UNIVERSITE MONTPELLIER I – UFR DE MEDECINE

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Formation Doctorale: BIOLOGIE-SANTE

soutenue publiquement par Anne Farret le

7 Décembre 2010

EFFETS ET MECANISMES DE L'ACTIVATION DES RECEPTEURS PURINERGIQUES P2Y DE LA CELLULE β PANCREATIQUE

JURY:

Pr Pierre Petit, Professeur, CNRS UMR 5232, Montpellier, Directeur de Thèse

Pr Hélène Hanaire, Professeur, Faculté de Médecine, Toulouse, Rapporteur

Pr Régis Guieu, Professeur, FRE 2738 – BIMC, Marseille, Rapporteur

Dr Anne Lajoix, CNRS UMR 5232, Montpellier, Examinateur

Liste des abréviations:

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ADPβS : adénosine-5'-0-(2-thio-diphosphate)

AMP : adénosine monophosphate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ATP : adénosine triphosphate

ATPαS : adénosine-5'-O-(1-thio-triphosphate)

BrdU : 5-bromo-2'deoxyuridine

BSA : bovin serum albumin

CPID : Centre de Pharmacologie et d'Innovation dans le Diabète - UMR 5232

DMSO : diméthylsulfoxide

DPP-IV : dipeptidyl peptidase 4

GLP-1 : glucagon like peptide-1

IBMX : iso-butyl-méthyl-xanthine

IP_3 : inositol 1,4,5-triphosphate

NO : monoxyde d'azote

PKA/PKC : protéine kinase A et C

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction

SNP : sodium nitroprusside

SVF : sérum de veau foetal

UDP : uridine diphosphate

UMR : Unité Mixte de Recherche

UTP : uridine triphosphate

INDEX

1 Introduction 4
2 Revue bibliographique 10
2.1 Le diabète de type 2 et ses traitements 11
2.1.1 Le diabète de type 2 11
2.1.2 Les différents traitements du diabète de type 2 15
2.1.2.1 Les insulino-stimulants 16
2.1.2.1.1 Les sulfonylurées et apparentés 16
2.1.2.1.2 Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), analogues du GLP-1 et inhibiteurs de la dégradation du GLP-1. 22
2.1.2.1.2.1 Le GLP-1 22
2.1.2.1.2.2 Les agonistes du récepteur GLP-1 23
2.1.2.1.2.2.1 L'exénatide 24
2.1.2.1.2.2.2 Le liraglutide 24
2.1.2.1.2.3 Les inhibiteurs des DPP-IV 25
2.1.2.2 Les insulino-sensibilisateurs 26
2.1.2.2.1 Les biguanides 26
2.1.2.2.2 Les thiazolidinediones 27
2.1.2.3 Les inhibiteurs des α-glucosidases 31
2.1.3 Les thérapeutiques en recherche et développement 31
2.1.3.1 Les autres principaux agonistes des récepteurs GLP-1 en cours de développement (46) 32
2.1.3.2 Les autres inhibiteurs des DPP-IV en cours de développement 34
2.1.3.3 Les agonistes des récepteurs purinergiques 34
2.1.3.4 Les dérivés imidazoliniques 34
2.1.3.5 Les inhibiteurs du transporteur sodium/glucose de type 2 (SGLT2) 35
2.1.3.6 Les activateurs de l'Epac 2 36
2.1.3.7 Les activateurs de la protéine kinase activée par l'AMP 36
2.1.3.8 Les autres voies de développement 37
2.2 Les récepteurs purinergiques 52
2.2.1 Historique et classification 52
2.2.1.1 Généralités 52
2.2.1.2 Classification des récepteurs 54
2.2.2 Le système purinergique de la cellule β pancréatique 57
2.2.2.1 Rôle du système purinergique de la cellule β pancréatique 57
2.2.2.1.1 Synchronisation et rythmicité 57
2.2.2.1.2 Modulation de l'insulino-sécrétion 60
2.2.2.1.2.1 Amplification 60
2.2.2.1.2.2 Inhibition 61
2.2.2.1.3 Prolifération, différentiation et mort cellulaires 63
2.2.2.2 Les récepteurs purinergiques P2 de la cellule β du pancréas 63
2.2.2.2.1 Etudes fonctionnelles des récepteurs P2 64
2.2.2.2.1.1 Les récepteurs P2X 67
2.2.2.2.1.2 Les récepteurs P2Y 68
2.2.2.2.2 Expression des sous types de récepteurs P2 69
2.2.2.2.2.1 Expression des récepteurs purinergiques P2X 69
2.2.2.2.2.2 Expression des récepteurs purinergiques P2Y 72
2.2.2.2.3 Les mécanismes de couplage 75
3 Travaux expérimentaux 80

3.1 Introduction 81
3.2 Modèles expérimentaux 82
3.2.1 Le pancréas isolé perfusé de Rat. 82
3.2.1.1 Animaux 82
3.2.1.2 Technique du pancréas isolé et perfusé 82
3.2.1.3 Technique analytique : dosage de l'insuline 86
3.2.1.4 Protocoles expérimentaux 87
3.2.1.5 Produits utilisés 87
3.2.2 La culture de la lignée cellulaire INS-1E 88
3.2.3 Les îlots isolés de Souris 89
3.3 Résultats des différents travaux 90
3.3.1 Mécanismes de transduction intracellulaire des récepteurs purinergiques pancréatiques 90
3.3.1.1 Méthodologie 91
3.3.1.2 Résultats 92
3.3.2 Recherche de nouveaux agonistes purinergiques 98
3.3.2.1 Introduction 98
3.3.2.2 Méthodologie 99
3.3.2.3 Résultats 100
3.3.3 Effets des agonistes purinergiques sur la prolifération cellulaire 110
3.3.3.1 Introduction 110
3.3.3.2 Méthodologie 111
3.3.3.3 Résultats 114
3.3.4 Implication des récepteurs P2Y1 dans l'insulino-sécrétion 117
3.3.4.1 Méthodologie 117
3.3.4.2 Résultats 117
4 Discussion et perspectives 126
5 Bibliographie 138

1 Introduction

Le diabète de type 2 est une pathologie multifactorielle dont la prévalence augmente régulièrement, parallèlement à celle de l'obésité. D'après l'IDF (International Diabetes Federation), le nombre de cas de diabète de type 2 dans le monde était de 194 millions en 2003 et sera d'après les estimations de 334 millions en 2025, ce qui constitue un grave problème mondial de santé publique (124). Le diabète de type 2 se caractérise par une altération de la sécrétion d'insuline et de l'action de cette hormone sur les tissus extra-pancréatiques. Le pronostic de cette maladie chronique est lié à celui de ses nombreuses complications macrovasculaires et microvasculaires.

Afin d'en diminuer la morbidité et la mortalité, la prise en charge du diabète de type 2 a comme objectif d'obtenir un bon équilibre glycémique : les moyens thérapeutiques sont tout d'abord le respect des règles hygiéno-diététiques (activité physique régulière, régime adapté) mais le plus souvent, une prise en charge médicamenteuse est nécessaire pour obtenir un équilibre glycémique satisfaisant. Il faut d'ailleurs souvent prescrire une association de plusieurs molécules, de mécanismes d'action différents.

Les médicaments actuellement disponibles sont de plusieurs types : les insulino-sensibilisateurs (metformine et thiazolidinediones), les inhibiteurs de l'α-glucosidase (réduisant l'absorption intestinale de glucose) et les insulino-sécrétagogues.

Les insulino-sécrétagogues comprennent les sulfonylurées agissant sur le canal potassique ATP-dépendant de la cellule β pancréatique, ainsi que les glinides,

ayant la même cible cellulaire. Leur principal inconvénient est la survenue d'hypoglycémies potentiellement dangereuses, dues à la capacité insulino-stimulante de ces molécules, même lorsque la glycémie est basse. Plus récemment, s'est développé une nouvelle classe médicamenteuse insulino-sécrétagogue : les incrétinomimétiques comprenant les analogues du GLP-1 et les inhibiteurs des DPP-IV, enzymes de dégradation du GLP-1. Les analogues du GLP-1 sont intéressants puisque leur action gluco-dépendante entraîne moins d'hypoglycémies ; cependant, leur nature peptidique impose une administration parentérale, ce qui reste un inconvénient certain. Enfin, dans la même famille des incrétinomimétiques, on retrouve les inhibiteurs des DPP-IV, cette dernière classe thérapeutique insulino-sécrétrice a des avantages puisque sa voie d'administration est orale mais son efficacité sur l'insulino-sécrétion reste plus modeste.

Ces différentes thérapeutiques sont encore insuffisantes pour obtenir un équilibre optimum et de nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires et les voies de recherche sont nombreuses (56, 61, 226).

Dans ce contexte, le laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Montpellier dirigé par le Pr Petit (CPID, UMR 5232 du CNRS) s'intéresse depuis plusieurs années à de nouvelles cibles pharmacologiques, en particulier les récepteurs purinergiques membranaires P2Y de la cellule β pancréatique. Les travaux menés jusqu'ici ont permis d'étudier ces récepteurs qui ont la capacité

de moduler la sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante, et qui ont donc un intérêt potentiel pour le traitement du diabète de type 2.

J'ai pu lors de mon assistanat dans le service de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Montpellier, collaborer aux travaux de l'équipe de recherche du CPID, mais aussi aux travaux de l'équipe du Centre d'Investigation Clinique (Inserm CIC 0001) de Montpellier.

Dans le travail réalisé au CPID, nous avons tenté de mieux caractériser les mécanismes cellulaires mis en jeu par l'activation des récepteurs P2Y de la cellule β pancréatique, nous avons également évalué l'effet de nouveaux agonistes purinergiques P2Y sur le pancréas de Rat. Nous avons aussi étudié les effets de l'activation des récepteurs purinergiques P2Y sur la prolifération cellulaire β pancréatique ; enfin, nous avons exploré les effets de l'activation des sous types de récepteurs P2Y1 sur la sécrétion insulinique.

Dans le travail réalisé au CIC, nous nous sommes intéressés à la pharmacologie clinique du diabète et avons étudié les effets d'une prise orale unique de rosiglitazone chez des volontaires sains sur la sensibilité à l'insuline, la sécrétion et la clairance de l'insuline.

Notre exposé sera présenté de la façon suivante :

Dans une première partie, un rappel bibliographique rassemblera les principales données concernant :

- le diabète de type 2 et ses traitements, et plus particulièrement les insulino-sécrétagogues actuellement disponibles ou en cours d'étude (chapitre qui a fait l'objet d'une publication dans la revue «**Fundamental and Clinical Pharmacology**» (75) (pages 38 à 47) ; nous montrerons également dans ce chapitre les résultats d'une étude clinique sur la rosiglitazone, qui ont été publiés dans la revue «**Diabetologia**» (73) (pages 48 à 51),

- les récepteurs purinergiques, et plus particulièrement les récepteurs purinergiques P2Y de la cellule β pancréatique.

La seconde partie comprendra les travaux expérimentaux :

Nous étudierons tout d'abord l'implication du canal potassique ATP-dépendant ainsi que celui du métabolisme intracellulaire du glucose dans les mécanismes de transduction des récepteurs purinergiques pancréatiques P2Y dans le modèle du pancréas isolé perfusé de Rat. Ces travaux ont été publiés dans la revue «**Diabetes**» (76) (pages 94 à 97).

Dans un second temps, nous étudierons les effets de nouveaux agonistes purinergiques des récepteurs P2Y synthétisés dans le laboratoire du Pr Ficher (Université de Bar-Ilan en Israël) sur la sécrétion d'insuline et la résistance vasculaire pancréatique dans le modèle du pancréas isolé perfusé de Rat. Ces travaux ont été publiés dans la revue «**Pharmaceutical Research**» (74) (pages 103 à 109).

Puis, les effets de l'activation des récepteurs purinergiques sur l'AMPc intracellulaire et la prolifération des cellules β pancréatiques seront étudiés dans la lignée INS-1E de cellules insulino-sécrétrices provenant d'insulinome de rat.

Nous exposerons également les résultats de travaux menés en collaboration avec le Pr C. Gachet (Strasbourg) sur les effets de l'invalidation des récepteurs P2Y1 sur la sécrétion insulinique chez la souris. Ces travaux ont été publiés dans la revue «**Purinergic signalling**» (152) (pages 119 à 125).

Enfin, la troisième partie sera consacrée à une conclusion générale des travaux réalisés ainsi qu'à l'exposé des grands axes de recherche qu'il conviendra de suivre afin de cerner au mieux les potentialités thérapeutiques des agonistes purinergiques pancréatiques.

2 Revue bibliographique

2.1 Le diabète de type 2 et ses traitements

2.1.1 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique, définie par une hyperglycémie chronique, et caractérisée par des altérations multiples de la sécrétion d'insuline et de son action.

Ce syndrome possède une base multi-génique forte sur laquelle se superposent de nombreux facteurs environnementaux, dont l'obésité, provoquée par une alimentation hypercalorique et déséquilibrée associée à une diminution de l'activité physique. Néanmoins, l'interférence entre inné et acquis dans l'étiopathologie du diabète de type 2 reste mal définie : si plus de 60 % des diabétiques sont obèses, seulement 10 à 20 % des obèses sont diabétiques.

Les modifications récentes du mode de vie dans les pays développés et en voie de développement sont en partie responsable de l'augmentation de la prévalence et de l'incidence du diabète de type 2. D'après les estimations de l'IDF (International Diabetes Federation), le nombre de personnes atteintes dans le monde ne va pas cesser d'augmenter : 194 millions en 2003 et d'après les estimations, 334 millions en 2025, constituant alors un problème de santé majeur à l'échelle de la planète (124). La prévalence du diabète chez les adultes dans le monde était estimée à 4,0% en 1995 et atteindrait 5,4 % en 2025 (140).

La majeure partie de cette augmentation se retrouvera dans les pays en voie de développement (140) : il y aura une augmentation de 42% (de 51 à 72 millions) dans les pays développés et de 170% (de 84 à 228 millions) dans les pays en voie de développement. Ainsi, en 2025, plus de 75% des diabétiques résideront dans les pays en voie de développement, contre 62% en 1995 (140).

La classification actuelle du diabète permet de distinguer 5 types : *le diabète de type 1*, ancien diabète insulino-dépendant, se définissant par une carence sévère en insuline due à la destruction auto-immune massive des cellules β pancréatiques ; *le diabète de type 2*, proche de l'ancien diabète non-insulino-dépendant, se caractérisant par une déficience relative de la sécrétion insulinique associée à une perturbation de l'action de l'insuline sur les tissus cibles (insulino-résistance) ; *les diabètes monogéniques de type MODY* (Maturity Onset Diabetes of the Young) ; *les diabètes gestationnels*, découverts lors d'une grossesse et pouvant évoluer soit vers une rémission, soit vers un diabète de type 2 ; et enfin *les diabètes secondaires à une cause définie*, résultant d'une pathologie ou d'un traitement associés directement responsables de l'hyperglycémie, ils sont majoritairement liés à l'existence de pancréatopathies, d'endocrinopathies responsables d'une hypersécrétion d'hormone hyperglycémiante ou de causes iatrogènes (corticoïdes, interféron…).

De toutes les formes de diabète, le type 2 est de loin le plus fréquent, affectant plus de 80 % des diabétiques.

Nous ne développerons ici que le diabète de type 2.

Les critères diagnostiques du diabète de type 2 ont été redéfinis en 1999 par l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé, afin d'être en accord avec les nouvelles définitions émises par les instances internationales telle que l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (62)

Le diabète sucré est une maladie définie par :

- une glycémie veineuse supérieure ou égale à 1,26 g/l (7 mmol/l) après un jeûne de 8 heures mesurée à 2 reprises, à deux jours différents, en l'absence de situation cliniquement diabétogène (maladie intercurrente, médicaments diabétogènes). Ce seuil de 1,26 g/l correspond au chiffre au-dessus duquel le risque de complications microangiopathiques et macroangiopathiques est significativement augmenté,
- une glycémie aléatoire, autrement dit réalisée à n'importe quel moment de la journée, supérieure ou égale à 2 g/l (11 mmol/l) associée à des symptômes évocateurs de diabète (polyurie, polydipsie, perte de poids inexpliquée, prurit vulvaire chez la femme, balanite chez l'homme, infections récidivantes et traînantes),
- ou une glycémie veineuse supérieure ou égale à 2 g/l, deux heures après l'ingestion de 75 g de glucose au cours d'une hyperglycémie provoquée orale.

La pathogénie du diabète de type 2 résulte de deux altérations majeures.

La première est une altération de la sécrétion de l'insuline liée à une dégradation progressive de la fonction des cellules β pancréatiques, il y a une réduction importante de la masse de cellules β (environ 50 %) et une altération de la capacité de sécrétion des cellules β restantes.

La deuxième altération est l'insulino-résistance, une anomalie des effets de l'insuline sur les tissus cibles (sensibilité altérée des tissus périphériques et du foie à l'action de l'insuline). C'est un état métabolique dans lequel des concentrations physiologiques d'insuline produisent une réponse biologique diminuée. Il se traduit par une baisse de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique de glucose et une baisse de la captation, de l'oxydation et du stockage périphérique du glucose. Cette insulino-résistance entraîne au niveau du pancréas une stimulation accrue de la sécrétion d'insuline.

Ainsi, il est clairement établi que le diabète de type 2 résulte à la fois d'un défaut de la sécrétion d'insuline et d'une plus ou moins grande insulino-résistance des tissus périphériques et du foie. La réserve insulinique endogène est toujours déficitaire en regard du stimulus glycémique correspondant (210). La correction du défaut de sécrétion insulinique est donc primordiale dans le traitement du diabète de type 2.

2.1.2 Les différents traitements du diabète de type 2

Dans le chapitre suivant, nous allons rappeler les différents traitements du diabète de type 2 actuellement disponibles ou en cours de développement, en insistant tout particulièrement sur les insulino-sécrétagogues qui permettent de restaurer, au moins dans un premier temps, la sécrétion insulinique.

Le chapitre sur les insulino-stimulants a fait l'objet d'une publication dans la revue «Fundamental and Clinical Pharmacology» en 2005 : Pharmacological interventions that directly stimulate or modulate insulin secretion from pancreatic β-cell: implications for the treatment of type 2 diabetes (pages 38 à 47)**.**

Ce chapitre a été réactualisé étant donné l'ancienneté de cette publication.

Par ailleurs, dans le cadre de mon assistanat hospitalo-universitaire au CIC (durant les années 2000 à 2005), j'ai été médecin investigateur d'une recherche clinique étudiant les effets d'une prise orale unique de rosiglitazone chez des volontaires sains sur la sensibilité à l'insuline, la sécrétion et la clairance de l'insuline. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue «Diabetologia» en 2007 (pages 48 à 51)**.**

L'étude britannique multicentrique «United Kingdom Prospective Diabetes Study» débutée en 1977, comparant deux groupes de nouveaux diabétiques de type 2 (traitement intensif versus traitement conventionnel) sur un suivi moyen

de 10 ans chez environ 4000 patients, a révélé que l'amélioration de l'équilibre glycémique, quelque soit le moyen thérapeutique utilisé, permettait de diminuer ou de freiner l'évolution des complications micro et macroangiopathiques (238). L'objectif principal du traitement, qui est d'éviter l'hyperglycémie à jeun et post-prandiale, est d'abord obtenu par le suivi de règles hygiéno-diététiques (un régime adapté associé à une activité physique régulière). Quand cela ne suffit plus, l'approche pharmacologique devient nécessaire.

La prise en charge thérapeutique du diabète de type 2 s'appuie actuellement sur seulement trois grandes classes d'antidiabétiques oraux : deux sont des thérapeutiques agissant spécifiquement sur l'un ou l'autre des dysfonctionnements majeurs conduisant au diabète de type 2 : les insulino-sécrétagogues -sulfonylurées et apparentés- mais aussi la nouvelle classe des incrétinomimétiques pour le déficit de la sécrétion d'insuline, les insulino-sensibilisateurs -biguanides et thiazolininediones- pour la résistance à l'action de l'insuline. Les inhibiteurs des α-glucosidases intestinales qui ralentissent l'absorption intestinale du glucose constituent la 3ème classe.

2.1.2.1 Les insulino-stimulants

2.1.2.1.1 Les sulfonylurées et apparentés

Les sulfonylurées et apparentés sont capables de stimuler directement la sécrétion d'insuline déficiente.

Les sulfonylurées peuvent être classées en deux générations : la première comprend l'acétohexamide, le chlorpropamide, le tolbutamide, le carbutamide et le tolazamide ; la deuxième comprend le glipizide, le gliclazide, le glibenclamide ou glyburide, le gliquidone, le glycopyramide et le glimépiride.

La modulation thérapeutique de l'activité du canal potassique ATP-dépendant de la cellule β est utilisée depuis de nombreuses années pour augmenter l'insulino-sécrétion des patients diabétiques de type 2. Le canal potassique ATP-dépendant de la cellule β est un complexe hétéro-octamérique de quatre sous unités (Kir 6.2) formant un pore central et quatre sous unités régulatrices appelées SUR1 (5). L'activité de ce canal est physiologiquement régulée par les concentrations intracellulaires des nucléotides dérivés de l'adénosine, ATP et ADP. SUR1, qui a été identifié dans les cellules β pancréatiques (4), induit l'ouverture du canal par l'intermédiaire du Mg^{2+}-ADP, alors que l'ATP agit directement sur le Kir 6.2 comme un bloqueur de canal.

Mimant l'effet stimulant du glucose, les sulfonylurées stimulent l'insulino-sécrétion en fermant les canaux potassiques ATP-dépendant de la membrane plasmatique de la cellule β ; ils interagissent avec la sous-unité SUR1 de ce canal et diminuent sa probabilité d'ouverture. La dépolarisation de la membrane qui en découle et l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants entraînent une augmentation de la concentration du calcium cytosolique, ce qui permet alors l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline (236).

Malheureusement, ces insulino-stimulants ont l'inconvénient d'entraîner des hypoglycémies (78) ; en bloquant directement les canaux potassiques ATP-dépendants, ils court-circuitent l'étape de métabolisation du glucose et stimulent la sécrétion d'insuline indépendamment du taux de glucose circulant ; de ce fait, le risque majeur de ces médicaments est l'hypoglycémie, potentiellement dangereuse.

Les sulfonylurées sont classées en composés de première et deuxième génération. Les molécules de ces différentes générations ont en commun le groupement sulfonylurée ; ils diffèrent principalement par la puissance de leur effet insulino-stimulant et de leur action antidiabétique. Cependant, il a été montré que le groupement sulfonylurée n'est pas essentiel pour l'activité de ces composés. En conséquence, le **méglitinide, et d'autres dérivés non sulfonylurées** peuvent stimuler l'insulino-sécrétion et ont une action antidiabétique (59). Ces molécules (**les glinides**) agissent sur la même cible cellulaire que les sulfonylurées, à savoir les canaux potassiques ATP dépendants, mais ils interagissent en fait avec des régions différentes du SUR1. Les glinides comprennent le répaglinide, le méglitinide, le natéglinide et le mitiglinide.

Deux motifs de liaison sont impliqués dans l'interaction des sulfonylurées et des glinides avec le SUR1, l'un favorisant le groupement sulfonylurée et l'autre préférant les molécules meglitinide-like ; les médicaments se liant à plus d'un site de liaison ont une interaction particulièrement forte (100). Il y a une relation

entre la réversibilité des composés et le nombre d'interactions potentielles avec SUR1. Les composés avec seulement un groupe actif (qu'il soit sulfonylurée ou non-sulfonylurée) sont rapidement réversibles ; c'est le cas du tolbutamide, de la chlorpropamide, du gliclazide et du méglitinide. A l'inverse, les molécules avec à la fois des groupements sulfonylurées et non-sulfonylurées (comme le glibenclamide et le glimépiride) sont clairement moins réversibles.

Le **répaglinide** est une molécule dérivée de la partie non sulfamide du glibenclamide. Il est développé par le Laboratoire pharmaceutique NovoNordisk, sous le nom commercial français Novonorm®. Le répaglinide apparaît 25 fois plus puissant que le glibenclamide chez le rat (164), mais ses effets hypoglycémiants seraient plus réduits chez l'homme ; son action est plus courte et son effet hypoglycémiant semble plus prononcé sur l'hyperglycémie postprandiale que sur la glycémie à jeun. Le répaglinide améliore l'équilibre glycémique chez les diabétiques de type 2 (52, 129).

Le **R acétohexamide** est un nouveau sulfonylurée d'action rapide et plus courte que le glibenclamide ; ces propriétés pourraient améliorer le contrôle de l'hyperglycémie postprandiale avec un faible risque d'hypoglycémie (212).

Le **natéglinide** (A4166) est dérivé de la phénylalanine, il possède une structure non sulfonylurée et bloque spécifiquement les canaux potassiques ATP-dépendants. Il diffère assez peu du gliclazide dans son action insulino-stimulante mais son effet hypoglycémiant est peut être plus rapide et moins durable (123, 136). Cependant, il inhibe la sécrétion de glucagon du pancréas isolé et perfusé

de Rat, empêchant ainsi une contre-régulation indispensable. Son absorption et sa clairance rapides pourraient néanmoins permettre de réduire les risques d'hypoglycémies. Il est commercialisé par le laboratoire pharmaceutique Novartis.

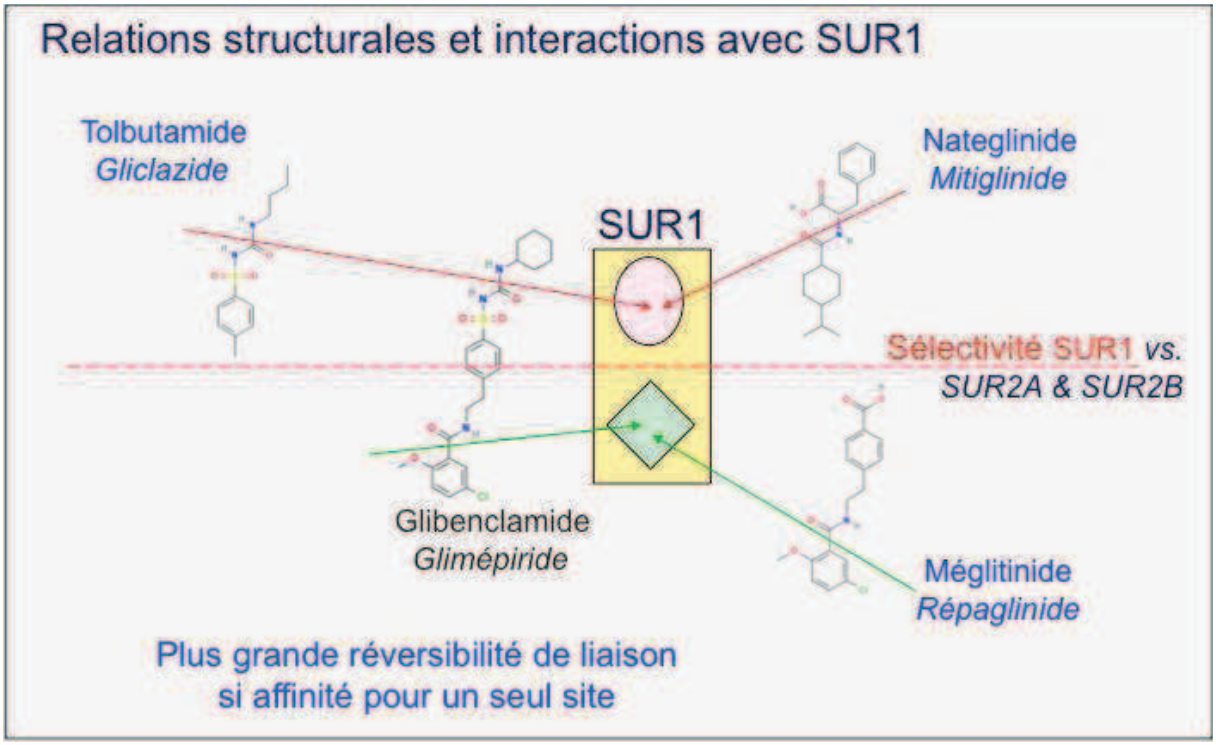
Un autre bloqueur du canal potassique ATP dépendant, développé par le laboratoire Knoll Pharmaceuticals Co, est un composé dérivé de la guanidine (**BTS67582**) (70, 224).

En plus de la cellule β, les canaux potassiques ATP-dépendant sont également présents dans des tissus extra-pancréatiques, en particulier les cellules musculaires cardiaques (exprimant l'isoforme SUR2A) et les cellules musculaires lisses vasculaires (exprimant l'isoforme SUR2B) (254). L'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendant vasculaires a lieu en réponse à certains neurotransmetteurs et à l'hypoxie, et induit une vasodilatation physiologique ; une réponse similaire peut être aussi induite par des ouvreurs des canaux potassiques ATP-dépendant. Dans le tissu cardiaque, l'activation des canaux potassiques ATP-dépendant pourrait constituer une protection contre le stress métabolique de l'hypoxie en raccourcissant le potentiel d'action et en réduisant l'entrée de calcium. On pourrait émettre l'hypothèse que l'ouverture du canal potassique ATP-dépendant de la cellule β pancréatique pourrait apporter un mécanisme protecteur contre le stress métabolique de l'hypoglycémie.

Sur la base de leur sélectivité pour SUR1 ou SUR2, les sulfonylurées et les glinides pourraient être divisés en deux groupes : les molécules relativement

sélectives pour SUR1, comme le **tolbutamide,** le **chlorpropamide,** le **gliclazide,** le **natéglinide** et le **mitiglinide**, et les molécules relativement non sélectives pour SUR1, comme le **glibenclamide**, le **glimépiride**, le **répaglinide** et le **méglitinide** (100).

La possibilité que des bloqueurs non sélectifs des canaux potassiques ATP-dépendant puissent induire des effets secondaires extrapancréatiques dans la pratique clinique est toujours un sujet de controverse. De toute façon, l'UK Prospective Diabetes Study, n'a montré aucune augmentation du risque d'événements vasculaires attibuable à une thérapie par glibenclamide (238).



2.1.2.1.2 Glucagon-like peptide 1 (GLP-1), analogues du GLP-1 et inhibiteurs de la dégradation du GLP-1.

2.1.2.1.2.1 Le GLP-1

Le GLP-1 est une hormone incrétine polypeptidique de 30 acides aminés sécrétée par les cellules L de l'intestin en réponse à une ingestion alimentaire. La forme active du GLP-1 est le GLP-1 7-36. Le GLP-1 diminue l'hyperglycémie post-prandiale en augmentant l'insulino-sécrétion, en inhibant la sécrétion du glucagon et donc la production hépatique de glucose, et en diminuant la vidange gastrique (173, 185). Le GLP-1 peut également stimuler la prolifération pancréatique des cellules β (28), il peut aussi inhiber l'apoptose (28, 154, 240).

Le GLP-1 potentialise l'insulino-sécrétion induite par les nutriments en activant des recepteurs membranaires de la cellule β couplés à une protéine G, cette activation entraîne essentiellement une augmentation d'AMPc (231). L'insulino-sécrétion induite par le GLP-1 dépend en grande partie de l'augmentation de l'AMPc qui va activer à la fois des voies PKA-dépendantes mais aussi des voies PKA-indépendantes ; des mécanismes d'activation indépendants de l'AMPc ont été aussi décrits (101, 170, 225, 249).

L'effet insulino-stimulant du GLP-1 est également gluco-dépendant, ce qui prévient le risque d'hypoglycémie (54).

Toutes ces propriétés font du GLP-1 une molécule très intéressante pour le traitement du diabète de type 2 ; cependant, sa demi-vie est très courte en raison de son catabolisme rapide par la DPP-IV (moins de 2 minutes) (53), ce qui est un inconvénient majeur pour une utilisation thérapeutique. L'enzyme DPP-IV, présente dans les membranes des bordures en brosse intestinales et rénales, à la surface des capillaires et dans la circulation, clive les deux premiers acides aminés N-terminaux du GLP-1, le rendant ainsi inactif (GLP-1 9-36).

Deux stratégies pharmacologiques ont permis de renforcer l'action incrétine : la synthèse d'agonistes du récepteur au GLP-1 résistants à la dégradation et la synthèse d'inhibiteurs des DPP-IV, ces deux classes pharmacologiques étant rassemblées sous le nom d'i**ncrétinomimétiques**.

Un autre inconvénient des incrétinomimétiques est la survenue d'effets secondaires digestifs comme nausées et vomissements, beaucoup plus fréquents d'ailleurs avec les agonistes du récepteur GLP-1 (20, 86), ces effets secondaires sont dose-dépendants et diminuent le plus souvent avec le temps (7) mais ils entraînent malheureusement parfois l'arrêt du traitement.

2.1.2.1.2.2 Les agonistes du récepteur GLP-1

La première approche pour contourner ce défaut majeur qu'est la demi-vie courte du GLP-1 est la synthèse d'agonistes résistants à la dégradation enzymatique par DPP-IV. Plusieurs molécules sont en cours de développement,

impliquant de nombreux laboratoires pharmaceutiques, montrant l'intérêt majeur de ces molécules dans le traitement du diabète de type 2.

2.1.2.1.2.2.1 L'exénatide

L'exénatide ou exendine 4 a été initialement homologué par les laboratoires Amylin Pharmaceutical Inc. et par la suite codéveloppé avec Eli Lilly and Company. C'est un peptide de 39 acides aminés, dérivé du venin d'un lézard (l'Heloderma suspectum ou monstre de Gila) (71). Il est assez similaire au GLP-1 original en terme de structure et de propriétés ; il stimule les récepteurs au GLP-1 de la cellule β pancréatique (230). L'exénatide est plus stable que le GLP-1, avec une demi-vie d'environ 2 heures (79) ; il a été montré qu'il réduisait la glycémie à jeun et postprandiale chez les sujets diabétiques de type 2 (144). L'exénatide est administré par voie sous-cutanée à la dose maximale de 10 µg x 2 par jour. Cette administration biquotidienne en sous-cutanée reste tout de même un inconvénient pour les patients. L'autorisation de la mise sur le marché a été tout d'abord obtenue aux Etats Unis en 2005, puis en France en 2008 (Byetta®). L'exénatide est désormais couramment utilisé dans le traitement du diabète de type 2 (201).

2.1.2.1.2.2.2 Le liraglutide

Le liraglutide a été développé par le laboratoire pharmaceutique Novo Nordisk (Victoza®). C'est un analogue à longue durée d'action du GLP-1 humain. La fraction glutamine-acides gras (palmitoyl C-16) est liée à la lysine 26 d'une

molécule GLP-1 modifiée, facilitant la liaison non covalente à l'albumine sérique et conférant une protection contre la dégradation par la DPP-IV (68). Sa demi-vie est d'environ 13 heures (68) permettant une administration sous-cutanée une fois par jour. Le liraglutide a obtenu récemment l'autorisation de mise sur le marché américaine et européenne, il améliore l'équilibre glycémique et la fonction β cellulaire chez les patients diabétiques de type 2 (20, 171, 203).

2.1.2.1.2.3 Les inhibiteurs des DPP-IV

Ce sont des composés non peptidiques qui inhibent la DPP-IV, enzyme dégradant le GLP-1. Leur administration est orale, ce qui est bien sûr un avantage par rapport à l'administration sous-cutanée des agonistes du GLP-1. Les inhibiteurs des DPP-IV sont capables d'augmenter de 4 à 6 fois les concentrations endogènes de GLP-1 actif. Le rationnel de cette stratégie thérapeutique a été mis en évidence en 1998 par Holst JJ qui a démontré, sur des modèles animaux, l'action insulinotropique de l'augmentation de GLP-1 endogène par les inhibiteurs de la DPP-IV (121).

Comme avec les agonistes GLP-1, un nombre important de molécules ont été développées ou sont en cours de développement, impliquant de nombreux laboratoires pharmaceutiques, montrant l'intérêt suscité par ces molécules dans le traitement du diabète de type 2.

Elles appartiennent à la famille des **gliptines**. Ainsi, il y a la sitagliptine (Januvia®, Xelevia®) développée par les laboratoires Merck Sharp & Dohme-

Chibret (174), la vidagliptine (Galvus®) développée par les laboratoires Novartis (12), et plus récemment la saxagliptine (Onglyza®), développée par les laboratoires Bristol-Meyers Squibb et AstraZeneca qui a obtenu l'autorisation de mise sur le marché américain en juillet 2009 (55), et très récemment en France. Par exemple, l'inhibition des DPP-IV avec la saxagliptine entraîne, chez le diabétique de type 2, une stimulation de la sécrétion d'insuline, une freination du glucagon et une inhibition de la production hépatique de glucose (213).

Ces différentes molécules anti-DPP-IV ont des profils pharmacodynamiques et pharmacocinétiques différents ; mais globalement, l'efficacité et la tolérance clinique apparaissent similaires.

Cependant, la sélectivité des gliptines envers l'enzyme DPP-IV est variable et ces substances pourraient également interférer avec d'autres peptides qui sont aussi dégradés par la DPP-IV (spécificité inférieure à 100 %) ; ces effets potentiels sur d'autres peptides ne sont pas encore connus (141).

