

Surrénale et insuliniémie chez le rat

I. Médullosurrénale et insuline sérique

B. C. J. SUTTER,

avec l'assistance technique de Melle M. HORRENBERGER*, Melle G. LEROUX** et Mme M. ROTH**

Laboratoire de Physiologie Générale, Faculté des Sciences, rue René-Descartes, Strasbourg et C. N. R. S., Département de Biologie, Centre nucléaire de Strasbourg-Cronembourg

Reçu le 13 Novembre 1967

Adrenals and insulinemia in the rat. I. Adrenal medulla and serum insulin

Summary. "Total", "non-suppressible" and "suppressible" serum insulin-like activities in normal rats, in adrenalectomized rats treated with corticosteroids and in rats with demedullated adrenals were measured using the rat diaphragm "in vitro" and the immunoreactive insulin determined by a radio-immunological procedure. — The three forms of insulin-like activities were higher in the demedullated than in the normal rat. In contrast, the levels of immunoreactive insulin were identical in the two groups of animals. These results can be explained by the fact that epinephrine is an inhibitor (and not an antagonist) of insulin action on muscle and adipose tissue. — The influence of the basal serum glucose level on insulin secretion was seen in the normal rat, by a linear relationship between the serum glucose levels and the serum insulin concentrations. In the absence of the adrenal medulla, the slopes corresponding to the three forms of insulin-like activities measured by the rat diaphragm were increased. However, this phenomenon was not related to an influence of epinephrine on insulin secretion: "in vitro" experiments showed that the inhibitory effect of physiological doses of epinephrine was greater when the concentration of insulin in the medium was elevated, which explains the observations made "in vivo". — The serum response "in vivo" to glucose loads, and the insulin secretion "in vitro" into a medium or into sera taken from adrenalectomized rats and brought to a glucose concentration of 1 or 7.5 mg/ml, have not led to the demonstration of an influence of basal concentrations of endogenous epinephrine on the pancreatic secretion of insulin.

Résumé. L'insuline «totale», l'insuline «non supprimable» et l'insuline «supprimable», dosées par la méthode du diaphragme de Rat, ainsi que l'insuline immunoréactive, ont été mesurées dans le sérum de rats normaux, de rats surrénalectomisés traités par des hormones corticosurrénales et de rats à surrénale énucléée. — Les différentes formes d'activité insulinique sont plus élevées chez le Rat médulloprive que chez le Rat normal. L'insuline immunoréactive est, par contre, identique dans les deux groupes d'animaux. Ceci s'explique par le fait déjà démontré que l'adrénaline est un inhibiteur (et non un antagoniste) de l'effet de l'insuline sur le muscle et le tissu adipeux. — L'influence du niveau glycémique sur la sé-

crétion pancréatique se traduit, chez le Rat normal, par une relation linéaire entre la glycémie et l'insuliniémie. En l'absence de la médullosurrénale, les pentes des droites correspondant aux trois formes d'insuline mesurées par la méthode du diaphragme sont augmentées. Il ne s'agit cependant pas d'un effet de l'adrénaline sur la sécrétion insulinique mais de l'absence de l'effet inhibiteur de l'adrénaline dans le sérum des rats médulloprives, comme l'ont montré des expériences «in vitro». — Les réponses pancréatiques à des surcharges en glucose et la sécrétion d'insuline «in vitro» dans du tampon ou du sérum de rats surrénalectomisés glucosés à 1 mg ou 7.5 mg/ml, n'ont pas permis de mettre en évidence une influence de l'adrénaline endogène sur la sécrétion d'insuline par le pancréas.

Nebenniere und Insulinämie bei der Ratte. I. Nebennierenmark und Seruminsulin

Zusammenfassung. Die „totale“, die „nicht hemmbare“ und die „hemmbare“ Insulinaktivität wurde im Rattenserum mit der Zwerchfellmethode gemessen, ferner das immunoreaktive Insulin (IRI). Die Bestimmungen wurden bei normalen Ratten, bei nebennierenlosen Tieren, mit oder ohne Nebennierenrindenhormonenbehandlung und bei Ratten ohne Nebennierenmark vorgenommen. — Nach Nebennierenmarkexstirpation ist die Insulinaktivität des Serums größer als zuvor, doch das IRI bleibt unverändert. Diese Differenz ist dem Adrenalin, das ein Inhibitor des Insulins ist und dessen Effekt auf die Glucoseaufnahme des Zwerchfells und des Fettgewebes verringert, zuzuschreiben. — Bei den normalen Tieren besteht eine lineare Beziehung zwischen der Glykämie und dem Insulingehalt des Serums. Wenn kein Nebennierenmark mehr vorhanden ist, ist die Neigung der Geraden stärker, gleich um welche der Insulinaktivitäten es sich auch handelt. Dies ist nicht einer Wirkung des Adrenalins auf die Insulinsekretion, vielmehr der Abwesenheit des inhibitorischen Effektes dieses Hormons bei den nebennierenmarklosen Ratten, wie es die „in vitro“ Experimente zeigen, zuzuschreiben. — Ein Einfluß des endogenen Adrenalins auf die Insulinsekretion bei Tieren, die keinem Stress unterworfen waren, konnte nicht bewiesen werden, obwohl das Verhalten unter Glucosebelastung und die „in vitro“ Insulinsekretion überprüft wurden.

Key-words: Adrenal medulla, adrenaline, serum insulin.

L'intervention de la médullosurrénale dans le métabolisme glucidique est surtout connue par l'action glycogénolytique de l'adrénaline, qui entraîne une hyperglycémie; son effet sur l'insuliniémie a été peu étudié. Cependant, on peut observer fréquemment un

diabète sucré chez des sujets humains atteints de phéochromocytome, tumeur chromaffine sécrétant des quantités considérables d'adrénaline et de noradrénaline. En outre, LOUBATIÈRES et coll. ont montré, chez le Chien (1964a et b) et chez le Rat (1965) qu'une perfusion d'adrénaline dans le sang artériel pancréatique détermine des lésions profondes des îlots de Langer-

* D. R. M. E.

