long after the sulphonylurea has been removed from the perfusion fluid. — 7. In our experimental conditions, repeated tolbutamide administration in the presence of glucose, does not modify the insulin secretory response of the pancreas to the sulphonamide.

Résumé. Nos expériences effectuées sur le pancréas isolé et perfusé du rat montrent que: 1. En l'absence de glucose, le pancréas sécrète seulement une très petite quantité d'insuline: c'est la sécrétion basale. — 2. Quand on utilise des concentrations croissantes de glucose, le débit d'insuline augmente en fonction de la concentration de glucose (suivant une courbe sigmoïde). — 3. Le tolbutamide seul, en l'absence de glucose, augmente légèrement la sécrétion basale. — 4. Le tolbutamide potentialise les effets insulino-sécréteurs de concentrations croissantes de glucose. En présence de tolbutamide, la quantité supplémentaire d'insuline sécrétée s'élève en même temps que la concentration de glucose, jusqu'à 2 g/l; à 3 g/l elle diminue. — 5. A forte concentration (100 mg/l), l'effet potentialisateur du tolbutamide sur l'insulino-sécrétion due au glucose (1.5 g/l) se prolonge bien au delà de l'arrêt

de l'infusion du sulfamide. A faible concentration (5 mg/l) il cesse dès que l'infusion est supprimée. — 6. Le glibenclamide (à faible concentration: 1 µg/l), non seulement potentialise l'action du glucose, mais aussi prolonge son action stimulante sur la cellule bêta, longtemps après la suppression du sulfamide hypoglycémiant. — 7. Dans nos conditions expérimentales, l'administration répétée de tolbutamide, en présence de glucose, ne modifie pas la réponse insulino-sécrétoire du pancréas à ce sulfamide.

Untersuchungen der Insulinsekretion am isolierten, perfundierten Rattenpankreas

I. Synergismus von Glucose und blutzuckersenkenden Sulfonamiden

Zusammenfassung. Unsere Untersuchungen am isolierten, perfundierten Rattenpankreas zeigen: 1. In Abwesenheit von Glucose sezerniert das Pankreas nur eine sehr kleine Insulinmenge; Sie entspricht der Basalsekretion. — 2. Bei Verwendung steigender Glucosekonzentration steigt die Insulinausschüttung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration an (sie beschreibt dabei eine S-förmige Kurve). — 3. Tolbutamid allein ohne Glucosezusatz steigert die Basalsekretion geringfügig. — 4. Das Tolbutamid potenziert die Wirkung steigender Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion. In Gegenwart von Tolbutamid steigt die zusätzlich sezernierte Insulinmenge parallel zur Glucosekonzentration bis 200 mg% an; ab 300 mg% verringert sie sich. — 5. Bei hohen Tolbutamidkonzentrationen (100 mg/l) hält sein potenzierender Effekt auf die durch Glucose (150 mg%) stimulierte Insulinausschüttung noch lange nach Beendigung der Sulfonamidinfusion an. Bei niedrigen Konzentrationen (5 mg/l) hört er bei Abbruch der Infusion sofort auf. — 6. Schon niedrige Konzentrationen von Glibenclamid (1 µg/l) verstärken nicht nur den Effekt der Glucose, sondern verlängern auch ihre stimulierende Wirkung auf die B-Zelle noch lange über die Beendigung der Zufuhr des blutzuckersenkenden Sulfonamids hinaus. — 7. Unter unseren Versuchsbedingungen verändert die wiederholte Zufuhr von Tolbutamid in Gegenwart von Glucose die Reaktion der Insulinausschüttung des Pankreas auf dieses Sulfonamid nicht.

Key-words: Insulin secretion, isolated perfused rat pancreas, hypoglycaemic sulphonylureas, insulin-secretion stimulators, glucose-sulphonylureas synergism, tolbutamide, glibenclamide.

Introduction

La préparation de pancréas isolé et perfusé du rat constitue une technique convenant particulièrement à l'étude des variations de la sécrétion insulinaire sous l'effet de diverses substances. Cette préparation présente en effet de multiples avantages par rapport à

d'autres méthodes étudiant le comportement de fragments de pancréas *in vitro*. D'une part, la vascularisation de l'organe est conservée et de ce fait les substances administrées sont apportées aux cellules par la voie physiologique normale; d'autre part, il est possible de suivre dans le temps l'évolution du débit d'insuline.

Dans ce travail, nous avons étudié la sécrétion insulinique en fonction de la concentration de glucose présent dans le milieu irriguant les cellules bêta des îlots de Langerhans, et les variations de cette sécrétion provoquées par les sulfamides hypoglycémiant. Nous avons essentiellement utilisé dans ce but le tolbutamide (1-butyl-3-p-tolyl-sulfonylurée). Certains de ces résultats ont été rapportés antérieurement [8, 10, 11, 12, 13, 16].

Méthode

La technique utilisée a été décrite ailleurs en détails, Loubatières et Coll [14]. Rappelons seulement que le pancréas est isolé de tous les tissus et organes voisins, en particulier de l'estomac, du duodénum et de la rate. Il est perfusé par son système artériel en circuit ouvert et le liquide efférent de l'organe s'écoule librement par la veine porte sectionnée; il est recueilli à la partie inférieure de la cuve qui contient le pancréas. Le débit peut être ainsi à tout instant mesuré; il est dans nos expériences compris entre 2 ml et 2.5 ml par minute.

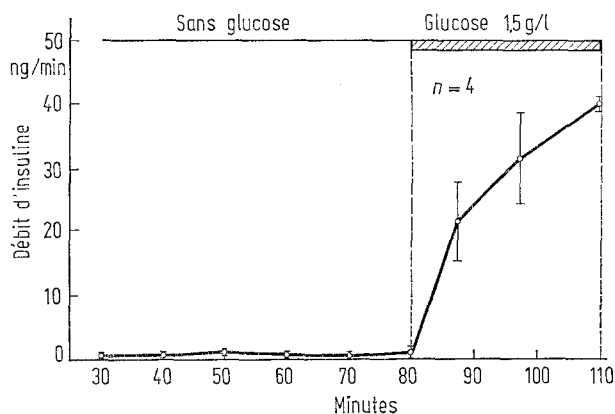


Fig. 1. Cette figure représente d'abord le débit d'insuline du pancréas isolé et perfusé du rat sans glucose, puis l'effet du glucose à la concentration de 1.5 g/l. Chaque point représente la moyenne des valeurs obtenues avec 4 pancréas et porte indication de l'erreur standard de la moyenne

Le liquide de perfusion est une solution tampon au bicarbonate dont la composition par litre est la suivante : NaCl : 7.28 g — KCl : 0.354 g — CaCl₂ : 0.282 g — MgSO₄ · 7H₂O : 0.294 g — KH₂PO₄ : 0.162 g — NaHCO₃ : 1.54 g. Ce liquide est additionné d'albumine de boeuf purifiée (2 g/l) et de glucose à différentes concentrations. Un mélange d'oxygène 93% et de gaz carbonique 7% est mis à barboter dans le liquide à la pression atmosphérique. Le pH de la solution est \approx 7.2.