2.1.2.2 Les insulino-sensibilisateurs

2.1.2.2.1 Les biguanides

Les dérivés de la biguanidine sont représentés aujourd'hui par une seule molécule, la metformine (1,1-diméthylbiguanide hydrochloride). Cette dernière améliore la tolérance au glucose sans stimuler la sécrétion d'insuline, mais en restaurant l'efficacité de l'insuline sur ses tissus cibles. La metformine entraîne

une amélioration globale de l'insulino-résistance, qui se traduit par une diminution de l'hyperinsulinémie. La principale action de la metformine est l'amélioration de l'hyperglycémie par inhibition de la gluconéogénèse hépatique (122) notamment en activant la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (83) ; de manière secondaire, la metformine augmente la sensibilité à l'insuline dans le foie et dans les tissus périphériques. Elle est à prescrire en première intention chez les diabétiques de type 2, selon les dernières recommandations de l'HAS (Haute Autorité de Santé) mais aussi de l'ADA (American Diabetes Association).

La metformine n'entraîne pas de prise de poids (un effet anorexigène a même été avancé), cause rarement des hypoglycémies, mais les troubles gastro-intestinaux (nausées, diarrhées) sont de fréquents inconvénients qui peuvent parfois causer l'arrêt de sa prescription.

La metformine peut provoquer également mais de façon heureusement beaucoup plus rare une augmentation du taux de lactates sanguins avec le risque d'acidose lactique en cas de facteurs favorisants associés (insuffisance rénale, hypoxie tissulaire, etc.) (207).

Malgré ses inconvénients, la metformine reste le médicament de référence et est prescrit de façon majoritaire pour le traitement du diabète de type 2 (22).

2.1.2.2.2 Les thiazolidinediones

Les thiazolidinediones (pioglitazone et rosiglitazone) améliorent l'action de l'insuline sur les tissus périphériques (utilisation du glucose par les muscles et le tissu adipeux) et diminueraient la néoglucogénèse hépatique dans différents modèles de diabète et d'insulino-résistance (208). Ce sont des agonistes des «peroxysome proliferative activated receptors» (PPARs-γ), récepteurs nucléaires se dimérisant avec des récepteurs rétinoïques afin de contrôler l'expression de gènes codant pour des protéines du métabolisme glucidique et lipidique. Les thiazolidinediones stimulent ainsi l'adipogénèse et inhibent l'expression de la leptine (57), molécule connue pour favoriser l'insulino-résistance. Ces composés diminuent l'hyperglycémie à jeun et post-prandiale, l'insulinémie et les taux de triglycérides et de cholestérol, ils sont prescrits pour traiter le syndrome métabolique et le diabète de type 2 (127). Ils ont également des effets pleiotropiques bénéfiques (200).

Dans le cadre de mon assistanat hospitalo-universitaire au CIC (durant les années 2000 à 2005), j'ai été médecin investigateur d'une recherche clinique étudiant les effets d'une prise orale unique de rosiglitazone chez des volontaires sains sur la sécrétion et la sensibilité à l'insuline. Cette recherche avait été initiée à la suite de travaux chez l'animal montrant un effet insulino-stimulant de la rosiglitazone en aigu (252). L'étude n'a pas confirmé ce type d'effet chez l'homme, mais a montré une action sur la sensibilité à l'insuline en aigu, ainsi que sur la clairance de l'hormone. Ces

résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue «Diabetologia» en 2007 (pages 48 à 51) : «Direct rosiglitazone-induced modifications in insulin secretion, action and clearance: a single-dose hyperglycaemic clamp study.»

Résumé de la publication :

Il a été montré que les thiazolidinediones amélioraient non seulement la sensibilité à l'insuline, mais qu'elles modulaient également la fonction cellulaire β du pancréas et la clairance de l'insuline chez des sujets diabétiques de type 2. Nous avons voulu dans ce travail étudier les effets potentiels d'une prise unique de rosiglitazone sur la fonction cellulaire β du pancréas et sur la clairance de l'insuline en utilisant la technique du clamp hyperglycémique chez des volontaires sains. Sujets et méthodes : Vingt hommes volontaires sains ont été inclus dans une étude randomisée, en double aveugle contre placebo et selon un plan d'administration croisé. La rosiglitazone (8 mg) ou le placebo était pris per os 45 minutes avant le clamp hyperglycémique (10 mmol/l durant deux heures). Résultats: la seconde phase de l'insulino-sécrétion est réduite significativement par la rosiglitazone alors que la première phase de l'insulino-sécrétion n'est pas modifiée. Le taux de C-peptide n'est pas modifié. Le traitement par la rosiglitazone augmente significativement la clairance de l'insuline et l'index de la sensibilité à l'insuline. Conclusions: ces résultats montrent qu'une dose unique de rosiglitazone augmente rapidement la clairance insulinique et l'index d'insulino-sensibilité chez des volontaires sains ; cependant, cette même dose de rosiglitazone n'a aucun effet sur l'insulino-sécrétion. Les mécanismes précis de ces effets ne sont pas encore déterminés.

2.1.2.3 Les inhibiteurs des α-glucosidases

L'acarbose (Glucor®) et le miglitol (Diastabol®) inhibent compétitivement les α-glucosidases, enzymes digestives de la bordure en brosse entérocytaire responsables de l'hydrolyse de l'amidon, du saccharose et du maltose. De ce fait, ils retardent l'absorption intestinale des glucides et limitent l'hyperglycémie postprandiale. Ils ne provoquent pas d'hypoglycémie mais peuvent induire des troubles intestinaux importants dus aux fermentations intestinales (11, 235). Ils sont des antidiabétiques oraux, permettant une diminution de l'HbA1c (241). Il existe un troisième inhibiteur des α-glucosidases : le voglibose, qui n'est pas commercialisé en France ; on le retrouve dans d'autres pays comme le Japon (Laboratoire pharmaceutique Takéda).

2.1.3 Les thérapeutiques en recherche et développement

Nous nous sommes proposés dans le chapitre suivant de développer les thérapeutiques d'avenir, cette liste n'est évidemment pas exhaustive.

2.1.3.1 Les autres principaux agonistes des récepteurs GLP-1 en cours de développement (46)

L'exénatide LAR

Une forme retard de l'exénatide (Long-Acting Release-LAR) est actuellement en cours de développement, l'injection sous cutanée se fait une fois par semaine, elle améliore l'équilibre glycémique des patients diabétiques de type 2 (34, 137).

Le CJC-1134-PC

Tout d'abord, le CJC-1131 a été développé par le laboratoire ConjuChem, c'était un analogue du GLP-1 de longue durée d'action, résistant aux protéases de dégradation ; il activait le récepteur du GLP-1 *in vivo* (138) et diminuait la glycémie chez le sujet diabétique de type 2 (232) ; mais son développement clinique a été arrêté. Actuellement, le CJC-1134-PC est en cours de développement (46, 245).

L'albugon ou albiglutide

L'albugon est une protéine recombinante GLP-1-albumine à longue durée d'action, synthétisée par fusion d'une forme de GLP-1 résistante à la DPP-IV à l'albumine humaine. La molécule est actuellement développée par le laboratoire GlaxoSmithKline (GSK716155). L'albiglutide (Syncria®) est actuellement en

phase III de développement. Il a été montré que l'albiglutide améliorait l'équilibre glycémique des diabétiques de type 2 (166, 202, 211).

Le lixisénatide

Le laboratoire Sanofi-Aventis développe actuellement un autre analogue du récepteur du GLP-1, le lixisénatide (l'AVE0010) ; il est actuellement en phase III de développement clinique ; l'administration se fait une fois par jour par voie sous-cutanée (47, 248).

Le taspoglutide

Le taspoglutide (R1583/BIM51077), issu de la recherche Ipsen et dévelopé par Roche, est un analogue de GLP-1 réalisé selon une séquence humaine permettant une administration hebdomadaire. Il est actuellement testé dans le programme T-emerge constitué de huit études différentes de phase III. Les études T-emerge 5 (taspoglutide en administration hebdomadaire sous-cutanée comparé à l'insuline glargine en administration quotidienne, en complément de la metformine chez des patients non contrôlés par la metformine associée à un sulfamide hypoglycémiant) et T-emerge 7 (taspoglutide en administration hebdomadaire sous-cutanée comparé à un placebo, en complément de la metformine chez des patients ayant un indice de poids corporel élevé) ont toutes deux atteint leurs critères principaux d'amélioration du taux d'HbA1C. Reterstol K a récemment écrit une revue expliquant les effets du taspoglutide (197).

2.1.3.2 Les autres inhibiteurs des DPP-IV en cours de développement

D'autres gliptines sont en cours de développement comme l'alogliptine (SYR-322), développée par les laboratoires Takeda (195), la linagliptine, développée par les laboratoires Boehringer Ingelheim Corp (233), ou la dutogliptine développée par les laboratoires Phenomix Corp, Forest Laboratories Inc et Chiesi Farmaceutici SpA (130).

2.1.3.3 Les agonistes des récepteurs purinergiques

Concernant directement le thème de cette thèse, ce point sera abordé dans la revue bibliographique des récepteurs purinergiques.

2.1.3.4 Les dérivés imidazoliniques

Sur la base d'observations montrant une augmentation de l'insulino-sécrétion induite par le glucose par les antagonistes α-adrénergiques, certaines molécules ont été étudiées en tant que substances potentiellement antidiabétiques. Les dérivés imidazoliniques, comme la phentolamine et l'efaroxan, qui sont connus pour être des antagonistes α_2-adrénergiques, ont montré qu'ils pouvaient augmenter l'insulino-sécrétion (13, 40). Cet effet était médié, non pas par le blocage des récepteurs α_2-adrénergiques, mais par l'inhibition des canaux

potassiques ATP-dépendant (192) par l'intermédiaire des sites imidazoliniques, en partie différents de ceux des sulfamides hypoglycémiants (40). Des études cliniques ont été faites avec le composé imidazolé, le **midaglizole,** et un effet hypoglycémique a été observé chez des sujets diabétiques de type 2 (133). Les imidazolines peuvent aussi avoir un effet sur l'exocytose de l'insuline indépendemment des canaux potassiques ATP-dépendant. Cet effet est dépendant à la fois de la protéine kinase A et de la protéine kinase C (256).

Le **RX871024**, un insulino-sécrétagogue imidazole, exerce un effet direct sur l'exocytose de l'insuline en augmentant la concentration intracellulaire du calcium par la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants (67, 257).

Un autre nouveau dérivé imidazolé, le **BL11282**, n'interagit pas avec les canaux potassiques et stimule l'insulino-sécrétion d'une façon gluco-dépendante (66, 67). Le mécanisme d'action précis reste à déterminer, tout comme l'intérêt clinique potentiel de cette seconde génération de composés imidazoliques.

2.1.3.5 Les inhibiteurs du transporteur sodium/glucose de type 2 (SGLT2)

L'inhibition du transporteur transmembranaire sodium/glucose de type 2 (SGLT2) est un nouveau traitement potentiel du diabète de type 2. Le rein joue un rôle central dans le métabolisme du glucose et la régulation de la glycémie. Le SGLT2 rénal a un rôle clé dans le transport actif du glucose en régulant sa

réabsorption rénale ; ainsi, des agents pharmacologiques inhibiteurs du SGLT2 sont en cours de développement clinique comme par exemple la dapagliflozine (BMS-512148), développée conjointement par les laboratoires Bristol-Myers Squibb et AstraZeneca, actuellement en phase 3 de développement clinique (26, 36).

2.1.3.6 Les activateurs de l'Epac 2

Une nouvelle cible potentielle pour de nouveaux sécrétagogues pourrait être aussi l'activation sélective de l'Epac 2 (ou cAMP-GEFII), régulant l'exocytose de l'insuline (219). L'intérêt potentiel de cette stratégie est soutenu par le fait que cette voie PKA-indépendante est impliquée dans certaines modulations physiologiques ; elle est en effet nécessaire à la potentialisation de l'insulino-sécrétion par les incrétines (132). L'étude d'analogues de l'AMPc ayant une spécificité pour l'Epac valide cette approche (131).

2.1.3.7 Les activateurs de la protéine kinase activée par l'AMP

Il a été montré que la voie de la protéine kinase activée par l'AMP jouait un rôle important dans le mécanisme d'action de la metformine et des thiazolinediones. Ainsi, cette voie d'activation pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour le diabète de type 2 (102, 250, 255).

2.1.3.8 Les autres voies de développement

D'autres cibles se sont révélées potentiellement prometteuses pour le traitement du diabète de type 2.

Nous pouvons citer notamment comme cibles thérapeutiques potentielles, l'activation de la glucokinase (103, 181), l'antagonisme du récepteur du glucagon (143, 162, 217), l'activation du récepteur du facteur de croissance 21 des fibroblastes (60, 135) ou l'inhibition de la 11-β-déshydrogénase de type 1 (23, 107), ou encore la modulation du récepteur GPR43 (234). Il existe aussi les agents anti-inflammatoires comme le salsalate, prodrogue du salicylate et inhibiteur de NF-kB (90) ou encore les anticorps anti-IL-1 β, comme le XOMA052 (180).

Une autre voie de recherche s'intéresse aux substances d'origine végétale (163), comme par exemple la 4-Hydroxyisoleucine qui peut amplifier l'insulino-sécrétion *in vitro* de façon gluco-dépendante (209), améliorer la tolérance au glucose *in vivo* et diminuer l'insulinémie basale dans un modèle animal de diabète de type 2 (25). La 4-Hydroxyisoleucine pourrait donc être un candidat pour le traitement du diabète de type 2 (128).

Mais notre propos n'est pas de faire une liste exhaustive ; il y a actuellement de très nombreuses voies thérapeutiques potentielles pour le diabète de type 2 et d'intenses recherches sont réalisées.

doi: 10.1111/j.1472-8206.2005.00375.x

REVIEW ARTICLE

Pharmacological interventions that directly stimulate or modulate insulin secretion from pancreatic β-cell: implications for the treatment of type 2 diabetes

Anne Farret[a,b], Laura Lugo-Garcia[a], Florence Galtier[b], René Gross[a], Pierre Petit[a,b]*

[a]*CNRS UMR 5160, Center for Pharmacology and Health Biotechnology, Montpellier, France*
[b]*INSERM CIC 0001, Clinical Investigation Center, University Hospital, Montpellier, France*

Keywords
anti-diabetic drugs,
diabetes,
insulin secretion

Received 27 May 2005;
revised 8 June 2005;
accepted 12 September 2005

*Correspondence and reprints:
p-petit@chu-montpellier.fr

ABSTRACT

Blood glucose concentration is controlled by a number of hormone and neurotransmitter signals, either increasing or reducing glucose levels in the case of hypoglycemia or hyperglycemia, respectively. The pancreatic β-cell responds to an increase in circulating glucose levels by a cascade of metabolic and electrophysiological events leading to the secretion of insulin. Type 2 diabetes is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia; the progressive pancreatic β-cell dysfunction, with altered insulin production and secretion, is a major pathophysiological determinant of the disease together with the resistance of insulin-sensitive tissues to the action of the hormone. Hence, drugs which stimulate or enhance insulin secretion will reduce plasma glucose concentrations; this lowering of hyperglycemia will, in turn, reduce the occurrence of long-term complications. K_{ATP} channels play a critical role in insulin secretion and can be considered as transducers of glucose-induced metabolic changes into biophysical events leading to the exocytosis of insulin granules. All currently marketed insulin secretagogues, sulfonylureas and glinides, target the β-cell K_{ATP} channels and reduce their opening probability. They induce insulin release regardless of the plasma glucose concentration, thus favoring the occurrence of hypoglycemia in the fasting state. Despite the intensive use of current drugs, many patients suffering from type 2 diabetes still exhibit poor glycemic control, others fail to respond to the treatment, and some develop serious complications. Therefore, there is a real need for innovative compounds, either enhancing insulin secretion from the pancreas or improving insulin action on the hormone-sensitive tissues. Here, we overview the existing and novel approaches targeting the β-cell to enhance the release of insulin, with special emphasis on new ways of amplifying insulin secretion in a glucose-dependent manner.

INTRODUCTION

Blood glucose concentration is very tightly controlled by a number of hormone and neurotransmitter signals, either increasing (catecholamines, glucagon, cortisol, growth hormone) or reducing (insulin) glucose levels in the case of hypoglycemia or hyperglycemia, respectively. Elevated glucose is the major stimulus of the pancreatic insulin-secreting β-cells. Glucose equilibrates across the plasma membrane through the glucose transporter (GLUT2) and is rapidly phosphorylated to glucose-6-phosphate by glucokinase. This enzyme also called 'glucose sensor' triggers the first step of glycolysis, leading to the generation of pyruvate that enters the

© 2005 Blackwell Publishing

tricarboxylic acid cycle in the mitochondria for oxidative metabolism. Hence, the metabolic rate in the β-cell is responsive to plasma glucose concentration, resulting in enhanced glycolytic and mitochondrial generation of adenosine triphosphate (ATP) from adenosine diphosphate (ADP) at high glucose levels. The subsequent increase in the ATP/ADP ratio in the cytosol induces depolarization of the plasma membrane through the closure of ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels and the decrease in potassium outflow from the cell [1,2]. This depolarization results in opening of voltage-dependent calcium (Ca^{2+}) channels and elevation of cytosolic calcium, which in turn triggers the exocytosis of insulin secretory granules (*Figure 1*). In addition to this triggering pathway, glucose stimulation of insulin secretion also involves the generation of distinct amplification signals [3].

Type 2 diabetes is a metabolic disorder with both genetic and environmental determinants; it is characterized by a chronic hyperglycemia leading to long-term complications increasing both morbidity and mortality. The pathogenesis of type 2 diabetes involves two main mechanisms: the resistance of insulin-sensitive tissues to the action of this hormone and the dysfunction of pancreatic β-cells, which fail to adapt to insulin resistance [4]. The two corresponding pharmacological interventions are: (i) improvement of insulin action (metformin and thiazolidinediones) and (ii) enhancement of insulin secretion [5–7]. As β-cell dysfunction is a critical component in the pathophysiology of type 2 diabetes, this overview considers drugs which stimulate or amplify insulin release. Such drugs are well known to reduce plasma glucose concentration; they may also indirectly improve insulin sensitivity, as chronic hyperglycemia is known to generate secondary insulin resistance [8]. Achieving a tight glycemic control is a major endpoint in the treatment of type 2 diabetes as it is associated with reduced long-term complications [9].

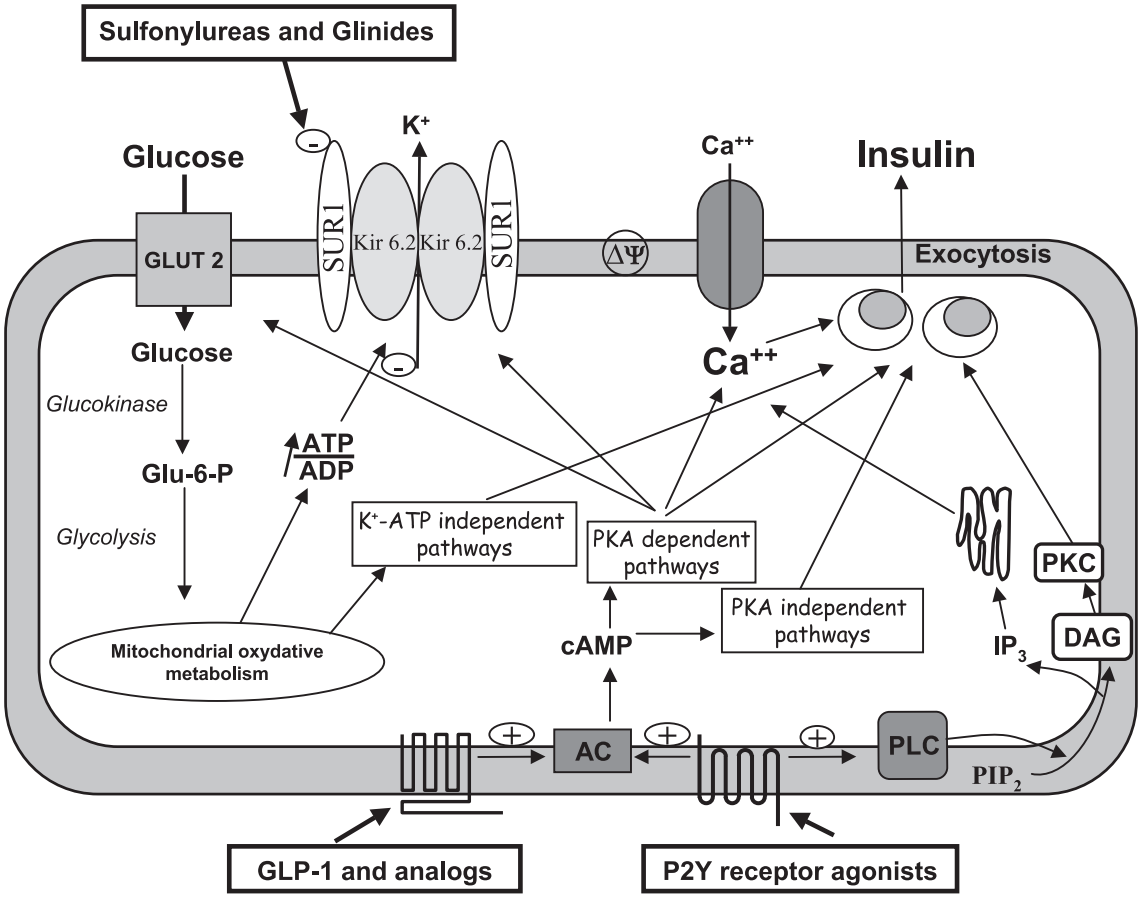


Figure 1 Schematic representation of the mechanisms controlling the initiation and some amplification pathways of insulin secretion in the pancreatic β-cell.

However, the use of classic insulin secretagogues can be limited due to the risk of hypoglycemia. This overview will focus on existing and novel approaches targeting the pancreatic β-cell in order to enhance insulin release, with a special emphasis on new ways of amplifying the secretion in a glucose-dependent manner.

CURRENT INSULIN-SECRETING AGENTS: SULFONYUREAS AND RELATED COMPOUNDS

Following the serendipitous discovery of the hypoglycemic activity of the first sulphonamide derivatives by Janbon and Loubatières [10], the therapeutic modulation of β-cell K_{ATP} channel activity has been used for decades to increase insulin secretion in patients with type 2 diabetes. The K_{ATP} channel in β-cells consists of a hetero-octomeric complex of four inwardly rectifying subunits (Kir6.2) forming a central pore and four regulatory sulfonylurea receptor SUR1 subunits [11]. The activity of the channel is physiologically regulated by the intracellular concentrations of the adenine nucleotides, ATP and ADP. SUR1, which has been identified in pancreatic β-cells [12], mediates Mg^{2+}-ADP-induced channel opening, whereas ATP directly acts on Kir6.2 as a channel blocker.

Similar to the stimulating effect of glucose, sulfonylureas trigger insulin secretion by closing the K_{ATP} channel of the β-cell plasma membrane (*Figure 1*); they interact with the SUR1 subunit of this channel and reduce its opening probability. The subsequent depolarization of the membrane and opening of voltage-gated calcium channels induce an increase in the cytosolic calcium concentration which allows the exocytosis of insulin secretory granules [13,14]. Even if the insulin response induced by sulfonylureas is known to be amplified by glucose, these drugs are able to initiate insulin secretion in the presence of a low plasma glucose concentration, thus possibly leading to hypoglycemia depending on the conditions in which they are used [15]. Additionally, it has been shown that sulfonylureas interfere with the β-cell exocytotic machinery by a mechanism independent of the K_{ATP} channel [16].

Sulfonylureas are classified into first- and second-generation compounds. Drugs of these two generations have, in common, the sulfonylurea group (*Figure 2*); they differ mainly by the potency of their insulin-releasing and anti-diabetic actions, the second-generation compounds being the more potent. Nevertheless, it has been shown that the sulfonylurea group is not essential for drug activity. Accordingly, meglitinide, which is related to the non-sulfonylurea moiety of glibenclamide, and other non-sulfonylurea derivatives (*Figure 3*), also displays insulin-secreting and anti-diabetic actions [17]. These drugs (glinides) act on the same cellular target as do the sulfonylureas, namely they close the K_{ATP} channels, although they may interact with distinct regions of the sulfonylurea receptor SUR1.

Two binding motives are involved in the interaction of sulfonylureas and glinides with SUR1, one favoring the sulfonylurea group and the other preferring meglitinide-like molecules; drugs binding to more than one motive produce a particularly strong interaction [18]. There is a relationship between drug reversibility and the number of potential interactions with SUR1. Most drugs with only one active group (either a sulfonylurea or a non-sulfonylurea) are rapidly reversible; it is the case for tolbutamide, chlorpropamide, gliclazide, and meglitinide. In contrast, drugs with both sulfonylurea and non-sulfonylurea moieties (such as glibenclamide and glimepiride) are clearly less reversible. From a clinical viewpoint, it remains to be established whether rapidly reversible drugs provide any advantages over slowly reversible compounds as many other parameters have to be considered in an integrated situation, particularly drug pharmacokinetics.

In addition to the β-cell, K_{ATP} channels are also present in extrapancreatic tissues, particularly in cardiac muscle cells (expressing the SUR2A isoform), and vascular smooth muscle cells (expressing the SUR2B isoform) [19]. Vascular K_{ATP} channel opening occurs in response to neurotransmitters and hypoxia, and induces physiological vasodilatation; a similar response may also be triggered by K_{ATP} channel openers. In cardiac tissue, activation of the K_{ATP} channel may constitute a protective mechanism against the metabolic stress of hypoxia by shortening action potential and reducing calcium entry. Interestingly, it can be hypothesized that pancreatic β-cell K_{ATP} channel opening could afford a protective mechanism against the metabolic stress of hypoglycemia. Based on their selectivity for SUR1 or SUR2, sulfonylureas and glinides may be divided into two groups: relatively SUR1-selective drugs, such as tolbutamide, chlorpropamide, gliclazide, nateglinide and mitiglinide, and SUR1-non-selective drugs such as glibenclamide, glimepiride, repaglinide, and meglitinide [18]. The possibility that non-selective K_{ATP} channel blockers may induce extrapancreatic side effects in clinical practice is still a matter of controversy. The cardiovas-

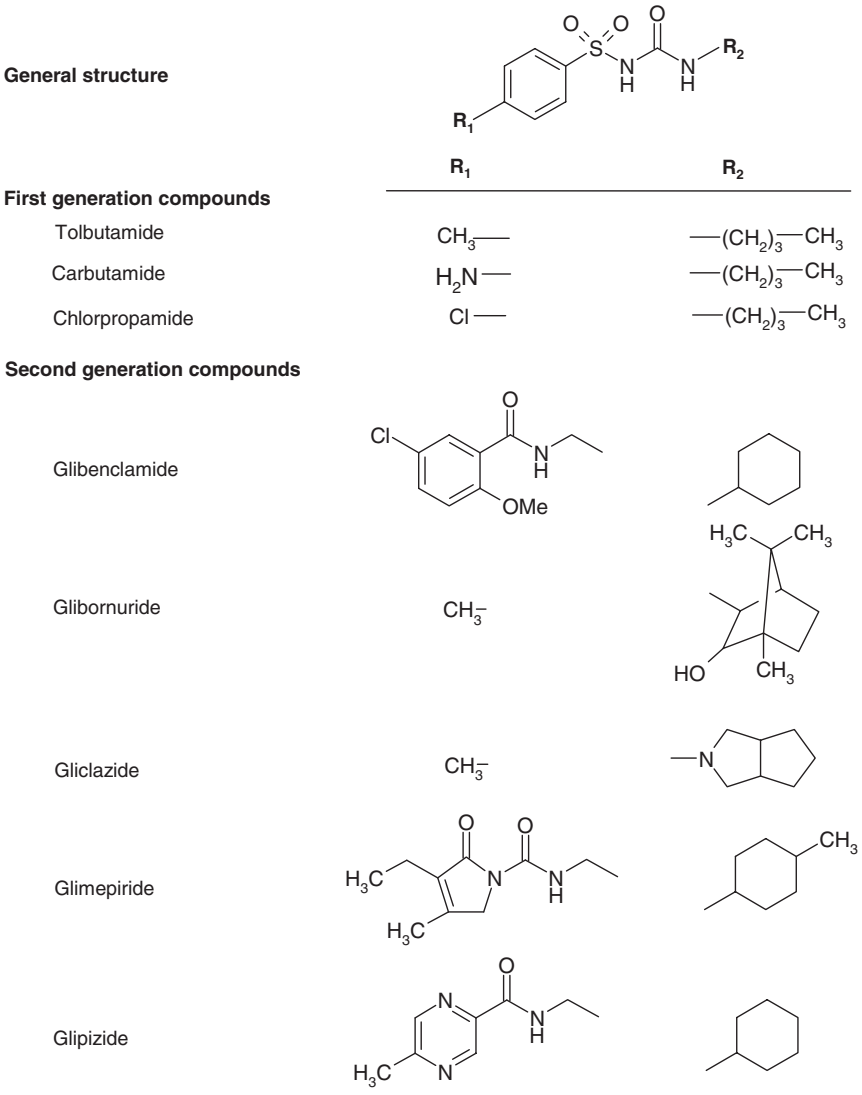


Figure 2 Sulfonylureas: general structure and compounds of first and second generation.

cular consequences of K_{ATP} channel inhibition could be subtle or restricted to situations such as myocardial ischemia or severe stress, and further investigations are required to ascertain this hypothesis. However, the UK Prospective Diabetes Study, did not show any increased risk of vascular events attributable to glibenclamide therapy [9].

NOVEL INSULIN RELEASERS

Despite the intensive use of current anti-diabetic agents, many patients suffering from type 2 diabetes still exhibit poor glycemic control, fail to respond to treatment (primary and secondary therapeutic failures), and some develop serious complications. Given the multifactorial pathophysiology and the consequent heterogeneity of type 2 diabetes, there is clearly a place for the use of different compounds targeting the various pathogenic mechanisms of the disease.

The drugs currently used as insulin secretagogues in clinical practice all belong to the sulfonylurea or the glinide family. As previously described, they all share a similar mechanism of action, the blockade of the K_{ATP} channel of the β-cell membrane, thereby depolarizing the cell and potentially triggering insulin secretion even when the glucose concentration is low, explaining the risk of hypoglycemia. This common drawback is also possible with the glinide analogs, even if it is claimed that the frequency is lower, because of the rapid pharmacokinetics of these compounds. From a therapeutic point of

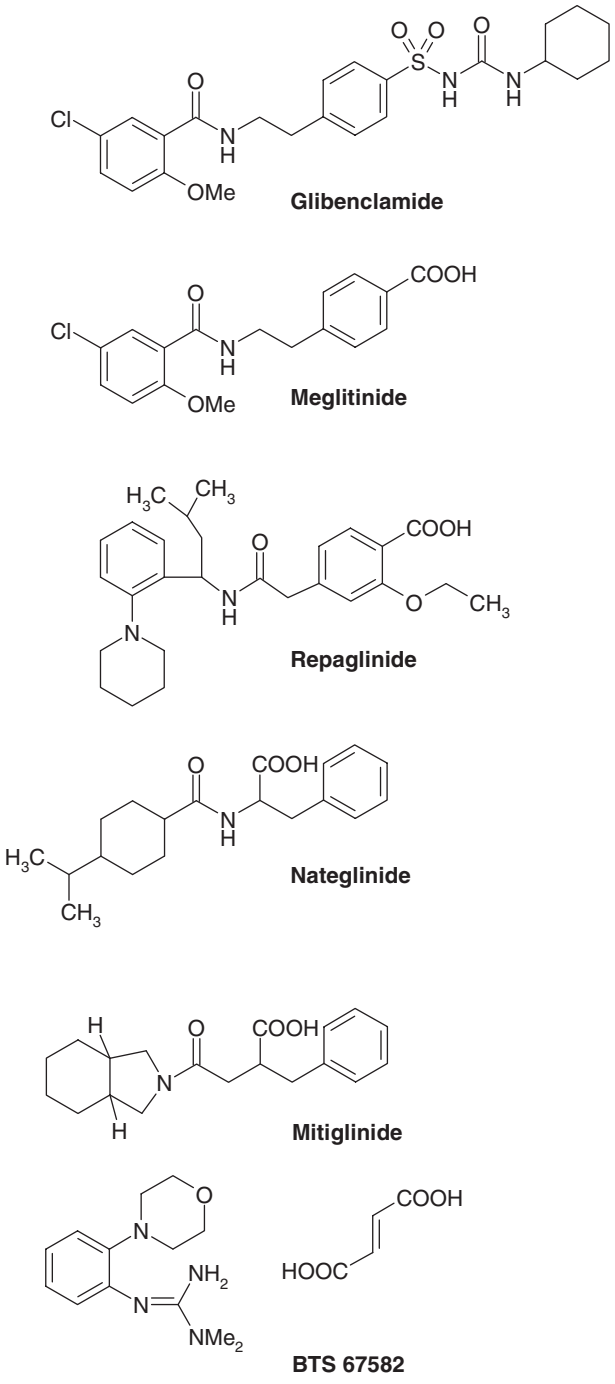


Figure 3 Chemical structures of glibenclamide and some newer non-sulfonylurea secretagogues.

view, novel insulin releasers with both efficacy and safety are clearly needed, and numerous pharmaceutical companies are involved in the research and development of novel compounds.

Novel K_{ATP} channel modulators

Sulfonylureas and non-sulfonylurea analogs

R-acetohexamide is a new sulfonylurea with a more rapid onset of action and a shorter duration of hypoglycemic activity than glibenclamide [20]; its short duration of action may help to control post-prandial hyperglycemia with a low risk of hypoglycemia.

In addition to the benzoic acid derivative repaglinide (NN623) and the phenylalanine derivative nateglinide (A4166) which are already marketed, other compounds such as meglitinide, mitiglinide (KAD 1229) and the guanidine derivative BTS67582, are currently developed to boost prandial insulin secretion, with rapid pharmacokinetics [21].

Potassium channel openers

A contradictory pharmacological approach has been recently evaluated. The strategy of decreasing the workload of insulin-secreting cells was proposed to protect them from chronic overstimulation and improve β-cell function; the induction of β-cell rest preserves insulin stores and pulsatile insulin secretion [22]. This strategy, using the K_{ATP} channel opener diazoxide, was shown to improve the β-cell function in type 2 diabetic patients [23,24]; however, these studies gave no evidence for any decrease in blood glucose concentration. The diazoxide analog NN414 has been shown to activate pancreatic β-cell K_{ATP} channels in a potent and selective way [25], thereby reducing insulin secretion. This SUR1/Kir6.2-selective potassium channel opener reduces blood glucose and improves glucose tolerance in the diabetic fatty Zucker rat model [26].

Imidazoline derivatives

On the basis of early observations showing an improvement of glucose-induced insulin secretion by α-adrenergic blockade, a number of compounds were investigated as potential anti-diabetic drugs. Imidazoline derivatives, such as phentolamine and efaroxan, which are known to be α_2-adrenoreceptor blockers, have been shown to enhance insulin secretion [27,28]. This effect was shown to be mediated by the inhibition of K_{ATP} channels [29] and not by the α_2-adrenoreceptor blockade. Human studies have been performed with the imidazoline compound midaglizole and a hypoglycemic effect has been observed both in normal and type 2 diabetic subjects [30,31]. Imidazolines may also exert a K_{ATP}-independent effect on insulin exocytosis. This effect is dependent on both protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) [32]. RX871024, an imidazoline insulin

secretagogue which increases the intracellular calcium concentration by closing K_{ATP} channels, also exerts a direct effect on insulin exocytosis [33]. Newer derivatives, such as BL11282, do not interact with potassium channels and only stimulate insulin secretion in a glucose-dependent manner [34]. The precise mechanism is still to be determined, as well as the potential clinical interest of this second generation of imidazoline compounds.

GLP-1, GLP-1 analogs and inhibitors of GLP-1 degradation

The incretin hormone glucagon-like peptide 1 (GLP-1) is an intestinal polypeptide secreted by L-cells in response to food ingestion. GLP-1 attenuates postprandial hyperglycemia by enhancing insulin secretion, inhibiting glucagon secretion and reducing gastrointestinal mobility [35]. GLP-1 agonists potentiate nutrient-induced insulin secretion via β-cell membrane receptors that essentially increase cyclic adenosine monophosphate (cAMP) [36] (*Figure 1*). If cAMP signaling through both PKA-dependent and -independent pathways accounts for a great part of the mechanisms involved in GLP-1-induced insulin secretion, cAMP-independent mechanisms have also been recently described [37–41]. The glucose dependence of the insulin-stimulating effect of GLP-1 has been well established and prevents the risk of hypoglycemia [42]. GLP-1 was also shown to induce pancreatic cell proliferation and β-cell neogenesis [43], as well as to inhibit apoptosis [44]. However, the very short half-life of GLP-1, which is <2 min [45], is a major limitation to its clinical use.

The first approach to counterbalance this drawback is the development of long-acting GLP-1 agonists. Exenatide (AC2993, synthetic exendin-4) is a 39-residue peptide derived from the venom of *Heloderma suspectum* (Gila monster lizard) acting on GLP-1 receptors. Exenatide is more stable than GLP-1, with a half-life of 2.4 h [46]; it was shown to reduce postprandial and fasting plasma glucose in type 2 diabetic subjects [47] and was recently approved by the US Food and Drug Administration. Acetylated derivatives of GLP-1, which bind to albumin, have also been designed to extend the half-life. Liraglutide (NN2211) was shown to improve 24-h glycemia and β-cell function in patients with type 2 diabetes after a week of once daily administration [48]. A novel long-acting GLP-1 analog resistant to protease degradation (CJC-1131) has also been designed to be able to conjugate to albumin *in vivo*; CJC-1131 was shown to activate the GLP-1 receptor *in vivo* [49]. By a technology fusing the gene for human albumin to the gene encoding GLP-1, the production of a stabilized form of GLP-1 with a longer half-life was also recently developed [50].