** C. N. R. S.

hans, pouvant être à l'origine d'un diabète sucré passager. Par ailleurs, des perfusions d'adrénaline bloquent la sécrétion insulínique chez l'Homme (WILLIAMS et ENSINCK, 1966). Enfin, les travaux de GROEN et coll. (1958) permettent de penser que l'adrénaline pourrait compter parmi les nombreuses substances sériques capables d'interférer avec l'action de l'insuline sur les tissus bien que les résultats de ces auteurs aient été obtenus avec des concentrations très élevées d'adrénaline.

Nous avons donc cherché à préciser les relations de la médullosurrénale, dans les conditions physiologiques, avec l'insuline sérique chez le Rat, dosée par la méthode du diaphragme et par la technique immunologique de HALE et RANDLE. Après avoir mesuré l'insulínémie chez le Rat normal, chez le Rat surrénalectomisé traité aux corticostéroïdes, et chez le Rat à surrénale greffée ou énucléée, nous avons étudié l'effet de la médullosurrénale sur la réponse pancréatique aux variations du glucose sanguin, et, enfin, celui de cette glande sur la sécrétion insulínique «*in vitro*».

Matériel et méthodes

Tous les animaux sont à jeun depuis 18 à 24 h au moment de leur utilisation.

Les techniques de dosage de la corticostérone et de l'adrénaline, et les conditions de prise de sang ont été décrites antérieurement (MIALHE et coll., 1965), ainsi que les conditions d'élevage des animaux et les méthodes de dosage du glucose et de l'insuline sériques (SUTTER, 1968 a). L'énucléation de la surrénale est faite d'après la technique de KOCH et coll. (1963). Les surcharges en glucose sont faites par voie intrapéritonéale chez l'animal éveillé. On injecte 0.8 ml par 100 g de poids corporel d'une solution de glucose à 15%. Les rats témoins reçoivent un volume équivalent de ClNa 9⁰/₀₀. Les prises de sang sont faites par décapitation 6, 12 ou 18 min après l'injection.

Dans les expériences de sécrétion pancréatique «*in vitro*» les fragments de pancréas sont prélevés sur des rats mâles d'environ 250 g. Les canaux pancréatiques issus de la région splénique ont été ligaturés quatre semaines auparavant, ce qui provoque la dégénérescence des acini exocrines et supprime les risques de destruction, par les enzymes protéolytiques, de l'insuline libérée par les fragments de pancréas (MIALHE et MEYER, 1961). Ces derniers sont incubés dans du tampon de GEY et GEY (1936) gélatiné à 1⁰/₀₀, ou dans du sérum de rats surrénalectomisés. Les milieux d'incubation des pancréas ont été ajustés à 1 ou 7.5 mg de glucose par ml. La première de ces concentrations en glucose est très proche de celle que l'on mesure dans le sérum du Rat à jeun, la deuxième accroît sensiblement la sécrétion pancréatique (MIALHE et MEYER, 1961). Les pancréas ligaturés sont coupés en petits fragments de 2 à 3 mg et incubés dans un appareil de Warburg à 37°C. L'insuline sécrétée en 6 h par 150 mg de

pancréas dans 25 ml de milieu, a été estimée par la méthode du diaphragme; l'insuline immunoréactive est dosée après incubation d'1 h de 10 mg de tissu pancréatique dans 1 ml de sérum. Dans le premier cas, on préincube les pancréas dans du tampon sans glucose pendant 30 min, dans le deuxième, pendant 1 h. Les milieux sont équilibrés avec un mélange gazeux de 5% de gaz carbonique et 95% d'oxygène pendant 5 min. avant la préincubation et avant l'incubation. Si celle-ci dure 6 h on équilibre à nouveau les milieux avec le mélange gazeux après les 3 premières heures d'incubation. Pour le dosage de l'insuline par la méthode du diaphragme, les concentrations en glucose des milieux dans lesquels ont incubé les pancréas sont ajustées à 2.5 mg/ml par addition de glucose anhydre ou de tampon sans glucose. Pour ramener les concentrations en glucose des sérums hyperglycémiques à 2.5 mg de glucose/ml, ceux-ci sont dialysés contre du tampon sans glucose.

Quand un calcul statistique a été possible, les moyennes sont données accompagnées des limites de confiance à 95%; certains calculs ont été faits au Centre de Calcul de l'Université de Strasbourg (MIALHE et coll., 1965).

Résultats

1. Insulínémie de base et médullosurrénale

Nous avons comparé à des rats normaux des animaux porteurs d'une surrénale énucléée. Les mesures ont porté sur les concentrations sériques du glucose, de la corticostérone et de l'adrénaline, sur l'insulínémie «totale» (IT), l'insuline «supprimable» (IS) et l'insuline «non supprimable» (INS) mesurées par la méthode du diaphragme, et, enfin, sur l'insuline immunoréactive (IRI) du sérum.

A. Taux du glucose, de la corticostérone et de l'adrénaline du sérum

L'énucléation de la surrénale ne change pas les glycémies dont les valeurs moyennes sont égales à celles observées chez le Rat normal (Tableau 1).

Le sérum du Rat normal contient en moyenne, dans nos conditions expérimentales, environ 36 µg/100 ml (31—41) de corticostérone. Si on laisse la surrénale régénérer pendant 4 semaines, le taux de corticostérone du sérum n'est que 50% de la valeur normale (KOCH et coll., 1962 et 1963; MIALHE et coll., 1965). Cependant, 8 semaines après l'énucléation de la surrénale, le taux de corticostérone sérique est 30 µg/100 ml (24—36), valeur analogue à celle du Rat normal. Les valeurs élevées que nous observons pourraient provenir de l'agression due au transport et à la manipulation de nos animaux avant la prise de sang. En effet, le niveau de base de la corticostérone sérique n'est que de quelques µg/100 ml chez les rats de notre laboratoire quand ils sont isolés et laissés dans la salle d'élevage.