L'insuline du liquide efférent a été dosée par la méthode radioimmunologique B de Hales et Randle [6]. Les standards d'insuline nécessaires au dosage sont préparés avec de l'insuline pure de rat. Selon Gliemann [3] l'activité biologique de l'insuline de rat est de 19 μ U/ng.

Dans la plupart de nos expériences il s'est écoulé une période d'adaptation de la préparation d'une durée de 30 min entre la mise en perfusion de l'organe et le premier prélèvement destiné au dosage de l'insuline; pendant cette période l'organe était déjà perfusé avec la solution contenant le glucose à la concentration étudiée (0 g à 5 g/l); les échantillons étaient ensuite prélevés à différents intervalles. Deux échantillons étaient toujours pris avant l'addition de sulfamide hypoglycémiant au liquide de perfusion. Ces deux prélèvements étaient effectués à 10 ou 15 min d'intervalle; ils représentent les échantillons témoins et permettent de connaître la sécrétion d'insuline sous l'influence de la concentration de glucose utilisée. Les temps indiqués en abscisses sur les graphiques sont calculés à partir de la mise en perfusion de l'organe.

Résultats

I. Dans un premier groupe d'expérience, l'étude des effets de concentrations croissantes de D-glucose sur la sécrétion d'insuline a permis d'établir les faits suivants

a) En l'absence de glucose dans le liquide de perfusion, le pancréas isolé et perfusé du rat ne sécrète qu'une très faible quantité d'insuline inférieure à 2 ng par minute: c'est la sécrétion basale (Fig. 1). En l'absence de glucose, cette sécrétion peut se maintenir pendant 80 min sans altération fonctionnelle apparente de la cellule bêta si l'on en juge par ses réactions ultérieures au glucose (voir Fig. 1). En effet la cellule conserve ses capacités insulino-sécrétrices et répond

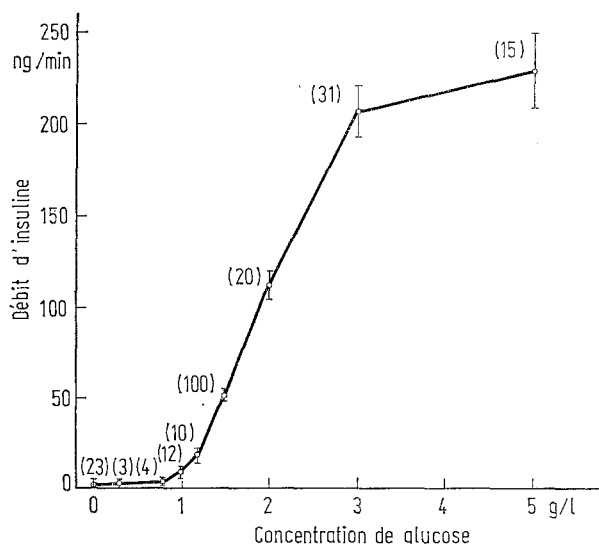


Fig. 2. Débit d'insuline du pancréas isolé et perfusé du rat en fonction de la concentration de glucose. Le nombre de pancréas est indiqué entre parenthèses

immédiatement à la stimulation provoquée par l'addition au liquide de perfusion d'une quantité adéquate de glucose.

b) Sous l'effet de concentrations croissantes de glucose dans le liquide de perfusion, le débit d'insuline sécrétée augmente selon les modalités représentées sur la Fig. 2. Les résultats rapportés représentent les valeurs du débit d'insuline mesurées toujours dans les mêmes conditions, 30 min après la mise en perfusion de l'organe, celui-ci étant perfusé depuis le début de l'expérience avec la solution physiologique contenant le glucose à la concentration étudiée.

On constate que la courbe représentant le débit d'insuline en fonction de la concentration de glucose s'exprime par une sigmoïde. Pour les concentrations inférieures à 0.8 g/l le D-glucose ne modifie pas l'insulino-sécrétion de base d'une manière appréciable. L'action stimulante du glucose sur l'insulino-sécrétion commence à se manifester pour des concentrations comprises entre 0.8 g/l et 1.2 g/l (qui représentent

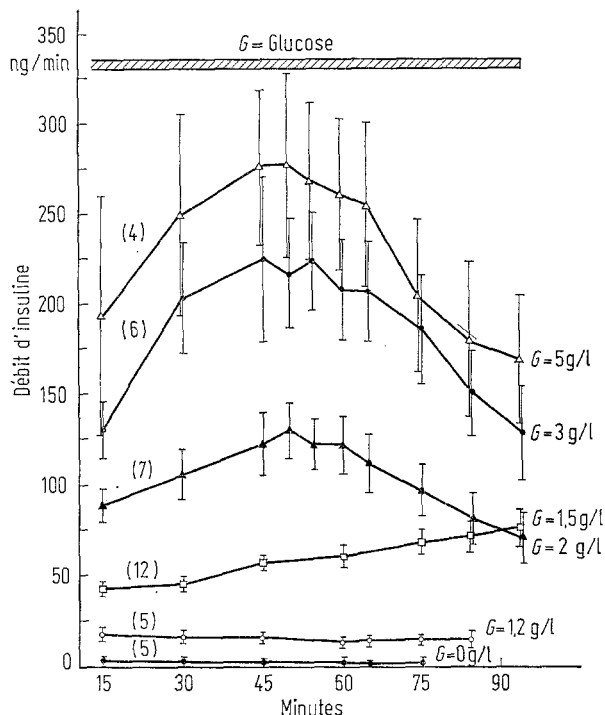


Fig. 3. Cette figure représente l'évolution dans le temps, du débit d'insuline du pancréas du rat, isolé et perfusé avec un liquide physiologique contenant du glucose à des concentrations croissantes (0 g/l à 5 g/l). Chaque point représente la valeur moyenne et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. Le nombre de pancréas est indiqué entre parenthèses

pratiquement la zone physiologique des valeurs de glucose dans le plasma). A partir de 1.2 g/l et jusqu'à 3 g/l l'insulino-sécrétion s'accroît très rapidement; pour cette dernière concentration le débit d'insuline est égal à plus de 100 fois la sécrétion basale. A la concentration de 5 g/l de glucose, la sécrétion n'est que peu supérieure à celle obtenue avec 3 g/l.

Nous avons d'autre part étudié les effets du glucose à différentes concentrations non seulement à un

moment précis du déroulement de l'expérience, mais également d'une manière dynamique en suivant l'évolution de cette sécrétion dans le temps. Dans cette série d'expériences les premiers prélèvements ont été effectués un peu plus tôt que dans nos expériences habituelles, c'est-à-dire 15 min seulement après la mise en perfusion de l'organe. Les résultats obtenus sont rapportés dans la Fig. 3.