GLP-1 itself, as a peptide, is rapidly degraded which limits its therapeutic application. An alternative approach is currently being considered by some pharmaceutical companies, namely administration of agents that inhibit the dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) enzyme which degrades GLP-1. LAF237 has been described as a potent, stable and selective DPP-IV inhibitor with oral bioavailability and antihyperglycemic activity [51]. It was shown to improve metabolic control in type 2 diabetic subjects [52].

A frequent drawback of the treatment with GLP-1 agonists, either direct or indirect, is the occurrence of digestive adverse reactions such as nausea. The other problem is that GLP-1 analogs, as peptides, have to be administered subcutaneously. Inhibitors of GLP-1 degradation can be given orally but such drugs may affect other peptides that are degraded by DPP-IV.

P2Y receptor agonists

P2 receptors on pancreatic β-cells respond to ATP, which is co-released with insulin during the glucose-induced exocytosis of secretory granules. This co-releasing of ATP exerts a positive autocrine feedback amplifying the secretion of insulin. A similar amplification process may occur during the cholinergic control of insulin secretion, as ATP is also co-released with acetylcholine from the vagus nerve terminations. External ATP has been reported to favor the synchronization of the Ca^{2+} rhythmicity in the β-cells required for a pulsatil release of insulin [53]. However, ATP is rapidly degraded into adenosine by type I ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases), and adenosine can in turn reduce the secretion of insulin through β-cell A1 receptors. Thus, P2 and A1 receptors are physiologically relevant to control insulin secretion [54]. Nevertheless, depending on the animal models, some discrepancies appear in the literature concerning the functional effects of extracellular ATP. So, in the mouse, an inhibitory control of insulin secretion has been consistently reported [55,56].

From a pharmacological viewpoint, P2 receptors on different tissues have been considered as potential targets for the development of novel drugs; the large molecular heterogeneity of P2 receptor subtypes in different cell types opens the possibility of developing selective tissue-specific drugs targeting these receptors.

The presence of P2 receptors of the P2Y subtype on rat pancreatic β-cells is well documented; their activation by

extracellular ATP and stable structural analogs results in stimulation of insulin secretion [54]. In contrast to sulfonylureas, P2Y agonists amplify insulin release only in the presence of stimulating glucose concentrations, which may reduce the risk of hypoglycemia. The mechanism whereby P2Y receptor agonists enhance glucose-induced insulin release has been linked, at least in part, to the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway of the β-cell [57]; it was also shown to be independent of a direct effect on K_{ATP} channels and to require glucose metabolism [58].

P2Y receptor agonists have been shown to be effective in amplifying insulin secretion *in vitro* from the pancreas of diabetic animals [59]. The activation of P2Y receptors *in vivo* leads to an insulin response which is dependent on the nutritional status of the animal and the level of plasma glucose. An improvement of glucose tolerance was also demonstrated after oral administration [54].

In human pancreatic islets, different P2 receptor agonists were shown to increase insulin release, and the response of a P2Y selective agonist was glucose-dependent [60]. This insulin-secreting action is in agreement with previous results showing that ATP increases intracellular Ca^{2+} concentration in isolated human insulin-secreting cells [61]. There is still no clinical study investigating the effects of a P2Y receptor agonist on glucose homeostasis.

The use of P2Y receptor-selective ligands may represent a novel mechanistic approach for compounds with glucose-regulated action and potential selectivity for the pancreas. Concerning the molecular pharmacology of the P2Y receptors, a number of subtypes have been cloned and functionally defined in various tissues. Recent studies in $P2Y_1$ receptor knock-out mice suggest that this receptor subtype plays a physiological role in the maintenance of glucose homeostasis, at least in part through regulation of insulin secretion [56]. A medicinal chemistry approach combined with analysis of the structure–activity relationships led to a series of $P2Y_1$-selective compounds with good potency for amplification of insulin secretion but still insufficient tissue specificity [62,63]. The challenge for a novel generation of analogs will be to improve their pancreatic specificity [64]. In that prospect, it has to be taken into account that different molecular subtypes of P2Y receptors are expressed in pancreatic islets [65].

Other secretagogues

4-Hydroxyisoleucine (ID 1101) is an amino acid derivative which was first shown to amplify insulin secretion *in vitro* in a clearly glucose-dependent manner [66]. The mechanism of this action remains to be fully elucidated; it does not depend on a direct effect on K_{ATP} channel and may be mediated by an action on early steps of glucose metabolism [67]. This compound was shown to improve glucose tolerance *in vivo* and to lower hyperglycemia, also decreasing basal insulinemia, in an animal model of type 2 diabetes [68]. More recently, it was established that, in addition to its direct insulinotropic activity, 4-hydroxyisoleucine reduced insulin resistance through activation of the early steps of insulin signaling in peripheral hormone-sensitive tissues and in the liver [69].

Inhibition of phosphodiesterase activity has also been investigated as a strategy to amplify insulin secretion in a glucose-dependent manner [70]. Whether this approach will prove therapeutically useful depends on the possibility to design specific inhibitors of the β-cell phosphodiesterase isoform.

A potential new target for novel secretagogues could also be the selective activation of the exchange protein activated by cAMP2/cAMP-guanine nucleotide exchange factor II (EPAC2/cAMP-GEFII), regulating insulin exocytosis [71]. The potential interest of this strategy is supported by the fact that this PKA-independent pathway mediates some physiologic modulations; it is indeed critical in the potentiation of insulin secretion by incretins [72]. The recent report of cAMP analogs with specificity for EPAC further supports the validity of this approach [73].

CONCLUSION

A number of different strategies have been explored to increase insulin release and some are still the matter of research. Real innovations in the discovery of novel insulin secretagogues will come from pharmacological interventions independent from the K_{ATP} channel and amplifying insulin release in a glucose-dependent manner. In the clinical perspective of a chronic treatment, the search for orally active drugs devoid of any risk of hypoglycemia and weight gain is also a condition of progress.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Mr Claude Coquelet from the National Graduate School of Chemistry in Montpellier for his expertise.

REFERENCES

1 Henquin J.C. D-glucose inhibits potassium efflux from pancreatic islet cells. Nature (1978) **271** 271–273.
2 Rorsman P., Trube G. Glucose-dependent K^+ channels in pancreatic beta cells are regulated by ATP. Pflügers Arch. (1985) **405** 305–309.
3 Henquin J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. Diabetes (2000) **49** 1751–1760.
4 Stumvoll M., Goldstein B.J., Van Haeften T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet (2005) **365** 1333–1346.
5 Krentz A.J., Bailey C.J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. Drugs (2005) **65** 385–411.
6 Setter S.M., Iltz J.L., Thams J., Campbell R.K. Metformin hydrochloride in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. Clin. Ther. (2003) **25** 2991–3026.
7 Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. N. Engl. J. Med. (2004) **351** 1106–1118.
8 Yki-Järvinen H. Acute and chronic effects of hyperglycaemia on glucose metabolism. Diabetologia (1990) **33** 579–585.
9 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet (1998) **352** 837–853.
10 Henquin J.C. The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work? Diabetologia (1992) **35** 907–912.
11 Aguilar-Bryan L., Bryan J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. Endocr. Rev. (1999) **20** 101–135.
12 Aguilar-Bryan L., Nichols C.G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., Nelson D.A. Cloning of the β-cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science (1995) **268** 423–426.
13 Henquin J.C., Meissner H.P. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on ^{86}Rb fluxes and membrane potential in pancreatic beta cells. Biochem. Pharmacol. (1982) **31** 1407–1415.
14 Trube G., Rorsman P., Ohno-Shosaku T. Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K^+ channel in mouse pancreatic beta cells. Pflügers Arch. (1986) **407** 493–499.
15 Ferner R.E., Neil H.A. Sulphonylureas and hypoglycaemia. Br. Med. J. Clin. Res. (1988) **296** 949–950.
16 Renström E., Barg S., Thevenod F., Rorsman P. Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K+ channel-independent action. Diabetes (2002) **51** S33–S36.
17 Dornhorst A. Insulinotropic meglitinide analogues. Lancet (2001) **358** 1709–1716.
18 Gribble F.M., Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. Diabetologia (2003) **46** 875–891.
19 Yokoshiki H., Sunagawa M., Seki T., Sperelakis N. ATP-sensitive K+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. (1998) **274** C25–C37.
20 Seri K., Sanai K., Kurashima K., Imamura Y., Akita H. (R)-ACX is a novel sulfonylurea compound with potent, quick and short-lasting hypoglycemic activity. Eur. J. Pharmacol. (2000) **389** 253–266.
21 Pratley R.E., Foley J.E., Dunning B.E. Rapid acting insulinotropic agents: restoration of early insulin secretion as a physiologic approach to improve glucose control. Curr. Pharm. Des. (2001) **7** 1375–1397.
22 Ritzel R.A., Hansen J.B., Veldhuis J.D., Butler P.C. Induction of beta-cell rest by a Kir6.2/SUR1-selective K(ATP)-channel opener preserves beta-cell insulin stores and insulin secretion in human islets cultured at high (11 mM) glucose. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2004) **89** 795–805.
23 Qvigstad E., Kollind M., Grill V. Nine weeks of bedtime diazoxide is well tolerated and improves beta-cell function in subjects with type 2 diabetes. Diabet. Med. (2004) **21** 73–76.
24 Guldstrand M., Grill V., Bjorklund A., Lins P.E., Adamson U. Improved beta cell function after short-term treatment with diazoxide in obese subjects with type 2 diabetes. Diabetes. Metab. (2002) **28** 448–456.
25 Dabrowski M., Larsen T., Ashcroft F.M., Bondo Hansen J., Wahl P. Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type K(ATP) channel by two novel diazoxide analogues. Diabetologia (2003) **46** 1375–1382.
26 Carr R.D., Brand C.L., Bodvarsdottir T.B., Hansen J.B., Sturis J. NN414, a SUR1/Kir6.2-selective potassium channel opener, reduces blood glucose and improves glucose tolerance in the VDF Zucker rat. Diabetes (2003) **52** 2513–2518.
27 Berdeu D., Gross R., Ribes G., Loubatieres-Mariani M.M., Bertrand G. Effects of imidazolines and derivatives on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas. Eur. J. Pharmacol. (1994) **254** 119–125.
28 Chan S.L., Dunne M.J., Stillings M.R., Morgan N.G. The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K+ATPchannels in insulin-secreting cells. Eur. J. Pharmacol. (1991) **204** 41–48.
29 Plant T.D., Henquin J.C. Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K^+ channels in mouse pancreatic beta-cells. Br. J. Pharmacol. (1990) **101** 115–120.
30 Kawazu S., Suzuki M., Negishi K., Watanabe T., Ishii J. Studies of midaglizole (DG-5128). A new type of oral hypoglycemic drug in healthy subjects. Diabetes (1987) **36** 216–220.
31 Kawazu S., Suzuki M., Negishi K. et al. Initial phase II clinical studies on midaglizole (DG-5128). A new hypoglycemic agent. Diabetes (1987) **36** 221–226.
32 Zaitsev S.V., Efanov A.M., Efanova I.B. et al. Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K(ATP) channels and interaction with the exocytotic machinery. Diabetes (1996) **45** 1610–1618.
33 Zaitsev S.V., Efanov A.M., Raap A. et al. Different modes of action of the imidazoline compound RX871024 in pancreatic beta-cells. Blocking of K+ channels, mobilization of Ca2+ from endoplasmic reticulum, and interaction with exocytotic machinery. Ann. N. Y. Acad. Sci. (1999) **881** 241–252.
34 Efanov A.M., Zaitsev S.V., Mest H.J. et al. The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin

secretionin pancreatic beta-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity. Diabetes (2001) **50** 797–802.
35 Perfetti R., Merckel P. Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic β-cell function. Eur. J. Endocrinol. (2000) **143** 717–725.
36 Thorens B., Waeber G. Glucagon-like peptide-1 and the control of insulin secretion in the normal state and NIDDM. Diabetes (1993) **42** 1219–1225.
37 Gromada J., Brock B., Schmitz O., Rorsman P. Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. (2004) **95** 252–262.
38 Miura Y., Matsui H. Glucagon-like peptide-1 induces a cAMP-dependent increase of [Na+]i associated with insulin secretion in pancreatic beta-cells. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2003) **285** 1001–1009.
39 Suga S., Kanno T., Ogawa Y., Takeo T., Kamimura N., Wakui M. cAMP-independent decrease of ATP-sensitive K+ channel activity by GLP-1 in rat pancreatic beta-cells. Pflugers Arch. (2000) **440** 566–572.
40 Wheeler M.B., Lu M., Leng X.H., Chen C., Boyd A.E. III Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. Endocrinology (1993) **133** 57–62.
41 MacDonald P.E., Wang X., Xia F. et al. Antagonism of rat β-cell voltage-dependent K^+ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/Protein Kinase A and phosphatidylinositol 3-Kinase signaling pathways. J. Biol. Chem. (2003) **278** 52446–52453.
42 Deacon C.F. Therapeutic Strategies Based on Glucagon-Like Peptide 1. Diabetes (2004) **53** 2181–2189.
43 Perfetti R., Zhou J., Doyle M.E., Egan J.M. Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats. Endocrinology (2000) **141** 4600–4605.
44 Hui H., Nourparvar A., Zhao X., Perfetti R. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5′-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. Endocrinology (2003) **144** 1444–1455.
45 Deacon C.F., Nauck M.A., Toft-Nielsen M., Pridal L., Willms B., Holst J.J. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. Diabetes (1995) **44** 1126–1131.
46 Fineman M.S., Bicsak T.A., Shen L.Z. et al. Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care (2003) **26** 2370–2377.
47 Kolterman O.G., Buse J.B., Fineman M.S. et al. Synthetic exendin-4 (exenatide) significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2003) **88** 3082–3089.
48 Degn K.B., Juhl C.B., Sturis J. et al. One week's treatment with the long-acting glucagons-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. Diabetes (2004) **53** 1187–1194.
49 Kim J.G., Baggio L.L., Bridon D.P. et al. Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. Diabetes (2003) **52** 751–759.
50 Baggio L.L., Huang Q., Brown T.J., Drucker D.J. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. Diabetes (2004) **53** 2492–2500.
51 Villhauer E.B., Brinkman J.A., Naderi G.B. et al. 1-[[(3-hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: a potent, selective, and orally bioavailable dipeptidyl peptidase IV inhibitor with antihyperglycemic properties. J. Med. Chem. (2003) **46** 2774–2789.
52 Ahren B., Landin-Olsson M., Jansson P.A., Svensson M., Holmes D., Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. (2004) **89** 2078–2084.
53 Grapengiesser E., Dansk H., Hellman B. Pulses of external ATP aid to the synchronization of pancreatic β-cells by generating premature Ca^{2+} oscillations. Biochem. Pharmacol. (2004) **68** 667–674.
54 Petit P., Hillaire-Buys D., Loubatières-Mariani M.M., Chapal J. Purinergic receptors and the pharmacology of type 2 diabetes, in: Abbrachio M.P., Williams M. (Eds), Handbook of Experimental Pharmacology: 'Purinergic and Pyrimidinergic Signalling'. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2001, Chapter 27, pp. 377–391.
55 Poulsen C.R., Bokvist K., Olsen H.L. et al. Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. Diabetes (1999) **48** 2171–2181.
56 Léon C., Freund M., Latchoumanin O., Farret A., Petit P., Cazenave J.P. The P2Y1 receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. Purinergic Signalling (2005) **1** 145–151.
57 Chevassus H., Roig A., Belloc C. et al. P2Y receptor activation enhances insulin release from pancreatic β-cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. (2002) **366** 464–469.
58 Farret A., Vignaud M., Dietz S., Vignon J., Petit P., Gross R. P2Y purinergic potentiation of glucose-induced insulin secretion and pancreatic β-cell metabolism. Diabetes (2004) **53** (Suppl 3) S63–S66.
59 Tang J., Pugh W., Polonsky K.S., Zhang H. Preservation of insulin secretory responses to P2 purinoceptor agonists in Zucker diabetic fatty rats. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (1996) **270** E504–E512.
60 Fernandez-Alvarez J., Hillaire-Buys D., Loubatieres-Mariani M.M., Gomis R., Petit P. P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. Pancreas (2001) **22** 69–71.

61 Squires P.E., James R.F., London N.J., Dunne M.J. ATP-induced intracellular Ca2+ signals in isolated human insulin-secreting cells. Pflugers Arch. (1994) **427** 181–183.
62 Fischer B., Chulkin A., Boyer J.L. et al. 2-thioether and 5′-O-(1-thiotriphosphate) adenine derivatives as new insulin secretagogues acting through P2Y-receptors. J. Med. Chem. (1999) **42** 3636–3646.
63 Hillaire-Buys D., Shahar L., Fischer B. et al. Pharmacological evaluation and chemical stability of 2-benzylthioether-5′-O-(1-thiotriphosphate)-adenosine, a new insulin secretagogue acting through P2Y receptors. Drug Develop. Res. (2001) **53** 33–43.
64 Farret A., Linck N., Manteghetti M., Gross R., Petit P. A novel generation of P2Y-receptor agonists amplifying insulin release *in vitro*. Fundam. Clin. Pharmacol. (2005) **19** 208.
65 Coutinho-Silva R., Parsons M., Robson T., Lincoln J., Burnstock G. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. Mol. Cell. Endocrinol. (2003) **204** 141–154.
66 Sauvaire Y., Petit P., Broca C. et al. 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. Diabetes (1998) **47** 206–210.
67 Broca C., Fernandez-Alvarez J., Manteghetti M. et al. Intracellular signalling and 4-hydroxyisoleucine insulinotropic effect. Diabetologia (1999) **42** A129.
68 Broca C., Gross R., Petit P. et al. 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. Am. J. Physiol. (1999) **277** E617–E623.
69 Broca C., Breil V., Cruciani-Guglielmacci C. et al. The insulinotropic agent ID1101 (4-hydroxyisoleucine) activates insulin signaling in rat. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. (2004) **287** E463–E471.
70 Leibowitz M.D., Biswas C., Brady E.J. et al. A novel insulin secretagogue is a phosphodiesterase inhibitor. Diabetes (1995) **44** 67–74.
71 Springett G.M., Kawasaki H., Spriggs D.R. Non-kinase second messenger signaling: new pathways with new promise. BioEssays (2004) **26** 730–738.
72 Kashima Y., Miki T., Shibasaki T. et al. Critical role of cAMP-GEFII.Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. J. Biol. Chem. (2001) **276** 46046–46053.
73 Kang G., Joseph J.W., Chepurny O.G. et al. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2′-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca2+-induced Ca2+ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. J. Biol. Chem. (2003) **278** 8279–8285.

Diabetologia (2007) 50:1384–1387
DOI 10.1007/s00125-007-0682-4

SHORT COMMUNICATION

Direct rosiglitazone-induced modifications in insulin secretion, action and clearance: a single-dose hyperglycaemic clamp study

A. Farret · H. Chevassus · B. Roux · P. Petit · F. Galtier

Received: 21 February 2007 / Accepted: 19 March 2007 / Published online: 8 May 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract
Aims/hypothesis In addition to the improvement in insulin sensitivity, it has been shown that thiazolidinediones modulate beta cell function and insulin clearance in type 2 diabetic subjects. However, interactions between all these actions, and confounding factors due to co-morbidities and co-treatments in diabetic individuals, complicate the identification of specific effects. The aim of this pilot study was to investigate the potential acute effects of rosiglitazone on beta cell function and insulin sensitivity by the hyperglycaemic clamp technique in healthy volunteers.
Subjects and methods Twelve healthy men were included in a randomised, double-blind crossover study. Rosiglitazone (8 mg) or placebo was given orally 45 min before the hyperglycaemic clamp (10 mmol/l for 2 h).
Results The second phase of the insulin response was significantly decreased by rosiglitazone: 13,066±1,531 vs 16,316±2,813 pmol l^{-1} 110 min in controls ($p<0.05$), without change in the first phase. Serum C-peptide was not modified. Rosiglitazone treatment significantly increased insulin clearance (molar ratio of the C-peptide to insulin AUCs: 12.80± 1.34 vs 11.38±.33, $p<0.05$) and the insulin sensitivity index (12.0±1.5 vs 8.5±1.1 μmol m^{-2} min^{-1} $pmol^{-1}l$, $p<0.01$).
Conclusions/interpretation The present results show that a single dose of rosiglitazone rapidly increases insulin clearance and insulin sensitivity index in healthy volunteers, with no direct effect on insulin secretion. The precise mechanisms mediating these actions remain to be determined. ClinicalTrials.gov ID no.: NCT00285142

Keywords C-Peptide · Diabetes · Healthy volunteers · Hyperglycaemic clamp · Insulin clearance · Insulin secretion · Insulin sensitivity · Rosiglitazone · Thiazolidinediones

Abbreviations
PPAR peroxisome proliferator-activated receptor

Introduction

Thiazolidinediones are high-affinity peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ ligands [1]. In addition to their effect on insulin sensitivity, animal studies and long-term clinical studies have reported thiazolidinedione-induced modifications of beta cell function. This action can be either direct, or secondary to the improvement of insulin sensitivity. More recently, rosiglitazone was shown to increase insulin clearance in type 2 diabetic subjects after 12 weeks [2] and 16 weeks [3] of treatment. Although incompletely understood, this effect was considered to be secondary to a decreased liver fat content [3].

A. Farret · H. Chevassus · B. Roux · F. Galtier
CHU Montpellier, Centre d'Investigation Clinique,
Montpellier, France

A. Farret · H. Chevassus · B. Roux · F. Galtier
INSERM, CIC 0001,
Montpellier, France

P. Petit
Université Montpellier I, CNRS UMR 5232,
Montpellier, France

F. Galtier (✉)
Centre d'Investigation Clinique, Hôpital St Eloi,
80 Avenue Augustin Fliche,
34295 Montpellier Cedex 05, France
e-mail: f-galtier@chu-montpellier.fr

In an integrated system such as the human body, and after repeated administration, interactions between all these actions hamper the precise identification of specific effects. To differentiate between direct and secondary effects, evaluating immediate pharmacological actions after a single-dose administration can be helpful. To date, there are no data concerning acute effects of thiazolidinediones in humans. In addition, most evaluations were conducted in diabetic subjects in whom the underlying pathology, possible co-morbidities and co-treatments lead to various confusing factors. Healthy volunteers are a robust model allowing the investigation of pharmacological effects in humans with as few confounding factors as possible. Therefore, the aim of this pilot study was to investigate the potential acute effects of rosiglitazone on beta cell function and insulin sensitivity by the hyperglycaemic clamp technique in healthy volunteers.

Subjects and methods

The protocol, approved by the local ethics committee, was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki as revised in 2000 and the Guideline for Good Clinical Practice (ICH Topic E6, 1996).

Subjects Twelve healthy Europid men, aged 26.5±1.5 years, with normal (21.7±0.4 kg/m^2) and stable BMI, normal glycaemia (4.7±0.1 mmol/l) and insulinaemia (31.2±4.6 pmol/l) were included in this study after informed consent.

Study design This was a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled crossover study. Participants attended the research centre twice, once for the placebo session and once for the rosiglitazone session, conducted in random order, separated by a 6 week washout period.

Investigations At 07.00 hours, after an overnight fast at the study centre, a venous catheter was inserted into each forearm, one for administration of 30% dextrose (1.67 mol/l), the other for blood sampling. Rosiglitazone (8 mg) or placebo was administered orally 45 min before the onset of the dextrose infusion. Blood glucose was clamped at 10 mmol/l for 120 min according to DeFronzo et al. [4]. Briefly, participants received a priming dose based on their surface area and initial blood glucose. Continuous dextrose infusion was started 15 min later at a rate adjusted every 5 min on the basis of the prevailing plasma glucose concentrations.

Plasma samples for glucose were taken at −50, −45, −30, −15 and 0 min, then every 5 min after starting the glucose infusion. After centrifugation (6,700 *g*, 1 min), glucose was immediately analysed (Glucose Analyser 2300 Stat Plus; System Industry, Bourg St Andeol, France) and plasma was frozen at −20°C for later laboratory glycaemia confirmation.

Samples were taken at −50, −45, −30, −15, 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 and 120 min for serum insulin and C-peptide and at −45, −30, −15, 0, 15, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 min for plasma rosiglitazone. After centrifugation at 2,500 *g*, serum and plasma were immediately frozen at −20°C.

Immediately after discontinuation of the glucose infusion, urine was collected to determine urinary glucose excretion.

Biochemical analysis Serum insulin and C-peptide were measured by RIA (BI-INSULIN IRMA and IRMA-C-PEP; CIS Bio-international, Gif-sur-Yvette, France). Plasma glucose was assayed by the glucose oxidase method; rosiglitazone concentrations were assayed by HPLC and tandem mass spectrometric detection (LC-MS/MS; Pharma Bio-Research Group BV, Zuidlaren, the Netherlands).

Calculated indexes First and second phases of insulin and C-peptide responses were the AUCs of their concentrations from 0 to 10 min and 10 to 120 min, respectively. The insulin sensitivity index was the mean glucose infusion rate divided by the mean plasma insulin concentration from 60 to 120 min, after correcting for urinary glucose excretion [4]. AUCs were determined by the trapezoidal rule.

Fasting glucose and insulin levels were the average of two baseline samples. Insulin clearance was assessed as the molar ratio of the C-peptide to insulin AUCs [5] for each phase of the insulin response and for the total duration of the clamp.

Statistical analysis Results are expressed as means±SE. Comparisons of means were performed by repeated-measures ANOVA with assessment of carry-over effect, after $\log_e$ transformation for non-parametric variables. Pearson correlations after logarithmic transformation and Spearman correlations were used when appropriate. Systat 10.0 software for Windows from SPSS (Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The level of significance was set at $p<0.05$.

Results

Mean baseline glycaemia was similar between the treatment and the placebo sessions (5.4±0.1 vs 5.3±0.1 mmol/l, respectively, NS). During the hyperglycaemic clamp, mean glycaemia was identical for the two sessions (10.2±0.1 mmol/l, Fig. 1a). Plasma rosiglitazone concentrations peaked at 875.5±203.1 nmol/l (415±96 μg/l) at 0 min, then

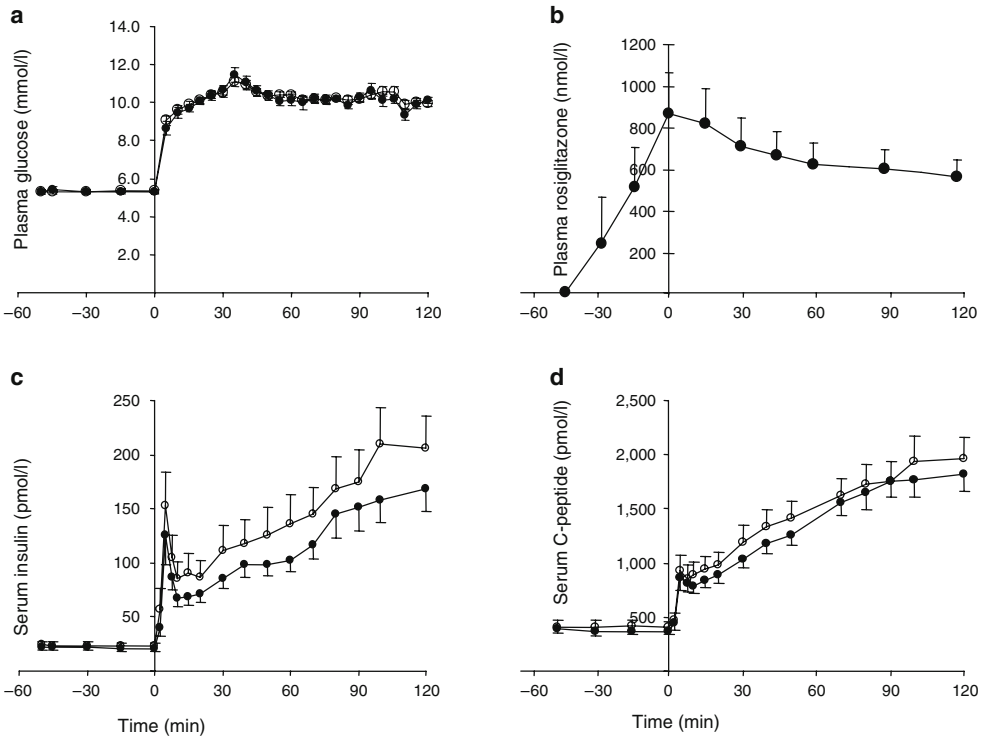


Fig. 1 Mean glucose (**a**), rosiglitazone (**b**), insulin (**c**) and C-peptide (**d**) concentrations after treatment administration and during the hyperglycaemic clamp: *closed circles*, rosiglitazone session; *open circles*, placebo session; to convert rosiglitazone levels from nmol/l to μg/l, multiply by 0.474

decreased and plateaued at about 600 nmol/l (300 μg/l) from 45 min onwards (Fig. 1b).

Figure 1c and d displays the glucose-induced modifications of insulin and C-peptide concentrations. Rosiglitazone did not modify baseline hormone concentrations (insulin: 21.0±2.1 vs 23.4±2.6 pmol/l, NS; C-peptide: 369±36 vs 408±56 pmol/l, NS). Regarding the insulin response, there was no treatment effect on the first phase ($AUC_{insulin\ 0–10}$: 742±121 vs 924±181 pmol l^{-1} 10 min, NS), whereas the second phase was significantly decreased in the presence of rosiglitazone ($AUC_{insulin\ 10–120}$: 13,066±1,531 vs 16,316±2,813 pmol l^{-1} 110 min, $p<0.05$). In contrast, serum C-peptide concentrations remained similar between rosiglitazone and placebo sessions, during both the first phase ($AUC_{C\text{-}peptide\ 0–10}$: 6,699±675 vs 7,285±989 pmol l^{-1} 10 min, NS) and the second phase ($AUC_{C\text{-}peptide\ 10–120}$: 155,018±12,691 vs 167,962±17,939 pmol l^{-1} 110 min, NS). Accordingly, the insulin clearance was significantly higher after rosiglitazone intake as compared with placebo (Table 1).

The insulin sensitivity index was significantly increased by rosiglitazone (Table 1). The change in insulin sensitivity index (difference between the rosiglitazone and placebo sessions) correlated neither with the changes in insulin AUC ($r=0.196$, p=NS) nor with the change in insulin clearance ($r=-0.154$, p=NS).

No carry-over effect was observed.

Discussion

In this study, we report for the first time acute effects of a thiazolidinedione on both insulin sensitivity and insulin clearance indexes in human subjects after a single oral dose.

Table 1 Comparison of glucose and insulin parameters between the rosiglitazone and placebo sessions: means±SE

	Session	
	Placebo	Rosiglitazone
Mean plasma $insulin_{60–120\ min}$ (pmol/l)	180.7±29.2	147.8±19.3
Glucose infusion $rate_{60–120\ min}$ (μmol m^{-2} min^{-1})	1,328±159	1,553±166
Insulin sensitivity index (μmol m^{-2} min^{-1} $pmol^{-1}$ l)	8.5±1.1	12.0±1.5**
Insulin clearance (molar ratio of C-peptide to insulin AUCs)		
0–10 min	8.96±1.03	10.02±0.87*
10–120 min	11.55±1.37	13.01±1.40*
0–120 min	11.38±1.33	12.80±1.34*

*$p<0.05$, **$p<0.01$ (rosiglitazone session vs placebo session)

The hyperglycaemic clamp technique is considered the gold standard to evaluate beta cell function, and provides an accurate estimation of insulin sensitivity [6]. Our experimental conditions for glycaemia and rosiglitazone concentrations were appropriate. One limitation of our methodology is the estimation of insulin clearance by the ratio $AUC_{C\text{-peptide}}$: $AUC_{insulin}$ instead of deriving insulin secretion rates by deconvolution of C-peptide concentrations. We preferred this method because given the high individual variability in C-peptide kinetics [7], using fixed standard kinetic parameters in a small sample may be erroneous.

Both animal studies and long-term human studies in type 2 diabetes suggest beneficial effects of thiazolidinediones on pancreatic beta cells, but it remains unclear whether it is a direct effect or secondary to modifications in insulin sensitivity and glucotoxicity. In our acute model, the reduction in insulin concentrations associated with a conserved C-peptide response, suggests an immediate increase in insulin clearance, consistent with the long-term increase previously described [3]. In this latter study, the authors proposed that the rosiglitazone-associated rise in insulin clearance could be secondary to a decreased liver fat content [3]. Here we suggest another mechanism, as the immediate increase of insulin clearance following rosiglitazone intake makes it unlikely to be accounted for by a modification in fat content. Moreover, as the change in insulin clearance is not correlated with the change in the insulin sensitivity index, it is more likely to be a direct effect of rosiglitazone rather than a consequence of the change in insulin sensitivity.

The insulin sensitivity index was immediately increased after acute rosiglitazone intake. One limitation of our methodology is that clamp studies cannot differentiate between an authentic effect on insulin sensitivity or an insulinomimetic effect. Our results challenge the contention that thiazolidinediones act via PPAR-γ-dependent gene expression only, as the rapid onset of the insulin-sensitising action is not compatible with a modulation of gene transcription [8]. Alternatively, a rapid-onset insulin-independent stimulation of glucose uptake was also demonstrated after thiazolidinedione administration in several cell lines. Other explorations are needed to better examine glucose utilisation after acute rosiglitazone administration.

In conclusion, we demonstrated an acute effect of a single dose of rosiglitazone on insulin clearance and insulin sensitivity index in healthy volunteers, suggesting new aspects of thiazolidinedione action in humans. The therapeutic implications of these findings remain to be evaluated.

Acknowledgements The expert technical assistance of F. Costa, I. Gabillaud and A. Massebiau (research nurses) is gratefully acknowledged. We thank A. Bonardet, B. Bories-Azeau, A. Cadène, J. Foppolo, P. Rambourg and A.-M. Puech-Cathala for their contribution. We also thank S. L. Salli for presubmission editorial assistance. This study was sponsored and financed by the Montpellier University Hospital and received an additional grant from GlaxoSmithKline Laboratory (Marly-le-Roi, France).

Duality of interest None of the authors has a conflict of interest regarding the content of this paper.

References

1. Lehman JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). J Biol Chem 270:12953–12956
2. Kim SH, Abbasi F, Chu JW et al (2005) Rosiglitazone reduces glucose-stimulated insulin secretion rate and increases insulin clearance in nondiabetic, insulin-resistant individuals. Diabetes 54:2447–2452
3. Tiikkainen M, Hakkinen A-M, Korsheninnikova E, Nyman T, Makimattila S, Yki-Jarvinen H (2004) Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. Diabetes 53:2169–2176
4. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979) Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol 237:E214–E223
5. Polonsky KS, Given BD, Hirsch L et al (1988) Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. J Clin Invest 81:435–441
6. Mitrakou A, Vuorinen-Markkola H, Raptis G et al (1992) Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp. J Clin Endocrinol Metab 75:379–382
7. Polonsky KS, Licinio-Paixao J, Given BD et al (1986) Use of biosynthetic human C-peptide in the measurement of insulin secretion rates in normal volunteers and type I diabetic patients. J Clin Invest 77:98–105
8. Brunmair B, Gras F, Neschen S et al (2001) Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated changes in gene expression. Diabetes 50:2309–2315

2.2 Les récepteurs purinergiques

2.2.1 Historique et classification

2.2.1.1 Généralités

Les récepteurs purinergiques membranaires ont été découverts dans les années 70. L'adénosine ainsi que ses dérivés phosphorylés, l'adénosine monophosphate (AMP), l'adénosine diphosphate (ADP) et l'adénosine triphosphate (ATP) avaient été tout d'abord considérés pour leurs fonctions intracellulaires ; ces molécules interviennent en effet dans le fonctionnement cellulaire comme substrats énergétiques ou comme constituants de cofacteurs enzymatiques, ainsi que dans la réplication cellulaire. Puis leur rôle en tant qu'agonistes de récepteurs membranaires purinergiques a été peu à peu mis en évidence ; de nombreux travaux ont montré des effets inhibiteurs ou excitateurs de ces composés sur de nombreux tissus et organes.

Les récepteurs purinergiques ont une localisation ubiquitaire (3, 31) ; ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques (31, 32, 33) comme par exemple la fonction cardiaque (259), la fonction pulmonaire (260), le tonus musculaire lisse des vaisseaux et des organes, l'agrégation plaquettaire, la neuromodulation centrale et périphérique, les sécrétions exocrines et endocrines,

la réponse immunitaire, l'inflammation, la douleur (239), la modulation de la fomation osseuse (179), l'homéostasie énergétique et la régulation des adipocytes (146, 178).

Le système purinergique joue probablement un rôle important dans l'homéostasie glucido-lipidique, puisqu'il est retrouvé dans de nombreux tissus impliqués, comme le pancréas endocrine, le tissu adipeux ou le système nerveux.

L'hétérogénéité des sous-types des récepteurs purinergiques exprimés dans les différents tissus offre la possibilité de développer des nouvelles molécules spécifiques de certains organes ou tissus pour d'éventuelles applications thérapeutiques. D'intenses recherches sont menées dans de nombreuses disciplines (algologie, cardiologie, pneumologie, neurologie, cancérologie, gastro-entérologie, endocrinologie…). Il existe déjà une application thérapeutique ; il s'agit d'antagonistes des récepteurs purinergiques plaquettaires P2Y12 aux propriétés anti-agrégantes plaquettaires (193) ; la ticlopidine, commercialisée sous le nom de Ticlid® (F.Hoffman-La Roche) et le clopidogrel, commercialisé sous le nom de Plavix® (Bristol-Myers Squibb/Sanofi-Synthelabo).