L'énucléation de la surrénale abaisse fortement l'adrénalinémie (0.027 à 0.010 $\mu\text{g/ml}$) qui est environ 0.150 $\mu\text{g/ml}$ de sérum chez le Rat normal (Tableau 1). STUFFEL et ROFFI (1960) ont mesuré des quantités d'adrénaline plus faibles dans le plasma du Rat normal. Les valeurs importantes de l'adrénalinémie sont sans doute également dues aux conditions de prise de sang. L'adrénaline qui subsiste dans le sérum des rats à surrénale énucléée, provient vraisemblablement des terminaisons sympathiques, car les surrénales énucléées ne contiennent plus d'adrénaline: 17 $\mu\text{g/g}$ (— 35—69) contre 722 $\mu\text{g/g}$ (643—801) chez des rats normaux, pour des dosages faits au laboratoire, et moins de 2 $\mu\text{g/g}$ de surrénale énucléée contre 303 $\mu\text{g/g}$ (239—367) de surrénale normale, pour des dosages faits par M. J. ROFFI¹.

conditions seule la corticosurrénale régénère; il ne subsiste que des traces d'adrénaline (cf. § A).

Si l'on utilise les animaux 4 semaines après l'opération, l'insulínémie «totale» du sérum dilué au $1/10$ est beaucoup plus élevée chez les rats témoins, pour des concentrations en glucose équivalentes. Cependant, les taux de corticostérone du sérum des animaux opérés sont inférieurs à ceux des rats témoins normaux (MIALHE et coll., 1965). Ceci provient, sans doute, de la régénération incomplète de la corticosurrénale 4 semaines après l'intervention. C'est pourquoi, dans une deuxième série d'expériences, nous avons laissé la corticosurrénale régénérer pendant 8 semaines. Dans ces conditions, les concentrations de la corticostérone (BROGI et PELLEGRINO, 1959) et du glucose sériques sont les mêmes que chez le Rat normal. L'adrénaliné-

Tableau 1. Insulínémie «totale» (IT), insuline «non supprimable» (INS), insuline «supprimable» (IS) et insuline «immunoréactive» (IRI) chez le Rat normal et chez le Rat à surrénale énucléée. Dans chaque case les moyennes sont inscrites sur la 1ère ligne, les limites de confiance 95% sur la 2ème, le nombre total de valeurs sur la 3ème

Rats	Concentration du sérum en			Insulínémie du sérum en $\mu\text{U/ml}$			
	glucose mg/ml	corticosté- rone $\mu\text{g}/100\text{ ml}$	adrénaline $\mu\text{g/ml}$	Dilutions	1/1	1/4	1/16
normaux	1.05	36	0.147	IT	160	1938	6838
					112 — 229	1397 — 2690	5721 — 8172
					54	54	54
	1.05	36	0.147	INS	98	1215	3132
					59 — 164	833 — 1771	2331 — 4208
					54	54	54
1.05	36	0.147	IS	62	723	3706	
				IRI	51		
					41 — 61		
33							
à surrénale énucléée	1.02	32	0.010	IT	766	3101	11 325
					671 — 875	2713 — 3545	9421 — 13614
					69	69	69
	1.02	32	0.010	INS	512	2704	7382
					411 — 638	1974 — 3702	5409 — 10073
					69	69	69
1.09	28	0.010	IS	254	397	3943	
				IRI	53		
					45 — 61		
28							

B. Insulínémie des rats médulloprives

Nous avons montré ailleurs que l'administration d'hydrocortisone ou de corticostérone relève l'IT du Rat surrénalectomisé (SUTTER 1968 b).

a. *Enucléation de la surrénale.* Afin de réaliser nos expériences dans des conditions plus physiologiques, nous avons respecté la source endogène des corticostéroïdes grâce à l'énucléation de la surrénale. Dans ces

conditions, l'insulínémie, par contre, n'est plus que $1/5$ de sa valeur normale. L'IT, l'INS et l'IS du sérum entier sont, là encore, plus élevés chez les animaux à surrénale énucléée que chez les rats témoins. Enfin, le Rat normal et le Rat à surrénale énucléée ont des taux d'insuline immunoréactive identiques (Tableau 1).

b. *Insuline «supprimable» et insuline «non supprimable» du sérum chez le Rat normal et chez le Rat porteur d'une surrénale énucléée: effet de la dilution du sérum.* Dans le sérum entier et dans le sérum dilué au $1/4$ et au

¹ Laboratoire de Physiologie Comparée, Faculté des Sciences, Paris.

$1/16$ nous avons pu mettre en évidence de l'insuline «supprimable» chez les rats témoins, ainsi que dans le sérum entier et le sérum dilué au $1/16$ du Rat à surrénale énucléée (Tableau 1). Le sérum dilué au $1/4$ des rats médulloprives représente une exception curieuse. L'IS représente entre 30 à 50% de l'IT.

La dilution du sérum provoque l'augmentation de l'IT, de l'IS et de l'INS dans les deux groupes d'animaux. Cependant, l'effet est de deux à quatre fois plus faible chez le Rat à surrénale énucléée que chez l'animal normal, suivant que le sérum est dilué ou non (Tableau 1; Fig. 1).

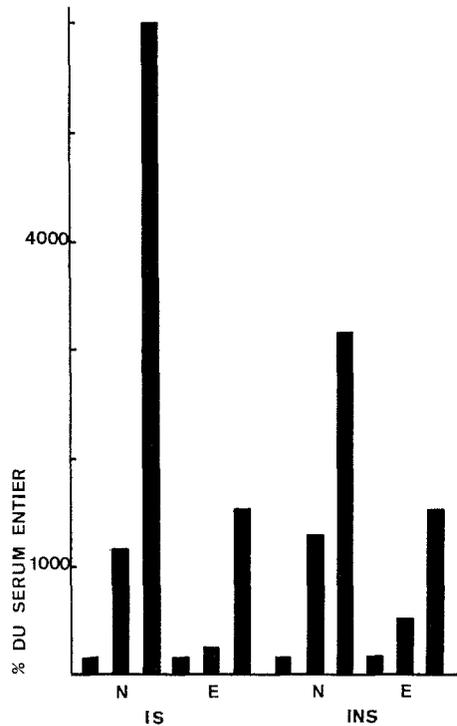


Fig. 1. Effet de la dilution du sérum sur les concentrations de l'insuline «supprimable» (IS) et de l'insuline «non supprimable» (INS) chez le Rat normal (N) et chez le Rat à surrénale énucléée (E). — Les résultats sont exprimés en % de l'insulinémie du sérum entier. Pour chaque forme d'insuline les trois colonnes qui se suivent représentent respectivement les concentrations de cette hormone dans le sérum entier, le sérum dilué au $1/4$ et au $1/16$

De l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que, dans les conditions de base, l'absence de la médullo-surrénale entraîne une élévation des différentes formes d'insuline mesurables par la méthode du dia-phragme.