On peut constater que pour la concentration de glucose de 1.2 g/l la sécrétion d'insuline est à peu près constante, alors que pour 1.5 g/l il apparaît que la sécrétion va en augmentant légèrement dans le temps pendant les 90 min. Pour les concentrations supérieures: de 2 g/l à 5 g/l, le débit va en augmentant dans le temps pendant une première phase, mais la cellule bêta ne peut maintenir longtemps ce rythme de sécrétion élevé, et après une phase à peu près stationnaire, il apparaît une décroissance d'autant plus accusée que la concentration de glucose est importante. Nous pouvons remarquer que durant la période de 45 à 65 min la sécrétion n'est pas très modifiée. Cette période est importante dans nos conditions expérimentales puisqu'elle correspond à la période pendant laquelle l'effet du tolbutamide est étudié dans le deuxième groupe d'expériences que nous exposerons plus loin.

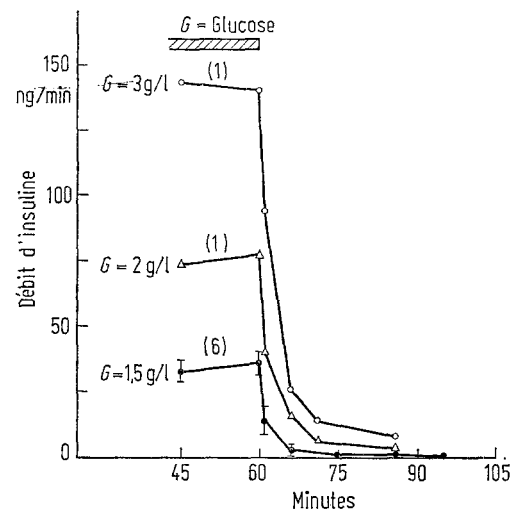


Fig. 4. Evolution de la sécrétion d'insuline du pancréas isolé et perfusé du rat après suppression du glucose du liquide de perfusion

c) Lorsque le glucose (1.5 g/l) est supprimé du liquide de perfusion (Fig. 4) la sécrétion insulinaire s'effondre brusquement et atteint rapidement le niveau de sécrétion basale, même si la perfusion a duré 60 min; le même phénomène se produit lorsque la concentration de glucose utilisée est de 2 g/l ou de 3 g/l (Fig. 4). Cela signifie que dans les conditions expérimentales où nous nous sommes placés, l'état d'excitation bêta-cellulaire qui détermine la sécrétion d'insuline endogène cesse pratiquement dès que le glucose disparaît du milieu.

II. Les effets du tolbutamide sur la sécrétion d'insuline ont été étudiés en l'absence et en présence de glucose

La concentration de tolbutamide utilisée est de 100 mg/l, soit une concentration très nettement supérieure à celle qui permet d'obtenir l'effet insulino-sécréteur maximum de ce sulfonurée.

a) En l'absence de glucose dans le liquide de perfusion le tolbutamide (100 mg/l) augmente légèrement le débit insulinaire basal du pancréas et cet effet persiste pendant l'infusion du produit qui a duré, dans certaines de nos expériences, jusqu'à 70 min (Fig. 5).

Dès que le tolbutamide intervient il apparaît une stimulation relativement importante de la sécrétion qui se traduit par un pic du débit insulinaire. La sécrétion diminue ensuite mais le débit d'insuline reste cependant supérieur à celui observé avant l'addition du sulfamide.

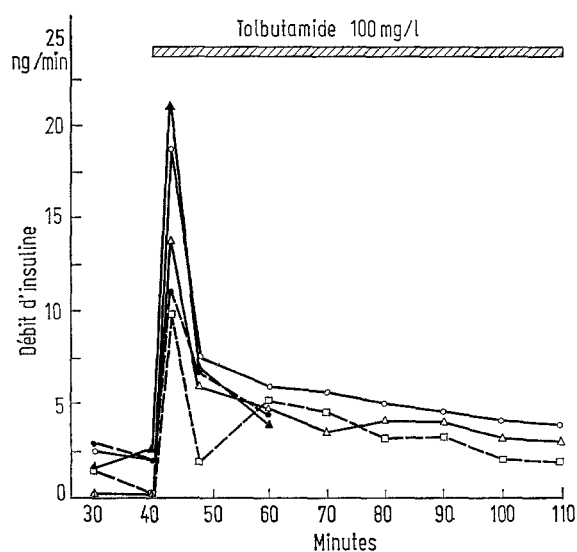


Fig. 5. Effet du tolbutamide (100 mg/l) sur le débit d'insuline du pancréas du rat, isolé et perfusé avec un liquide physiologique ne contenant pas de glucose

La réponse sécrétoire au tolbutamide, en l'absence de glucose, se manifeste donc en deux phases, comme Grodsky et coll. [4] l'ont décrit. Cependant en raison des conditions expérimentales différentes qu'ils ont utilisées, leurs résultats ne sont pas absolument superposables à ceux que nous avons obtenus. Par contre nos résultats se rapprochent davantage de ceux obtenus par Sussman et coll. [18].

b) Il était important d'étudier ensuite le comportement de la sécrétion d'insuline en présence de différentes concentrations de glucose réalisant ainsi les conditions dans lesquelles le sulfamide hypoglycémiant intervient dans l'organisme.

En présence de différentes concentrations de glucose, l'infusion de tolbutamide (100 mg/l) étant maintenue pendant 20 min, nous avons pu observer les faits suivants:

— Pour les très faibles concentrations de glucose: 0.3 g/l, le comportement du pancréas ne se révèle pas sensiblement différent de celui observé en l'absence de glucose (Fig. 6).

— Pour les concentrations de glucose plus élevées, nous avons obtenu les résultats suivants représentés sur la Fig. 7: Entre 0.8 g/l et 3 g/l, la sécrétion d'insuline s'élève rapidement et de façon importante par l'addition de tolbutamide au liquide de perfusion. Pour les concentrations allant jusqu'à 2 g/l, cet effet persiste pendant l'infusion qui dure 20 min dans nos expériences. Pour la concentration de 3 g/l cet effet,

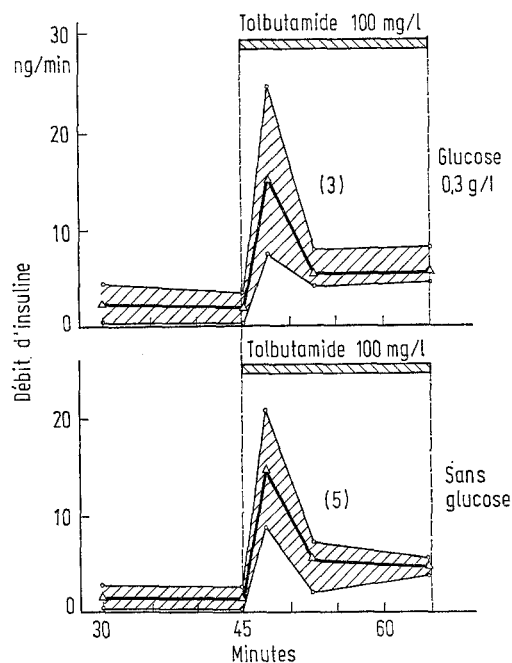


Fig. 6. Effets du tolbutamide (100 mg/l) sur le débit d'insuline du pancréas du rat, isolé et perfusé avec un liquide physiologique ne contenant pas de glucose, ou contenant du glucose à la concentration de 0.3 g/l. La ligne \triangle — \triangle représente la moyenne; la zone hachurée l'étendue des variations

bien que net, va en diminuant légèrement dans le temps; ceci traduit probablement la diminution progressive des possibilités sécrétoires du pancréas dans les conditions expérimentales que nous utilisons. Ce dernier effet s'accuse encore pour la concentration de 5 g/l.