Des chercheurs ont modélisé le récepteur P2Y1 humain afin de cribler à l'échelle industrielle différents ligands qui pourraient avoir des implications thérapeutiques (120).

2.2.1.2 Classification des récepteurs

Un effort permanent de classification des récepteurs purinergiques est effectué ; ils peuvent être classés de différentes manières.

Un premier niveau de classification est basé sur la caractérisation des **propriétés pharmacologiques** de ces récepteurs en fonction de l'affinité de différents agonistes et antagonistes (29, 125, 243). Ainsi, on distingue les récepteurs P1 (ou récepteurs à l'adénosine) liant sélectivement l'adénosine et les récepteurs P2 reconnaissant sélectivement les nucléotides ATP, UTP, ADP ou UDP. Un récepteur a par exemple été caractérisé de cette façon, le récepteur P2Y des cellules endothéliales de l'aorte de Souris (105), de même pour les récepteurs P2Y11 (49) ou P2Y13 humains (165).

Les récepteurs P1 et P2 sont eux-même subdivisés : les P1 en A_1, A_{2A}, A_{2B} et A_3 et les P2 en P2X et P2Y (2, 84). L'ancienne nomenclature distinguant les P2X, P2Y, P2U et P2Z a été abandonnée.

Les P2X sont des récepteurs ionotropes alors que les récepteurs P2Y, métabotropes, sont couplés aux protéines G et possèdent sept domaines transmembranaires. Chaque famille présente plusieurs sous-types : sept sous-types caractérisés pour la famille des P2X : P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 P2X6 et P2X7 (72) et huit sous types caractérisés pour la famille des P2Y : P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14 (1). Les récepteurs P2Y ont une affinité variable pour les purines (ADP, ATP) ou pyrimidines

(UDP, UTP) (1). Ainsi, les récepteurs P2Y2 sont aussi bien activés par les purines que les pyrimidines (ATP et UTP) alors que les récepteurs P2Y4 et P2Y6 sont activés sélectivement par les pyrimidines (UTP pour P2Y4, UDP pour P2Y6) et que les récepteurs P2Y1, P2Y11, P2Y12 et P2Y13 sont sélectifs des purines (1).

Mais la sélectivité des agonistes et antagonistes est parfois insuffisante pour distinguer clairement les différents sous-types de récepteurs, il existe donc d'autres moyens pour les classer.

L'étude du **mécanisme de signalisation intra-cellulaire** est un autre moyen pour caractériser ces récepteurs. La plupart des récepteurs P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6) sont couplés à la phospholipase C aboutissant à la formation d'IP_3 et à la mobilisation du calcium intracellulaire, augmentant le Ca^{2+} libre cytosolique (29, 64, 84, 196). Le récepteur P2Y11, également couplé à la phospholipase C, induit aussi l'activation de l'adénylate cyclase via la protéine Gs (48). Par ailleurs, les récepteurs P2Y12, P2Y13 et P2Y14 sont couplés à l'inhibition de l'adénylate cyclase via la protéine Gi (1).

Enfin, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, la **caractérisation génétique** de ces récepteurs est désormais possible. Le premier récepteur purinergique a été cloné en 1993 (247) et depuis, de nouveaux récepteurs sont séquencés et clonés régulièrement chez l'animal et chez l'homme, correspondant parfois à des récepteurs jusqu'ici «orphelins» (85, 215, 258). Actuellement, les

huit sous-types de récepteurs P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 et P2Y14) ont été clonés (72).

La **distribution tissulaire** de ces récepteurs peut être également étudiée par immuno-précipitation et hybridation in situ. Cette technique permet également de mieux caractériser ces récepteurs (142).

Mais l'étude de ces récepteurs, que ce soit sur le plan pharmacologique, fonctionnel ou moléculaire, reste complexe.

En effet, dans de nombreux types cellulaires, on retrouve une **co-expression** de différents sous-types de récepteurs P2.

Leur expression peut également varier au cours du **développement** ou dans certaines **conditions pathologiques**. La proportion de différents sous-types au sein d'un même tissu peut être modulée (50).

De plus, l'effet de certains agonistes peut varier en fonction du nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule (204).

Par ailleurs, des nucléotides peuvent être agonistes pour un sous-type de récepteur et antagonistes pour un autre, avec des différences également entre les espèces. Par exemple, l'ATP est un antagoniste du récepteur P2Y4 humain mais un agoniste du récepteur P2Y4 du Rat et de la Souris (204).

Enfin, il existe des ectonucléotidases/exonucléotidases dégradant l'ATP à la surface cellulaire (148, 204) et qui jouent probablement un rôle physiologique ; ceci peut donc également compliquer l'interprétation des résultats ; c'est

d'ailleurs la raison pour laquelle des analogues structuraux stables ont été synthétisés et sont utilisés en pharmacologie.

2.2.2 Le système purinergique de la cellule β pancréatique

Nous allons étudier maintenant plus précisément les récepteurs purinergiques pancréatiques. Le pancréas exocrine exprime des récepteurs P2X et P2Y modulant la sécrétion exocrine (175), mais nous ne développerons pas ce chapitre. Différents types de cellules du pancréas endocrine expriment également des récepteurs purinergiques mais nous ne nous intéresserons qu'aux cellules β qui sont responsables de la sécrétion insulinique.

2.2.2.1 Rôle du système purinergique de la cellule β pancréatique

On sait depuis longtemps que le système purinergique pancréatique est impliqué dans l'insulino-sécrétion puisqu'il y a une co-sécrétion d'ATP lorsque l'insuline est sécrétée (151, 176). Dans le pancréas endocrine, les nucléotides se liant aux récepteurs purinergiques membranaires exercent une modulation physiologique autocrine et paracrine de la fonction β-cellulaire.

2.2.2.1.1 Synchronisation et rythmicité

Il est bien démontré maintenant que la sécrétion d'insuline *in vivo* est pulsatile (93), et que cette propriété est essentielle pour éviter la «down-régulation» du récepteur de l'insuline (92) et le développement d'une insulino-résistance (184). Des oscillations synchronisées ont été détectées *in vitro* dans le pancréas isolé (222), dans des groupes d'îlots isolés et dans les cellules β à l'intérieur des îlots (89). Différents mécanismes ont été proposés, en particulier la présence d'une innervation non adrénergique non cholinergique (221). Au niveau cellulaire, la pulsatilité de la sécrétion est liée aux oscillations de la concentration intracellulaire de calcium. En présence de glucose, la cellule β se comporte comme un oscillateur biologique avec des dépolarisations rythmiques permettant l'influx de calcium (109). Il existe une grande variabilité des oscillations de concentration de calcium entre les cellules ; pourtant, les cellules β ont un rythme commun quand elles sont couplées fonctionnellement par des jonctions intercellulaires, appelées «gap jonctions» (39, 167). A l'intérieur des cellules, des facteurs diffusibles sont complémentaires des gap jonctions pour coordonner l'activité oscillatoire des cellules β (97), l'effet de synchronisation de ces facteurs peut être lié à la génération de pics calciques intracellulaires transitoires ayant pour effet d'interrompre temporairement l'entrée de calcium en activant un courant potassique repolarisant (63). L'ATP a un rôle de coordonnateur pour la sécrétion en générant de tels pics calciques sans élévation soutenue de la concentration de calcium (95).

A côté des molécules diffusibles comme l'oxyde nitrique (96) et le monoxyde de carbone (161), l'ATP a été proposé comme acteur dans la coordination des signaux calciques des cellules β et la synchronisation des événements calcium-dépendant (39).

Utilisant un modèle d'ondes calciques intercellulaires induites mécaniquement dans la lignée cellulaire RINm5F, ces auteurs (39) rapportent que la synchronisation des pics calciques intracellulaires induits par des stimuli physiologiques pourrait résulter de deux mécanismes distincts : une propagation par l'intermédiaire des "gap jonctions", la dépolarisation de la membrane plasmatique et l'activation des canaux calciques voltage-dépendants ou une propagation par la stimulation des récepteurs P2 par l'ATP sécrété, activation de la phospholipase C, génération d'IP_3 et mobilisation des réserves intracellulaires de calcium .

Le rôle de l'ATP externe dans la communication intercellulaire a été étudié dans les cellules β de souris ob/ob (94, 108). La libération intermittente d'ATP des terminaisons nerveuses synchronise les îlots en un rythme commun en remplaçant les oscillations calciques ordinaires par une oscillation anticipée, due à la fermeture des canaux potassiques ATP dépendants induite par la phospholipase A_2. De plus, l'ATP génère des pics calciques intracellulaires synchronisés, ce qui conduit à la rythmicité des cellules β en interrompant leur activité électrique. Ces pics calciques activent aussi l'exocytose, conduisant à une libération intermittente d'ATP. Il a donc été proposé que les cellules β, d'un

côté reçoivent un signal ATP d'origine neuronale avec des effets de coordination sur les oscillations de Ca^{2+} et l'activité sécrétoire, et de l'autre propagent ce message aux cellules adjacentes par une libération intermittente d'ATP, et un couplage par les gap jonctions.

Savoir quel sous-type de récepteur est impliqué dans ces effets demeure une question non résolue. Un récepteur P2U (P2Y2) a d'abord été proposé par Cao et ses collaborateurs (39) ; cependant, l'induction de pics calciques transitoires par l'ATP, dans l'étude de Hellman et ses collaborateurs (108), était obtenue avec l'ADP et le 2-méthylthio-ATP, mais non avec l'UTP, suggérant l'implication d'un sous-type moléculaire différent. Il a été montré qu'antagoniser les récepteurs P2Y1 avec le MRS 2179 empêchait la pulsatilité de l'insuline (205), indiquant que ce sous-type de récepteur pourrait être impliqué ; cependant, il y a des différences entre les sensibilités des différentes hormones pancréatiques à cet antagoniste puisque, à concentration plus basse, ce composé supprime les sécrétions pulsatiles et antisynchrones de somatostatine et de glucagon , tout en maintenant la rythmicité de celle de l'insuline (206).

2.2.2.1.2 Modulation de l'insulino-sécrétion

2.2.2.1.2.1 Amplification

Les nucléotides dérivés de l'adénine, comme l'ATP, ont d'abord été connus pour stimuler l'insulino-sécrétion *in vivo* chez le rat (38) et chez les primates (153). Il a été démontré qu'ils potentialisent l'insulino-sécrétion induite par une

concentration modérément élevée en glucose (8,3 mmol/l), en activant les récepteurs pancréatiques P2 de la cellule β (43, 44, 157). Il est maintenant très bien démontré que l'ATP et différents analogues augmentent l'insulino-sécrétion dans différentes espèces, y compris chez l'homme.

L'ATP est stocké et co-sécrété avec l'acétylcholine, qui est impliquée dans le contrôle parasympathique de l'insulino-sécrétion, en particulier dans la période postprandiale précoce aussi appelée phase céphalique. Il a été prouvé que ce nucléotide agissait en synergie avec l'acétylcholine sur l'insulino-sécrétion (14). L'ATP est aussi co-sécrété avec l'insuline durant l'exocytose des granules de sécrétion. Ainsi, il peut exercer un feedback positif et amplifier l'insulino-sécrétion induite par le glucose, ce qui a été montré *in vitro* durant une augmentation physiologique de glucose (17). Finalement, il a également été montré qu'il pouvait augmenter l'amplitude de la première phase de la réponse insulinique dans des conditions d'insuffisance énergétique (42).

2.2.2.1.2.2 Inhibition

L'ATP est rapidement dégradé en adénosine par des ectonucléotidases (ectonucléosides triphosphates diphosphohydrolases de type I ou NTPDases) et l'adénosine peut à son tour réduire la sécrétion d'insuline via des récepteurs A1 de la cellule β, négativement couplés à l'adenylate cyclase (18, 37, 117). Cette action inhibitrice indirecte de l'ATP a bien été élucidée par Verspohl et ses collaborateurs (242). L'adénosine pourrait ainsi limiter l'effet amplificateur de

l'ATP, ces deux composés participant à un processus régulateur autocrine local. Il est probable que les NTPDases elles-mêmes soient impliquées dans la modulation de la sécrétion d'insuline (147), mais tous les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés. Il a été montré que l'ATP lui-même est capable de diminuer l'insulino-sécrétion chez la souris (186), en interagissant avec la machinerie sécrétoire à un niveau situé après l'étape d'élévation de la concentration intracellulaire de calcium (194). Ce résultat est d'ailleurs confirmé par certains de nos travaux (Léon C, Freund M, Latchoumanin O, Farret A, Petit P, Cazenave JP, Gachet C (2005) The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. Purinergic Signal, 1: 145-51) (pages 119 à 125), montrant une augmentation de l'insulino-sécrétion induite par le glucose majorée dans les îlots de souris déficientes en récepteur P2Y1 (152). Ces résultats ne sont peut être pas seulement imputables aux différences inter-espèces dans le profil d'expression des récepteurs P2, puisqu'on a montré récemment qu'un antagoniste du récepteur P2 amplifiait l'insulino-sécrétion induite par une concentration élevée de glucose dans les îlots de rat, avec suppression de la pulsatilité (205), ce qui reflète une action inhibitrice de l'ATP également dans cette espèce. Cet effet est cohérent avec l'inhibition des canaux calciques de type L médiée par le récepteur P2Y déjà rapportée (91), et représente une boucle de rétrocontrôle négatif générée par l'accumulation d'ATP autour de la cellule β durant la stimulation par une forte

concentration de glucose (20 mmol/l). Cela pourrait impliquer un sous-type de récepteur à faible affinité pour l'ATP.

2.2.2.1.3 Prolifération, différentiation et mort cellulaires

Le système purinergique est également impliqué dans la prolifération, la différentiation et la mort cellulaire (30, 72, 99), ainsi que dans le contrôle du cycle cellulaire (183).

Tan et ses collaborateurs ont montré l'implication du récepteur P2Y13 dans l'apoptose des cellules β pancréatiques (227). Plus récemment, l'activation du récepteur P2Y6 s'est révélée protectrice de l'apoptose induite par le TNF-α dans la lignée MIN6, alors que l'activation du récepteur P2Y1 était sans effet sur ce paramètre (10). Cependant, la connaissance de l'implication réelle du système purinergique dans la régulation de la vie cellulaire concernant les cellules β pancréatiques est encore peu documentée.

2.2.2.2 Les récepteurs purinergiques P2 de la cellule β du pancréas

De nombreuses recherches ont été réalisées pour étudier le système purinergique de la cellule β du pancréas. Il a été montré par exemple chez le Rat, que les deux sous-types de récepteurs P1 et P2 étaient présents dans les cellules β pancréatiques et modulaient différemment la sécrétion d'insuline (44, 115, 191).

Les récepteurs P_1, couplés à l'adénylate cyclase qu'ils inhibent, diminuent la sécrétion insulinique induite par le glucose (114, 117). Nous n'allons pas développer ce chapitre puisque nous nous intéressons bien sûr aux récépteurs dont l'activation augmente la sécrétion insulinique.

Nous allons en revanche, développer les récepteurs purinergiques P2 de la cellule β pancréatique.

Les cellules β pancréatiques expriment différents sous types de récepteurs purinergiques membranaires P2, qui induisent ou modulent la sécrétion d'insuline en se liant à l'ATP ou ses analogues structuraux. Les récepteurs membranaires P2 se différentient en deux sous types: P2X et P2Y (15). L'activation des deux sous-types de récepteurs P2X et P2Y induit une augmentation de la sécrétion insulinique, mais leurs mécanismes d'action sont différents.

Les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs métabotropiques P2Y ont été caractérisés par différentes approches expérimentales explorant la fonction de ces récepteurs, leurs expressions et leurs mécanismes de couplage stimulus-sécrétion.

2.2.2.2.1 Etudes fonctionnelles des récepteurs P2

De nombreuses recherches ont été menées pour évaluer la relation concentration-réponse de l'ATP et d'analogues de l'ATP ayant une sélectivité différente pour les sous types de récepteurs spécifiques. L'étude de la puissance

relative des agonistes a été une approche intéressante ; cependant, il existe une grande variabilité dépendant du modèle utilisé. Les principaux résultats peuvent être résumés dans le tableau ci-après qui est inspiré de la publication de Petit P. et ses collaborateurs en 2009 (189).

La CE_{50} est une mesure de la puissance d'un médicament ; il s'agit de la concentration de principe actif qui induit un effet correspondant à 50% de l'effet maximal.

A noter que nous avons indiqué dans ce tableau les résultats de nos travaux qui seront développés au chapitre «travaux expérimentaux» ; il s'agit de l'article : «P2Y receptor mediated modulation of insulin release by a novel generation of 2-substituted-5'-O-(1-boranotriphosphate)-adenosine analogues» publié en 2006 dans lequel nous exposons nos travaux sur les effets du 2-méthylthio-ATP-α-B sur l'insulino-sécrétion dans le modèle du pancréas isolé perfusé de Rat (pages 103 à 109) (74).

Relation concentration–réponse de différents agonistes des récepteurs P2 augmentant l'insulino-sécrétion (tableau d'après Petit et coll., 189, actualisé).

Composés	Modèles	Concentrations de glucose (mmol/l)	Gamme de concentrations (µmol/l)	CE_{50} (mol/l)	Références
ATP	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	1–300	$\sim 2 \times 10^{-5}$	157
ATP	Ilots isolés de Rat	8,3	300–3000		19
ATP	Cellules β INS-1	5,6 et 8,3	0,001–0,01	$\sim 3{,}2 \times 10^{-9}$	242
Agonistes P2					
α,β-méthylène-ATP	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	1–100		43
α,β-méthylène-ATP	Ilots isolés de Rat	8,3	5–200		19
Agonistes P2Y					
2-méthylthio-ATP	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	0,02–2	$\sim 0{,}5 \times 10^{-6}$	15
2-méthylthio-ATP	Cellules β INS-1	8,3	1–100	15×10^{-6}	242
ADPβS	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	0,005–0,5	$\sim 0{,}2 \times 10^{-6}$	16
ADPβS	Cellules β INS-1	8,3	0,01–0,1	$\sim 2 \times 10^{-8}$	242
ATPαS	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	0,15–15	$\sim 1{,}5 \times 10^{-6}$	119
Agonistes P2Y1					
2-méthylthio-ATP-α-B	Pancréas isolé perfusé de Rat	8,3	0,0015–5	$2{,}8 \times 10^{-8}$	Farret et coll. (2006) (74)
2-méthylthio-ADP	Lignée de cellules β MIN6	16,7	0,001–10	$4{,}5 \times 10^{-8}$	10
Agonistes P2Y6					
	Ilots isolés de	8,3	0,001–1	$3{,}2 \times 10^{-8}$	182
UDPβS	Souris	20	0,01–10	$1{,}6 \times 10^{-7}$	
Up_3U	Lignée de cellules β MIN6	16,7	0,001–10	$3{,}1 \times 10^{-8}$	10

2.2.2.2.1.1 Les récepteurs P2X

L'ATP via les récepteurs P2X, étudiés spécifiquement avec l'α,β-méthylène-ATP, a d'abord été connu pour induire une insulino-sécrétion transitoire, avec une désensibilisation rapide de la réponse (188). Cet effet transitoire est probablement physiologiquement approprié pour majorer la phase cholinergique céphalique, survenant avant toute augmentation de concentration plasmatique de glucose. L'insulino-sécrétion a été étudiée dans deux modèles distincts *in vitro*, le pancréas perfusé de Rat et les îlots isolés, incluant les îlots isolés humains (77). La stimulation par l'α,β-méthylène-ATP peut s'observer dans des conditions de basse concentration de glucose (3 mmol/l) : elle n'est donc pas gluco-dépendante. Le rôle de l'ATP et du zinc, qui sont co-sécrétés avec l'insuline, a aussi été étudié dans les îlots de Rat dans des conditions de concentration de glucose plus élevée (10 mmol/l) (199) ; ces molécules ont une profonde influence sur la régulation autocrine de l'insulino-sécrétion par l'intermédiaire des récepteurs canaux P2X activés par l'ATP et modulés par le zinc, induisant une réponse insulinique rapide. En outre, il a été montré récemment qu'une longue exposition des cellules β de la lignée cellulaire de hamster HIT-T15 à l'ATP induisait l'apoptose et la fragmentation de l'ADN via des récepteurs P2X7-like (149) ; l'activation des récepteurs P2X7 inhibe la sécrétion d'insuline induite par le glucose (150).

Le développement d'agonistes de récepteurs P2X de la cellule β dans un but thérapeutique n'est donc pas très pertinent puisque l'action amplificatrice de la sécrétion d'insuline par activation des récepteurs P2X n'est pas gluco-dépendante (15, 188).

2.2.2.2.1.2 Les récepteurs P2Y

Les récepteurs P2Y ont été bien étudiés dans les cellules β pancréatiques (187) ; leur activation par des agonistes sélectifs entraîne une amplification de l'insulino-sécrétion de façon gluco-dépendante, ce qui est d'un grand intérêt pour une éventuelle application thérapeutique. Cet effet a été tout d'abord caractérisé *in vitro* dans le pancréas isolé (15), et il a été montré que les analogues stables ADPβS et ATPαS sont des agonistes puissants (16, 119). Cet effet gluco-dépendant a aussi été montré dans les îlots pancréatiques humains (77), avec un profil d'effets des agonistes des récepteurs P2X et P2Y similaire à celui retrouvé dans les îlots de Rat. Les ligands sélectifs des récepteurs P2Y1, synthétisés pour être résistants à l'hydrolyse, sont des agonistes très puissants avec une grande efficacité (82, 119) ; cependant, ces agonistes manquent de spécificité puisque des effets vasculaires ont pu également être observés. Une seconde génération de composés présente une meilleure séléctivité pancréatique par rapport au tissu vasculaire : c'est ce que nous avons montré dans nos travaux développés dans le chapitre «travaux expérimentaux» et qui ont fait l'objet d'une publication en 2006 (74) (pages 103 à 109).

2.2.2.2.2 Expression des sous types de récepteurs P2

L'étude de l'expression des différents sous types de récepteurs met en jeu différentes techniques et peut se faire au niveau nucléique (amplification des ARNm par RT-PCR) ou au niveau protéique (Western Blot, immunohistochimie).

2.2.2.2.2.1 Expression des récepteurs purinergiques P2X

La cellule β pancréatique exprime différents récepteurs P2X. De l'ADN codant pour le récepteur **P2X4** a été isolé d'une librairie d'ADNc d'îlots pancréatiques de Rat (246) ; l'expression de l'ARNm de **P2X4** a été retrouvée dans plusieurs lignées cellulaires, comme les lignées RINm5F et HIT-T15. Plus récemment, différentes formes moléculaires de récepteurs P2X ont été observées dans les îlots de Langerhans en utilisant une méthode immunohistochimique (50). Il a été montré que les récepteurs **P2X1** et **P2X4** étaient absents dans le pancréas néonatal mais leur présence apparaît et s'accroît avec l'âge. Une immunoréaction nette des récepteurs **P2X7** a été observée dans les cellules α d'îlots de pancréas normaux et de pancréas diabétiques (50, 51), alors qu'aucune expression n'a pu être détectée dans les cellules β, ce qui contraste avec la caractérisation récente de récepteurs **P2X7** dans les cellules β HIT-T15 (149, 150). Récemment, les récepteurs **P2X1** et **P2X3** ont été détectés dans les cellules β d'îlots isolés de souris par une analyse immunocytochimique (214) ; les récepteurs **P2X3** ont été aussi observés dans les îlots humains (126). En outre,

l'expression des récepteurs P2X a été examinée dans les îlots de Rats normaux et dans les lignées cellulaires β immortalisées de Rat et de Souris : de multiples sous types de récepteurs P2X ont pu être déterminés, à savoir les sous types **P2X2**, **P2X3**, **P2X4** et **P2X6** (199).

Les différents sous types de récepteurs P2X exprimés dans les cellules β pancréatiques sont résumés dans le tableau ci-après qui est inspiré de la publication de Petit P. et ses collaborateurs en 2009 (189).

Les différents sous types de récepteurs P2X exprimés dans les cellules β pancréatiques

Sous type de Récepteur	Origine tissulaire
P2X1	Pancréas de rat et de souris (50) Cellules d'îlots de souris (214)
P2X2	Ilots de rat, modèles de cellules β de rat (INS-1) et de souris (βTC3) (199)
P2X3	Cellules d'îlots de souris (214), Ilots humains (126) Ilots de rat, modèles de cellules β de rat (INS-1) et de souris (βTC3) (199)
P2X4	Ilots de rat, cellules RINm5F et HIT-T15 (246) Pancréas de rat et de souris (50) Ilots de rat, modèles de cellules β de rat (INS-1) et de souris (βTC3) (199)
P2X6	Ilots de rat, modèles de cellules β de rat (INS-1) et de souris (βTC3) (199)
P2X7	Cellules HIT-T15 (150)

2.2.2.2.2.2 Expression des récepteurs purinergiques P2Y

Les études de souris déficientes en récepteurs **P2Y1** indiquent que ce sous type de récepteur joue un rôle physiologique dans le maintien de l'homéostasie glucidique, au moins en partie, par la régulation de l'insulino-sécrétion. La puissance relative de différents agonistes nous éclaire aussi sur le rôle des récepteurs **P2Y1** ou **P2Y1-like** dans l'amplification de l'insulino-sécrétion. Les études immunohistochimiques ont montré que les cellules β pancréatiques de rats normaux et diabétiques expriment le récepteur **P2Y4** (50, 51), ce qui a été confirmé par la suite dans les cellules INS-1 et RIN par analyse immunoblot et RT-PCR (21). L'équipe du Pr P. Petit a également montré récemment que les cellules β pancréatiques de la lignée cellulaire d'insulinome de rat INS-1, au niveau à la fois de l'ARN messager et des protéines, expriment cinq sous types moléculaires : **P2Y1**, **P2Y2**, **P2Y4**, **P2Y6** et **P2Y12** (159). Ce profil d'expression peut expliquer l'interaction complexe des ligands des récepteurs P2 avec des sites de liaison de haute et faible affinité pour l'ATPαS. L'expression des récepteurs **P2Y1** et **P2Y6** au niveau de l'ARNm a aussi été reportée dans les cellules β d'insulinome TC6 (177), dans les îlots et les cellules β de souris (182), ainsi que dans la lignée MIN6 d'insulinome de souris (10). L'expression du récepteur **P2Y13** a été également démontrée dans les îlots et les cellules β de souris (6), ainsi que dans la lignée MIN6 d'insulinome de souris (10). De plus, l'expression des récepteurs **P2Y11** et **P2Y12** a été rapportée dans des îlots

pancréatiques humains (160) ; ces récepteurs, décrits comme couplés à l'adenylate cyclase, sont intéressants si l'on considère les récepteurs P2Y comme des cibles potentielles pour des nouveaux insulino-sécrétagogues. Savoir si le pancréas humain exprime un sous-type de récepteur P2 tissu-spécifique médiant les réponses fonctionnelles de l'ATP, comme suggéré par Stam et ses collaborateurs (223), est une hypothèse intéressante mais toujours non résolue.

Les différents sous types de récepteurs P2Y exprimés dans les cellules β pancréatiques

Sous type de Récepteur	Origine tissulaire
P2Y1	Cellules β INS-1 (159), îlots et cellules β de souris (182)
	Cellules β d'insulinome TC6 (177)
	Cellules β d'insulinome de souris MIN6 (10)
P2Y2	Cellules β INS-1 (159)
P2Y4	Cellules β pancréatiques (rats normaux et diabétiques) (50)
	Ilots de rat, cellules INS-1 et cellules RIN (21)
	Cellules β INS-1 (159)
P2Y6	Cellules β INS-1 (159), îlots et cellules β de souris (182)
	Cellules β d'insulinome TC6 (177)
	Cellules β d'insulinome de souris MIN6 (10)
P2Y11	Cellules β humaines (160), cellules HIT-T15 (150)
P2Y12	Cellules β INS-1 (159), cellules β humaines (160)
P2Y13	Ilots de souris et cellules β (6)
	Cellules β d'insulinome de souris MIN6 (10)

2.2.2.2.3 Les mécanismes de couplage

Le couplage des récepteurs P2 de la cellule β a donné lieu à d'intensives recherches schématisées dans le tableau ci-après ; de nombreux mécanismes ont été impliqués, dépendants des fonctions étudiées et des conditions expérimentales.

Mécanismes de couplage des récepteurs P2 des cellules β.

Mécanismes	Agonistes	Résultats	Tissus/espèces	Références
Canaux potassiques ATP dépendants	ATP (100 µM)	Inhibition	Cellules RINm5F	8
	ATP (200 µM)	Inhibition	Cellules RINm5F	155
	ATP (100 µM)	Inhibition	Cellules β de souris	194
Conductance potassique	α,β-Me-ADP (100 µM)	Augmentation	Ilots de Souris	186
	α,β-Me-ATP (200 µM)	Réduction modérée	Ilots de Rat	188
Potentiels/courants membranaires	ATP (200 µM)	Dépolarisation	Cellules RINm5F	8
	ATP (CE_{50}: 2–3 µM)	Dépolarisation	Cellules RINm5F	155
	α,β-Me-ADP (100 µM)	Hyperpolarisation transitoire	Ilots de Souris	186
	α,β-Me-ATP (100 µM)	Courants entrant à décroissance rapide	Cellules β de souris	214
	ATP (100 µM)	Courants entrant à décroissance rapide	Cellules β de porc et humaines	214
Calcium libre cytosolique	ATP (1–200 µM)	Augmentation	RINm5F	8
	ATP (2–20 µM)	Augmentation	Cellules HIT-T15	88
	ATP (200 µM)	Augmentation transitoire	Ilots humains	139
	ATP (CE_{50}: 2–3 µM)	Augmentation	Cellules RINm5F	155
	ATP (5–50 µM)	Augmentation	Cellules β isolées humaines	220
	ATP (100 µM)	Augmentation	Cellules β de Rat	229
	2-méthylthioADP (0,001-10 µM)	Augmentation	Cellules MIN6	10
Influx de Ca^{2+}	α,β-Me-ADP (165 µM)	Augmentation	Ilots de Rat	191
Mobilisation de Ca^{2+}	ATP (1000 µM)	Augmentation	Ilots de Rat	19
	ATP (2–200 µM)	Augmentation	Ilots de Souris (ob/ob)	106
	ATP (100 µM)	Augmentation	Cellules β de Souris	194
Courants calciques	ATP, 2MeSATP, ADPβS	Inhibition	Cellules β de Rat	91
Accumulation d'IP3	ATP (1000 µM)	Augmentation	Ilots de Rat	19
	ATP (200 µM)	Augmentation	Ilots de Souris (ob/ob)	110
	ATP (200 µM)	Augmentation	Cellules RINm5F	8
	ATP (100 µM)	Augmentation	Cellules RINm5F	155
	2-méthylthioADP (0,001-10 µM)	Augmentation	Cellules MIN6	10
Accumulation d'AMPc	ADPβS (50 µM)	Augmentation	Ilots de Rat	45
	ATPαS (50, 150 µM)	Augmentation	Cellules β INS-1	45
Exocytose	ATP (100 µM)	Diminution	Cellules β de Souris	194
	ATP (1–100 µM)	Augmentation	Cellules β isolées de Rat	251

Des modifications de la conductance membranaire potassique par l'ATP extracellulaire ou ses analogues structuraux ont été montrées dans les îlots de Souris et les cellules β de Souris (186, 194) mais aussi dans les cellules d'insulinome RINm5F (155). Comme suggéré par Li et ses collaborateurs, l'ATP externe pourrait fermer directement le canal potassique ATP dépendant et dépolariser la cellule (155). Mais il a aussi été montré que l'ATP pouvait fermer le canal potassique ATP dépendant indirectement par l'activation de la phospholipase A2 (194). La comparaison de l'action des agonistes des récepteurs P2X et P2Y sur la conductance membranaire potassique suggère que le couplage avec les canaux ATP dépendants est dû aux récepteurs P2X et non aux récepteurs P2Y (188). Plus récemment, des courants entrants de décroissance rapide associés à des canaux ioniques régulés par l'ATP ont été rapportés dans les cellules β pancréatiques de Souris, de Porc et humaines (214).
On sait que l'ATP augmente la **concentration cytoplasmique de calcium libre** (8, 229), notamment dans les îlots pancréatiques humains et les cellules β isolées humaines (139, 220). A la fois une **augmentation de l'influx de calcium extracellulaire** (88, 191) et une **mobilisation du calcium intracellulaire** (19, 106, 155, 194, 220) ont été décrits. Un relargage localisé de calcium via des récepteurs IP_3 a été récemment montré dans le couplage d'un signal par l'ATP avec l'augmentation de l'exocytose dans des cellules β pancréatiques de Rat (251). D'un autre coté, dans les cellules β de Souris, l'inhibition de l'exocytose

calcium-dépendante par l'ATP résulterait d'une activation de la calcineurine, dépendant d'une protéine G (194).

Différents mécanismes relatifs aux récepteurs couplés aux protéines G ont également été impliqués, en fonction des conditions expérimentales.

L'hydrolyse de phosphoinositides a été rapportée dans de nombreuses études (8, 10, 19, 110, 155), mais on a montré aussi qu'une réponse insulinique pouvait se faire indépendamment de l'accumulation d'IP_3 (190).

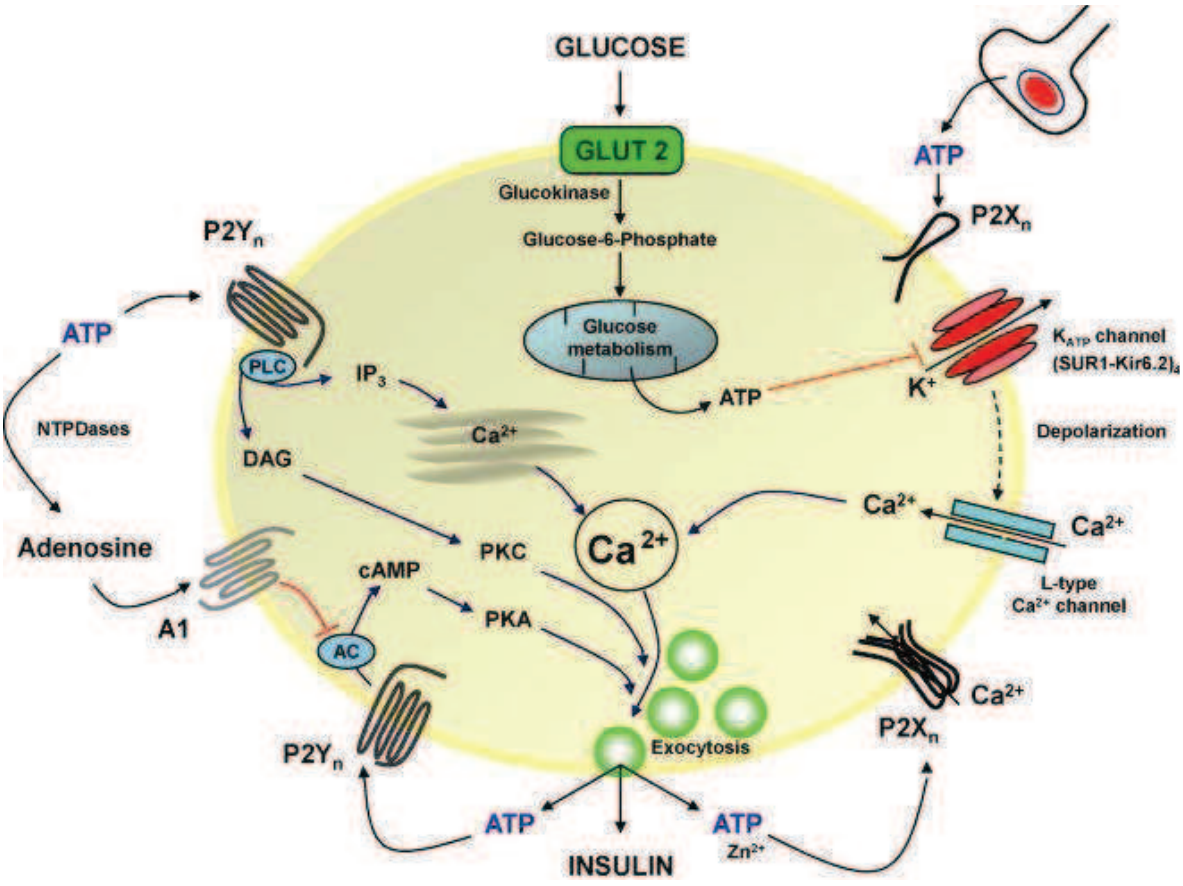
Plus récemment, il a été montré que l'activation des récepteurs P2Y pouvait activer la voie **AMPc/protéine kinase A,** le niveau de la réponse insulinique étant corrélé au niveau d'AMPc (45) ; la réponse insulinique était de plus supprimée quand l'adénylate cyclase ou la PKA était inhibée.

En outre, nos propres travaux, détaillés plus loin dans ce document (76) (pages 94 à 97) ont montré que la réponse à l'activation des récepteurs P2Y est clairement indépendante des canaux potassiques ATP dépendants et requiert le métabolisme du glucose.

Une représentation schématique des voies de signalisation des récepteurs P2 dans la cellule β selon la publication de Petit P. et ses collaborateurs en 2009 (189) peut être proposée.