Nous avons recherché antérieurement le mode d'action de l'adrénaline, que nous rappellerons brièvement ci-dessous.

C. Effet inhibiteur de l'adrénaline

L'adrénaline ajoutée à du sérum entier ou dilué de Rat normal diminue l'insulinémie «totale» (MIALHE et coll., 1965).

Par ailleurs, en l'absence d'insuline, l'adrénaline n'a aucun effet sur la consommation en glucose du muscle (MIALHE et coll., 1965; SUTTER et coll., 1966a). Par contre, quand on ajoute à du milieu tampon contenant de l'insuline, différentes doses d'adrénaline, chacune inhibe une partie importante de l'insuline présente

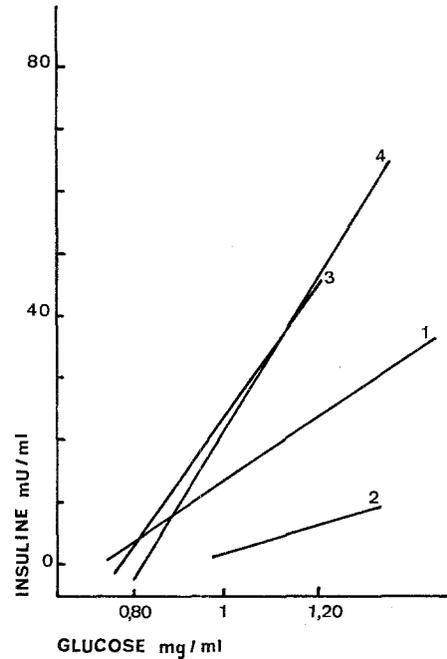


Fig. 2. Relation linéaire entre la concentration en glucose et l'insulinémie «totale» chez le Rat normal (1), le Rat surrénalectomisé traité à l'hydrocortisone (2) ou à la corticostérone (3), et chez le Rat à surrénale énucléée (4)

Données relatives aux droites de régression

Courbe n°	1	2	3	4
Pente de la courbe	48	20	98	106
Limites de confiance	38 - 57	6 - 34	57 - 139	71 - 141
Nombre de valeurs	18	10	18	24
F	111.96 ^b	9.68 ^a	25.75 ^b	39.82 ^b
Index de précision (λ)	0.094	0.320	0.199	0.158
Coefficient de corrélation (r)	0.93	0.73	0.78	0.80

^a Significatif au seuil de 5%

^b Significatif au seuil de 1%

Chaque valeur correspond à un mélange de sérums de 8 à 12 animaux.

(MIALHE et coll., 1965). L'adrénaline est donc un inhibiteur et non un antagoniste de l'insuline.

Nous avons recherché si cet effet inhibiteur était capable de modifier la relation entre l'insulinémie et le niveau glycémique.

2. Relation insulinémie-glycémie et médullosurrénale

A. Relation entre la concentration en glucose et l'insulinémie «totale» du sérum chez le Rat normal, le Rat surrénalectomisé traité à la corticostérone et chez le Rat à surrénale énucléée

Les concentrations en glucose sérique des animaux des 4 groupes sont comprises entre 0.71 et 1.46 mg/ml. L'insulinémie «totale» du sérum dilué au $1/10$ est une

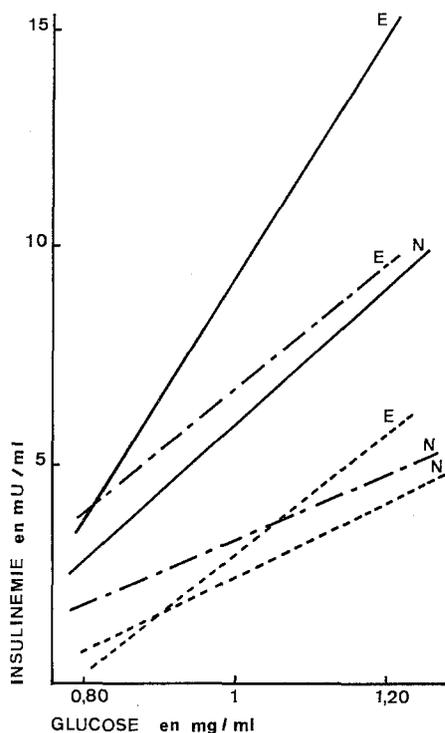


Fig. 3. Relations linéaires entre la concentration en glucose et les trois formes d'insuline du sérum, chez le Rat normal (N) et chez le Rat à surrénale énucléée (E)

IT = insulinémie totale (trait plein)
INS = insuline «non supprimable» (traits et points)
IS = insuline «supprimable» (pointillé)

Données relatives aux courbes

Insuline	IT		INS		IS	
	N	E	N	E	N	E
Courbe						
Pente de la courbe	13	30	5	14	8	16
Limites de Confiance	7 - 19	20 - 40	2 - 10	5 - 22	4 - 11	12 - 20
Nombre de valeurs	21	20	21	20	21	20
Nombre de rats	63	60	63	60	63	60
F	23.41 ^b	39.53 ^b	4.66 ^a	10.96 ^b	22.7 ^b	56.30 ^a
Index de précision (λ)	0.207	0.159	0.462	0.302	0.209	0.130
Coefficient de corrélation (r)	0.74	0.82	0.44	0.61	0.73	0.87

^a Significatif au seuil de 5%

^b Significatif au seuil de 1%

fonction linéaire de la concentration du glucose sérique chez le Rat normal, le Rat surrénalectomisé traité à la corticostérone (5 mg/kg/jour en 2 injections journa-

lières pendant 6 jours) et chez le Rat à surrénale énucléée (Fig. 2). La pente de la droite est significativement plus élevée pour les rats surrénalectomisés traités à la corticostérone et pour les rats à surrénale énucléée que pour les rats normaux. Pour étendre ces observations à la relation entre les différentes formes d'insuline et la glycémie nous avons choisi un des groupes d'animaux médulloprives, celui des rats à surrénale énucléée, pour le comparer aux rats normaux.