Il nous est apparu intéressant de représenter les débits d'insuline en fonction des concentrations de glucose en l'absence et en présence de tolbutamide.

Sur la Fig. 8 nous avons porté, en fonction des concentrations de glucose, les effets sur l'insulino-sécrétion, d'une part du glucose seul (valeur prise au temps 45 min), d'autre part de l'administration simultanée du glucose et du tolbutamide sur le même pancréas (temps 65 min), après 20 min d'infusion du sulfamide hypoglycémiant. Cette durée de 20 min a été choisie car en l'absence de glucose, ou pour les très faibles

concentrations (0.3 g/l), le pic de sécrétion produit par le tolbutamide est terminé et l'action du sulfamide sur l'insulino-sécrétion est pratiquement stable.

On constate que les deux courbes obtenues sont de forme sigmoïde. Pour une concentration donnée de glucose, les valeurs enregistrées en présence de tolbutamide sont supérieures à celles mesurées en l'absence du sulfamide; l'écart entre elles représente la quantité supplémentaire d'insuline sécrétée par minute.

Sur la Fig. 9 nous avons représenté ce débit supplémentaire d'insuline en fonction de la concentration en glucose. Il ressort nettement que ce débit supplé-

c) L'évolution de la sécrétion provoquée par les sulfonylurées en présence d'une concentration de glucose de 1.5 g/l a été suivie après l'arrêt de l'infusion de la drogue

Nous avons réalisé ce type d'expérience à l'aide de deux sulfonylurées: le tolbutamide et le glibenclamide (N-4-{2-(5-chloro-2-methoxy-benzamido)-éthyl}-phényl-sulfonyl-N'-cyclohexyl-urée). L'infusion des drogues était maintenue dans les deux cas pendant 15 min.

Comme le montre la Fig. 10, si la perfusion de solution glucosée est continue, l'infusion temporaire de

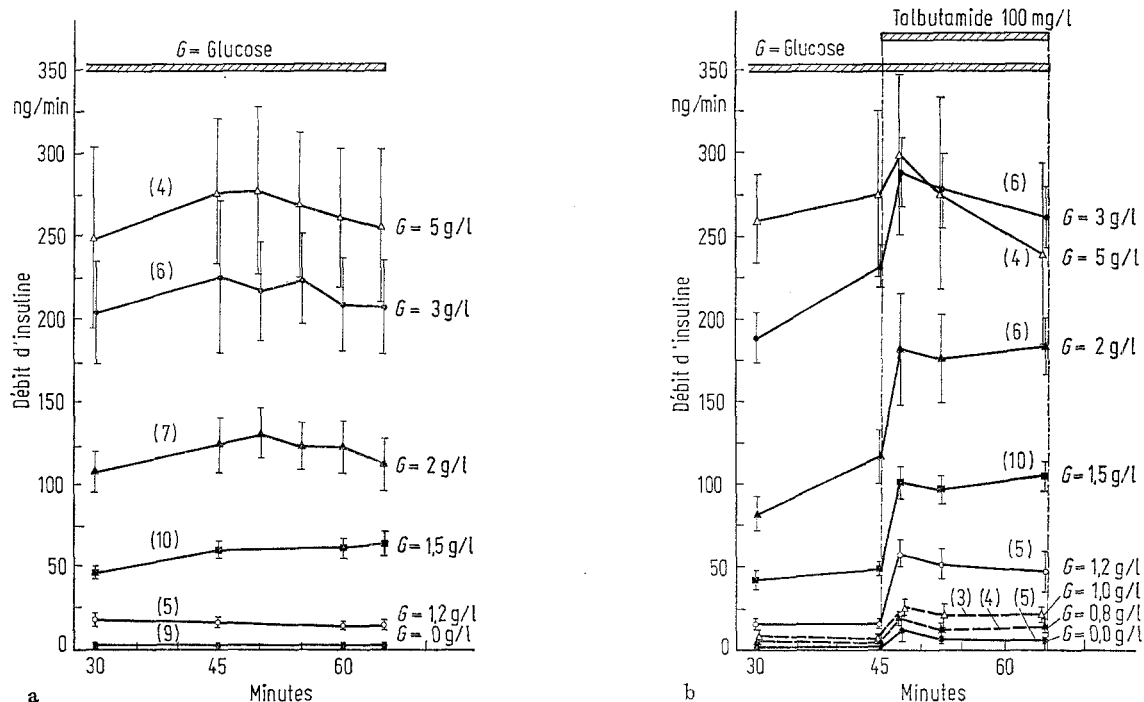


Fig. 7. Effet du tolbutamide (100 mg/l) (graphique b) sur la sécrétion d'insuline du pancréas du rat, isolé et perfusé avec un liquide physiologique contenant du glucose à des concentrations croissantes (0 g/l à 5 g/l). Chaque point représente la valeur moyenne et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. Le nombre de pancréas utilisés est indiqué entre parenthèses

En parallèle (graphique a) nous avons représenté l'évolution en l'absence de tolbutamide

mentaire s'élève en même temps que la concentration de glucose, jusqu'à un maximum atteint pour 2 g de glucose par litre, il décroît ensuite pour des concentrations de glucose de 3 g/l et s'annule pratiquement pour 5 g/l.

La décroissance du phénomène observée pour les très fortes concentrations en glucose peut s'expliquer par le fait que l'on atteint pratiquement, dans nos conditions expérimentales, les capacités maximales de réponse de la cellule bêta.

D'après les résultats obtenus, l'effet insulino-sécréteur du tolbutamide n'est donc pas indépendant, dans les limites que nous avons définies, de la concentration du glucose présente dans le milieu, comme l'ont suggéré Curry et Coll. [1], Malaisse et Coll. [15], il est même fonction de cette concentration.

tolbutamide (100 mg/l) provoque une stimulation importante de l'insulino-sécrétion (plus de 100% d'augmentation) pendant toute la durée de l'infusion. Cette stimulation persiste longtemps après l'arrêt de l'infusion de la drogue (environ 40 min).