Récepteurs purinergiques dans la cellule β-pancréatique

L'ATP est relargué par les terminaisons nerveuses et les granules sécrétoires d'insuline. L'ATP module l'insulino-sécrétion en interagissant avec le récepteur canal P2X multimérique modulé par le zinc (Zn^{2+}), autorisant l'influx de calcium (Ca^{2+}), et avec les récepteurs P2Y couplés aux protéines G. Ces derniers récepteurs sont couplés à la phospholipase C (PLC) et induisent la synthèse d'IP_3, ce qui mobilise le calcium du réticulum endoplasmique, et le diacylglycérol (DAG) qui stimule la voie de la protéine kinase C (PKC). Ils impliquent aussi l'adenyl-cyclase (AC) et la voie AMPc-protéine kinase A (PKA). Tous ces messagers contribuent à augmenter l'exocytose d'insuline. L'ATP est aussi dégradé par des ectonucléotidases (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases de type I, NTPDases) en adénosine qui, en interagissant avec les récepteurs A1, inhibe l'adenylate cyclase et inhibe l'AMPc, réduisant ainsi l'insulino-sécrétion.



3 Travaux expérimentaux

3.1 Introduction

Les récepteurs purinergiques membranaires P2Y de la cellule β pancréatique sont étudiés dans le Laboratoire de Pharmacologie du Pr Petit depuis plusieurs années. Les travaux menés jusqu'ici ont permis de montrer leur capacité à moduler la sécrétion d'insuline de façon gluco-dépendante ; ils représentent donc une cible d'un intérêt potentiel pour le traitement du diabète de type 2.

Dans le travail que nous présentons, nous avons tenté de mieux caractériser les mécanismes cellulaires mis en jeu par l'activation des récepteurs P2Y de la cellule β. Nous avons par ailleurs étudié les effets pancréatiques de nouveaux agonistes purinergiques synthétisés par l'équipe du Pr B. Fischer en Israël. Nous avons également voulu évaluer l'impact de l'activation de certains récepteurs purinergiques sur la prolifération cellulaire pancréatique. Enfin, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr C. Gachet pour étudier l'implication des récepteurs P2Y1 dans l'insulino-sécrétion.

3.2 Modèles expérimentaux

Nous avons utilisé différentes techniques et différents modèles expérimentaux pour mener à bien nos recherches.

3.2.1 Le pancréas isolé perfusé de Rat.

Un des modèles d'étude est le pancréas isolé perfusé de Rat.

3.2.1.1 Animaux

Les animaux sont des rats mâles albinos Wistar de l'élevage IFFA-CREDO (L'Arbresle, France), exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Ils sont âgés de 11 à 12 semaines et pèsent entre 320 et 340 g. Les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau jusqu'au moment de l'expérience.

3.2.1.2 Technique du pancréas isolé et perfusé

Cette technique mise au point par Loubatières (158) consiste à isoler entièrement le pancréas de tous les tissus voisins. Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg). Après laparotomie médiane, le pancréas est progressivement isolé de l'œsophage, de la rate, de l'estomac et du duodénum par ligature puis section des vaisseaux. Puis

le canal de Wirsung, les vaisseaux mésentériques supérieurs et l'artère rénale sont ligaturés et sectionnés avant d'introduire la canule de perfusion dans l'aorte abdominale, au niveau du tronc coeliaque, qui sera ligaturée de part et d'autre de la canule juste après sa pose, de manière à obtenir un cul de sac aortique. Enfin, le pédicule hépatique est ligaturé de même que la veine porte qui, elle, sera sectionnée immédiatement après les ligatures de l'aorte. Le liquide de perfusion va donc se substituer au sang, circuler dans le système artériel et veineux pancréatiques et s'évacuer par la veine porte sectionnée. Le pancréas, ainsi perfusé par son propre système artériel, est alors placé dans une cuve immergée dans un bain marie thermostaté à 37°C. La circulation du liquide de perfusion est assurée par une pompe péristaltique à pression constante (30 à 40 cm d'eau) afin d'obtenir un débit liquidien d'environ 2,5 ml/min en début d'expérimentation. Le milieu de perfusion est un tampon Krebs Ringer Bicarbonate à 2 g/l de sérum albumine bovine et ayant la composition ionique suivante (en mmol/l) : NaCl 108 ; KH_2PO_4 1,19 ; KCl 4,74 ; $CaCl_2$ 2,54 ; $MgSO_4.7H_2O$ 1,19 ; $NaHCO_3$ 18. Ce tampon est continuellement bullé par un mélange 5 % CO_2 / 95 % O_2 afin de maintenir le pH à une valeur proche de 7,35 et une oxygénation adéquate. Une période de stabilisation de 30 min est observée après la mise en perfusion de l'organe avant d'effectuer les prélèvements nécessaires au dosage de l'insuline. Chaque prélèvement dure 1 min et permet de déterminer le débit liquidien de l'organe, donc ensuite le débit en hormone (en multipliant la concentration en hormone obtenue en ng/ml par le

débit en ml/min). Les tubes de prélèvements sont immédiatement congelés à -20°C jusqu'au dosage de l'insuline. Cette technique est schématisée ci-après :

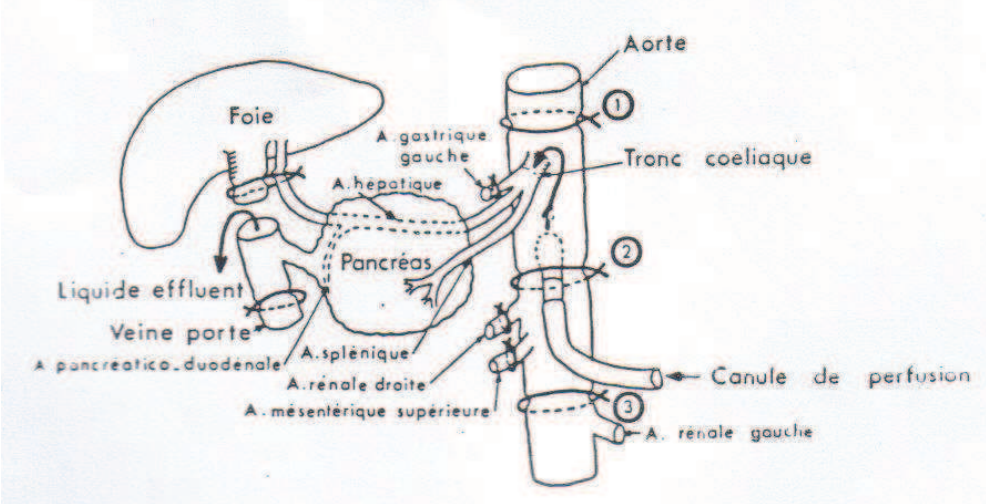


Schéma de la préparation du pancréas isolé

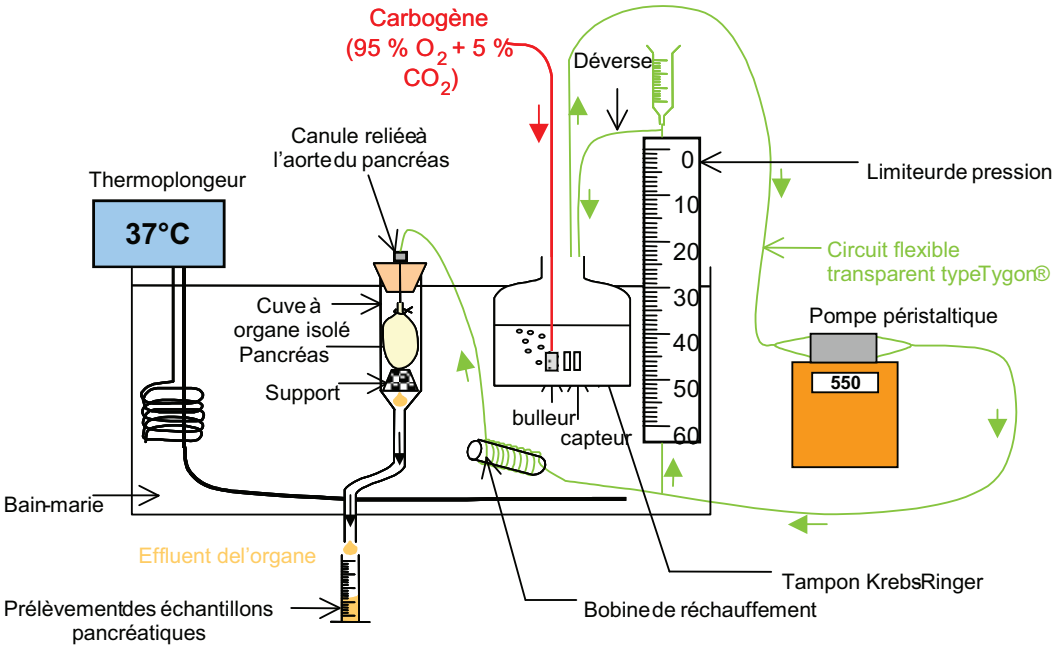


Schéma du dispositif de perfusion du pancréas isolé

3.2.1.3 Technique analytique : dosage de l'insuline

L'insuline contenue dans le liquide de perfusion est dosée selon une méthode radio-immunologique adaptée d'Herbert et ses collaborateurs (112). L'insuline à doser est mise en compétition avec une insuline marquée à l'iode 125 (Insuline-I^{125}, ICN, Paris) vis-à-vis d'une quantité fixe d'anticorps anti-insuline (Laboratoires ICN, Puteaux, France).

Le dosage est réalisé selon le protocole suivant :

Le premier jour, les échantillons sont dilués dans du tampon phosphate albuminé (phosphate monosodique 8 g/l et sérum albumine bovine 1g/l, pH = 7,4) ; à 100 µl d'échantillons dilués sont ajoutés 300 µl d'anticorps dilués au 1/10000.

Le deuxième jour, 300 µl d'Insuline-I^{125} sont déposés dans le mélange antigène-anticorps précédent. L'incubation est poursuivie pendant deux jours à 4°C.

Le cinquième jour, la fraction libre de l'insuline marquée est séparée de la fraction liée à l'anticorps par centrifugation dans du tampon phosphate contenant 2,5 g/l de dextran et 5 mg de charbon (charcoal, Sigma Chemical Company). Le culot de charbon retient la fraction libre alors que la fraction liée est évacuée dans le surnageant. Enfin, la radioactivité émise par la fraction libre est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

La sensibilité analytique est de 0,1 ng/ml. Les valeurs mesurées sont exprimées en ng/min.

3.2.1.4 Protocoles expérimentaux

Les protocoles expérimentaux reposent sur le principe suivant : la sécrétion insulinique est induite par des concentrations de glucose déterminées (conditions basales ou en incrément de glucose) et amplifiée par un agoniste des récepteurs P2Y, en comparaison avec les conditions témoins sans agoniste. Les conditions varient et seront détaillées pour chaque expérience dans les figures des résultats.

Une période d'adaptation de 30 min est observée après la mise en perfusion de l'organe avant de réaliser le premier prélèvement. Après une période basale de 15 minutes, des prélèvements sont effectués à la $3^{ième}$, $7^{ième}$, $12^{ième}$ et $17^{ième}$ minutes dans des conditions déterminées, puis une fois les conditions modifiées, les prélèvements sont réalisés toutes les minutes durant les sept premières minutes puis à la $12^{ième}$, $17^{ième}$ et $22^{ième}$ minute. Enfin, le pancréas isolé est re-soumis à des conditions basales de glucose et des prélèvements sont à nouveau effectués à la $7^{ième}$ et $17^{ième}$ minute pour contrôler l'intégrité fonctionnelle du pancréas.

3.2.1.5 Produits utilisés

Expériences explorant l'effet de nouveaux agonistes des récepteurs purinergiques pancréatiques:

Tous les dérivés de l'adénosine substitués en position 2 (dérivés boranotriphosphate) ont été synthétisés dans le laboratoire de chimie de

l'Université de Bar-Ilan en Israël, utilisant une méthode décrite par Nahum et ses collaborateurs (172) et ont été fournis gracieusement par le Professeur B. Fischer. Les deux diastéréoisomères ont été séparés par chromatographie en phase liquide à haute performance. Comme discuté déjà par leurs auteurs (172), leur configuration absolue ne peut pas être définie, et les deux diastéréoisomères sont donc désignés arbitrairement A et B.

3.2.2 La culture de la lignée cellulaire INS-1E

Un autre modèle expérimental *in vitro* utilisé est la culture cellulaire de la lignée INS-1E.

Il s'agit de cellules β issues de la lignée cellulaire INS-1E sécrétrices d'insuline (169) clonées à partir de la lignée cellulaire INS-1 issue d'insulinome de Rat, fournies par le Professeur CB. Wollheim (Genève, Suisse).

Les cultures cellulaires sont effectuées dans le milieu RPMI-1640 (sans L-glutamine et avec 11,2 mmol/l glucose), supplémenté avec 7,5% de sérum de veau foetal (SVF), 10 mmol/l HEPES, 1 mmol/l sodium pyruvate, 2 mmol/l L-glutamine, 50 μmol/l β-mercaptoethanol ; 100 UI/ml penicilline et 100 μg/ml de streptomycine.

3.2.3 Les îlots isolés de Souris

Le laboratoire du Pr C. Gachet (Strasbourg) nous a fourni des souris femelles sauvages et déficientes en récepteur P2Y1. Les îlots de Langherans de ces souris ont été isolés du pancréas par digestion à la collagénase suivant une technique inspirée de celle de Lacy et Kostianowsky (145). Les îlots ont été stabilisés pendant 45 minutes à 37°C dans un tampon Krebs Ringer Bicarbonate à 1 mg/ml de sérum albumine bovine (fraction V), supplémenté en glucose concentré à 5 mmol/l et ayant la composition ionique suivante (en mmol/l) : NaCl 108, KH_2PO_4 1,2, KCl 4,7, $CaCl_2$ 2,5, $MgSO_4$ 1,2, $NaHCO_3$ 18. Ce tampon était continuellement bullé par un mélange 5 % CO_2 / 95 % O_2 afin de maintenir le pH à une valeur proche de 7,4 et une oxygénation adéquate.

Par la suite, des lots de trois îlots de souris sauvages et de souris déficientes en récepteur P2Y1 étaient incubés pendant 60 minutes dans 1 ml de tampon Krebs Bicarbonate contenant différentes concentrations de glucose (3, 7, 11 et 20 mmol/l). A la fin de la période d'incubation, un échantillon du milieu était prélevé pour le dosage de l'insuline.

3.3 Résultats des différents travaux

3.3.1 Mécanismes de transduction intracellulaire des récepteurs purinergiques pancréatiques

Dans le travail que nous présentons, nous avons tenté de mieux caractériser les mécanismes cellulaires mis en jeu par l'activation des récepteurs P2Y de la cellule β : l'implication du canal potassique ATP-dépendant a été évaluée, ainsi que l'interaction avec le métabolisme intracellulaire du glucose. Les effets de l'ADPβS, agoniste des récepteurs P2Y, sur la sécrétion insulinique ont été étudiés dans différentes conditions : sous stimulation glucosée, dans des conditions dépolarisantes non métaboliques (sous l'effet d'un bloquant du canal potassique ATP-dépendant, le tolbutamide, et sous l'effet du KCl), et sous l'effet d'une invalidation pharmacologique des canaux potassiques ATP-dépendants (diazoxide + KCl) en présence de glucose 5 mmol/l et lors d'une stimulation glucosée (passage de 5 à 11 mmol/l).

L'interaction avec le métabolisme intracellulaire de glucose a également été analysée : les effets de l'ADPβS sur la sécrétion insulinique ont été étudiés sous l'effet du SNP. Enfin, l'interaction de l'ADPβS avec le méthylpyruvate et le méthylsuccinate a été évaluée.

Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal «Diabetes» en 2004 (76) (pages 94 à 97).

3.3.1.1 Méthodologie

La technique utilisée pour étudier les mécanismes de transduction des récepteurs purinergiques en conditions de fonctionnalité est la technique du pancréas isolé perfusé chez le Rat.

L'agoniste purinergique P2Y utilisé est l'ADPβS (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA). C'est un analogue spécifique et stable ; il est également puissant et efficace (environ 100 fois plus puissant que l'ATP, dans le pancréas isolé perfusé de Rat) (16, 113). Il est perfusé à une concentration de 0,5 µmol/l, capable d'induire un effet maximal.

Le tolbutamide, le diazoxide, le SNP, le méthylpyruvate, le méthylsuccinate et l'arginine sont fournis par Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, USA.

3.3.1.2 Résultats

Effets de l'ADPβS sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

L'ADPβS concentré à 0,5 µmol/l n'entraîne pas d'augmentation de la sécrétion d'insuline lorsque le glucose est à 5 mmol/l. En revanche, lorsque le glucose passe de 5 mmol/l à 11 mmol/l, l'ADPβS, à la même concentration, entraîne une amplification de la sécrétion d'insuline d'environ un facteur 3, tout en respectant les deux phases de sécrétion (premier pic précoce suivi d'un deuxième pic plus ample et durable).

Effets d'un inhibiteur du métabolisme de glucose sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose

L'inhibiteur du métabolisme de glucose utilisé est le sodium nitroprusside (SNP), c'est un donneur de monoxyde d'azote (NO). Il est utilisé à une concentration de 300 µmol/l. Lors d'une augmentation du glucose de 5 à 11 mmol/l, on étudie la sécrétion d'insuline induite par l'ADPβS : la première phase de sécrétion d'insuline n'est pas modifiée par la perfusion de SNP ; en revanche, la deuxième phase de sécrétion d'insuline est significativement inhibée par le SNP.

Effets de l'ADPβS sur la dépolarisation de la cellule β pancréatique

La perfusion de KCl à une concentration de 5 mmol/l dépolarise la membrane cellulaire et permet l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendants. On obtient ainsi des conditions de calcium permissif pour la sécrétion d'insuline.

La perfusion de KCl dans le milieu entraîne une réponse biphasique de l'insulino-sécrétion.

Lorsque l'on rajoute de l'ADPβS, la deuxième phase de l'insulino-sécrétion est augmentée significativement.

Des résultats similaires sont observés avec l'arginine.

L'effet du tolbutamide a été également étudié. Le tolbutamide est un sulfamide de première génération, qui ferme les canaux potassiques ATP dépendants ; c'est un agent dépolarisant non métabolique de la cellule β pancréatique. Il est perfusé à une concentration de 185 µmol/l. Le tolbutamide entraîne une insulino-sécrétion biphasique à un taux de glucose de 5 mmol/l ; lorsque l'ADPβS est ajouté, les effets du tolbutamide sont augmentés sur les deux phases de l'insulino-sécrétion.

Les effets du méthylpyruvate et du méthylsuccinate ont aussi été évalués.

P2Y Purinergic Potentiation of Glucose-Induced Insulin Secretion and Pancreatic β-Cell Metabolism

A. Farret,[1] M. Vignaud,[1] S. Dietz,[2] J. Vignon,[1] P. Petit,[1] and R. Gross[1]

Purine nucleotides and their analogs increase insulin secretion through activation of pancreatic β-cell P2Y receptors. The present study aimed at determining the role of glucose metabolism in the response to P2Y agonists and whether ATP-activated K^+ channels (K_{ATP} channels) are involved in this response. The experiments were performed in the rat isolated pancreas, perfused with a Krebs-bicarbonate buffer supplemented with 2 g/l bovine serum albumin under dynamic glucose conditions from 5 mmol/l baseline to 11 mmol/l. ADPβS (0.5 μmol/l) was selected as a stable and selective P2Y agonist. This compound, ineffective on the 5 mmol/l glucose background, induced a significant threefold increase in insulin release triggered by the glucose challenge. The effect of ADPβS was markedly reduced ($P < 0.001$) in the presence of an inhibitor of glucose metabolism. In addition to glucose, the ADP analog also amplified the β-cell insulin response to 15 mmol/l methyl pyruvate ($P < 0.05$), but it was ineffective on the insulin response to 2.5 mmol/l methyl succinate. A nonmetabolic stimulus was applied using tolbutamide (185 μmol/l). Insulin secretion induced by the K_{ATP} channel blocker was strongly reinforced by ADPβS ($P < 0.001$), which prompted us to check a possible interplay of K_{ATP} channels in the effect of ADPβS. In the presence of diazoxide 250 μmol/l and 21 mmol/l KCl, ADPβS still amplified the second phase of glucose-induced insulin secretion ($P < 0.001$). We conclude that P2Y receptor activation is able to promote insulin secretion through a mechanism, involving β-cell metabolism and a rise in intracellular calcium; this effect does not result from a direct inhibitory effect on K_{ATP} channels. *Diabetes* 53 (Suppl. 3):S63–S66, 2004

Purine nucleotides (ATP and ADP) and their analogs have been shown to increase glucose-induced insulin secretion through activation of P2 receptors present on pancreatic β-cells (1). These receptors were characterized as P2Y receptor subtypes (2), of which the structural analog ADPβS [adenosine-5′-*O*-(2-thiodiphosphate)] is a stable and potent agonist (3). The pharmacological properties of β-cell P2 receptors have been reviewed elsewhere (4).

The activation of P2Y receptors in vivo leads to an insulin response that is clearly dependent on the nutritional status of the animals and the plasma level of glucose; this action improves glucose tolerance (5). The glucose dependency of the insulin response brought about by P2Y receptor activation was also shown in vitro in rat (6) as well as in human islets (7). The stimulus-secretion coupling of β-cell P2 receptors is still a matter of investigation. Both an increased influx of extracellular calcium (8) and an intracellular calcium mobilization (9) have been reported. An increase in cytoplasmic free calcium concentration has been consistently observed (10). In human pancreatic islets and isolated human insulin-secreting cells, extracellular ATP was also shown to raise the cytoplasmic free Ca^{2+} concentration (11). In addition, alterations in membrane potassium conductance by extracellular ATP or structural analogs have also been described in mouse islets and single β-cells (12), as well as in RINm5F insulinoma cells (13). A slight decrease in the membrane potassium conductance has been reported in rat islets with a P2X but not with a P2Y agonist (6), and a P2X receptor subtype has been characterized, with functional activity at a low, nonstimulating glucose concentration. More recently, Chevassus et al. (14) showed that a P2Y receptor activation amplifies glucose-induced insulin secretion by activating β-cell adenylyl cyclase and the subsequent cAMP/protein kinase A signaling pathway in rat pancreatic islets and in the INS-1 secreting cell line.

The present study was designed to further investigate the mechanism whereby P2Y receptor activation amplifies insulin response in dynamic conditions that mimic a postprandial glucose challenge.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Experimental procedure. Experiments were performed in vitro in the isolated perfused pancreas from male Wistar albino rats (Charles River, Lyon, France). Rats weighing 340–360 g were housed in a light-controlled room and given free access to food and water in accordance with the national guidelines for the use and care of laboratory animals. After sodium pentobarbitone anesthesia (60 mg/kg i.p.), the pancreas was completely isolated from all the neighboring tissues, according to a technique previously described (15), and perfused in the presence of a 5 mmol/l glucose background. A 30-min adaptation period was allowed before the first sample was taken for insulin assay and was followed by a further 30-min control period before any change in glucose concentration, or in type of secretagogue, and ADPβS administration. Upon administration of various secretagogues in the presence or absence of ADPβS, pancreatic effluents were collected every minute during the first 5 min immediately after the beginning of the treatments. Additional samplings were performed after 10, 15, and 20 min. Effluents were measured in graduated test tubes and immediately frozen until insulin assay.

Chemicals. ADPβS [adenosine 5′-*O*-(2-thiodiphosphate)], glucose, sodium nitroprusside, tolbutamide, pyruvic acid methyl ester, succinic acid mono-

From the [1]Center for Pharmacology and Health Biotechnology, CNRS UMR 5160, Montpellier, France; and [2]Innodia, Montpellier, France.

Address correspondence and reprint requests to Dr. René Gross, Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, CNRS UMR 5160, Faculté de Médecine, Institut de Biologie, 4 Boulevard Henri IV, CS89508, 34960 Montpellier Cedex 2, France. E-mail: gross@univ-montp1.fr.

Received for publication 18 March 2004 and accepted in revised form 13 May 2004.

This article is based on a presentation at a symposium. The symposium and the publication of this article were made possible by an unrestricted educational grant from Servier.

ADPβS, adenosine 5′-*O*-(2-thiodiphosphate); K_{ATP} channel, ATP-activated K^+ channel.

© 2004 by the American Diabetes Association.

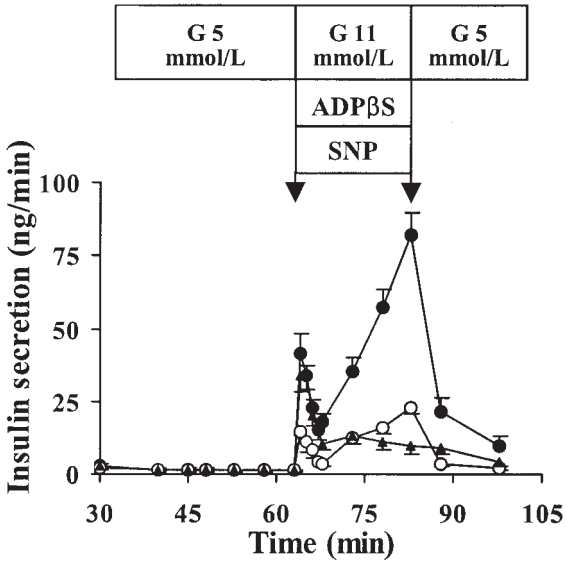


FIG. 1. Insulin release induced by a glucose challenge (from 5 to 11 mmol/l) in the absence (○) and in the presence (●) of ADPβS (0.5 μmol/l). Effects of SNP (300 μmol/l) (▲) on insulin release in the presence of ADPβS (0.5 μmol/l). The results are the means ± SE of seven experiments. G, glucose.

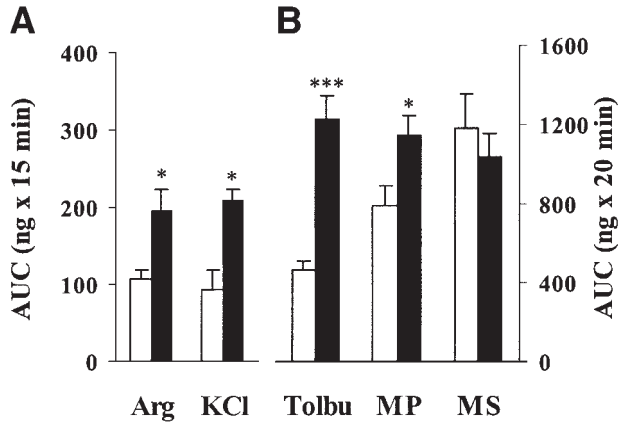


FIG. 2. AUCs during the last 15 min (*A*) or the whole 20 min (*B*) of insulin secretion induced by different secretagogue agents: arginine (Arg, 5 mmol/l), KCl (5 mmol/l), tolbutamide (Tolbu, 185 μmol/l), methyl pyruvate (MP, 15 mmol/l), and methyl succinate (MS, 5 mmol/l) in the absence (□) or in the presence (■) of ADPβS (0.5 μmol/l). The results are the means ± SE of 6–8 experiments (*$P < 0.001$; *$P < 0.05$). Please note the two different scales on *y*-axis of panels *A* and *B*.**

methyl ester, arginine hydrochloride, bovine serum albumin (fraction V), and diazoxide were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Other chemicals were obtained from various commercial sources at the greatest purity available.

Assays. Insulin concentrations were determined by the radioimmunological method of Herbert et al. (16) using purified rat insulin as standard (Linco Research, St. Charles, MO) and guinea pig antiporcine-insulin antiserum (ICN Biochemicals, Puteaux, France). The sensitivity of our assay was 0.06 ng/ml.

Data expression and statistical analysis. Insulin output was calculated by multiplying concentration in the effluent by pancreatic outflow rate measured during 1 min. Results are expressed as means ± SE. Integrated data were obtained by calculating the areas under the curves during the 20 or last 15 min (for arginine and KCl) of high glucose or of other secretagogue administration. Kinetics data were submitted to ANOVA followed by the multiple comparison test of Newman-Keuls and integrated data by the Student's *t* test.

RESULTS

Potentiation of glucose-induced insulin secretion by ADPβS and effect of an inhibitor of glucose metabolism. ADPβS (0.5 μmol/l), ineffective on the 5 mmol/l glucose background (data not shown), causes a threefold increase in insulin release induced by a rise in glucose concentration from 5 to 11 mmol/l (Fig. 1). The typical biphasic pattern of insulin response to glucose was retained with a mean integrated response reaching 845 ± 83 ng × 20 min vs. 251 ± 19 ng × 20 min in the absence of ADPβS ($P < 0.001$). As shown also in Fig. 1, the nitric oxide donor sodium nitroprusside (SNP) at a concentration of 300 μmol/l is able to drastically reduce the second phase of secretion in the presence of the P2Y receptor agonist; the last 15 min integrated response was reduced by 75%, reaching 171 ± 36 ng × 15 min vs. 678 ± 71 ng × 15 min in the absence of the metabolic inhibitor ($P < 0.001$).

Nonmetabolic β-cell depolarization and potentiation of insulin secretion by ADPβS. A 5 mmol/l increase in the concentration of the biophysical depolarizing agent KCl provoked a biphasic response of insulin secretion. After a 5-min first phase, insulin secretion stabilized slightly over basal values. Addition of ADPβS resulted in the potentiation of the second phase (Fig. 2) with a 15-min area under the curve (AUC) reaching 210 ± 14 ng × 15 min vs. 93 ± 26 ng × 15 min in the absence of ADPβS ($P < 0.05$). Similar data could be observed with arginine as a depolarizing agent. When tolbutamide (185 μmol/l) was used as a nonmetabolic stimulus, β-cell membrane depolarization resulted also in a biphasic insulin response in the presence of the 5 mmol/l glucose concentration. Simultaneous administration of ADPβS markedly potentiated both phases of tolbutamide effect. As shown in Fig. 2, mean 20 min integrated insulin secretion reached 1,229 ± 121 ng × 20 min and 462 ± 51 ng × 20 min in the presence and the absence, respectively, of ADPβS ($P < 0.001$).

ADPβS and insulin secretion induced by pyruvate and succinate methyl esters. Methyl pyruvate (15 mmol/l) induced a biphasic insulin response with a 20-min AUC reaching 791 ± 102 ng × 20 min. Addition of ADPβS resulted in a slight but significant 45% increase (1,145 ± 99 ng × 20 min; $P < 0.05$; Fig. 2). In contrast, when methyl succinate (2.5 mmol/l) was used as a secretagogue, no further increase could be observed in the presence of the P2Y receptor agonist. Mean integrated data reached 603 ± 85 ng × 20 min and 681 ± 90 ng × 20 min in the presence and absence, respectively, of ADPβS. Similar data could be observed in the presence of 5 mmol/l methyl succinate (Fig. 2).

Effect of ADPβS (0.5 μmol/l) on glucose-induced insulin secretion in the presence of diazoxide 250 μmol/l and 21 mmol/l KCl. Administration of diazoxide and KCl, during a 15-min pretreatment on the 5 mmol/l glucose background, induced a slight increase in insulin secretion. Raising glucose concentration from 5 to 11 mmol/l provoked an increase in insulin secretion with a mean 20-min AUC reaching 366 ± 52 ng × 20 min (Fig. 3*A*). It is noteworthy that the first phase of insulin response was completely suppressed. Upon addition of ADPβS, β-cell response appeared markedly enhanced by 200%. It must be mentioned that the increase observed during the first 5 min is not due to restoration of a first phase since it also occurs with ADPβS in the absence of any change in glucose concentration (Fig. 3*B*). It may be ascribable to the potentation by ADPβS of the effect of a

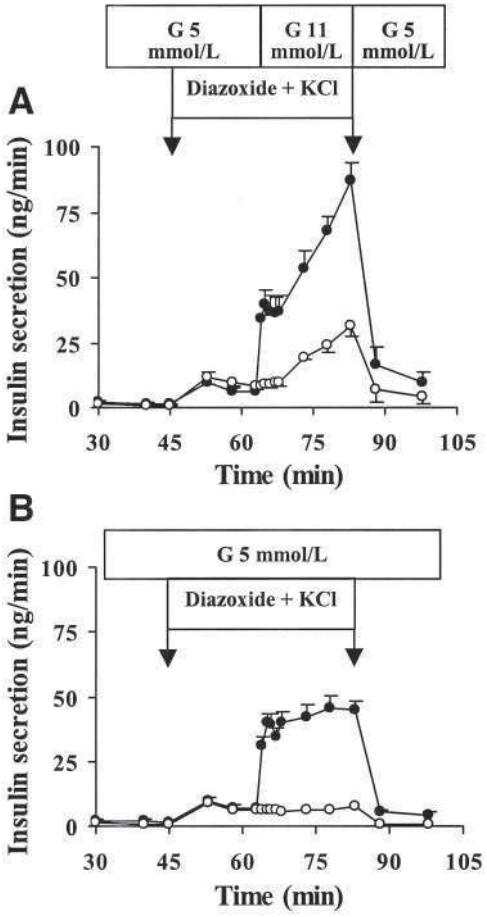


FIG. 3. Insulin release in the presence of diazoxide (250 μmol/l) and KCl (21 mmol/l), in the absence (○) or in the presence (●) of ADPβS (0.5 μmol/l) during a rise in glucose concentration (*A*) or on the 5 mmol/l glucose background (*B*). The results are the means ± SE of eight experiments. G, glucose.

slight increase in intracellular Ca^{2+} during the diazoxide-KCl pretreatment, which also accounts for the moderate elevation of insulin secretion over basal values.

DISCUSSION

Our data demonstrate that the stable P2Y receptor agonist ADPβS potentiates glucose-induced insulin secretion during an acute glucose challenge that mimics a postprandial rise in the sugar concentration. This effect depends on glucose metabolism, is independent of a direct effect on K_{ATP} channels, but probably requires a rise in intracellular Ca^{2+} concentration. The involvement of glucose metabolism is clearly demonstrated by our experiments performed in the presence of SNP, a chemical NO donor. Indeed, NO has been reported to inhibit important glycolytic enzymes such as phosphofructokinase (17) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (18) as well as mitochondrial cytochrome oxidase (19), and the NO donor drastically decreases the ADPβS-potentiating effect. Because glucose is known to trigger insulin secretion through its oxidative metabolism, rise in the ATP/ADP ratio, closure of K_{ATP} channels, membrane depolarization, opening of voltage-operated Ca^{2+} channels, Ca^{2+} influx, rise in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration, and activation of the exocytotic machinery (20), we wondered whether ADPβS could be able to potentiate insulin secretion induced by a nonmetabolic membrane depolarization. Using tolbutamide, a sulfonylurea known as a K_{ATP} channel blocker, we show that the P2Y receptor agonist is still strongly effective, suggesting that a rise in cytosolic Ca^{2+} is probably involved in the potentiating effect. This is also supported by the data resulting from experiments using two other nonmetabolic depolarizing agents, KCl and arginine, but raises the question of a possible direct involvement of K_{ATP} channels. To investigate such a possibility, we first adapted the elegant method developed by Gembal et al. (21) to the "isolated perfused rat pancreas" model. Therefore, pancreatic β-cells were first hyperpolarized using the K_{ATP} channel opener diazoxide and then repolarized with an appropriate rise in KCl concentration. Because vascular smooth muscle cells are regulated by K_{ATP} channels (22), we used our results on pancreatic effluent output rate to determine the KCl concentration necessary to repolarize these cells (i.e., the concentration required to completely counteract the vasodilator effect of diazoxide). Under such conditions (i.e., bypass of K_{ATP} channels in the presence of clamped intracellular Ca^{2+} concentration), ADPβS still strongly potentiates the amplifying pathway of glucose-induced insulin secretion, which definitely excludes a possible direct effect on K_{ATP} channel activity in the effect of P2Y receptor activation on pancreatic β-cell function. As concerns the triggering pathway, the potentiation of glucose- and tolbutamide-induced first phases, but not of arginine- and KCl-induced first phases, raises the possibility of a modulation by the P2Y agonist, of K_{ATP} channel closure induced by either glucose or tolbutamide. Such an additional mechanism might be put together with the effect of GLP-1 on K_{ATP} channels mediated by protein kinase A (PKA) (23).

The importance of glucose metabolism prompted us to investigate the effect of ADPβS on insulin secretion induced by the cell permeant methyl esters of two tricarboxylic acid cycle intermediates: pyruvate and succinate. These compounds have both been reported to stimulate β-cell function, not exclusively through mitochondrial ATP production. Methyl pyruvate has first been proposed to initiate insulin release through an extramitochondrial effect or production of mitochondrial coupling factors different from ATP (24), and more recently through a direct inhibitory effect on K_{ATP} channels (25). In our conditions, such an action should however be of minor importance since a consistent response to the methyl ester was obtained only at the high 15 mmol/l concentration and could only be amplified by 45% in the presence of ADPβS. From the present data, we cannot conclude as to the precise mechanism involved; nevertheless, it probably differs from that of tolbutamide, which appears to be much more sensitive to the activation of P2Y receptors.

When compared with methyl pyruvate, the succinate methyl ester appears to be approximately four times more potent on insulin secretion. This probably results from the ability of succinate to react with both succinate dehydrogenase to provide metabolic energy and succinate thiokinase when present at high concentrations (26). As a consequence, succinyl CoA generated by the reversal of thiokinase reaction interacts with acetoacetate to produce succinate and acetoacetyl-CoA that would in turn react

with acetyl-CoA to yield 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, a precursor of mevalonate that has been shown to modify GTP binding proteins by isoprenylation, a prerequisite for their association to membranes (27,28). Therefore, mevalonate or one of its metabolites has been proposed as a signal for insulin secretion. If the thiokinase reaction with succinate consumes either GTP or ATP, the cost in metabolic energy is probably low in the presence of succinate esters, due to the flux of high levels of succinate through succinate dehydrogenase, which generates two molecules of ATP per molecule of succinate. Considering this succinate mechanism on insulin release proposed by Fahien and McDonald (26), the inability of ADPβS to potentiate methyl succinate–induced insulin secretion might be due to the decrease in intracellular GTP levels resulting from the reversal of succinate thiokinase reaction. Indeed, GTPase activity is well known to play a central role in the signaling pathways that couple receptors to adenylyl cyclase.