B. Relation entre la concentration du glucose sérique et les trois formes d'insuline du sérum (IT, INS et IS) chez le Rat normal et le Rat à surrénale énucléée

L'insuline sérique a été estimée par la méthode du diaphragme dans un sérum dilué au $1/16$. Les standards d'insuline ont été préparés avec du tampon gélatiné à 1^o/₁₀₀, ce qui explique que les concentrations en insuline sont plus faibles que celles qui ont été citées dans le § A où les standards étaient préparés avec du tampon sans gélatine.

Les concentrations en glucose des sérums sont comprises entre 0.77 et 1.27 mg/ml. La droite de régression représentant la relation qui existe entre la glycémie et l'IT du sérum a une pente significativement plus forte chez le Rat à surrénale énucléée, que celle qui a été calculée pour le groupe des rats normaux (Fig. 3).

Entre la glycémie et l'INS, il existe une relation linéaire dans le groupe des animaux normaux et dans celui des rats à surrénale énucléée. Néanmoins les pentes de ces deux groupes de rats ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre (Fig. 3).

Enfin, le taux de l'IS s'accroît linéairement en fonction de la concentration en glucose du sérum chez

le Rat normal, mais la pente de la droite est inférieure à celle qui a été observée chez le Rat à surrénale énucléée (Fig. 3).

Ces résultats peuvent être expliqués par deux hypothèses: l'adrénaline médullosurrénalienne inhibe la sécrétion pancréatique ou bien il s'agit simplement d'un effet «*in vitro*» de l'adrénaline qui pourrait inhiber d'autant plus d'insuline que celle-ci est plus concentrée. Ceci nous a amené à l'expérience suivante.

C. Inhibition «in vitro» par l'adrénaline de doses variables d'insuline.

Lorsqu'on incube des diaphragmes de Rat en présence de différentes doses d'insuline, il existe une relation linéaire entre les logarithmes des doses d'insuline

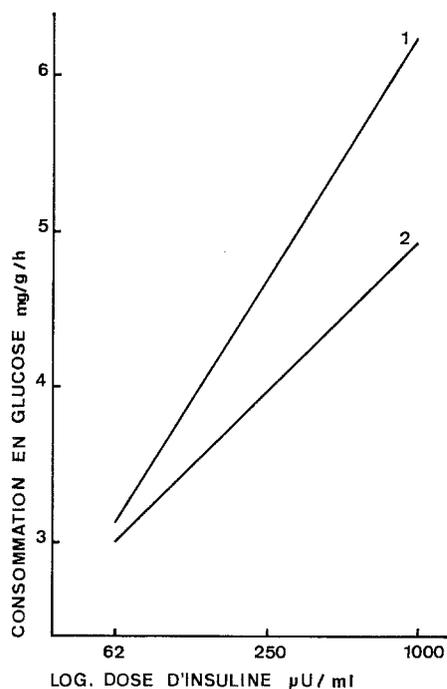


Fig. 4. Effet de 0.1 μ /ml d'adrénaline sur la relation linéaire entre les logarithmes des doses d'insuline et la consommation en glucose du diaphragme. La présence d'adrénaline (droite 2) abaisse la pente de la fonction linéaire (droite 1)

Courbe n°	1	2
Pente de la courbe	2.57	1.54
Limites de confiance	2.06 - 3.08	1.07 - 2.01
Nombre de valeurs	48	48
F	102	44
Index de précision (λ)	0.099	0.155
Coefficient de corrélation (r)	0.98	0.97

et les consommations en glucose des muscles incubés (Fig. 4) (SUTTER et MIALHE, 1966). La pente de la droite est comprise entre 2.06 et 3.08. Après addition à chacune des doses d'insuline de 0.1 μ g/ml d'adrénaline, la relation reste linéaire, mais la pente diminue et est

comprise entre 1.07 et 2.01. Les résultats du paragraphe précédent s'expliquent donc simplement par un effet «*in vitro*» de l'adrénaline.

Un dernier problème se posait: l'adrénaline modifie-t-elle la réponse à une surcharge en glucose?

D. Glycémie et insuline immunoréactive du sérum après une surcharge intrapéritonéale en glucose chez le Rat normal et le Rat porteur d'une surrénale énucléée

Les courbes des concentrations en glucose du sérum sont identiques dans les deux groupes d'animaux étudiés. Les concentrations sériques de l'insuline immunoréactive varient également dans le même sens. Néanmoins, le Rat normal nécessite, pour corriger l'hyperglycémie consécutive à l'administration de glucose, une quantité d'insuline circulante un peu supérieure à celle qu'on observe chez le Rat à surrénale énucléée (Fig. 5).

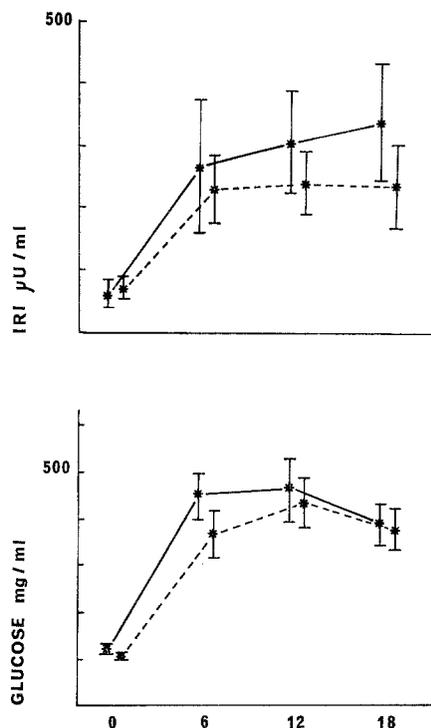


Fig. 5. Variation des concentrations de l'insuline immunoréactive (IRI) et du glucose sériques au cours d'une surcharge intrapéritonéale en glucose, chez le Rat normal (trait plein) et chez le Rat à surrénale énucléée (pointillé). Le temps est exprimé en minutes

Par conséquent, «*in vitro*», l'adrénaline de la médullosurrénale diminue l'effet des différentes formes d'activité insulïnique du sérum par son action inhibitrice, mais elle ne modifie pas la concentration de l'insuline immunoréactive mesurée «*in vivo*» après injection de glucose. Il ne semble donc pas y avoir d'effet de l'adrénaline sur la sécrétion pancréatique, ce que l'on pouvait vérifier par des expériences de sécrétion pancréatique «*in vitro*».