Ainsi les effets insulino-sécréteurs du tolbutamide à cette concentration et en présence de glucose, non seulement se maintiennent importants pendant toute la durée de l'infusion, mais se prolongent même après l'arrêt de l'infusion. Le même phénomène a été retrouvé en utilisant un autre sulfamide hypoglycémiant: le glibenclamide (HB 419). Ce sulfamide particulièrement actif provoque à la dose de 50 µg/l une augmentation très importante de la sécrétion d'insuline (+ 200 à 300%), augmentation qui persiste longtemps après l'arrêt de l'infusion (Fig. 11).

Cette persistance de l'action après l'arrêt de l'infusion a été observée même pour des concentrations de glibenclamide aussi faibles que 1 µg/l (Fig. 11).

Il apparaît ainsi que l'action du sulfamide n'est pas seulement aiguë mais durable. Il semble que sous

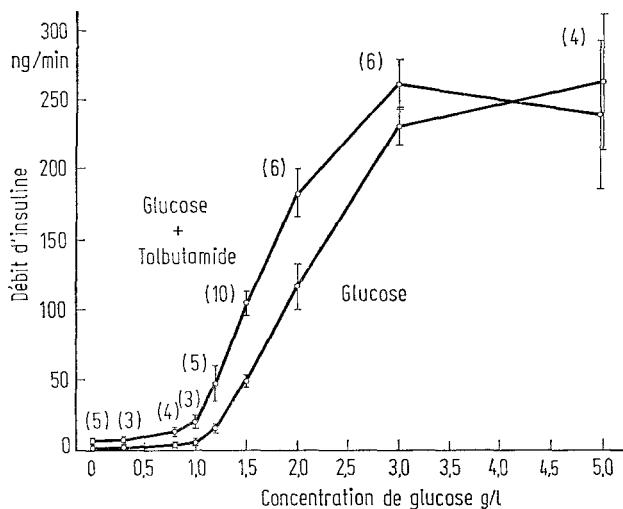


Fig. 8. Débit d'insuline en fonction de la concentration de glucose, en l'absence et en présence de tolbutamide. Le nombre de pancréas utilisés pour chaque concentration est indiqué entre parenthèses. Chaque point représente la valeur moyenne et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. Le même pancréas a été utilisé pour déterminer le débit d'insuline d'abord avec glucose seul, puis, 20 min après l'addition de tolbutamide

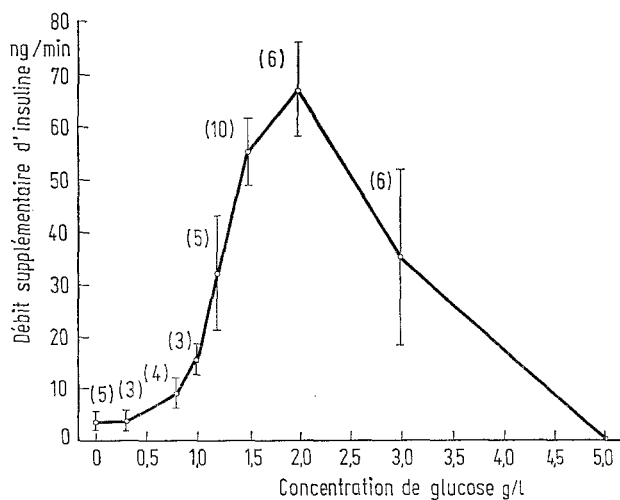


Fig. 9. Cette figure représente, en fonction des concentrations de glucose, la différence entre les débits d'insuline obtenus sur les mêmes pancréas, en présence et en l'absence de tolbutamide (100 mg/l). Chaque point représente la valeur moyenne et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. Le nombre de pancréas est indiqué entre parenthèses

l'influence de ces drogues (spécialement le HB 419) et en présence de glucose, la cellule bêta demeure dans un état de stimulation prolongée qui persiste même lorsque l'infusion de la drogue a été arrêtée.

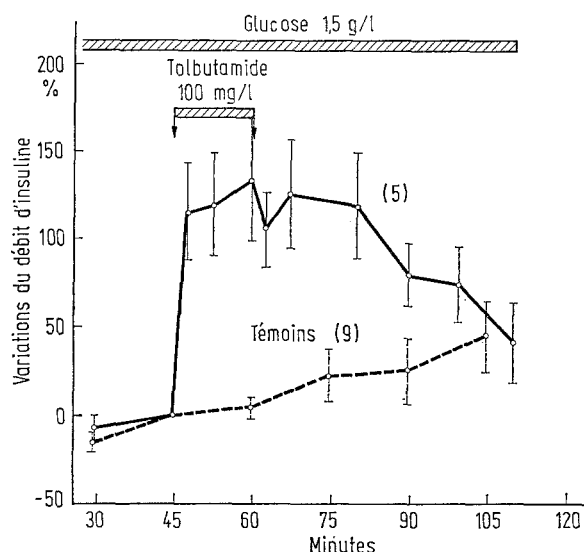


Fig. 10. Variations du débit d'insuline provoquées par le tolbutamide (100 mg/l) sur le pancréas du rat isolé et perfusé avec un liquide physiologique contenant du glucose (1.5 g/l). Les variations sont exprimées en pourcentages de la valeur enregistrée immédiatement avant l'addition du tolbutamide. La ligne pointillée représente le débit d'insuline chez un groupe témoin perfusé seulement avec le liquide physiologique contenant le glucose à 1.5 g/l. Chaque point représente la valeur moyenne et porte indication de l'erreur standard de la moyenne. Le nombre de pancréas est indiqué entre parenthèses

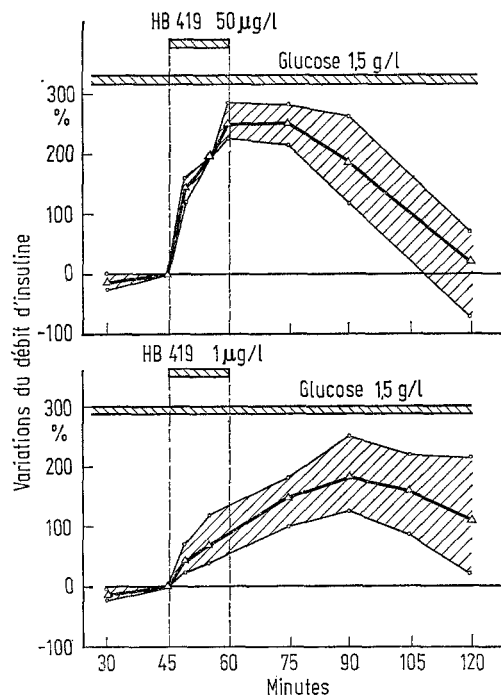


Fig. 11. Variations du débit d'insuline provoquées par le HB 419 à deux concentrations: 50 µg/l et 1 µg/l, sur le pancréas du rat, isolé et perfusé avec un liquide physiologique contenant du glucose (1.5 g/l). Les variations sont exprimées en pourcentages de la valeur enregistrée immédiatement avant l'addition de HB 419. La ligne \triangle — \triangle indique la valeur moyenne de 4 expériences; la zone hachurée l'étendue des variations

d) Les concentrations de tolbutamide que la plupart des expérimentateurs ont utilisées étaient en moyenne de 100 milligrammes par litre et plus. Nous avons recherché si des concentrations beaucoup plus faibles de cette substance seraient encore actives sur la sécrétion d'insuline.