We conclude that ADPβS, a stable P2Y receptor agonist, potentiates the insulin secretory effect of a glucose challenge that mimics a postprandial increase in the sugar concentration. This effect requires glucose metabolism, is probably related to an increase in intracellular Ca^{2+} concentration, and occurs independently of a direct effect on K_{ATP} channels, although different mechanisms are probably involved for the two phases of glucose-induced insulin secretion.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Céline Jahannault, Michel Tournier, and Jacqueline Boyer for expert technical assistance.

REFERENCES

1. Loubatières-Mariani MM, Petit P, Chapal J, Hillaire-Buys D, Bertrand G, Ribes G: Effects of purinoceptor agonists on insulin secretion. In *Adenosine and Adenine Nucleotides: From Molecular Biology to Integrate Physiology*. Belardinelli L, Pelleg A, Eds. Boston, Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 337–345
2. Bertrand G, Chapal J, Loubatières-Mariani MM, Roye M: Evidence for two different P_2-purinoceptors on β cell and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol* 91:783–787, 1987
3. Bertrand G, Chapal J, Puech R, Loubatières-Mariani MM: Adenosine-5′-*O*-(2-thiodiphosphate) is a potent agonist at P_2 purinoceptors mediating insulin secretion from perfused rat pancreas. *Br J Pharmacol* 102:627–630, 1991
4. Petit P, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Chapal J: Purinergic receptors and the pharmacology of type 2 diabetes. In *Handbook of Experimental Pharmacology: Purinergic and Pyrimidinergic Signaling*. Abbrachio MP, Williams M, Eds. Berlin, Springer-Verlag, 2001, p. 377–391
5. Hillaire-Buys D, Bertrand G, Chapal J, Puech R, Ribes G, Loubatières-Mariani MM: Stimulation of insulin secretion and improvement of glucose tolerance in rat and dog by the P_{2Y} purinoceptor agonist, adenosine-5′-*O*-(2-thiodiphosphate). *Br J Pharmacol* 109:183–187, 1993
6. Petit P, Hillaire-Buys D, Manteghetti M, Debrus S, Chapal J, Loubatières-Mariani MM: Evidence for two different types of P2-receptors stimulating insulin secretion from pancreatic B cell. *Br J Pharmacol* 125:1368–1374, 1998
7. Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Gomis R, Petit P: P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. *Pancreas* 22:69–71, 2001
8. Petit P, Manteghetti M, Puech R, Loubatières-Mariani MM: ATP and phosphate-modified adenine nucleotide analogs: effects on insulin secretion and calcium uptake. *Biochem Pharmacol* 36:377–380, 1987
9. Gylfe E, Hellman B: External ATP mimics carbachol in initiating calcium mobilization from pancreatic β-cells conditioned by previous exposure to glucose. *Br J Pharmacol* 92:281–289, 1987
10. Arkhammar P, Hallberg A, Kindmark H, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO: Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. *Biochem J* 265:203–211, 1990
11. Kindmark H, Köhler M, Nilsson T, Arkhammar P, Wiechel KL, Rorsman P, Efendic S, Berggren PO: Measurements of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in human pancreatic islets and insulinoma cells. *FEBS Lett* 291: 310–314, 1991
12. Petit P, Bertrand G, Schmeer W, Henquin JC: Effects of extracellular nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic β-cells. *Br J Pharmacol* 98:875–882, 1989
13. Li G, Milani D, Dunne MJ, Pralong WF, Theler JM, Petersen OH, Wollheim CB: Extracellular ATP causes Ca^{+}-dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. *J Biol Chem* 266:3449–3457, 1991
14. Chevassus H, Roig A, Belloc C, Lajoix AD, Manteghetti M, Petit P: P2Y-receptor activation enhances insulin release from pancreatic β -cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:464–469, 2002
15. Loubatières-Mariani MM, Demalbosc H, Ribes G, Chapal J: Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. *Diabetologia* 5:1–10, 1969
16. Herbert V, Law KS, Gotlieb CW, Blachier SJ: Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 25:1375–1384, 1965
17. Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y: Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 252:34–38, 1998
18. Dimmeler S, Lottspeich F, Brune B: Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 267:16771–16774, 1992
19. Brown GC, Cooper CE: Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356:295–298, 1994
20. Henquin JC: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49:1751–1760, 2000
21. Gembal M, Gilon P, Henquin JC: Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^{+} channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89:1288–1295, 1992
22. Brayden JE: Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:312–316, 2002
23. Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB: Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 16:2135–2144, 2002
24. Lembert N, Joos HC, Idahl LA, Ammon HP, Wahl MA: Methyl pyruvate initiates membrane depolarization and insulin release by metabolic factors other than ATP. *Biochem J* 354:345–350, 2001
25. Dufer M, Krippeit-Drews P, Buntinas L, Siemen D, Drews G: Methyl pyruvate stimulates pancreatic beta-cells by a direct effect on KATP channels, and not as a mitochondrial substrate. *Biochem J* 368:817–825, 2002
26. Fahien LA, MacDonald MJ: The succinate mechanism of insulin release. *Diabetes* 51:2669–2676, 2002
27. Metz SA, Rabaglia ME, Stock JB, Kowluru A: Modulation of insulin secretion from normal rat islets by inhibitors of the post-translational modifications of GTP-binding proteins. *Biochem J* 295:31–40, 1993
28. Li G, Regazzi R, Roche E, Wollheim CB: Blockade of mevalonate production by lovastatin attenuates bombesin and vasopressin potentiation of nutrient-induced insulin secretion in HIT-T15 cells: probable involvement of small GTP-binding proteins. *Biochem J* 289:379–385, 1993

3.3.2 Recherche de nouveaux agonistes purinergiques

3.3.2.1 Introduction

Le laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de Montpellier dirigé par le Pr P. Petit développe depuis plusieurs années des nouveaux agonistes purinergiques pancréatiques qui seraient des candidats potentiels pour le traitement du diabète de type 2. Ces agonistes devraient être efficaces (inducteurs d'une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose), spécifiques (effets sélectifs sur la réponse insulinique sans effet vasculaire pancréatique), stables (résistants à l'hydrolyse), et facilement synthétisables. Dans cette optique, le laboratoire travaille avec le laboratoire du Pr B. Fischer (Département de Chimie à l'Université de Bar-Ilan en Israël). Ces dernières années, plusieurs agonistes avaient été développés.

Il a été précédemment démontré que des substitutions au niveau de l'adénine en position C2 et des modifications de la chaîne polyphosphate de l'ATP permettaient d'augmenter la capacité de stimuler la sécrétion d'insuline (41). Il a aussi été montré qu'une substitution en thioether en position C2 sur l'ATP rendait les dérivés plus actifs, principalement sur les récepteurs P2Y (81). Une série d'analogues de l'ATP substitués en position C2 a été développée en collaboration avec le Pr B. Fischer (81, 119). Ces composés avaient été

développés pour être des ligands spécifiques des récepteurs purinergiques P2Y1, stables (résistants à la dégradation enzymatique) et il avait été montré qu'ils étaient des insulino-sécrétagogues puissants et efficaces ; toutefois, ils avaient une faible sélectivité tissulaire pour les cellules β pancréatiques puisqu'ils augmentaient la résistance vasculaire pancréatique ; leur spécificité était donc insuffisante.

Récemment, de nouveaux composés avaient été synthétisés par cette même équipe ; le but de notre travail a donc été d'étudier leurs effets pancréatiques, en ce qui concerne leurs effets sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais aussi leurs effets sur la résistance vasculaire.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue «Pharmaceutical Research» en 2006 (74) (pages 103 à 109).

Des études de binding ont également été effectuées au sein de l'équipe du Pr P. Petit (études dirigées par le Dr J. Vignon), elles ont été exposées dans cette même publication, mais elles ne seront pas détaillées dans ce travail étant donné que je n'y ai pas participé.

3.3.2.2 Méthodologie

La technique utilisée pour étudier les agonistes des récepteurs purinergiques est la technique du pancréas isolé perfusé chez le Rat.

3.3.2.3 Résultats

Effets du 2-méthylthio-ATP-α-B (isomères A et B) sur l'insulino-sécrétion et la résistance vasculaire pancréatique

En présence d'une concentration modérément stimulante de glucose (8,3 mmol/l), l'administration de 2-méthylthio-ATP-α-B (isomère A) entraîne une amplification immédiate de la sécrétion d'insuline, cette réponse est corrélée à la concentration dans la gamme comprise entre 0,0015 et 5 µmol/l. La sécrétion d'insuline est biphasique.

Les résultats avec l'isomère B sont qualitativement similaires aux résultats obtenus avec l'isomère A, mais l'isomère B est moins puissant.

En fonction de la courbe concentration-réponse, la valeur de la CE_{50} du 2-méthylthio-ATP-α-B (isomère A) est de 28,1 nmol/l ; son efficacité maximale atteint neuf fois la sécrétion basale, l'isomère B est nettement moins puissant.

Par ailleurs, l'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B n'a aucun effet significatif sur la résistance vasculaire pancréatique, alors que l'isomère B induit une vasoconstriction transitoire.

L'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B n'entraîne pas d'augmentation de l'insulino-sécrétion du pancréas isolé lorsque la concentration en glucose est basse (2,8 et 4,2 mmol/l). Il n'entraîne qu'une augmentation faible et transitoire de la sécrétion d'insuline lorsque la concentration en glucose est de 5 mmol/l.

En revanche, il y a une forte augmentation de la sécrétion d'insuline lorsque le pancréas est stimulé par une concentration de glucose de 6,6 ou 8,3 mmol/l.

L'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B présente une gluco-dépendance de son effet sur la première et deuxième phase de sécrétion d'insuline.

Effets de l'ATP-α-B (isomère A) et du 2-chloro-ATP-α-B (isomères A et B) sur l'insulino-sécrétion et la résistance vasculaire pancréatique

En présence de glucose à la concentration de 8,3 mmol/l, les trois composés induisent une augmentation de la réponse insulinique biphasique et dépendante de la concentration, avec un profil comparable à celui obtenu avec l'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B.

Les isomères B du 2-méthylthio-ATP-α-B et du 2-chloro-ATP-α-B sont moins puissants que leurs isomères A, et les deux composés ont une puissance approximativement équivalente à celle de l'isomère A de l'ATP-α-B.

Par ailleurs, l'isomère A de l'ATP-α-B et l'isomère A du 2-chloro-ATP-α-B induisent, aux concentrations entraînant une réponse insulinique similaire à celle de l'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B, une vasodilatation, contrastant avec la vasoconstriction transitoire provoquée par l'isomère B du 2-méthylthio-ATP-α-B.

En conclusion, on peut dire que l'isomère A du 2-méthylthio-ATP-α-B est un insulino-sécrétagogue puissant et efficace, et qu'il présente une meilleure sélectivité tissulaire que les autres analogues étudiés lors de ces travaux (isomère B du 2-méthylthio-ATP-α-B; isomère A de l'ATP-α-B et isomères A et B du 2-chloro-ATP-α-B) ou que d'autres analogues structuraux précédemment étudiés, à savoir les dérivés de l'adénosine 2-thioether 5'-O-(1-thiotriphosphate) (81, 119). En outre, son effet est gluco-dépendant.

Pharmaceutical Research, Vol. 23, No. 11, November 2006 (© 2006)
DOI: 10.1007/s11095-006-9112-4

Research Paper

P2Y Receptor Mediated Modulation of Insulin Release by a Novel Generation of 2-Substituted-5′-*O*-(1-Boranotriphosphate)-Adenosine Analogues

Anne Farret,[1] Romain Filhol,[1] Nathalie Linck,[1] Michèle Manteghetti,[1] Jacques Vignon,[1] René Gross,[1] and Pierre Petit[1,2]

Received May 5, 2006; accepted July 5, 2006; published online October 18, 2006

Purpose. A series of C2-substituted ATP analogues was previously shown to have potent insulin-secreting properties, yet with poor tissue-selectivity for the pancreatic β-cell. The present study was designed to evaluate the binding profile on β-cell membranes and the effects on insulin release and pancreatic vascular resistance of a second generation of $P2Y_1$ receptor agonists, based on C2-substitution of the adenosine 5′-*O*-(1-boranotriphosphate) scaffold.
Materials and Methods. Functional experiments were performed in the rat isolated pancreas model; binding studies with ATP-α-[^{35}S] were performed in membrane homogenates from the rat insulinoma INS-1 cell line. The diastereoisomers of the compounds are designated by A and B.
Results. Under 8.3 mmol l^{-1} glucose, 2-methylthio-ATP-α-B, A isomer, induced a biphasic and concentration dependent insulin response; its maximal efficacy reaches ninefold the baseline secretion and its EC_{50} is 28.1 nmol l^{-1}. No significant effect of this isomer was observed on vascular resistance, whereas the B isomer, which was a less potent insulin secretagogue, consistently induced a transient vasoconstriction. Interestingly, the insulin response induced by 2-methylthio-ATP-α-B, A isomer, was clearly glucose-dependent. This drug competes with ATP-α-[^{35}S] binding in a complex two sites interaction model, with a $K_{0.5}$ value of 17.7 nmol l^{-1}. 2-Chloro-ATP-α-B had a similar insulin-secreting profile as 2-methylthio-ATP-α-B, with a lower tissue-selectivity. The non-substituted ATP-α-B analog, A isomer, was less potent than the C2-substituted derivatives (A isomers) and had a vasorelaxant effect.
Conclusions. We conclude that 2-methylthio-ATP-α-B, A isomer, is a potent and tissue-selective P2Y receptor agonist with high efficacy. Its insulin-releasing action is glucose-dependent, which gives interest to this compound as a drug candidate for treating type 2 diabetes.

KEY WORDS: diabetes; insulin secretion; P2 receptor; P2Y receptor ligand.

INTRODUCTION

Structural analogues of ATP, with improved stability and selectivity, have been shown to increase insulin secretion through activation of P2Y receptors in isolated rat pancreas (1) and isolated human islets (2). The potential interest of these receptors as novel therapeutic targets for insulin-releasing antidiabetic drugs has been previously discussed (3); it is essentially accounted for by the K_{ATP} channel-independent coupling mechanism of the P2Y receptors (4), as opposed to the P2X receptors (5), and the implication of the cAMP-PKA-dependent pathway (6).

Various molecular subtypes of P2Y and P2X receptors are differentially expressed in the pancreas (7,8). A role for the $P2Y_1$ receptor subtype has been clearly evidenced in the maintenance of glucose homeostasis and insulin secretion in mice (9), even if the functional effects in that species are opposite (10,11) to those observed in rats, dogs and human tissues (3).

A substitution at the adenine C2 position and modifications of the polyphosphate chain of ATP have been reported to enhance insulin secreting activity (12). It has also been shown that a long C2 thioether substitution on ATP made the derivatives highly active, mainly at the P2Y receptor subtypes (13). A series of C2-substituted ATP analogues was previously developed in collaboration with the Department of Chemistry at Bar-Ilan University in Israel (14,15). These compounds were designed as enzymatically stable $P2Y_1$ specific ligands and shown to be potent and effective insulin secretagogues; however, they had poor tissue-selectivity for the pancreatic β-cell since they increased pancreatic vascular resistance. A novel series of nucleotides based on C2-substitution of the adenosine 5′-*O*-(1-boranotriphosphate) scaffold (ATP-α-B) was recently developed as stable $P2Y_1$ receptor agonists (16). The aim of the present study was to evaluate the binding profile on β-cell membranes and the functional effects on insulin release and pancreatic vascular resistance of this second generation of $P2Y_1$ receptor agonists.

[1] Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, CNRS UMR 5160, Faculté de Pharmacie, 15 Avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093, Montpellier cedex 5, France.
[2] To whom correspondence should be addressed. (e-mail: pierre.petit@univ-montp1.fr)

0724-8741/06/1100-2665/0 © 2006 Springer Science + Business Media, Inc.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All 2-substituted-5′-*O*-(1-boranotriphosphate)-adenosine derivatives were synthesized in the Department of Chemistry at Bar-Ilan University, Israel, using a method described by Nahum *et al.* (16), and were kindly supplied by Prof. B. Fischer. The two diastereoisomers were separated on high performance liquid chromatography. As discussed by these authors (16), their absolute configuration could not be established and, therefore, they are designated A and B. Each isomer of 2-methylthio-adenosine-5′-*O*-(1-boranotriphosphate) [2-methylthio-ATP-α-B] and of 2-chloro-adenosine-5′-*O*-(1-boranotriphosphate) [2-chloro-ATP-α-B] were tested; for adenosine-5′-*O*-(1-boranotriphosphate) [ATP-α-B], only the isomer A was tested.

Bovine serum albumin (Fraction V) was obtained from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). ATP-α-S and ATP-α-[^{35}S] (specific radioactivity 1,250 Ci mmol l^{-1} at the reference date) were obtained from Perkin Elmer France. ADP-β-S and usual chemicals were obtained from Sigma-Aldrich France. Glass fiber filters (Whatman GF/B) were obtained from VWR France. The μBCA protein assay (Pierce) was obtained from Interchim France.

Functional Experiments in Isolated Perfused Pancreas

Experiments were performed in vitro in the isolated perfused pancreas from male Wistar albino rats (Charles River, France) fed ad libitum. Rats, weighing 340–360 g, were housed in a light-controlled room and given free access to food and water, in accordance with the national guidelines for the use and care of laboratory animals. After sodium pentobarbital anesthesia (60 mg kg^{-1} intraperitoneally), the pancreas was completely isolated from all the neighboring tissues, according to a technique previously described (17) and perfused through its own arterial system with a Krebs–Ringer bicarbonate buffer containing 2 g l^{-1} bovine serum albumin (BSA) and various concentrations of glucose: 2.8, 4.2, 5.0, 6.6 and 8.3 mmol l^{-1}. A mixture of O_2 (95%) and CO_2 (5%) was bubbled through this medium at atmospheric pressure. The pH of the solution was 7.35. The preparation was maintained at 37.5°C. Each organ was perfused at a constant pressure (40–50 cm water), selected so as to produce a flow rate of 2.5 ml min^{-1} at the start of the experiment; in these conditions, any change in the flow rate reflects a change in vascular resistance (18).

A 30 min adaptation period was allowed before the first sample was taken for insulin assay. A sample was taken 15 min later, at time 45 min. Then, an infusion of the ATP analogues was performed during 30 min. Pancreatic effluent fractions were collected during 1 min and measured in graduated test tubes, allowing the recording of pancreatic flow rate; an aliquot is then immediately frozen until insulin assay.

Assays

Insulin concentrations were determined by a radioimmunological method, using purified rat insulin as standard (Linco Research, St. Charles, MO, USA) and guinea pig antiporcine-insulin antiserum (ICN Biochemicals, Puteaux, France). The sensitivity of our assay was 0.06 ng ml^{-1}.

Data Expression and Statistical Analysis

Insulin output from perfused pancreas was determined by multiplying the hormone concentration in the effluent fraction by the flow rate and is expressed as nanograms per minute. Results are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). For the kinetics of insulin secretion and vascular flow rate, the results are expressed as changes in relation to the value at time 45 min taken as 100%. For the determination of the concentration–response curves, the mean insulin output rate was calculated by dividing the area under the curve (AUC) for the drug infusion period by the number of minutes. The concentration–response curve for the insulin secretion induced by 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A) and the effective concentration producing half maximal response (EC_{50}) were calculated with the Sigma Plot Software.

Binding Experiments on β-Cell Membrane Homogenates

Tissues and Homogenate Preparation

The rat insulinoma INS-1 cell line (19) was kindly provided by Prof. C. B. Wollheim (Geneva, Switzerland). The cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% foetal calf serum, 100 U ml^{-1} penicillin, 100 μg ml^{-1} streptomycin, 2 mmol l^{-1}L-glutamine, 10 mmol l^{-1} HEPES, 1 mmol l^{-1} sodium pyruvate and 50 μmol l^{-1} 2-mercaptoethanol (19). For binding experiments, INS-1 cells were plated in T150 culture flasks (Falcon) and grown until confluence 1 week later yielding about 10^8 cells per flask. Cells were scrapped and then homogenized for 20 s in a 50 mmol l^{-1} Tris/Hepes, pH 7.4 buffer, centrifuged for 20 min at 50,000 × *g*; the homogenization centrifugation steps were repeated a second time.

Binding Experiments

The homogenate (20 μg protein per assay) was incubated in the presence of 1 nmol l^{-1} ATP-α-[^{35}S] with or without 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A). The non-specific binding was determined in the presence of 100 μmol l^{-1} ADP-β-S. The protein concentration of the homogenates was determined by the μBCA assay with bovine serum albumin (BSA) as standard. BSA standards were prepared in the same buffer as the samples to correct for possible buffer interference.

The binding experiments were performed by the rapid filtration method on a MR-24 Brandel cell harvester using GF/B filters. The radioactivity retained on filters was measured by a liquid scintillation method on a Rack Beta 1214 (LKB) counter without correction for counting efficiency. These two apparatus were kindly lent by Dr A. Privat (INSERM U336, Montpellier). Compounds were dissolved in the binding incubation buffer at a 10^{-2} mol l^{-1} concentration and then submitted to sequential dilutions in order to achieve concentrations in the incubations ranging from 10^{-9} to 10^{-5} mol l^{-1}.

Data and Statistical Analysis

In all experiments, each value is the mean of triplicates. Each experiment was replicated three to five times. Experimental data were analyzed with the Sigma Plot software according to a single or two sites interaction model. The probability of each model was determined by ANOVA and their comparison was performed by a bilateral Fisher's test that indicated which model was the more statistically probable.

RESULTS

Effects of 2-Methylthio-ATP-α-B on Insulin Secretion and Pancreatic Vascular Resistance

The administration of 2-methylthio-ATP-α-B (A isomer) in the presence of a slightly stimulating glucose concentration (8.3 mmol l^{-1}) resulted in an immediate and concentration dependent response in the concentration range of 0.0015–5 μmol l^{-1} (Fig. 1a, upper panel). The increase in glucose-induced insulin release was biphasic with a first 5-min peak followed by a second phase of sustained secretion. The results with isomer B (Fig. 1b, upper panel) are qualitatively similar to those registered with isomer A, but the compound is less potent.

According to its concentration–insulin response curve, the EC_{50} value of 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A) is 28.1 nmol l^{-1}, and its maximal efficacy reaches ninefold the baseline secretion (Fig. 2); isomer B is clearly less potent.

On the other hand, there was no significant effect of 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A on pancreatic vascular resistance (Fig. 1a, lower panel), whereas isomer B of the same compound consistently induced a transient vasoconstriction, at concentrations similar to those amplifying insulin secretion (Fig. 1b, lower panel).

As shown in Fig. 3 (upper panel), 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A, does not increase insulin secretion from the isolated pancreas, when the glucose concentration in the medium is low (2.8 and 4.2 mmol l^{-1}). It induces only a small and

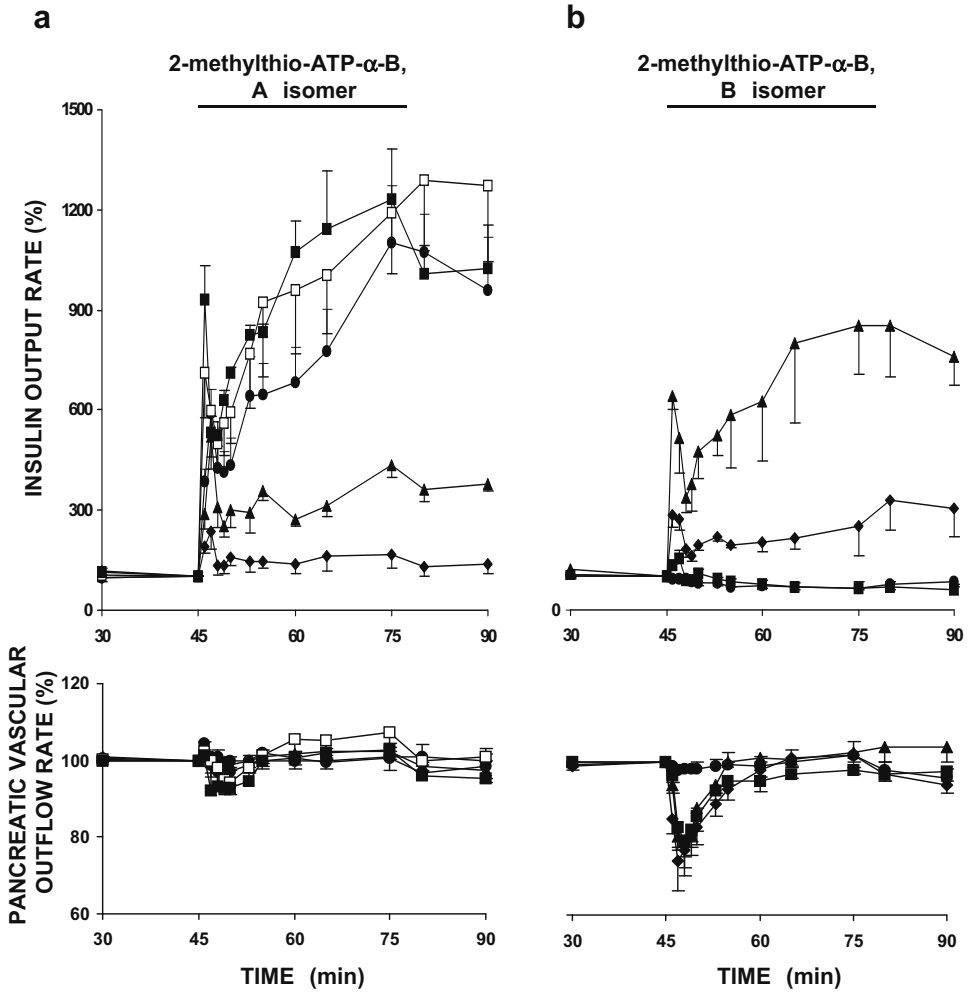


Fig. 1. (a) Insulin output (*upper panel*) and pancreatic vascular outflow (*lower panel*) induced by 2-methylthio-ATP-α-B, A isomer, at different concentrations: 0.0015 μmol l^{-1} (*filled diamond*), 0.005 μmol l^{-1} (*filled triangle*), 0.05 μmol l^{-1} (*filled circle*), 0.5 μmol l^{-1} (*open square*) and 5 μmol l^{-1} (*filled square*), in the presence of 8.3 mmol l^{-1} glucose. The results are the means ± SEM of three to five experiments. (b) Insulin output (*upper panel*) and pancreatic vascular outflow (*lower panel*) induced by 2-methylthio-ATP-α-B, B isomer, at different concentrations: 0.0015 μmol l^{-1} (*filled circle*), 0.015 μmol l^{-1} (*filled square*), 0.15 μmol l^{-1} (*filled diamond*), 1.5 μmol l^{-1} (*filled triangle*), in the presence of 8.3 mmol l^{-1} glucose. The results are the means ± SEM of three to four experiments.

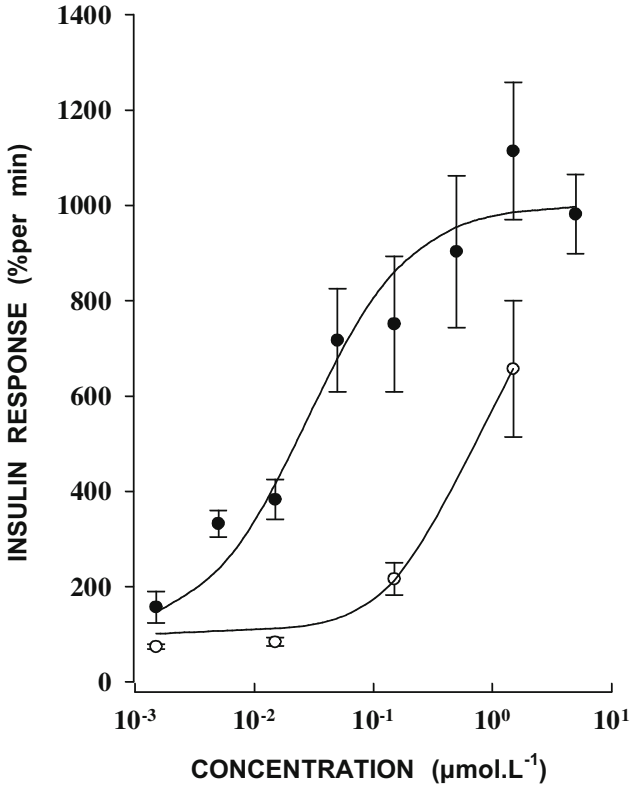


Fig. 2. Concentration–response curve for insulin secretion induced by the two isomers of 2-methylthio-ATP-α-B: isomer A (*filled circle*) and isomer B (*open circle*).

transient increase, in the presence of 5.0 mmol l^{-1} glucose. In contrast, there is a strong amplification of insulin release when the pancreas is stimulated by 6.6 or 8.3 mmol l^{-1} glucose. The glucose-dependence of the effect of 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A, is shown in Fig. 3 (lower panel), for the first and the second phase of insulin secretion.

Effects of ATP-α-B (Isomer A) and 2-Chloro-ATP-α-B (Isomers A and B) on Insulin Secretion and Pancreatic Vascular Resistance

In the presence of 8.3 mmol l^{-1} glucose, all of the three compounds induced a biphasic and concentration dependent increase in insulin release, with a comparable pattern as that of 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A (not shown). As shown in Fig. 4, isomers B of 2-methylthio-ATP-α-B and of 2-chloro-ATP-α-B are less potent than isomers A, and both display approximately the same potency as ATP-α-B, isomer A.

On the other hand, ATP-α-B (isomer A) and 2-chloro-ATP-α-B (isomer A), at concentrations inducing a similar insulin response as 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A), induced a sustained vasodilatation, contrasting with the transient vasoconstriction provoked by isomer B of 2-methylthio-ATP-α-B (Fig. 5).

Inhibition of ATP-α-[^{35}S] Binding to INS-1 Cells by Unlabeled ATP-α-S and 2-Methylthio-ATP-α-B (Isomer A)

ATP-α-[^{35}S] binding to INS-1 cell homogenate is accounted for by a high specific binding that is linear up to 1 mg protein ml^{-1} (non specific binding determined in the presence of 100 µmol l^{-1} unlabeled ATP-α-S is mainly due to a non-displaceable retention of the labeled drug to GF/B filters). The equilibrium is reached within 60–70 min at 25°C. At a 1 nmol l^{-1} concentration, ATP-α-[^{35}S] specific binding represents 93.41 ± 3.93 fmol/mg protein. Drug effects on ATP-α-[^{35}S] binding were investigated over a large concentration range by competition.

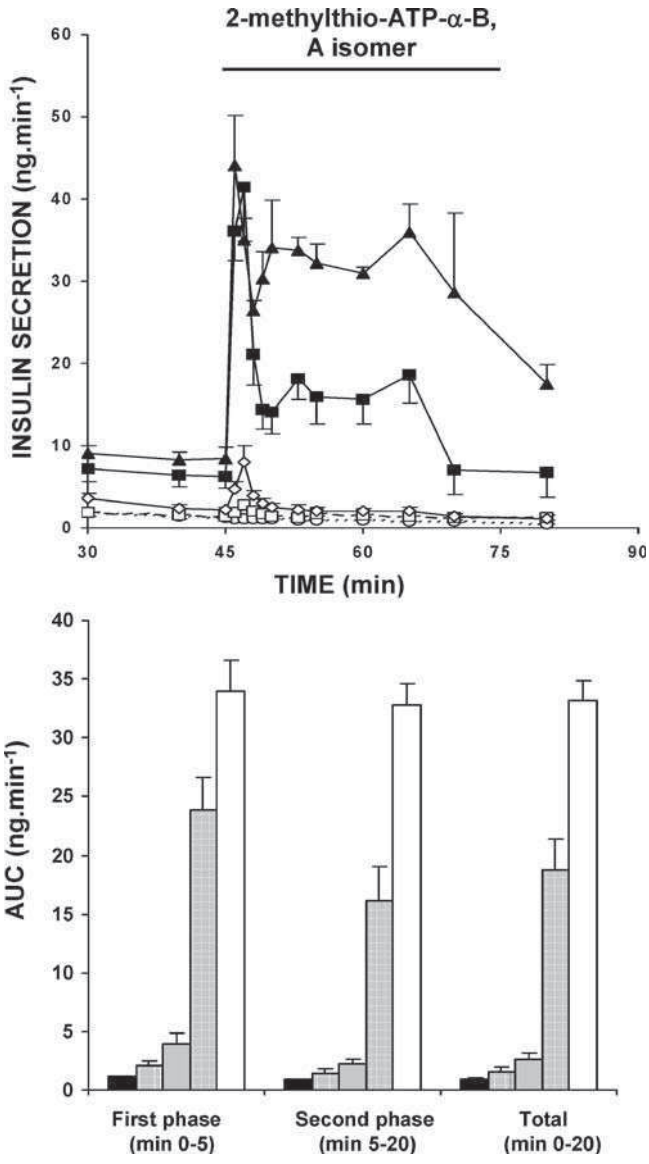


Fig. 3. *Upper panel*: insulin release in the presence of 2-methylthio-ATP-α-B (20 nmol l^{-1}), A isomer, at different glucose concentrations: 2.8 mmol l^{-1} (*open circle*), 4.2 mmol l^{-1} (*open square*), 5.0 mmol l^{-1} (*open diamond*), 6.6 mmol l^{-1} (*filled square*), 8.3 mmol l^{-1} (*filled triangle*). The results are the means ± SEM of five to six experiments. *Lower panel*: areas under the curve for the first phase (min 0–5), the second phase (min 5–20) and the total (min 0–20) insulin secretion induced by 2-methylthio-ATP-α-B (20 nmol l^{-1}), A isomer, in the presence of 2.8 mmol l^{-1} (*black column*), 4.2 mmol l^{-1} (column with *vertical lines*), 5.0 mmol l^{-1} (*grey column*), 6.6 mmol l^{-1} (column with *oblique lines*) and 8.3 mmol l^{-1} glucose (*white column*). The results are the means ± SEM of five to six experiments.

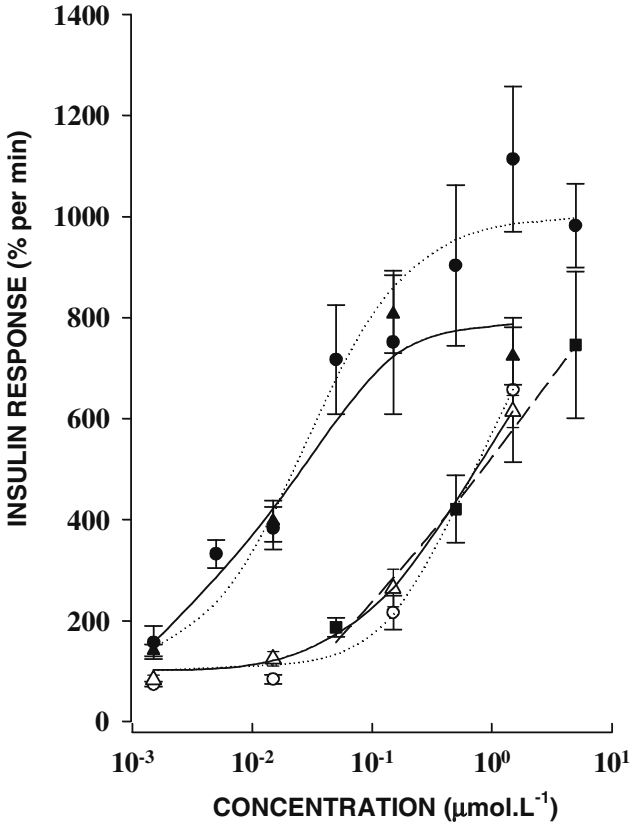


Fig. 4. Concentration-response curves of insulin secretion induced by 2-methylthio-ATP-α-B, isomers A (*filled circle*, *dotted line*) and B (*open circle*, *dotted line*); ATP-α-B, isomer A (*filled square*, *broken line*); and 2-chloro-ATP-α-B, isomers A (*filled triangle*, *full line*) and B (*open triangle*, *full line*).