3. Insuline sécrétée «in vitro» par des fragments de pancréas prélevés chez des rats normaux et chez des rats à surrénale énucléée

A. Méthode du diaphragme de Rat

a. Incubation des pancréas dans du tampon. Quand la concentration en glucose du milieu tampon est 1 mg/ml la quantité d'IS sécrétée par les fragments de pancréas est la même pour les deux groupes d'animaux ; il n'y a pas d'INS de sécrétée (Tableau 2).

Dans les deux groupes d'animaux, on peut mettre en évidence plus d'insuline sécrétée dans le sérum dilué que dans le sérum entier (Tableau 2). Cette insuline est entièrement inhibée par un sérum anti-insuline.

c. Insuline immunoréactive sécrétée, «in vitro», dans du sérum de rats surrénalectomisés. Les quantités d'insuline immunoréactive sécrétées par les fragments de pancréas sont identiques pour les deux groupes d'animaux ;

Tableau 2. Sécrétion pancréatique «in vitro». L'estimation de l'insuline sécrétée est faite par la méthode du diaphragme. 150 mg de pancréas, découpés en fragments de 2 à 3 mg, incubent pendant 6 h dans 25 ml de tampon ou de sérum de rats surrénalectomisés. Les concentrations d'insuline sont exprimées en $\mu U/ml$

Origine des pancréas	Forme de l'activité insulïnique	Milieu d'incubation				Dilution du sérum au moment du dosage
		Tampon glucosé		Sérum glucosé		
		à 1 mg/ml	7.5 mg/ml	1 mg/ml	7.5 mg/ml	
Rats normaux	IS	807	2903	452	369	1/1
	INS	0	596	0	261	
	IS			2929		1/4
	INS			0		
Rats à surrénale énucléée	IS	788	882	644	513	1/1
	INS	0	935	0	375	
	IS			2048		1/4
	INS			0		

Pour une concentration très élevée en glucose du tampon (7.5 mg/ml), la sécrétion d'IS est augmentée si les fragments de pancréas ont été prélevés sur les animaux normaux ; il n'en est pas de même s'ils proviennent de rats à surrénale énucléée ; dans les deux cas cependant cette sécrétion est accompagnée de celle d'INS, ce qui augmente la totalité de l'insuline sécrétée par le pancréas de Rat à surrénale énucléée (Tableau 2).

b. Incubation des pancréas dans du sérum entier de rats surrénalectomisés. Le sérum de Rat a été adopté pour incubé les pancréas dans des conditions plus physiologiques que celles que fournit le tampon. Nous avons utilisé du sérum de rats surrénalectomisés parce que l'adrénaline du sérum du Rat normal interfère dans le dosage biologique de l'insuline par son action inhibitrice (cf. § 2 C).

Pour une concentration en glucose du sérum de 1 mg/ml, les pancréas ne sécrètent, comme dans du tampon, que de l'IS. Les pancréas de rats porteurs d'une surrénale énucléée sécrètent un peu plus d'insuline que ceux provenant de rats normaux (Tableau 2).

Si le sérum d'incubation contient 7.5 mg de glucose par ml, les quantités d'IS sécrétées ne sont pas augmentées, mais elles sont accompagnées d'une sécrétion d'INS. La quantité totale d'insuline sécrétée augmente donc si la concentration en glucose du milieu d'incubation est élevée (Tableau 2).

Tableau 3. Sécrétion pancréatique «in vitro». Quatre fragments de pancréas pesant chacun 2.5 mg, incubent dans 1 ml de sérum de rats surrénalectomisés. L'insuline sécrétée, dosée par la méthode immunologique, est exprimée en % de la sécrétion des pancréas de rats normaux incubant à 1 mg/ml de glucose. Le taux de l'insuline sécrétée est porté sur la 1ère ligne, les limites de confiance à 95% sur la 2ème et le nombre de valeurs sur la 3ème

Origine des pancréas	Concentration en glucose du sérum d'incubation	
	1 mg/ml	7.5 mg/ml
Rats normaux	100	212
	(85 -- 115)	(170 -- 254)
	12	9
Rats à surrénale énucléée	90	206
	(73 -- 107)	(155 -- 257)
	14	13

elles sont doublées si les concentrations en glucose sont élevées (Tableau 3).

Les pancréas d'animaux déméduillés semblent donc sécréter autant d'insuline «in vitro» que les pancréas des rats normaux.

Discussion

Il convient tout d'abord de rappeler ce que mesurent les différentes méthodes de dosage de l'insuline. Nous avons montré antérieurement que les renseigne-

ments donnés par une méthode immunologique sur l'insuline du sérum chez le Rat, pouvaient être avantageusement complétés par ceux que fournit la méthode du diaphragme de Rat. En effet, cette technique mesure deux formes d'insuline du sérum, d'origine pancréatique directe ou indirecte, l'insuline «supprimable» et l'insuline «non supprimable» (SUTTER et MIALHE, 1967; SUTTER, 1968a). Il était donc intéressant d'étudier l'influence de la médullosurrénale sur ces deux formes d'insuline du sérum. La méthode du tissu adipeux semble, au contraire, peu spécifique (SUTTER et MIALHE, 1967; SUTTER, 1968a) et convient plutôt à des expériences «*in vitro*», aussi l'avions-nous utilisée, en même temps que la méthode du diaphragme, pour mesurer l'insulinémie «apparente» dans des mélanges d'insuline et d'adrénaline (MIALHE et coll., 1965).