L'étude des effets de différentes concentrations de tolbutamide agissant en présence d'une même concentration de glucose (1.5 g/l) a montré que ce sulfamide est déjà nettement actif à la concentration de 2.5 mg/l. A 5 mg/l il augmente la sécrétion d'insuline d'environ 100% (Fig. 12).

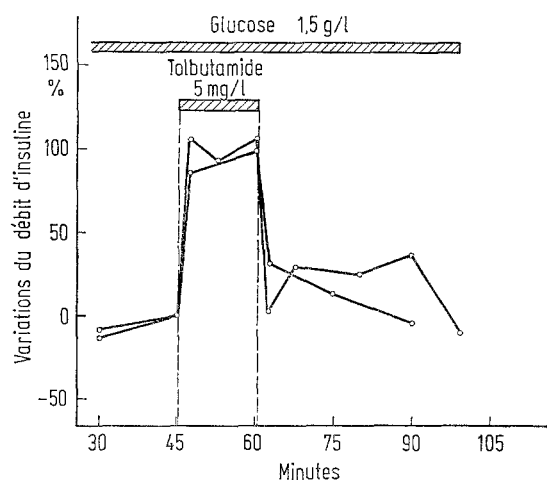


Fig. 12. Variations du débit d'insuline provoquées par le tolbutamide à la concentration de 5 mg/l sur le pancréas du rat isolé et perfusé avec un liquide physiologique contenant du glucose (1.5 g/l). Les variations sont exprimées en pourcentages de la valeur enregistrée immédiatement avant l'addition de tolbutamide

Cependant à ces faibles concentrations, le comportement du pancréas après arrêt de l'infusion de tolbutamide, est différent de celui enregistré lorsque la concentration de 100 mg/l est utilisée; comparer les Fig. 12 et 10.

Pour les concentrations de tolbutamide de 5 mg/l, aussitôt après l'arrêt de l'infusion, l'insulino-sécrétion retourne à des niveaux à peine supérieurs à ceux enregistrés avant l'adjonction du produit.

Une concentration suffisante de tolbutamide est donc nécessaire pour que se manifeste la prolongation de l'effet.

Les concentrations de tolbutamide de 5 mg/l se sont également montrées nettement actives sur la sécrétion d'insuline en présence de glucose à la concentration de 1 g/l.

e) Nous avons également étudié l'action des infusions répétées de tolbutamide sur le même pancréas en présence de concentrations différentes de glucose.

Sur la figure 13 sont rapportées deux expériences au cours desquelles les pancréas ont été d'abord perfusés avec un liquide physiologique contenant du glucose à la concentration de 0.8 g/l, et ensuite à l'aide d'un liquide contenant 1.5 g/l. Au cours de chaque

période est pratiquée une infusion identique de tolbutamide (100 mg/l) pendant une durée de 20 min. On peut constater qu'après la première infusion de tolbutamide, et alors que celle-ci a été arrêtée depuis 20 min, le pancréas répond normalement à une concentration de glucose de 1.5 g/l. Par la suite, le pancréas demeurant perfusé par la solution de glucose à la concentration de 1.5 g/l, la répétition d'une dose de tolbutamide identique à celle précédemment administrée est suivie d'une réponse normale du pancréas au tolbutamide en présence de glucose (1.5 g/l).

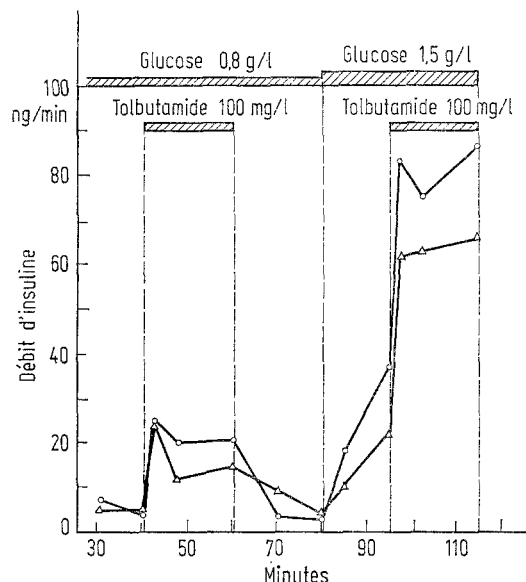


Fig. 13. Débit d'insuline du pancréas isolé et perfusé du rat pour deux concentrations de glucose: 0.8 g/l et 1.5 g/l, en l'absence et en présence de tolbutamide (100 mg/l)

En conséquence, il semble qu'un état réfractaire de la cellule bêta vis à vis de l'effet stimulant du glucose ou du tolbutamide en présence de glucose, et qui serait consécutif à une première administration de tolbutamide, ne se manifeste pas dans les conditions expérimentales où nous avons opéré.

Discussion

La préparation de pancréas isolé et perfusé telle que nous l'avons réalisée et mise au point exclut la présence d'éventuelles influences perturbatrices émanant de l'estomac, du duodénum et de la rate.

Dans cette méthode, les îlots de Langerhans superficiels ou profonds sont perfusés en circuit ouvert d'une manière continue par du liquide physiologique neuf, de même que les autres cellules de l'ensemble de l'organe, aussi bien cellules exocrines qu'éléments nerveux et tissu conjonctif. Ainsi les corrélations anatomiques et fonctionnelles présentes dans l'organe *in situ* demeurent conservées *in vitro*, à l'exception des apports régulateurs assurés dans l'organisme par l'innervation extrinsèque de l'organe.

La qualité particulièrement satisfaisante de cette méthode de survie de l'organe est attestée par les examens histologiques et microscopiques électroniques des tissus que nous avons prélevés en cours et après la perfusion. Elle est également confirmée par les tests fonctionnels que nous avons pu pratiquer.

L'avantage de cette méthode réside également en ce fait que le comportement du même organe pendant la période témoin sert de test à ses propres réponses.

D'après les résultats que nous avons obtenus avec cette préparation, en l'absence de glucose dans le milieu de perfusion, (celui-ci ne contenant aucun dérivé organique phosphorylé riche en énergie) la sécrétion du pancréas est minime: c'est la sécrétion basale.