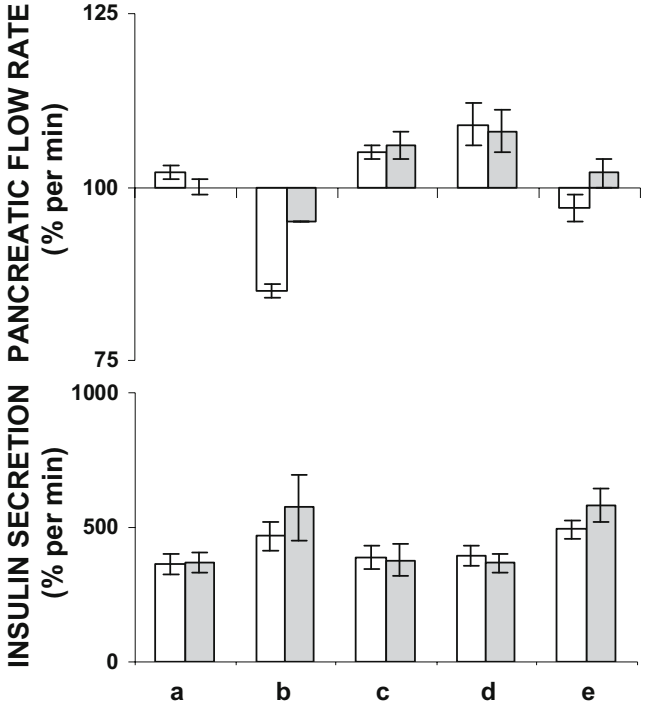


Fig. 5. Areas under the curve (percent of baseline) for the first 5 min (*open square*) and the total 20 min (*filled square*), calculated for the changes in pancreatic flow rate (*upper panel*) and insulin secretion (*lower panel*), for the different compounds: (a) 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A (0.015 µmol l^{-1}); (b) 2-methylthio-ATP-α-B, isomer B (1.5 µmol l^{-1}); (c) ATP-α-B, isomer A (0.5 µmol l^{-1}); (d) 2-chloro-ATP-α-B, isomer A (0.015 µmol l^{-1}) and (e) 2-chloro-ATP-α-B, isomer B (1.5 µmol l^{-1}).

As illustrated in Fig. 6, ATP-α-[^{35}S] binding inhibition by unlabeled ATP-α-S is accounted for by a complex interaction to INS-1 cell homogenate. The modeling of this inhibition according to a single site interaction is statistically less probable than a more complex two sites interaction ($P < 0.001$ in favor of the two sites model). This two sites interaction model allows determining that the high affinity component represents roughly 40% of the specific binding and the low affinity component the 60% remaining binding. The inhibitory constants $K_{0.5}$ (apparent dissociation constants) for high and low affinity sites are 8 nmol l^{-1} and 1.4 µmol l^{-1}, respectively.

As observed with ATP-α-S, inhibition of ATP-α-[^{35}S] binding by 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A) is better accounted for by a two sites interaction model ($P < 0.001$) with the same proportions of high and low affinity sites. $K_{0.5}$ values were 17.7 nmol l^{-1} and 2.5 µmol l^{-1} for high and low affinity sites respectively.

DISCUSSION

The present study reports the functional effects of a novel generation of 2-substituted-5′-*O*-(1-boranotriphosphate)-adenosine analogues on insulin secretion and pancreatic vascular resistance. The results clearly show that among these derivatives, 2-methylthio-ATP-α-B (A isomer) is a very potent and effective insulin secretagogue with a much better tissue-selectivity than its structural analogues (present study) and previously tested 2-thioether 5′-*O*-(1-thiotriphosphate) adenosine derivatives (14,15).

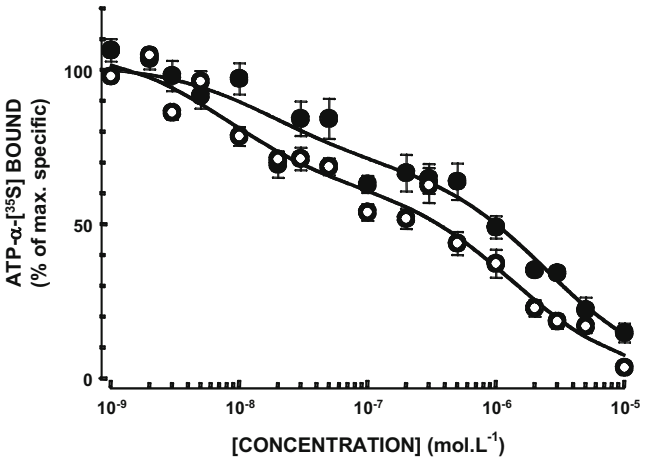


Fig. 6. Inhibition of ATP-α-[^{35}S] binding to INS-1 cell membrane homogenates by unlabeled ATP-α-S (*open circle*) or 2-methylthio-ATP-α-B, isomer A (*filled circle*). Data are the mean of three to five independent experiments, each performed in triplicates. For each P2Y receptor agonist, a two sites interaction is statistically the most relevant ($P < 0.001$, bilateral Fischer's test).

The chemical synthesis of these new entities, based on C2-substitution of the adenosine 5′-*O*-(1-boranotriphosphate) scaffold, was previously reported by Nahum *et al.* (16). These compounds were shown to be chemically highly stable and resistant to hydrolysis by ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase), which is a prerequisite for an ATP analogue with potential pharmacological interest.

In our conditions in the isolated rat pancreas, both 2-methylthio- and 2-chloro-ATP-α-B derivates (isomers A) were very potent insulin secretagogues, with an EC_{50} of 28.1 nmol l^{-1} for the former. This potency appears to be approximately fivefold higher than that of ADP-β-S (20), which has been shown to be 100 times more potent than ATP. This relative potency versus ATP mimics that of the first generation of 2-substituted ATP derivatives, namely 2-hexylthio-ATP-α-S (14) and 2-benzylthio-ATP-α-S (15). These data on the secretory potency of these new analogues are in agreement with the results concerning their potency as $P2Y_1$ receptor agonists evaluated by induction of stored Ca^{2+} release by HEK 293 cells stably transfected with rat-brain $P2Y_1$ receptors (16). Furthermore, diastereoisomers A of both 2-methylthio- and 2-chloro-ATP-α-B were more potent insulin secretagogues than their corresponding B counterparts, which is again in accordance with the relative potency in the $P2Y_1$-induced Ca^{2+} releasing action (16). It remains to be determined whether the 2-methylthio-ATP-α-B secretory effect is coupled to Ca^{++} release and/or to cAMP increase, as previously demonstrated for ATP-α-S (6). The new C2-substituted ATP-α-B derivatives also display a very high efficacy, with a maximal response for 2-methylthio-ATP-α-B (isomer A) reaching ninefold the baseline insulin secretion, which is clearly higher than that of ADP-β-S in similar conditions (20). In any case, whatever the mechanism of action, it should be tightly coupled to glucose metabolism and glucose-dependent amplification pathways, as evidenced by the glucose dependence of the insulin-releasing effect.

Since different P2Y receptors are expressed in various tissues and organs (21), and P2Y agonists are known to affect vascular tone, the tissue-selectivity of the new compounds was considered. The model used in the present study offers the opportunity to monitor within the same experiment the effects of agonists over time on both insulin secretion and pancreatic vascular tone (18). Most of the structural analogues which have been evaluated so far in that model show no or poor tissue selectivity in that they both induce insulin release and alter vascular resistance in the same concentration range, either relaxing (20) or increasing vascular tone (14,15). The most selective derivative as yet was 2-methylthio-ATP (1) but this compound is readily metabolized. In the present study, 2-methylthio-ATP-α-B (A isomer) proved to be highly selective since no significant vascular effect was registered at concentrations strongly effective at enhancing insulin secretion. In contrast, B isomer induced a transient but consistent vasoconstriction whereas the 2-chloro analogue induced a sustained vasodilatation.

Despite the fact that the P2Y receptors present on pancreatic β-cells display some characteristics of the $P2Y_1$ subtype and were proposed as $P2Y_1$-like by Ralevic and Burnstock (22), these receptors also exhibit some differences (15) and the precise molecular subtype(s) still remain(s) to be elucidated. The high potency of the 2-substituted-ATP-α-B derivatives (A isomers) enhancing insulin release, and the relatively lower potency of the B isomers, also recorded for Ca^{2+} release in $P2Y_1$ receptor transfected cells (16), is a strong additional argument to suggest the presence of a $P2Y_1$ receptor subtype on the pancreatic β-cell. Furthermore, these new compounds have been recently reported to be highly specific agonists for $P2Y_1$ as compared with $P2Y_2$ receptor subtypes (23). In addition, recent results in $P2Y_1$ receptor knock-out mice suggest that this receptor subtype plays a physiological role in the maintenance of glucose homeostasis, at least in part through regulation of insulin secretion (9), even if in that species it induces an inhibitory control of insulin secretion (11). We could recently identify by RNA amplification and protein determination the presence of $P2Y_1-$, $P2Y_2-$, $P2Y_4-$ and $P2Y_6-$ receptor subtypes in the INS-1 β-cell line (24).

The complexity of that issue is further illustrated by the results we have obtained in our binding experiments. The analysis of the competition between ATP-α-[^{35}S] and unlabelled ATP-α-S shows that ATP-α-S binds to two distinct sites with a high affinity component representing approximately 40% of the specific binding. Similar results were obtained by Schäfer and Reiser (25) on synaptosomal membranes from rat brain cortex. However, this result contrasts with data previously reported by Laubinger and Reiser (26), assuming the presence of a single binding site for ATP-α-S in rat lung although different P2 receptor subtypes are expressed in that tissue. 2-methylthio-ATP-α-B (A isomer) also interacts with ATP-α-[^{35}S] binding sites according to a two-site model. Its affinity value for the high affinity site is in the same range as ATP-α-S. Taking into account the effectiveness at low concentrations of both compounds, it can be postulated that the high affinity ATP-α-[^{35}S] binding site is involved in glucose-induced insulin secretion. However, relative potencies of ATP-α-S and 2-methylthio-ATP-α-B (A isomer) for insulin secretion are inverted compared to their affinities in the binding assay. Such a discrepancy suggests that the different sites detected in binding experiments have different functional relevance. The relative importance of each of the receptor subtypes ($P2Y_1-$, $P2Y_2-$, $P2Y_4-$ and $P2Y_6-$) in the binding pattern and in the functional response to P2Y receptor agonists remains to be clearly established. The two binding components detected with ATP-α-[^{35}S] might represent mean interactions with different receptor subtypes, thus explaining this lack of correlation between drug affinities and drug actions.

CONCLUSION

In conclusion, the $P2Y_1$ receptor agonist 2-methylthio-ATP-α-B, A isomer, amplifies insulin release from the rat pancreas in a glucose-dependent manner; such an effect results from a complex interaction of the agonist with P2Y receptor(s) involving both high and low affinity binding sites. 2-Methylthio-ATP-α-B displays a very high potency and efficacy, as well as a very good β-cell selectivity as compared to pancreatic vascular tissue. Therefore, this compound may be considered as a potentially attractive drug candidate for the treatment of type 2 diabetes.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Mr. Michel Tournier for expert technical assistance.

REFERENCES

1. G. Bertrand, J. Chapal, M. M. Loubatières-Mariani, and M. Roye. Evidence for two different P_2-purinoceptors on β-cell and pancreatic vascular bed. *Br. J. Pharmacol.* **91**:783–787 (1987).
2. J. Fernandez-Alvarez, D. Hillaire-Buys, M. M. Loubatières-Mariani, R. Gomis, and P. Petit. P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. *Pancreas* **22**:69–71 (2001).
3. P. Petit, D. Hillaire-Buys, M. M. Loubatières-Mariani, and J. Chapal. Purinergic receptors and the pharmacology of type 2 diabetes. In M. P. Abbrachio and M. Williams (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology: Purinergic and Pyrimidinergic Signalling*, Springer, Berlin Heidelberg New York, 2001, pp. 377–391.
4. A. Farret, M. Vignaud, S. Dietz, J. Vignon, P. Petit, and R. Gross. P2Y purinergic potentiation of glucose-induced insulin secretion and pancreatic β-cell metabolism. *Diabetes* **53** (Suppl 3):S63–S66 (2004).
5. P. Petit, D. Hillaire-Buys, M. Manteghetti, S. Debrus, J. Chapal, and M. M. Loubatières-Mariani. Evidence for two different types of P2-receptors stimulating insulin secretion from pancreatic β-cell. *Br. J. Pharmacol.* **125**:1368–1374 (1998).
6. H. Chevassus, A. Roig, C. Belloc, A. D. Lajoix, M. Manteghetti, and P. Petit. P2Y-receptor activation enhances insulin release from pancreatic β-cells by triggering the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**:464–469 (2002).
7. R. Coutinho-Silva, M. Parsons, T. Robson, and G. Burnstock. Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. *Cell Tissue Res.* **306**:373–383 (2001).
8. R. Coutinho-Silva, M. Parsons, T. Robson, J. Lincoln, and G. Burnstock. P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **204**:141–154 (2003).
9. C. Léon, M. Freund, O. Latchoumanin, A. Farret, P. Petit, and J. P. Cazenave. The P2Y1 receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. *Purinergic Signalling* **1**:145–151 (2005).
10. P. Petit, G. Bertrand, W. Schmeer, and J. C. Henquin. Effects of extracellular nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic β-cells. *Br. J. Pharmacol.* **98**:875–882 (1989).
11. C. R. Poulsen, K. Bokvist, H. L. Olsen, M. Hoy, K. Capito, P. Gilon, and J. Gromada. Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic β-cells. *Diabetes* **48**:2171–2181 (1999).
12. J. Chapal, D. Hillaire-Buys, G. Bertrand, D. Pujalte, P. Petit, and M. M. Loubatières-Mariani. Comparative effects of adenosine-5′-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **11**:537–545 (1997).
13. B. Fischer, J. L. Boyer, C. H. Hoyle, A. U. Ziganshin, A. L. Brizzolara, G. E. Knight, J. Zimmet, G. Burnstock, T. K. Harden, and K. A. Jacobson. Identification of potent, selective P2Y-purinoceptor agonists: structure-activity relationships for 2-thioether derivatives of adenosine 5′-triphosphate. *J. Med. Chem.* **36**:3937–3946 (1993).
14. B. Fischer, A. Chulkin, J. L. Boyer, K. T. Harden, F. P. Gendron, A. R. Beaudoin, J. Chapal, D. Hillaire-Buys, and P. Petit. 2-Thioether 5′-O-(1-thiotriphosphate)adenosine derivatives as new insulin secretagogues acting through P2Y-receptors. *J. Med. Chem.* **42**:3636–3646 (1999).
15. D. Hillaire-Buys, L. Shahar, B. Fischer, A. Chulkin, N. Linck, J. Chapal, M. M. Loubatières-Mariani, and P. Petit. Pharmacological evaluation and chemical stability of 2-benzylthioether-5′-*O*-(1-thiotriphosphate)-adenosine, a new insulin secretagogue acting through P2Y receptors. *Drug Dev. Res.* **53**:33–43 (2001).
16. V. Nahum, G. Zundorf, S. A. Levesque, A. R. Beaudoin, G. Reiser, and B. Fischer. Adenosine 5′-*O*-(1-boranotriphosphate) derivatives as novel P2Y(1) receptor agonists. *J. Med. Chem.* **45**:5384–5396 (2002).
17. M. M. Loubatières-Mariani, H. Demalbosc, G. Ribes, and J. Chapal. Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. *Diabetologia* **5**:1–10 (1969).
18. D. Hillaire-Buys, J. Chapal, P. Petit, and M. M. Loubatières-Mariani. Dual regulation of pancreatic vascular tone by P2X and P2Y purinoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **199**:309–314 (1991).
19. M. Asfari, D. Janjic, P. Meda, G. Li, P. A. Halban, and C. B. Wollheim. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**: 167–178 (1992).
20. G. Bertrand, J. Chapal, R. Puech, and M. M. Loubatières-Mariani. Adenosine-5′-*O*-(2-thiodiphosphate) is a potent agonist at P_2 purinoceptors mediating insulin secretion from perfused rat pancreas. *Br. J. Pharmacol.* **102**:627–630 (1991).
21. G. Burnstock and G. E. Knight. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cyt.* **240**:31–304 (2004).
22. V. Ralevic and G. Burnstock. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**:413–492 (1998).
23. M. E. Tulapurkar, W. Laubinger, V. Nahum, B. Fischer, and G. Reiser. Subtype specific internalization of P2Y1 and P2Y2 receptors induced by novel adenosine 5′-*O*-(1-boranotriphosphate) derivatives. *Br. J. Pharmacol.* **142**:869–878 (2004).
24. R. Filhol, L. Lugo-Garcia, C. Jahannault, C. Didier, R. Gross, P. Petit, and J. Vignon. Complex interaction of ATP-alpha-[^{35}S] with membrane P2 receptors of insulin-secreting β-cells. 9th Annual Meeting of the Société Française de Pharmacologie, Bordeaux, April 26–28. *Fundam. Clin. Pharmacol.***19**:226 (2005).
25. R. Schäfer and G. Reiser. ATP-α-S is a ligand for P2Y receptors in synaptosomal membranes: solubilization of [^{35}S]ATP-α-S binding proteins associated with G-proteins. *Neurochem. Int.* **34**:303–317 (1999).
26. W. Laubinger and G. Reiser. Differential characterization of binding sites for adenine and uridine nucleotides in membranes from rat lung as possible tools for studying P2 receptors in lung. *Biochem. Pharmacol.* **55**:687–695 (1998).

3.3.3 Effets des agonistes purinergiques sur la prolifération cellulaire

3.3.3.1 Introduction

Le système purinergique est impliqué dans la régulation de la prolifération, de la différentiation et de l'apoptose cellulaire dans de nombreux tissus et systèmes (30). Ces effets dans le pancréas endocrine sont encore mal connus, bien que récemment, il a été montré une implication des récepteurs P2Y6 et P2Y13 dans la régulation de l'apoptose de cellules pancréatiques de la lignée MIN6 (10, 227). Nous savons par ailleurs que l'activation des récepteurs P2Y des cellules β pancréatiques entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire (45) ; or, l'AMPc intracellulaire est impliqué dans la modulation de la prolifération cellulaire β pancréatique (216) ; en outre, le GLP-1, connu pour son action stimulante de la prolifération cellulaire β pancréatique et son action inhibitrice de l'apoptose cellulaire des cellules β pancréatiques (168), augmente aussi le taux d'AMPc intracellulaire.

Etant donné les similitudes entre l'activation des récepteurs P2Y et des récepteurs GLP-1, nous avons donc voulu étudier et comparer les effets potentiels des agonistes des récepteurs purinergiques P2Y pancréatiques et de l'hormone GLP-1 sur l'insulino-sécrétion, l'accumulation d'AMPc et la prolifération cellulaire des cellules β pancréatiques.

3.3.3.2 Méthodologie

Nous avons utilisé comme modèle expérimental des cultures cellulaires de la lignée INS-1E.

L'agoniste des récepteurs purinergiques P2Y choisi est l'ATPαS car c'est un agoniste stable, puissant et sélectif du récepteur P2Y ; la concentration de 150 µmol/l a été utilisée, compte tenu de la relation concentration-réponse préalablement retrouvée dans les cellules INS-1 (45). Le GLP-1 a été utilisé à une concentration de 10 nmol/l, car c'est la concentration classiquement utilisée pour étudier ses effets sur la prolifération cellulaire (35, 244), l'accumulation de l'AMPc (9) et l'insulino-sécrétion (134). Ces produits ont été testés en présence d'une concentration de glucose de 8,3 mmol/l, permettant d'observer une amplification de la sécrétion d'insuline par ces composés.

Détermination de l'insulino-sécrétion et de l'AMPc intracellulaire

Avant d'être étudiées, les cellules ont été placées durant 5 jours dans des plaques de 24 puits (2×10^5 cellules INS-1E) et cultivées dans un milieu RPMI-1640 supplémenté comme décrit précédemment (page 88). Les cellules ont été alors pré-incubées durant 60 minutes dans 1 ml de tampon Krebs-bicarbonate contenant (en mmol/l) : NaCl 118, $NaHCO_3$ 23, KCl 4,74, $CaCl_2$ 2,54, $MgSO_4$ 1,18, KH_2PO_4 1,18, HEPES 10, et supplémenté avec du sérum d'albumine bovine (Fraction V) (BSA) 0,1% ; le pH était ajusté à 7,4, et la solution,

dépourvue de glucose, était bullée avec un mélange 5 % CO_2 / 95 % O_2. Les cellules étaient alors incubées pendant 60 minutes dans 1ml de tampon Krebs-bicarbonate de composition similaire, mais contenant 8,3 mmol/l de glucose et 500 µmol/l d'IBMX (un inhibiteur non-spécifique de la phosphodiestérase) avec ou sans 10 nmol/l de GLP-1 ou 150 µmol/l d'ATPαS. Un échantillon de 500 µl était alors récupéré de chaque puit d'incubation et était congelé jusqu'à la détermination du taux d'insuline, effectuée par la méthode HTRF (Homogeneous Time Resolved Fluorecence) (CisBio International, Marcoules, France). La sensibilité de l'essai était de 0,2 ng/ml. Le reste du surnageant était enlevé puis les cellules étaient lysées avec 300 µl de tampon de lyse ; l'accumulation d'AMPc était mesurée par une méthode immuno-colorimétrique [(Biotrak cAMP enzyme immunoassay (EIA) system, fournie par Amersham Biosciences Europe (Orsay Cedex, France)], en accord avec les recommandations du fournisseur. La réactivité croisée avec l'ATP était inférieure à 0,00015.

Prolifération cellulaire

Les cellules étaient ensemencées 3 jours avant d'être étudiées dans des plaques de 96 puits (2 x 10^4 cellules INS-1E) et cultivées dans un milieu RPMI-1640 supplémenté comme décrit précédemment (page 88). Les cellules étaient alors pré-incubées durant 24 h dans un milieu RPMI minimal supplémenté comme décrit, dépourvu de SVF, avec 0,1% de sérum albumine bovine et 2 mmol/l de

glucose. Elles étaient alors incubées durant 24 h dans un milieu minimal RPMI supplémenté comme décrit (sans SVF et avec 0,1% de BSA) et contenant 8,3 mmol/l de glucose, en présence ou en absence de 10 nmol/l de GLP-1 ou 150 µmol/l d'ATPαS. La méthode pour la quantification de la prolifération cellulaire était une méthode immuno-colorimétrique [Cell Proliferation ELISA, BrdU (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Allemagne)], qui est basée sur la mesure de l'incorporation de BrdU durant la synthèse d'ADN durant les 5 dernières heures. Les contrôles des expériences étaient réalisés en présence de SVF à une concentration de 15%.

Réactifs

L'ATPαS est fourni par Calbiochem (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Le GLP-1 [(7-37) human], et une partie des réactifs de la culture cellulaire [penicilline, streptomycine, L-glutamine, BSA (fraction V)] et l'IBMX sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Le RPMI-1640 sans L-glutamine (avec 11,2 mmol/l glucose) était fourni par Biowhittaker (Verviers, Belgique). Le RPMI-1640 avec L-glutamine et sans glucose, et les réactifs de culture cellulaire (β-mercaptoethanol, sodium pyruvate, HEPES) étaient fournis par Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Le SVF était fourni par Biochrom AG (Berlin, Allemagne). L'IBMX était dissous dans du DMSO (0,1%), avant d'être dilué dans une solution de Krebs utilisée pour préparer les autres composés.

Analyse des résultats

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne ± erreur standard. Le seuil de significativité a été choisi à 5%.

3.3.3.3 Résultats

Effets des composés sur l'insulino-sécrétion

La moyenne de l'insulino-sécrétion basale des cellules β pancréatiques durant une incubation de 60 minutes était de 43,0 ± 5,2 ng/ml en présence d'un milieu contenant 8,3 mmol/l de glucose ; elle a été définie comme 100% (condition contrôle). Quand ils sont rajoutés au milieu, l'ATPαS ainsi que le GLP-1 induisent une augmentation significative ($P < 0,01$) et comparable de l'insulino-sécrétion de respectivement 57,7 ± 4,9 ng/ml et 64,6 ± 5,9 ng/ml (page 116, Figure 1A).

Effets des composés sur l'accumulation intracellulaire d'AMPc

L'accumulation basale d'AMPc des cellules β pancréatiques durant les 60 minutes d'incubation était en moyenne de 362,9 ± 37,5 fmol/l en présence de glucose 8.3 mmol/l ; cette valeur était définie comme 100% (condition contrôle). Comme montré dans la Figure 1B (page 116), l'ATPαS induit une augmentation du contenu en AMPc de 150% de façon significative ($P < 0,001$), tandis que le GLP-1 induit une augmentation de 500% ($P < 0,001$).

Effets des composés sur la prolifération cellulaire

Lorsque le GLP-1 était rajouté au milieu d'incubation contenant du glucose à 8,3 mmol/l, il y avait une augmentation significative de l'incorporation du BrdU par les cellules INS-1E ($P < 0,01$), de 100,0 ± 1,6 % chez les contrôles à 108,5 ± 1,8 % (Figure 1C, page 116). Dans ces conditions, l'ATPαS était totalement inefficace, tandis que l'augmentation de l'incorporation du BrdU induite par le FCS 15% (utilisé comme contrôle positif) atteignait 137,9 ± 4,7 % ($P < 0,001$) (résultats non montrés).

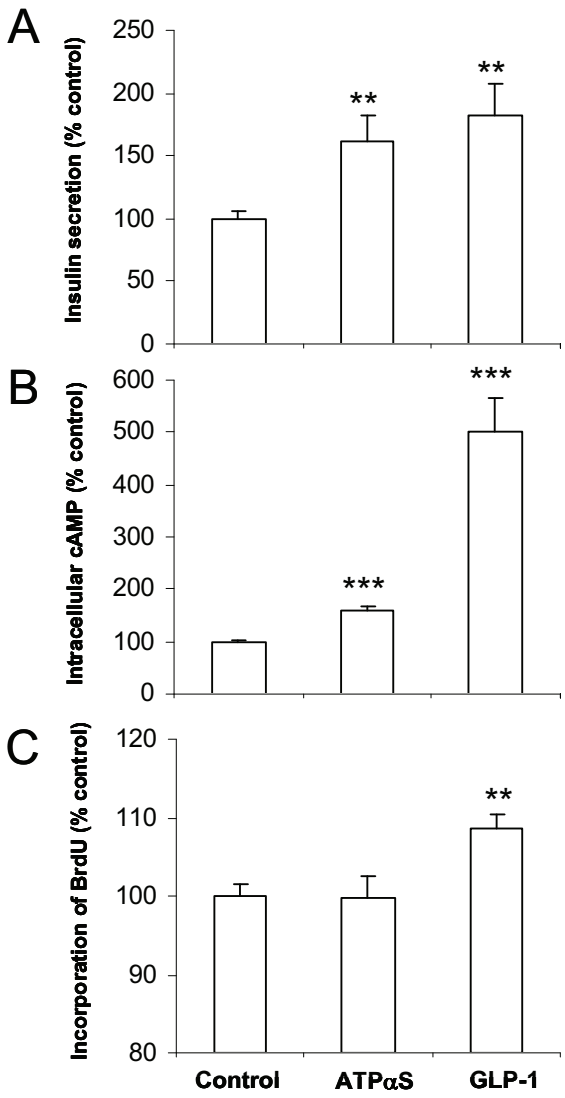


Figure 1 : Comparaison des effets fonctionnels de l'ATPα (150 µmol/l) et du GLP-1 (10 nmol/l) sur des cellules INS-1E incubées en présence de glucose (8,3 mmol/l).

A Effets sur l'insulino-sécrétion. Les résultats représentent les moyennes de tests de 15 échantillons issues de trois expériences indépendantes.

B Effets sur le contenant en AMPc. Les résultats représentent les moyennes de tests de 20 échantillons issues de quatre expériences indépendantes.

C Effets sur la prolifération cellulaire déterminée par l'incorporation de BrdU. Les résultats représentent les moyennes de tests de 42 échantillons issues de sept expériences indépendantes.

** $P < 0,01$ versus contrôle *** $P < 0,001$ versus contrôle.

3.3.4 Implication des récepteurs P2Y1 dans l'insulino-sécrétion

J'ai pu également participer à des travaux effectués en collaboration avec l'équipe du Professeur Gachet (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Strasbourg) sur les récepteurs P2Y1, ces travaux ont été publiés dans le journal «Purinergic Signalling» en 2005 : «The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice.» (152) (pages 119 à 125).

3.3.4.1 Méthodologie

Nous avons été responsables de l'étude sur l'insulino-sécrétion chez des souris déficientes en récepteur P2Y1. Le modèle expérimental utilisé est celui des îlots isolés de souris (décrit à la page 89).

3.3.4.2 Résultats

Les résultats présentés dans la publication à la page 123 (figure 5) sont la moyenne de 26 à 35 expériences indépendantes en présence de différentes concentrations de glucose.

La réponse insulinique des îlots de souris normales augmente avec le niveau de concentration en glucose du milieu, de 0,63 $\pm$ 0,07 ng/îlot par heure lorsque le

glucose est à 3 mmol/l, à 1,41 $\pm$ 0,14 ng/îlot par heure lorsque le glucose est à 20 mmol/l. En présence d'une concentration de glucose non stimulante de 3 mmol/l, le niveau d'insulino-sécrétion est identique entre les îlots de souris déficientes en P2Y1 (0,58 $\pm$ 0,09 ng/îlot par heure) et ceux de souris normales. En revanche, la réponse insulinique des îlots de souris déficientes en récepteur P2Y1 à une concentration de glucose stimulante (20 mmol/l) est significativement augmentée (2,0 $\pm$ 0,2 ng/îlot par heure) par rapport à la sécrétion des îlots de souris normales ($p < 0,02$).

Purinergic Signalling (2005) 1: 145–151 © Springer 2005

The $P2Y_1$ receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice

Catherine Léon[1], Monique Freund[1], Olivier Latchoumanin[2], Anne Farret[2], Pierre Petit[2], Jean-Pierre Cazenave[1] & Christian Gachet[1]

[1]*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace, Strasbourg Cedex, France;* [2]*Centre de Pharmacologie et Biotechnologie pour la Santé, CNRS UMR 5160, Faculté de Médecine, Institut de Biologie, Montpellier Cedex 2, France*

Received 27 August 2004; accepted in revised form 18 October 2004

Key words: glucose homeostasis, glycemia, insulin, knockout mice, $P2Y_1$

Abstract

Pancreatic β cells express several P2 receptors including $P2Y_1$ and the modulation of insulin secretion by extracellular nucleotides has suggested that these receptors may contribute to the regulation of glucose homeostasis. To determine whether the $P2Y_1$ receptor is involved in this process, we performed studies in $P2Y_1-/-$ mice. In baseline conditions, $P2Y_1-/-$ mice exhibited a 15% increase in glycemia and a 40% increase in insulinemia, associated with a 10% increase in body weight, pointing to a role of the $P2Y_1$ receptor in the control of glucose metabolism. Dynamic experiments further showed that $P2Y_1-/-$ mice exhibited a tendency to glucose intolerance. These features were associated with a decrease in the plasma levels of free fatty acid and triglycerides. When fed a lipids and sucrose enriched diet for 15 weeks, the two genotypes no longer displayed any significant differences. To determine whether the $P2Y_1$ receptor was directly involved in the control of insulin secretion, experiments were carried out in isolated Langerhans islets. In the presence of high concentrations of glucose, insulin secretion was significantly greater in islets from $P2Y_1-/-$ mice. Altogether, these results show that the $P2Y_1$ receptor plays a physiological role in the maintenance of glucose homeostasis at least in part by regulating insulin secretion.

Introduction

Extracellular nucleotides regulate biological processes as diverse as smooth muscle contraction, neurotransmission, the immune response, inflammation, platelet aggregation, pain or the modulation of cardiac functions by acting on specific receptors [1]. These so-called P2 receptors are divided into two families: The metabotropic P2Y and ionotropic P2X receptors. P2Y receptors are 7-transmembrane domain, G protein-coupled polypeptides, of which eight subtypes have been cloned and characterized to date, differing in their sequence, pharmacological properties and intracellular signaling. The first P2Y receptor to be cloned [2], thus named $P2Y_1$, is an ADP receptor expressed in a wide range of tissues which activates PLCβ through Gq coupling [3, 4]. Although the precise physiological function of this receptor in most tissues is not yet known, its role in hemostasis and thrombosis is now firmly established [5]. The $P2Y_1$ receptor is expressed in platelets [3] and together with the $P2Y_{12}$ receptor plays an important role in the platelet aggregation induced by ADP or other aggregating agents [6–9]. Thus, $P2Y_1$-deficient mice and wild-type (wt) mice treated with a $P2Y_1$ antagonist are resistant to thrombosis in several experimental models [9–13].

A growing body of evidence suggests that P2 receptors may be involved in the regulation of glucose homeostasis. Pancreatic β cells express a wide range of P2 receptors including P2Y subtypes [14], while stable analogues of ATP and ADP have been shown to increase insulin secretion and decrease glycemia *in vivo* [15]. In addition, potent $P2Y_1$ agonists have been described as insulin secretagogues in isolated rat pancreas [16], suggesting the functional participation of a $P2Y_1$-like receptor in this mechanism. A role of P2Y receptors in glucose transport has also been proposed in rat cardiomyocytes [17] and human skin fibroblasts [18].

To determine whether the $P2Y_1$ receptor subtype is involved in the regulation of glucose homeostasis, we performed studies in $P2Y_1-/-$ mice. $P2Y_1$ deficiency was found to result in increases in glycemia and insulinemia in the nonfasting state, associated with increased body weight and decreased plasma levels of free fatty acids and triglycerides. *In vitro* experiments in isolated pancreatic

Correspondence to: Dr Christian Gachet, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U.311, Etablissement Français du Sang-Alsace, 10 rue Spielmann 67065, Strasbourg Cedex, France. Tel: +33-388-212525; Fax: +33-388-212521; E-mail: christian.gachet@efs-alsace.fr

islets showed an increased insulin secretion in $P2Y_1$-deficient mice, suggesting a role of the $P2Y_1$ receptor in the maintenance of glucose homeostasis and in the regulation of insulin secretion.

Materials and methods

Animals

Wild-type and $P2Y_1$-deficient male and female mice were raised as described previously [9] and had a C57BL/6 background at the F7 generation. Animals used in the experiments were aged-matched (10–12 weeks old except otherwise stated), housed at 22 °C under a 12-h light/dark cycle and had free access to food and water. The mice were normally fed a standard laboratory chow containing about 3% fat (Safe, Epinay/Orge, France). Body weight was monitored by weighing the mice from weaning (21 days) to 12 months and food intake by weighing the grid metal food container every 2–3 days for 2 weeks and dividing the result by the number of mice per cage (three mice) and the number of days. The high fat/high sucrose diet (HF/HS), which was administered for 15 weeks, contained 24% fat (hydrogenated coconut oil) and was enriched in sucrose (30%) (Research Diets, New Brunswick, USA).

Lipid measurements

After an 8-h fast, mice were anesthetized with methoxyflurane and blood was drawn from the abdominal aorta into heparin lithium (20 U/ml) as anticoagulant. Plasma triglycerides, total cholesterol and HDL-cholesterol were determined using an Olympus AU400 analyzer (Olympus SA, Rungis, France) with kits and controls supplied by Olympus. Free fatty acids were measured on the AU400 analyzer using a kit from Wako (Richmond, USA).

Plasma glucose

Glucose tolerance was determined following a 24-h fast by i.p. administration of glucose (3 g/kg) and measurement of plasma glucose at 15, 30, 60 and 120 min. Insulin sensitivity was determined in mice fasted for 4 h by i.p. injection of insulin (Humulin, 0.75 mg/kg; Eli Lilly, France) and measurement of plasma glucose at 15, 30, 60 and 90 min. Blood samples were collected from the tail tip of conscious mice and glucose concentrations were measured using glucose analyzer strips (Accu-Chek active, Roche, Mannheim, Germany).

Insulin measurements

Mice were fasted for 4 h and injected with glucose (3 g/kg). Blood was taken from the orbital plexus of conscious mice at 0, 30 and 60 min and insulin was measured with a monoclonal insulin RIA (Linco Research, St Louis, MO). For the determination of insulin content in the whole pancreas, each mouse pancreas was homogenized in 4 ml of ice-cold acid–ethanol solution (0.15 N HCl:75% ethanol) [19], and insulin was extracted at 4 °C overnight. Insulin concentrations were assayed in 1,000-fold or 10,000-fold diluted samples.

Insulin secretion in isolated pancreatic islets

Langerhans islets from wild-type and $P2Y_1$-deficient female mice were isolated by collagenase digestion of the pancreas according to a technique derived from that of Lacy and Kostianowsky [20]. The islets were stabilized for 45 min at 37 °C in a Krebs–bicarbonate buffer containing (mmol/l) NaCl 108, $NaHCO_3$ 18, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2 and KH_2PO_4 1.2 (pH 7.4), bubbled with a mixture of O_2:CO_2 (95%:5%) and supplemented with glucose (5 mmol/l) and bovine serum albumin (Fraction V, 1 mg/ml). Thereafter, batches of three islets from wild-type and $P2Y_1-/-$ mice were incubated for 60 min in 1 ml of Krebs–bicarbonate buffer containing different concentrations of glucose (3, 7, 11 and 20 mmol/l). At the end of the incubation period, a sample of the medium was taken for immunoassay of insulin.

Histological examination of mouse pancreas and determination of the percentage of fat mass

For histological examination, mouse pancreas were fixed in 10% buffered neutral formalin and embedded in paraffin. For each pancreas, one slide containing three histological sections was stained with hematoxylin/eosin. The determination of body fat percentage was performed at the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France), using a Piximus apparatus (GE Medical System, Madison, Wisconsin, USA).

Statistical analyses

Values are reported as the mean ± SEM and nonparametric Mann–Whitney tests were performed to compare two groups of independent values, and the areas under the GTT curves were calculated to compare the difference between wt and $P2Y_1-/-$ mice in the glucose tolerance test. A Wilcoxon matched pairs test was used to compare the difference in body weight between wild-type and $P2Y_1-/-$ mice.