1. En l'absence de médullosurrénale, l'IT, l'IS et l'INS sont supérieures à celles que l'on peut mesurer chez le Rat normal, mais les quantités d'insuline immunoréactive sont identiques dans les deux groupes d'animaux. Les hormones médullosurréaliennes circulantes exercent un effet opposé à celui de l'insuline. L'action biologique de cette hormone au niveau des cellules musculaires est donc vraisemblablement masquée en partie par l'adrénaline dans le sérum du Rat normal. Le fait que l'on puisse diminuer l'insulinémie du sérum par des doses physiologiques d'adrénaline appuie cette hypothèse. En outre, le mode d'action de l'adrénaline a été précisé ailleurs (MIALHE et coll., 1965): l'adrénaline seule, à doses physiologiques, n'a que peu d'effet sur le diaphragme ou le tissu adipeux; son action ne s'exerce qu'en présence d'insuline. L'adrénaline n'est donc pas un antagoniste de l'insuline, si nous définissons comme telles les substances qui ont, «*in vitro*», en l'absence d'insuline, une action sur les tissus opposée à celle de cette hormone. Par contre, l'adrénaline apparaît comme un inhibiteur de l'insuline puisqu'elle s'oppose à l'action de cette hormone sur les tissus périphériques comme les muscles ou le tissu adipeux.

Nos résultats soulignent en outre l'intérêt persistant de l'emploi de méthodes biologiques de détermination de l'insulinémie: l'insuline «supprimable» semble être inhibée en partie par l'adrénaline circulante, fait dont les méthodes immunologiques ne pourraient rendre compte que si l'inhibition s'exerçait par une combinaison insuline-inhibiteur, ce qui ne semble pas être le cas pour l'adrénaline.

En ce qui concerne l'effet de la dilution du sérum, on sait que celle-ci fait apparaître de l'insuline dont l'effet est masqué dans le sérum entier (cf. bibliog. in SUTTER, 1964). GROEN et coll. (1958) et WILLEBRANDS et GROEN (1960) avaient émis deux hypothèses: la dilution ferait baisser l'effet de substances antagonistes de l'insuline plus rapidement que celui de cette hormone ou bien, une partie de l'insuline liée aux protéines pourrait être libérée par la dilution. Chez le Rat à surrénale énucléée l'effet de dilution est plus faible que chez le Rat normal. Cette différence pourrait être due à l'inhibition de

l'action de l'insuline du sérum chez le Rat normal. Néanmoins, nous avons montré ailleurs (MIALHE et coll., 1965) que l'effet inhibiteur de l'adrénaline ne rend pas compte à lui seul du phénomène de dilution, puisque de faibles concentrations d'adrénaline inhibent l'insuline sérique. Il semble donc logique, si les autres substances inhibitrices se comportent comme l'adrénaline, de penser qu'une libération d'insuline a également lieu lors de la dilution.

A l'appui de cette hypothèse on peut encore citer les faits suivants. L'insuline sécrétée «*in vitro*» dans du sérum de Rat surrénalectomisé peut vraisemblablement se lier à des protéines du sérum puisque dans du sérum d'incubation dilué on met en évidence plus d'IS sécrétée que dans le sérum entier. En outre, l'IS augmente dans le tampon et non dans le sérum sous l'effet d'une forte concentration en glucose; tout se passe comme si l'excédent de sécrétion dans le sérum s'était transformé en INS.

2. La droite qui exprime la relation entre l'IT, l'INS et l'IS, d'une part, et la concentration en glucose, d'autre part, a une pente plus forte chez le Rat à surrénale énucléée et chez le Rat surrénalectomisé traité à la corticostérone, que celle qui a été calculée pour le groupe des rats normaux. Ceci peut être dû à une action de l'adrénaline, soit sur la sécrétion insulinaire, soit sur les diaphragmes au moment du dosage. Nous avons pu vérifier la seconde hypothèse, puisque l'adrénaline inhibe d'autant plus l'action de l'insuline que la concentration de cette hormone est plus grande. L'adrénaline circulante pourrait servir de système régulateur, qui modérerait l'effet des décharges d'insuline en réponse aux augmentations de glycémie.

Il faut noter par ailleurs que l'INS augmente avec le niveau de la glycémie; l'INS mesurée par la méthode du diaphragme semble correspondre à une substance complètement différente de l'INS mise en évidence par la technique du tissu adipeux, qui, au contraire, diminue chez le Rat normal après injection de glucose (SUTTER et coll., 1966b). En outre, les concentrations du sérum en IS et INS varient toujours dans le même sens (Fig. 3); il se pourrait donc qu'il existe un équilibre entre ces deux formes d'activité insulinaire du sérum. Il reste à préciser les relations exactes entre l'INS mesurée par la méthode du diaphragme et le pancréas, ainsi que la signification physiologique éventuelle de cette forme d'activité insulinaire.

3. L'IRI évolue de la même manière après surcharge en glucose chez le Rat à surrénale énucléée et chez le Rat normal; il semble donc que l'adrénaline ne possède pas, chez le Rat, d'effet inhibiteur de la sécrétion pancréatique. Cette conclusion est confirmée par les expériences d'incubation de pancréas «*in vitro*», où les pancréas provenant de rats à surrénale énucléée ne sécrètent en général pas plus d'insuline que ceux qui ont été prélevés sur des rats normaux. Il y a pourtant une exception: des fragments de pancréas provenant de rats à surrénale énucléée, incubés dans du sérum de rats surrénalectomisés, sécrètent légèrement plus d'insuline que ceux

qui ont été prélevés sur des animaux normaux. Mais, si le dosage de l'insuline est fait par la méthode immunologique, aucune différence n'est visible; il en est de même pour les pancréas incubés dans du tampon. Il n'est donc pas possible de conclure à une action de l'adrénaline endogène sur la sécrétion insulínique chez le Rat, ce qui est en opposition avec les résultats obtenus par MALAISSE et coll. (1967) par addition de doses physiologiques d'adrénaline aux milieux d'incubation de fragments de pancréas de rats normaux «*in vitro*». En outre, des perfusions d'adrénaline provoquent chez le Rat (LOUBATIERES et coll., 1965) et chez le Chien (LOUBATIERES et MARIANI, 1964a et b) des lésions des îlots de Langerhans et des troubles dans la régulation glycémique pouvant aboutir à un diabète sucré. Enfin, l'influence de l'adrénaline sur la sécrétion insulínique pourrait être différente dans d'autres espèces; chez l'Homme, une perfusion d'adrénaline inhibe la sécrétion insulínique (WILLIAMS et ENSINCK, 1966). Mais dans ces cas le taux d'adrénalinémie est important et l'action de l'hormone ne peut se comparer qu'à celles de l'adrénaline dues à des cas pathologiques (phéochromocytomes), comme LOUBATIERES et coll. (1965) l'ont bien souligné, ou dues à l'agression ou à l'exercice musculaire, comme le proposent MALAISSE et coll. (1967).