Par contre lorsque du glucose est introduit dans le liquide de perfusion, la sécrétion s'accroît en suivant une courbe concentration-réponse de forme sigmoïde. Le glucose ne manifeste un effet stimulateur qu'à partir d'un certain seuil. Pour les taux de glucose dépassant 1, 2 g/l, et jusqu'à 3 g/l, (ce qui correspond à des valeurs supérieures aux valeurs physiologiques du glucose dans le plasma) la sécrétion est remarquablement sensible aux variations de glucose et devient linéaire, directement reliée à la concentration présente dans le milieu, et ceci jusqu'à 3 g/l. L'effet maximum du glucose se manifeste pour 5 g/l où la sécrétion atteint un plafond.

Le fait que la suppression brutale du glucose du liquide de perfusion (1.5 g/l) ait pour effet de stopper la sécrétion d'insuline, suggère que le glucose ou ses métabolites immédiats ont une action stimulante sur l'insulino-sécrétion de durée très brève parce que ces substances sont probablement rapidement détruites. Lorsque des concentrations plus élevées de glucose (2 g/l, 3 g/l) sont supprimées du liquide de perfusion, l'effet suspensif sur l'insulino-sécrétion est aussi net.

Matthews et Dean [17] ont rapporté que l'augmentation des concentrations de glucose de 0.5 g/l à 3 g/l, provoque l'apparition de potentiels d'action dans les cellules des îlots de Langerhans de la souris. Ces auteurs en faisant varier systématiquement la concentration de D-glucose constatent que la courbe reliant l'activité électrique à la concentration de glucose est une sigmoïde qui présente un seuil pour environ 0.7 g/l et un maximum à environ 5 g/l. Ces résultats sont en concordance avec ceux que nous avons obtenus; les deux sigmoïdes établies en fonction de la concentration du glucose (l'une pour l'activité électrique, l'autre pour le débit d'insuline) paraissent du même type.

La courbe sigmoïde qui représente la relation que nous avons établie entre la concentration de glucose dans le milieu intérieur et la quantité d'insuline sécrétée démontre la souplesse d'adaptation de la sécrétion de l'insuline à la quantité de glucose présente dans le liquide de perfusion.

Le fait que le tolbutamide, dans le liquide de perfusion privé de glucose manifeste une action stimulatrice sur la sécrétion d'insuline est l'une des preuves

les plus évidentes de l'action stimulatrice que ce sulfamide hypoglycémiant exerce sur la cellule bêta. Cette action se manifeste en deux phases l'une initiale qui est intense et brève, l'autre consécutive à la première, qui est peu intense mais qui est prolongée et qui donne une sécrétion insulinique supérieure à la sécrétion basale. Rappelons que la première phase est accompagnée de la production d'un courant d'action qui a été mis en évidence dans les expériences de Matthews et Dean [17].

La courbe qui exprime la sécrétion d'insuline provoquée par l'action simultanée du glucose à différentes concentrations et du tolbutamide à concentration fixe (100 mg/l) est également de forme sigmoïde, comme celle qui exprime l'augmentation de la sécrétion d'insuline sous l'effet de concentrations croissantes de glucose. Cependant elle est décalée horizontalement et vers l'origine des abscisses: le débit d'insuline enregistré pour une même concentration en glucose est donc plus élevé. L'effet maximum, qui a la même valeur que celui obtenu avec le glucose seul à 5 g/l, est atteint dans ce cas pour une concentration de glucose de 3 g/l.

Cette constatation peut suggérer qu'en présence de concentrations déterminées de glucose, le tolbutamide met en jeu des réactions plus intenses ou nouvelles, libératrices d'énergie et utilisables pour la sécrétion de l'insuline.

Comme le montre la Fig. 8 la synergie entre glucose et tolbutamide est particulièrement évidente à des concentrations glucosées qui caractérisent essentiellement le diabète de moyenne intensité qui survient à l'âge moyen de la vie et qui s'accompagne d'un état relativement gras des sujets. On sait que c'est bien dans cette indication que les sulfamides hypoglycémiant agissent d'une manière spectaculaire.

Il existe donc une synergie entre l'action du glucose et celle du tolbutamide sur l'insulino-sécrétion, comme nous l'avons antérieurement rapporté [8, 10, 11, 12, 13, 16].

Une discussion peut s'instaurer en ce qui concerne le point de savoir si cette synergie est potentialisatrice.

Considérons le glucose comme la première drogue et le tolbutamide comme la deuxième drogue, dont nous envisageons les effets sur l'insulino-sécrétion. Nous pouvons étudier l'effet résultant de l'action simultanée des deux drogues à l'aide de la méthode graphique utilisant l'isobole.

Les résultats obtenus nous ont permis, en ayant déterminé trois points pour chacune d'elles, de situer les deux isoboles représentées sur la Fig. 14. Les points de l'isobole I ont pour coordonnées les concentrations de glucose et de tolbutamide dont l'action combinée provoque un effet insulino-sécréteur constant, dans le cas présent égal à 40% de l'effet maximum. Les points de l'isobole II correspondent à 70% de l'effet maximum. Cet effet maximum est celui que l'on obtient lorsque les cellules bêta sont irriguées à l'aide d'un liquide de perfusion contenant 5 g de glucose par

litre; il est identique à celui que l'on obtient en présence de tolbutamide avec 3 g de glucose par litre (voir Fig. 8).

On peut constater que ces deux isoboles ne touchent qu'un seul axe, celui sur lequel sont portées les concentrations de glucose. En effet le tolbutamide seul, en l'absence de glucose, n'a qu'un effet insulino-sécréteur très faible: à la vingtième minute d'administration l'effet provoqué est égal à moins de 5% de l'effet maximum.

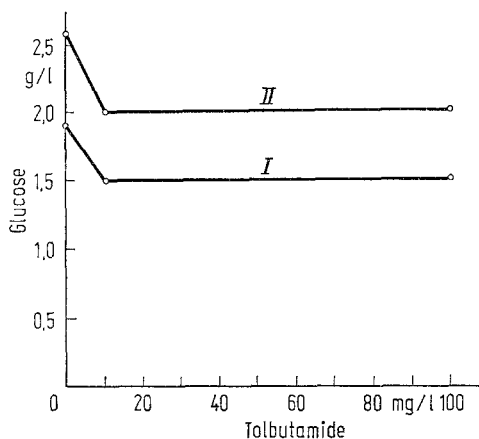


Fig. 14. Cette figure situe deux isoboles relatives à l'action du glucose et du tolbutamide sur l'insulino-sécrétion du pancréas isolé et perfusé du rat

Si l'on se réfère à l'étude des isoboles donnée par Loewe [7] celles que nous avons représentées correspondent à des isoboles «hétéroergiques» et expriment la potentialisation. Les interrelations entre le glucose et le sulfamide constituent en conséquence un phénomène de synergie potentialisatrice.

La Fig. 9 démontre d'une manière évidente, dans les limites expérimentales de concentrations de glucose que nous avons définies, que la quantité d'insuline supplémentaire sécrétée en présence de tolbutamide (100 mg/l) est fonction de la concentration de glucose. Le comportement de la dernière partie de la courbe peut raisonnablement s'expliquer par le fait que pour les concentrations élevées en glucose, les capacités maximales de réponse insulino-sécrétoire de la cellule bêta sont probablement atteintes.

Il en résulte que l'effet stimulateur du tolbutamide sur la sécrétion d'insuline tel qu'il se manifeste dans un organisme normal ou diabétique n'est pas indépendant de la concentration du glucose dans le milieu circulant.

Le phénomène de prolongation des effets insulino-sécréteurs du tolbutamide à fortes concentrations (100 mg/l) en présence de glucose (1,5 g/l) et qui se manifeste également pour des concentrations extrêmement faibles de glibenclamide (1 µg/l) est à notre sens remarquable (voir Fig. 10 et 11). Il démontre qu'en présence de glucose le glibenclamide même à faibles concentrations (1 µg/l) maintient la cellule

bêta dans un état de stimulation accrue et prolongée qui persiste alors que le sulfamide a été supprimé depuis un certain temps du liquide de perfusion. Ce phénomène que nous avons décrit dès 1967 [8, 9, 10, 11, 16] a été confirmé par Grodsky et coll. [5] et par Fussgänger et coll. [2]. Ces auteurs ont observé également qu'après la fin de l'infusion de HB 419, l'insulino-sécrétion continue pendant des périodes prolongées. Les expériences effectuées par Grodsky et coll. à l'aide de HB 419 radioactif ont indiqué que la sécrétion post-stimulatoire ne paraissait pas causée par des concentrations résiduelles de sulfamide dans le milieu de perfusion, le pancréas total ou les éluats. Cependant, la possibilité d'intervention de concentrations localisées à l'intérieur ou autour des îlots ne peut pas être complètement exclue de ces expériences.

Lorsque l'on considère les divers effets des sulfamides hypoglycémiant, c'est-à-dire la possibilité de stimuler deux fonctions physiologiques: celle d'insulino-sécrétion et de néogénèse des îlots — leur pouvoir de renforcer les effets propres hypoglycémiant de l'insuline — leur action potentialisatrice sur les effets insulino-sécréteurs du glucose, on est frappé par la complexité des actions de ces substances et surtout par la confluence des actions des sulfamides hypoglycémiant en vue d'assurer une meilleure régulation de la glycémie et du métabolisme, lorsque celui-ci est physiopathologiquement troublé comme cela se produit dans la majorité des diabètes humains.

Bibliographie

1. Curry, D.L., Bennett, L.L., Grodsky, G.M.: Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **83**, 572—584 (1968).
2. Fußgänger, R.D., Goberna, R., Hinz, M., Jaros, P., Karsten, C., Pfeiffer, E.F., Raptis, S.: Comparative studies on the dynamics of insulin secretion following HB 419 and tolbutamide of the perfused isolated rat pancreas and the perfused isolated pieces and islets of rat pancreas. *Tegernsee Konferenz über das neue orale Antidiabetikum HB 419*, 27—29 janvier 1969. *Hormone Metab. Res.* **1**, Suppl. 34—40 (1969).
3. Gliemann, J.: Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. I. Factors influencing the response to crystalline insulin. *Diabetologia* **3**, 382—388 (1967).
4. Grodsky, G.M., Bennett, L.L., Smith, D., Nemecek, K.: The effect of tolbutamide and glucose on the timed release of insulin from the isolated perfused pancreas. In "Tolbutamide after ten years", *Brook-Lodge Symposium* 6—7 march 1967, ed. Butterfield W. J. H. and Westering W., pp. 11—21. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
5. — Curry, D.L., Bennett, L.L.: Effect of HB 419 on insulin secretion in vitro. *Tegernsee-Konferenz über das neue orale Antidiabetikum HB 419*, 27—29 janvier 1969, p. 54.
6. Hales, C.N., Randle, P.J.: Immuno-assay of insulin with insulin-antibody precipitate. *Biochem. J.* **88**, 137—146 (1963).
7. Loewe, S.: Antagonisms and antagonists. *Pharmacol. Rev.* **9**, 237—242 (1957).
8. Loubatières, A.: Stimulators and inhibitors of insulin secretion: physiological and pharmacological inter-

- ferences, synergisms and antagonisms. In "Mechanism and regulation of insulin secretion", 2ème Capri-Conférence 8-9 avril 1968, ed. Levine R. et Pfeiffer E.F., pp. 220-255. Milano: Il Ponte.
9. — Mariani, M.M.: Etude pharmacologique d'un sulfonyleurée hypoglycémiant particulièrement actif, le glybenzcyclamide. C. R. Ac. Sci., Série D, **265**, 643-645 (1967).
 10. — — Chapal, J.: Action synergique entre glucose et sulfamides hypoglycémiant sur l'insulino-sécrétion. C.R. Acad. Sci., Paris, série D, **267**, 123-126 (1968a).
 11. — — — Effets de concentrations croissantes de glucose sur l'insulino-sécrétion. Synergie entre glucose et sulfamides hypoglycémiant. C.R. Soc. Biol. **162**, 1575-1580 (1968b).
 12. — — — Effets associés du tolbutamide et du glucose sur la sécrétion d'insuline du pancréas isolé et perfusé du rat. Abstracts 5ème Réunion annuelle de l'Association Européenne pour l'Etude du Diabète, Montpellier, 16-18 septembre 1969. Diabetologia **6**, 54 (1970).
 13. — — — Etude de la synergie entre le glucose et le tolbutamide dans les limites physio-pathologiques de la glycémie. C.R. Acad. Sc., Séance du 29 septembre 1969, **269**, Série D, 1460-1463.
 14. — — Ribes, G., de Malbosc, H., Chapal, J.: Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. I. Action bêta-cytotrope et insulino-sécrétoire. Diabetologia **5**, 1-10 (1969).
 15. Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mayhew, D.A., Wright, P.H.: Effects of sulfonylureas upon insulin secretion by the rat's pancreas. In "Tolbutamide after ten years", Brook-Lodge Symposium 6-7 march 1967, ed. Butterfield, W.J.H. and Van Westering W., pp. 49-59. Amsterdam: Excerpta Medica Foundation.
 16. Mariani, M.M.: The action of sulfonylureas on the insulin secretion of the perfused rat pancreas. In "Pharmacokinetics and mode of action of oral hypoglycaemic agents", 3ème Capri-Conférence 2-3 avril 1969, ed. Loubatières, A. et Renold, A.E., pp. 256-270. Milano: Il Ponte.
 17. Matthews, B.K., Dean, P.M.: Electrical activity in pancreatic islet cells. Symposium on "The structure and Metabolism of the pancreatic islets". Umea, Sweden, 17-19 February 1969, (in press).
 18. Sussman, K.E., Vaughan, G.D., Timmer, R.F.: An in vitro method for studying insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas. Metabolism **15**, 466-476 (1966).

Prof. A. Loubatières
Faculté de Médecine
Institut de Biologie
Montpellier, France