Conclusion

Dans les conditions de base, l'absence de la médullosurrénale entraîne une élévation des différentes formes d'insuline mesurables par la méthode du diaphragme. L'insuline immunoréactive du sérum n'est pas modifiée.

Ces observations s'expliquent aisément par le fait, déjà démontré, que l'adrénaline est un inhibiteur (et non un antagoniste) de l'insuline au niveau du muscle et du tissu adipeux.

D'autre part, l'adrénaline endogène, à concentrations basales, semble n'exercer, chez le Rat, aucune influence sur la sécrétion d'insuline par le pancréas.

Enfin, dans ces expériences, les hormones corticosurrénaliennes ont été utilisées chez le Rat surrénectomisé pour obtenir des animaux médulloprives. Le problème du rôle de la corticosurrénale dans la sécrétion insulínique n'a pas été abordé et fait l'objet d'une note séparée (SUTTER, 1968b).

Remerciements. Nous adressons nos remerciements les plus vifs à: Mme C. MIALHE-VOLOSS et MM. B. KOCH et A. KAMOUN qui ont effectué les dosages de corticostérone et nous ont montré la technique de dosage de l'adrénaline. — M. J. ROFFI qui a bien voulu faire certains dosages d'adrénaline.

Bibliographie

BROGI, M. P., and C. PELLEGRINO: The secretion of corticosterone by the rat adrenal cortex regenerating after enucleation. *J. Physiol. (Lond.)* **146**, 165—178 (1959).
GEY, G. O., and K. M. GEY: The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. Pre-

- liminary report: cultivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes of methods of cultivation. *Amer. J. Cancer* **27**, 45—76 (1936).
GROEN, J., H. v. d. GELD, R. E. BOLINGER, and A. F. WILLEBRANDS: The anti-insulin effect of epinephrine. Its significance for the determination of serum insulin by the rat diaphragm method. *Diabetes* **7**, 272—277 (1958).
KOCH, B., C. MIALHE et F. STUTINSKY: Dissociation entre excréation et sécrétion de la corticostérone chez le Rat porteur d'une autogreffe surrénalienne. *C.R. Acad. Sci.* **254**, 744—746 (1962).
— — — Dissociation entre synthèse et excréation de la corticostérone: étude de surrénales normales, greffées, énucléées et énervées. *Path. et Biol.* **11**, 296—301 (1963).
LOUBATIERES, A., et M. M. MARIANI: Lésions des îlots de Langerhans et troubles de la régulation glycémique par l'hyperadrénalinémie expérimentale intrapancréatique. *C.R. Acad. Sci.* **259**, 220—222 (1964a).
— — — Caractère du diabète sucré provoqué chez le Chien par la perfusion d'adrénaline dans le sang irriguant le pancréas. *C.R. Acad. Sci.* **259**, 441—443 (1964b).
— — — M. H. HOUAREAU, M. INQUIMBERT et J. TAYLOR: Action nocive de l'adrénaline pour les îlots de Langerhans du Rat. Action protectrice de la dihydroergotamine. *C.R. Soc. Biol.* **159**, 1801—1804 (1965).
MALAISSE, W., F. MALAISSE-LAGAE, P. H. WRIGHT, and J. ASHMORE: Effects of adrenergic and cholinergic agents upon insulin secretion in vitro. *Endocrinology* **80**, 975—978 (1967).
MIALHE, P., et V. MEYER: Sécrétion d'insuline par le pancréas de Rat in vitro. *C.R. Acad. Sci.* **253**, 1861—1863 (1961).
— B. CH. J. SUTTER et V. MEYER: L'adrénaline, inhibiteur de l'insuline sérique chez le Rat. *Diabetologia* **1**, 63—71 (1965).
STUFFEL, M., et J. ROFFI: Dosage fluorométrique de l'adrénaline dans le plasma et la surrénale du Rat. Influence de différents facteurs. *C.R. Soc. Biol.* **154**, 1216—1219 (1960).
SUTTER, B. CH. J.: Surrénales et insuline plasmatique chez le rat à jeun. *Path. Biol.* **12**, 550—557 (1964).
— Signification de l'insuline «supprimable», de l'insuline «non supprimable» et de l'insuline immunoréactive. *Diabetologia* **4**, 295—304 (1968).
— Surrénale et insulínémie chez le Rat. II. Corticosurrénale et insuline sérique. *Diabetologia* **4**, 295—304 (1968b).
— V. MEYER et P. MIALHE: Effets de la corticosurrénale et de la médullosurrénale sur l'insulínémie apparente chez le Rat. Symposium Technicon Européen 2—4 nov. Paris (1966a).
— — — Variations of "suppressible" and "non-suppressible" insulin-like activities (ILA) of the serum after glucose loading in the Rat. *Diabetologia* **2**, 220 (1966b).
—, et P. MIALHE: Inhibition in vitro par l'adrénaline de doses variables d'insuline. *J. Physiol. (Paris)* **58**, 267 (1966).
— — — Comparaison des méthodes de dosage biologique et immunologique de l'insuline sérique chez le Rat. *J. Physiol. (Paris)* **59**, 507—508 (1967).
WILLEBRANDS, A. F., and J. GROEN: Insulin bioassay in vitro using isolated rat diaphragm, in ANTONIADES, H. N.: Hormones in human plasma, p. 60. London: J. and A. Churchill 1960.
WILLIAMS, R. H., and J. W. ENSINCK: Secretion, fates and actions of insulin and related products. *Diabetes* **15**, 623—654 (1966).

BERNARD CH. J. SUTTER
Laboratoire de Physiologie Générale
Rue René-Descartes — Esplanade
F — 67 Strasbourg