Results

Increased glycemia and body weight despite normal food consumption in $P2Y_1-/-$ mice

The effect of $P2Y_1$ deficiency on glycemia was assessed according to the nutritional status of the animals. On a normal chow diet, the plasma glucose level in nonfasted animals was significantly increased in $P2Y_1-/-$ male mice as compared to wild-type (wt) male mice (9.79 ± 0.33 and 7.95 ± 0.30 mmol/l, respectively, $P < 0.01$). A similar

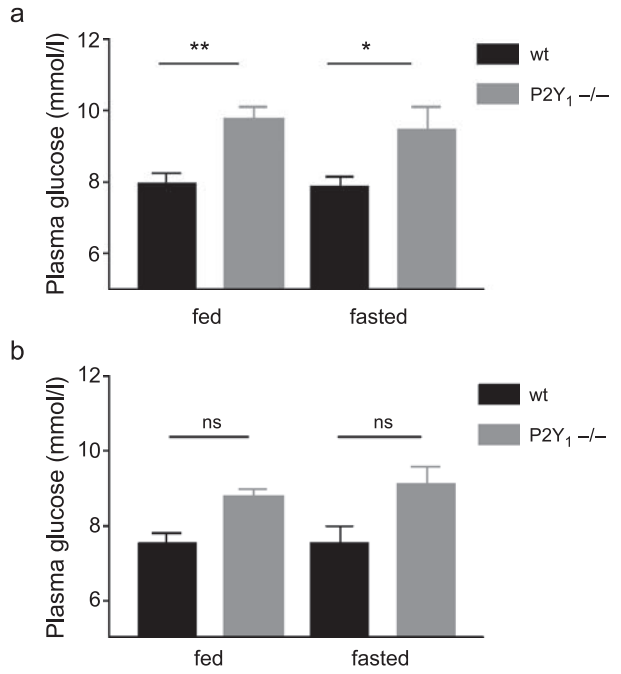


Figure 1. Plasma glucose concentrations. Plasma glucose was measured in conscious mice in the fed state or fasted for 6 h. (a) Male mice ($n = 9$), (b) female mice ($n = 10–12$). Results are the mean ± SEM; ns, nonsignificant; *$P < 0.05$; **$P < 0.01$.

tendency was observed in $P2Y_1-/-$ and wt female mice, although it did not reach statistical significance (8.98 ± 0.23 and 8.15 ± 0.38 mmol/l, respectively) (Figures 1a and b). After a 6-h fast, the difference in glucose level between the two genotypes was still significant in $P2Y_1-/-$ and wt males (9.5 ± 0.59 and 7.85 ± 0.29 mmol/l, respectively, $P < 0.05$), but not in $P2Y_1-/-$ and wt females (9.10 ± 0.20 and 7.53 ± 0.48 mmol/l, respectively) (Figures 1a and b). However, after an overnight fast, no significant difference was observed between $P2Y_1-/-$ and wt males (4.89 ± 0.19 and 4.56 ± 0.15 mmol/l, respectively) or females (4.92 ± 0.25 and 4.60 ± 0.20 mmol/l, respectively) (not shown). The increase in glycemia in fed and 6-h-fasted mice was not due to an increase in food consumption, which was similar in wt and $P2Y_1-/-$ mice (Figure 2a). It was nevertheless associated with a significant 10% increase in body weight for $P2Y_1-/-$ as compared to wt male mice, which was maintained for up to 10 months ($P < 0.0001$) (Figure 2b), whereas no difference was observed between wt and $P2Y_1-/-$ females (data not shown). Body fat percentages showed a slight increase for the male $P2Y_1-/-$ mice, although the difference did not reach statistical significance (10.7 ± 0.6 and 11.5 ± 0.5% of fat tissue for wt and $P2Y_1-/-$, respectively, $n = 4$). Similarly, the difference in plasma leptin levels, which reflect the amount of fat tissue, was not statistically different between the two genotypes (Table 1).

Biochemical parameters

A metabolic study revealed that plasma free fatty acids and triglycerides were about 20% lower ($P < 0.05$ and 0.01, respectively) in $P2Y_1-/-$ as compared to wt fasted male mice (Table 1), whereas no significant differences were observed in the nonfasted state (data not shown). No significant difference was observed in fasted or nonfasted female mice, whatever the parameter (Table 1). In view of these results, further dynamic experiments were performed in male mice only.

Glucose tolerance and insulin sensitivity

An i.p. glucose challenge (3 g/kg) was administered to determine the dynamic response of $P2Y_1-/-$ mice to increased glucose concentrations. A slight glucose intolerance was observed in $P2Y_1$-deficient mice as compared to wt mice ($P < 0.05$) (Figure 3a). The insulin sensitivity of mice fasted for 4 h was investigated by i.p. injection of insulin (0.75 U/kg) and measurement of plasma glucose concentrations over time. Although $P2Y_1-/-$ mice fasted for 4 h still exhibited increased glycemia, the glucose lowering effect of insulin was similar in these animals as compared to wt mice (Figure 3b). Insulin measurements revealed a 40% increased level in $P2Y_1-/-$ mice in the nonfasting state (4 h food withdrawal). However, after injection of glucose (3 g/kg), no significant difference in insulin levels was observed between the two genotypes at 30 and 60 min (Table 2).

Glucose tolerance, insulin sensitivity and plasma lipids in mice fed an HF/HS diet

To determine whether these slight differences could be exacerbated by diet, wt and $P2Y_1$-deficient mice were fed a high fat/high sucrose diet for 15 weeks. This diet resulted

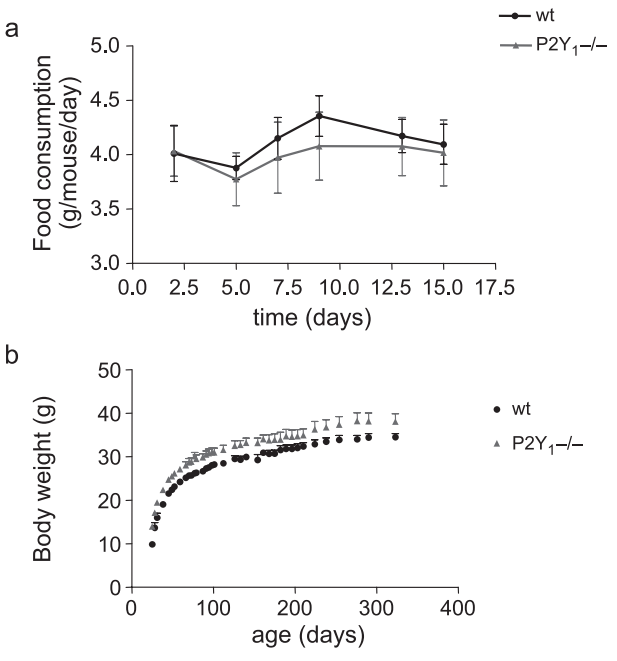


Figure 2. Food consumption (a) and growth (b) curves of wt and $P2Y_1-/-$ male mice. Data are the mean ± SEM ($n = 9$) and the difference in body weight was significant ($P < 0.0001$, Wilcoxon matched pairs test).

Table 1. Plasma levels of leptin and cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides and fatty acids in wt and $P2Y_1-/-$ mice fasted for 8 h (mean ± SEM, $n = 6$).

	Male		Female	
	wt	$P2Y_1-/-$	wt	$P2Y_1-/-$
Cholesterol (mmol/l)	1.84 ± 0.18	1.86 ± 0.11	1.62 ± 0.15	1.54 ± 0.13
HDL-C (mmol/l)	1.27 ± 0.18	1.32 ± 0.06	1.03 ± 0.11	1.04 ± 0.09
Triglycerides (mmol/l)	0.81 ± 0.03	0.66 ± 0.03[b]	0.61 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Fatty acids (mmol/l)	0.74 ± 0.04	0.60 ± 0.04[a]	0.78 ± 0.06	0.68 ± 0.04
Leptin (mmol/l)	0.28 ± 0.07	0.56 ± 0.23	0.43 ± 0.23	0.83 ± 0.37
Triglycerides (mmol/l)[c]	0.76 ± 0.06	0.72 ± 0.04	nd	nd
Fatty acids (mmol/l)[c]	0.67 ± 0.06	0.63 ± 0.03	nd	nd

C, cholesterol; nd, not determined.
[a]$P < 0.05$.
[b]$P < 0.01$.
[c]Measured after 15 weeks on a high fat/high sucrose diet.

in a significant increase in body weight of wt mice ($P < 0.01$). However, no more difference in body weight was observed between wt and $P2Y_1-/-$ mice fed the enriched diet (Figure 4a). The diet elicited glucose intolerance in both genotypes relative to the respective mice fed a normal chow diet, though after an overnight fast, glycemia remained identical whatever the genotype or diet (Figures 3a and 4b). In addition, no more significant difference in glucose tolerance or insulin sensitivity was observed between wt and $P2Y_1-/-$ mice fed the HF/HS diet (Figures 4b and c). After the 4-h fast, glycemia was nevertheless still higher in $P2Y_1-/-$ mice fed the enriched diet (Figure 4c). Concerning plasma lipids, neither triglycerides nor free fatty acids displayed any significant difference after the HF/HS diet (Table 1).

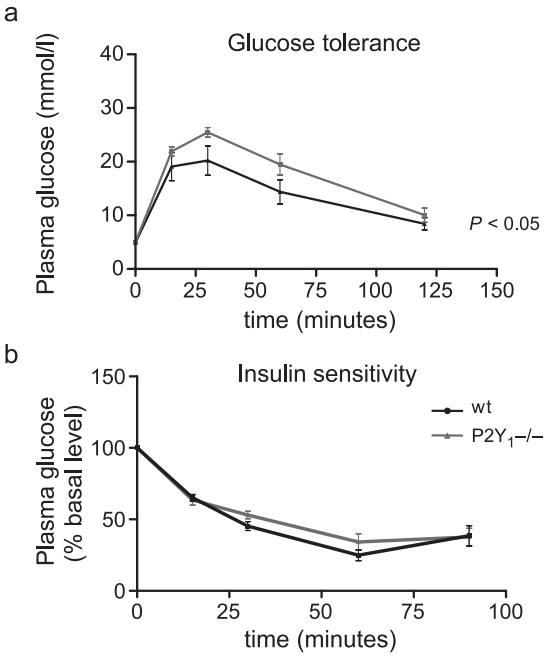


Figure 3. Glucose tolerance and insulin sensitivity of wt and $P2Y_1-/-$ mice. Plasma glucose levels were measured over time following intraperitoneal injection of glucose (3 g/kg) (a, $n = 9$; $P < 0.05$) or insulin (0.75 U/kg) (b, $n = 7$). Values are the means ± SEM. P indicates significant difference between the two area under the curve.

Pancreas morphology and insulin content, and insulin secretion in isolated pancreatic islets

Histological analysis of mouse pancreas revealed no difference between wt and $P2Y_1-/-$ mice ($n = 4$) regarding islets morphology. Pancreas weight was similar between the two genotypes (307.6 ± 30.1 and 296.2 ± 27.9 mg of tissue for the wt and $P2Y_1-/-$ mouse pancreas, respectively, $n = 5$). The insulin content of $P2Y_1-/-$ mice pancreas was not significantly different from that of wt mice (90.68 ± 7.75 and 142.3 ± 23.32 μg insulin/g tissue for the wt and $P2Y_1-/-$ pancreas, respectively, $n = 5$, $P > 0.05$). To assess the potential physiological role of the $P2Y_1$ receptor in the function of pancreatic β cells, we compared the insulin responses of pancreatic islets from wt and $P2Y_1$-deficient mice to increasing concentrations of glucose *in vitro*. The insulin response of wt islets increased with the level of glucose in the medium, from 0.63 ± 0.07 ng/islet per hour at 3 mmol/l glucose to 1.41 ± 0.14 ng/islet per hour at 20 mmol/l glucose (Figure 5). In the presence of a non-stimulating glucose concentration (3 mmol/l), the level of insulin secretion was similar in islets from $P2Y_1-/-$ (0.58 ± 0.09 ng/islet per hour) and wt mice. However, in islets from $P2Y_1-/-$ mice, the insulin response to a stimulatory glucose concentration (20 mmol/l) was significantly greater (2.0 ± 0.2 ng/islet per hour, $P < 0.02$) than the secretion in wt islets (Figure 5).

Table 2. Plasma insulin levels following glucose injection (3 g/kg) ($n = 20$).

Time (min)	0	30	60
wt (ng/ml)	0.248 ± 0.022	0.318 ± 0.036	0.190 ± 0.022
$P2Y_1-/-$ (ng/ml)	0.346 ± 0.024[a]	0.278 ± 0.035	0.168 ± 0.013

[a]$P < 0.01$.

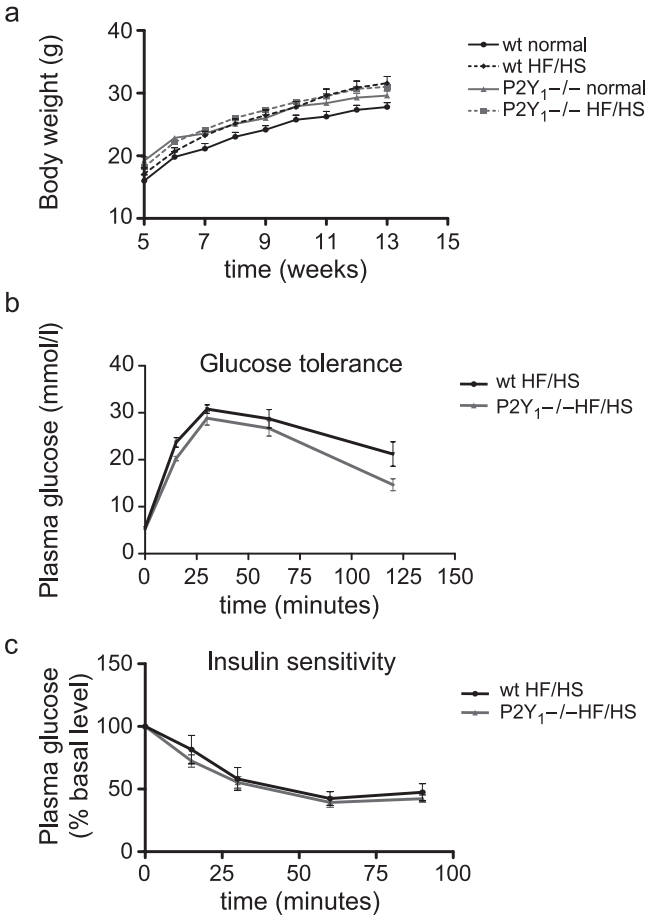


Figure 4. Growth curve, glucose tolerance and insulin sensitivity of wt and $P2Y_1-/-$ mice fed an HF/HS diet for 15 weeks. (a) The difference in body weight was again significant when comparing wt vs $P2Y_1-/-$ mice fed the normal chow diet ($n = 9$, $P < 0.01$), or wt mice fed the normal chow diet vs wt mice fed the HF/HS enriched diet ($n = 9$, $P < 0.01$), but not when comparing wt vs $P2Y_1-/-$ fed the enriched diet. (b, c) Plasma glucose levels were determined after intraperitoneal administration of glucose (3 g/kg) (b) or insulin (0.75 U/kg) (c). Results are the mean ± SEM ($n = 9$).

Discussion

In this study, we investigated the effects of $P2Y_1$ deficiency on the regulation of glucose homeostasis in mice. The most striking observations were increased glycemia and insulinemia in non-fasted $P2Y_1$-deficient animals as compared to wt mice, although a difference could no longer be detected after an overnight fast. These metabolic features were associated in males with an increase in body weight for $P2Y_1$-deficient as compared to wt mice, whereas no difference in food consumption was observed between the two genotypes. The occurrence of a significant rise in glycemia together with a 40% increase in insulinemia in $P2Y_1$-deficient mice would favor the presence of a state of insulin resistance induced by deletion of the $P2Y_1$ gene, in the absence of any increase in food intake.

It is worthy of note that the increase in insulin level was evident under basal conditions (4 h post-prandial), but not after an overnight fast or even under dynamic stimulated conditions. In the glucose tolerance test, a slight decrease in tolerance could be observed in the basal state although it should be noted that the test was performed with a relatively high dose of glucose (3 g/kg) which may have emphasized a mild phenotype. In addition, no significant difference in insulin sensitivity was observed. These findings may be explained by a mild defect of glucose transport as suggested by the work of Solini and coworkers [18]; this defect may be functionally relevant only in the post-prandial period. Regarding the increased insulinemia, our *in vitro* data in isolated islets strongly suggest that pancreatic β-cell function is improved in $P2Y_1$-deficient mice, particularly in the presence of high glucose concentrations, pointing to a putative inhibitory effect of the $P2Y_1$ receptor on insulin secretion. Although it is difficult to directly relate the *in vitro* data to the *in vivo* observations, it should be noted that insulinemia of the $P2Y_1-/-$ mice did not increase *in vivo* during a glucose challenge. One explanation for these data is that these results may be partly related to an abnormality in hypothalamic functions, where the $P2Y_1$ receptor was shown to be expressed [21, 22]. The function of islet β cells is indeed controlled by a glucose sensor acting in synergy with signals that integrate messages originating from other tissues, particularly the hypothalamus [23].

The role of extracellular nucleotides in the modulation of pancreatic insulin secretion is well known [24–26]. It has previously been demonstrated that adenine nucleotides amplify insulin secretion by acting on P2 receptors of pancreatic β cells. These receptors were found to belong to the P2Y family, with ADPβS, ATPαS and 2MeSATP being potent agonists in pancreatic islets isolated from rat, dog or man [15, 27–29]. The insulin response triggered by activation of P2Y receptors is also known to depend on the stimulating glucose concentration [29, 30]. Although the subtype of receptor involved and the stimulus-secretion coupling of β-cell P2 receptors have not yet been unequivocally established, potent $P2Y_1$ agonists have been shown to be strong insulin secretagogues in rat pancreas [16]. All these data disagree with our observation that absence of the $P2Y_1$ receptor contributes to increase insulin secretion instead of decreasing it. However, the effects of nucleotides on pancreatic cells appear to differ in the mouse from those observed in other species such as dog, rat or man. In mice, unlike in other species, the

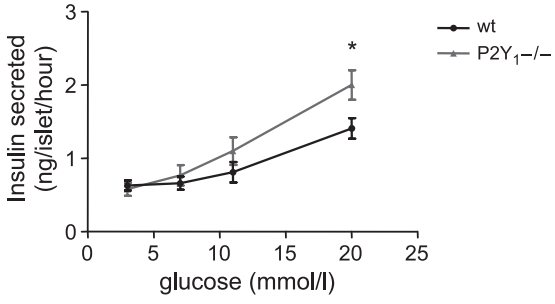


Figure 5. Insulin secretion of pancreatic islets from wt and $P2Y_1$-deficient mice in the presence of different concentrations of glucose. Results are the mean ± SEM for 26–35 independent determinations. *$P < 0.02$.

extracellular nucleotides ATP and ADP have been shown to inhibit insulin release from islet cells [31]. Similar observations were reported more recently [32], and the authors showed that nucleotides had an inhibitory action on insulin secretion through direct interference with the secretory machinery by activation of the protein phosphatase calcineurin. These results are in accordance with our findings in $P2Y_1-/-$ mice, suggesting an autocrine inhibitory role of this receptor in mouse pancreas in the fed state or under glucose stimulated conditions.

P2Y receptor stimulation was recently shown to participate in glucose uptake in human fibroblasts by mediating glucose transporter (GLUT1) translocation and activation [18]. In fibroblasts from type 2 diabetic patients, this P2Y-mediated glucose transport was defective due to constitutive P2Y desensitization in these cells, while co-incubation with the nucleotide degrading enzyme apyrase restored ATP-stimulated glucose uptake. Such a phenomenon could contribute to maintain hyperglycemia in these patients [18]. Although the P2Y subtype involved was not clearly identified, it would be interesting to determine whether the $P2Y_1$ receptor might participate in glucose transport, which could also contribute to the phenotype observed in $P2Y_1-/-$ mice. Desensitization of the $P2Y_1$ receptor is also observed in mice defective for the ectonucleotidase NTPDase1/CD39. These mice were recently reported to exhibit glucose intolerance, insulin resistance and a decrease in 2-deoxyglucose uptake in cultured hepatocytes, which adds evidence for an important role of extracellular nucleotides in glucose homeostasis, probably at least in part through the $P2Y_1$ receptor [33].

Another metabolic feature found in $P2Y_1$-deficient mice was the decrease in plasma free fatty acids (FFA) and triglycerides. Since the demonstration by [34] of the existence of the glucose–fatty acid cycle and more recently the elucidation of its mechanism [35], the inhibition of glucose metabolism by FFA has been well documented. FFA should not be involved in the insulin resistance of $P2Y_1-/-$ mice. On the contrary, the low levels of FFA and triglycerides are consistent with no real insulin resistance as these are normally elevated in insulin-resistant states. Concerning the mechanism of the decrease in plasma FFA, a direct effect of $P2Y_1$ receptor depletion in adipose tissue or in the liver cannot be excluded but would appear to be unlikely. Thus, if A_1 adenosine receptors have been shown to be expressed in adipocytes and to play an important physiological role in lipolysis control and insulin sensitivity [36], no information is available on the existence of $P2Y_1$ receptors on adipocytes. In the same way, $P2Y_1$ receptors are expressed in hepatocytes where they have recently been shown to stimulate glycogenolysis through activation of glycogen phosphorylase [37] but there is currently no evidence for the role of $P2Y_1$ receptors in fat metabolism. The decrease in plasma FFA in $P2Y_1$-deficient mice may be related to the higher plasma levels of insulin, which is a well-known antilipolytic and lipogenic hormone. This is supported by and could account for the increase in body weight in $P2Y_1$-deficient mice as compared to wt animals. Whether $P2Y_1-/-$ mice could have an enhanced utilization or storage of fatty acids remains to be investigated.

In conclusion, our data in the fed and post-prandial state in mice demonstrate a role of the $P2Y_1$ receptor in the maintenance of glucose homeostasis, at least in part through negative regulation of insulin secretion. This receptor may thus function as an autocrine loop for the feedback control of insulin secretion through release of ADP stored in insulin granules, thereby allowing the β cells to rapidly adapt their response to variations in plasma glucose. Nevertheless, we cannot exclude the possibility that the $P2Y_1$ receptor also acts through other metabolic pathways.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM and ARMESA. The authors would like to thank Dr René Gross, Michèle Manteghetti, Catherine Schwartz and Josiane Weber for their contribution to this study and Juliette Mulvihill for reviewing the text of the manuscript.

References

1. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev 1998; 50(3): 413–92.
2. Webb TE, Simon J, Krishek BJ et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. FEBS Lett 1993; 324(2): 219–25.
3. Leon C, Hechler B, Vial C et al. The $P2Y_1$ receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. FEBS Lett 1997; 403(1): 26–30.
4. Hechler B, Vigne P, Leon C et al. ATP derivatives are antagonists of the $P2Y_1$ receptor: Similarities to the platelet ADP receptor. Mol Pharmacol 1998; 53(4): 727–33.
5. Gachet C. Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. Int J Hematol 2001; 74(4): 375–81.
6. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. Nature 2001; 409(6817): 202–7.
7. Hechler B, Leon C, Vial C et al. The $P2Y_1$ receptor is necessary for adenosine 5′-diphosphate-induced platelet aggregation. Blood 1998; 92(1): 152–9.
8. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(14): 8070–4.
9. Leon C, Hechler B, Freund M et al. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. J Clin Invest 1999; 104(12): 1731–7.
10. Fabre JE, Nguyen M, Latour A et al. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in $P2Y_1$-deficient mice. Nat Med 1999; 5(10): 1199–202.
11. Lenain N, Freund M, Leon C et al. Inhibition of localized thrombosis in $P2Y_1$-deficient mice and rodents treated with MRS2179, a $P2Y_1$ receptor antagonist. J Thromb Haemost 2003; 1(6): 1144–9.
12. Leon C, Freund M, Ravanat C et al. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: Studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. Circulation 2001; 103(5): 718–23.
13. Leon C, Ravanat C, Freund M et al. Differential involvement of the $P2Y_1$ and $P2Y_{12}$ receptors in platelet procoagulant activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(10): 1941–7.
14. Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Burnstock G. Changes in

expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. Cell Tissue Res 2001; 306(3): 373–83.
15. Petit P, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Chapal J. Purinergic receptors and the pharmacology of type 2 diabetes. In Abbrachio M, Williams M (eds): Handbook of Experimental Phamacology: Purinergic and Pyrimidinergic Signalling. Berlin: Springer 2001; 377–91.
16. Fischer B, Chulkin A, Boyer JL et al. 2-thioether 5′-O-(1-thiotriphosphate)adenosine derivatives as new insulin secretagogues acting through P2Y-Receptors. J Med Chem 1999; 42(18): 3636–46.
17. Fischer Y, Becker C, Loken C. Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. J Biol Chem 1999; 274(2): 755–61.
18. Solini A, Chiozzi P, Morelli A et al. Defective P2Y purinergic receptor function: A possible novel mechanism for impaired glucose transport. J Cell Physiol 2003; 197(3): 435–44.
19. Yamaoka T, Yano M, Yamada T et al. Diabetes and pancreatic tumours in transgenic mice expressing Pa x 6. Diabetologia 2000; 43(3): 332–9.
20. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1967; 16(1): 35–9.
21. Kittner H, Franke H, Fischer W et al. Stimulation of $P2Y_1$ receptors causes anxiolytic-like effects in the rat elevated plus-maze: Implications for the involvement of $P2Y_1$ receptor-mediated nitric oxide production. Neuropsychopharmacology 2003; 28(3): 435–44.
22. Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP et al. Expression pattern of human P2Y receptor subtypes: A quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. Biochim Biophys Acta 2001; 1521(1–3): 107–19.
23. Penicaud L, Leloup C, Lorsignol A et al. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002; 5(5): 539–43.
24. Levine RA, Oyama S, Kagan A, Glick SM. Stimulation of insulin and growth hormone secretion by adenine nucleotides in primates. J Lab Clin Med 1970; 75(1): 30–6.
25. Loubatieres-Mariani MM, Chapal J, Lignon F, Valette G. Structural specificity of nucleotides for insulin secretory action from the isolated perfused rat pancreas. Eur J Pharmacol 1979; 59(3–4): 277–86.
26. Chapal J, Loubatieres-Mariani MM. Effects of phosphate-modified adenine nucleotide analogues on insulin secretion from perfused rat pancreas. Br J Pharmacol 1981; 73(1): 105–10.
27. Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani MM, Roye M. Evidence for two different P2-purinoceptors on beta cell and pancreatic vascular bed. Br J Pharmacol 1987; 91(4): 783–7.
28. Ribes G, Bertrand G, Petit P, Loubatieres-Mariani MM. Effects of 2-methylthio ATP on insulin secretion in the dog *in vivo*. Eur J Pharmacol 1988; 155(1–2): 171–4.
29. Petit P, Hillaire-Buys D, Manteghetti M et al. Evidence for two different types of P2 receptors stimulating insulin secretion from pancreatic B cell. Br J Pharmacol 1998; 125(6): 1368–74.
30. Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatieres-Mariani MM et al. P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. Pancreas 2001; 22(1): 69–71.
31. Petit P, Bertrand G, Schmeer W, Henquin JC. Effects of extracellular adenine nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic beta-cells. Br J Pharmacol 1989; 98(3): 875–82.
32. Poulsen CR, Bokvist K, Olsen HL et al. Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic beta-cells. Diabetes 1999; 48(11): 2171–81.
33. Thukral C, Kotani K, Csizmadia E et al. Glucose homeostasis in cd39-/- null mice: Role of extracellular nucleotides in mediation of insulin resistance. In 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides; 2004. Chapel Hill, North Carolina, USA 2004.
34. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1963; 1:785–9.
35. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 2000; 106(2): 171–6.
36. Dong Q, Ginsberg HN, Erlanger BF. Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. Diabetes Obes Metab 2001; 3(5): 360–6.
37. Dixon J, Hall JF, Webb TE, Boarder M. Regulation of rat hepatocyte function by P2Y receptors: Focus on control of glycogen phosphorylase and cyclic AMP by 2-MeSADP. J Pharmacol Exp Ther 2004.

4 Discussion et perspectives

Dans les travaux que nous avons présentés et qui ont été publiés dans la revue «Diabetes», nous avons tenté de mieux caractériser les mécanismes cellulaires mis en jeu par l'activation des récepteurs P2Y de la cellule β pancréatique, en utilisant le modèle du pancréas isolé perfusé de Rat (76).

Nos résultats montrent que l'ADPβS, agoniste stable des récepteurs P2Y, potentialise l'insulino-sécrétion induite par une stimulation glucosée mimant l'augmentation post-prandiale de la glycémie. Cet effet dépend du métabolisme du glucose ; il est indépendant d'un effet direct sur les canaux potassiques ATP dépendants, mais nécessite probablement une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. L'implication du métabolisme du glucose est clairement démontré par nos expériences réalisées en présence de SNP, qui est un donneur de NO. En effet, il a été montré que le NO inhibait de façon importante des enzymes glycolytiques telles que la phosphofructokinase (237), la glycéraldéhyde phosphate deshydrogénase (58), ainsi que l'oxydase du cytochrome mitochondrial (27), et le donneur de NO diminue de façon drastique l'effet de potentialisation de l'ADPβS. On sait que le glucose entraîne une insulino-sécrétion par son métabolisme oxydatif, l'augmentation du ratio ATP/ADP, la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants, la dépolarisation membranaire, l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants, l'influx de Ca^{2+}, l'augmentation de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} libre, et l'activation de l'exocytose (111). Nous nous sommes donc demandés si l'ADPβS pourrait potentialiser l'insulino-sécrétion par une

dépolarisation membranaire non métabolique. En utilisant le tolbutamide, une sulfonylurée qui bloque les canaux potassiques ATP dépendants, nous avons montré que l'agoniste du récepteur P2Y est encore fortement efficace, suggérant que l'augmentation du Ca^{2+} cytoplasmique est probablement impliqué dans l'effet de potentialisation. Ceci est également conforté par les résultats des expériences utilisant deux autres agents dépolarisants non métaboliques, le KCl et l'arginine, mais cela soulève la question d'une possible implication directe des canaux potassiques ATP dépendants. Pour explorer cette dernière hypothèse, nous avons utilisé la méthode développée par Gembal et ses collaborateurs (87), adaptée au modèle du pancréas isolé perfusé de Rat. Ainsi, les cellules β pancréatiques ont été d'abord hyperpolarisées en utilisant le diazoxide, qui ouvre les canaux potassiques ATP dépendants, puis repolarisées par une augmentation appropriée de la concentration de KCl. Puisque les cellules musculaires lisses vasculaires sont régulées par les canaux potassiques ATP dépendants (24), nous avons utilisé nos résultats sur le niveau du débit pancréatique pour déterminer la concentration de KCl nécessaire pour repolariser ces cellules (c'est-à-dire la concentration requise pour contrecarrer complètement l'effet vasodilatateur du diazoxide). Dans ces conditions (bypass des canaux potassiques ATP dépendants en présence d'une concentration intracellulaire Ca^{2+} clampée), l'ADPβS potentialise encore fortement la voie d'amplification de l'insulino-sécrétion induite par le glucose, ce qui exclut définitivement un possible effet direct de l'activation des récepteurs P2Y sur

l'activité du canal potassique ATP dépendant dans la fonction β cellulaire pancréatique. En ce qui concerne la voie de signalisation, le fait que la potentialisation de la première phase soit retrouvée avec le glucose et le tolbutamide, contrairement à ce qui se passe avec l'arginine et le KCl, est en faveur d'une modulation par l'agoniste P2Y, de la fermeture du canal potassique ATP dépendant induite par le glucose ou le tolbutamide. Un tel mécanisme additionnel peut être rapproché de l'effet du GLP-1 sur les canaux potassiques ATP dépendants médié par la protéine kinase A (156).

Nous avons donc démontré que l'ADPβS, un agoniste stable des récepteurs P2Y, potentialise l'effet insulino-sécrétoire d'une stimulation glucosée, mimant l'augmentation postprandiale de la glycémie. Cet effet nécessite le métabolisme du glucose, est probablement relié à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}, et se produit indépendamment d'un effet direct sur les canaux potassiques ATP dépendants.

Nous avons également réalisés des travaux qui ont fait l'objet d'une publication dans la revue «Pharmaceutical Research» (pages 103 à 109) qui étudiaient les effets pancréatiques d'une nouvelle génération d'agonistes des récepteurs P2Y substitués en C2 synthétisés par l'équipe du Pr B. Fischer, que ce soit leurs effets sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, mais aussi leurs effets sur la résistance vasculaire dans le modèle du pancréas isolé et perfusé de Rat.

Nos résultats montrent clairement que, parmi ces dérivés, le 2-méthylthio-ATP-α-B (isomère A) est un insulino-sécrétagogue efficace et puissant avec une meilleure sélectivité tissulaire que ses analogues structuraux (étudiés dans ces travaux) et que d'autres analogues dérivés de l'adénosine, substitués en thioether en position C2, précédemment testés (82, 119).

La synthèse chimique de ces nouveaux composés, basée sur la substitution en C2 de l'adénosine 5'-O-(1-boranotriphosphate), a été rapportée précédemment par Nahum et ses collaborateurs (172). Ces composés sont chimiquement très stables et résistants à l'hydrolyse par les ecto-nucléosides triphosphates diphosphohydrolases (NTPDases), ce qui est un prérequis indispensable pour qu'un analogue de l'ATP ait un intérêt pharmacologique potentiel.

Au cours de nos travaux, les dérivés 2-méthylthio et 2-chloro-ATP-α-B (isomères A) se sont révélés être des insulino-sécrétagogues puissants, avec une CE_{50} évaluée à 28,1 nmol/l pour le 2-méthylthio-ATP-α-B. Cette puissance est approximativement cinq fois supérieure à celle de l'ADPβS (16), qui est lui-même cent fois plus puissant que l'ATP. Cette puissance relative par rapport à l'ATP rappelle la première génération des dérivés de l'ATP substitués en C2, à savoir le 2-hexylthio-ATP-α-S (82) et le 2-benzylthio-ATP-α-S (119). Ces résultats sur l'efficacité sécrétoire de ces nouveaux analogues sont en accord avec les résultats concernant leur efficacité comme agonistes des récepteurs P2Y1, évaluée par l'induction de la libération du Ca^{2+} stocké par les cellules HEK 293 transfectées en récepteurs P2Y1 de cerveau de Rat (172). En outre, les

diastéréoisomères A des 2-méthylthio- et 2-chloro-ATP-α-B étaient des insulino-sécrétagogues plus puissants que leurs correspondants B, ce qui est également en accord avec la puissance relative de l'action de libération de Ca^{2+} induite par les récepteurs P2Y1 (172). Il reste à déterminer si l'effet sécrétoire du 2-méthylthio-ATP-α-B est couplé avec la libération de Ca^{2+} et/ou l'augmentation de l'AMPc, comme démontré auparavant avec l'ATP-α-S (45). Les nouveaux dérivés ATP-α-B substitués en C2 présentent également une très grande efficacité, avec une réponse maximale pour le 2-méthylthio-ATP-α-B (isomère A) permettant d'augmenter de neuf fois l'insulino-sécrétion basale, ce qui est supérieur à l'effet de l'ADPβS dans des conditions similaires (16). De toute façon, quelque soit le mécanisme d'action, il est certainement étroitement lié au métabolisme du glucose et à la voie d'amplification gluco-dépendante, comme le montre la gluco-dépendance de l'effet insulino-sécrétoire.

Puisque différents récepteurs P2Y sont exprimés dans différents tissus et organes (31), et que les agonistes P2Y sont connus pour modifier le tonus vasculaire, la sélectivité tissulaire de ces nouveaux composés a été étudiée. Le modèle utilisé pour nos travaux offre l'opportunité d'évaluer lors de la même expérience les effets des agonistes à la fois sur l'insulino-sécrétion mais aussi sur le tonus vasculaire pancréatique (116). La plupart des analogues structuraux qui ont été évalués jusqu'alors dans ce modèle avaient montré une faible, voire même aucune sélectivité tissulaire puisqu'ils entraînaient une libération d'insuline mais également une modification de la résistance vasculaire dans des

intervalles de concentrations équivalentes, que ce soit en diminuant (16) ou en augmentant le tonus vasculaire (82, 119). Le dérivé le plus sélectif jusqu'alors était le 2-méthyl-thio-ATP (15) mais ce composé est trop facilement métabolisé. Dans nos travaux, le 2-méthylthio-ATP-α-B (isomère A) se révèle être très sélectif puisque aucun effet vasculaire significatif n'a été observé à des concentrations fortement efficaces pour augmenter l'insulino-sécrétion. A l'opposé, l'isomère B induit une vasoconstriction transitoire mais significative alors que les analogues substitués en C2 par le chlore induisent une vasodilatation significative.

Par la suite, nous avons également étudié l'implication du système purinergique dans la régulation de la prolifération cellulaire dans le modèle expérimental de la lignée INS-1E des cellules pancréatiques. Dans nos travaux, l'agoniste du récepteur P2Y, l'ATP-α-S, mais aussi l'hormone GLP-1, entraînent une augmentation significative de l'insulino-sécrétion induite par le glucose. Ces résultats sont en accord avec les autres études précédemment réalisées concernant l'ATP-α-S (45) et le GLP-1 (134) dans le modèle des cellules INS-1. Dans nos conditions expérimentales, les effets fonctionnels de ces deux composés sur l'insulino sécrétion sont d'amplitude similaire.

L'ATP-α-S et le GLP-1 entraînent également une augmentation de l'AMPc intracellulaire des cellules β. L'accumulation en AMPc induite par l'ATP-α-S est un argument pour l'implication de cette voie de signalisation dans le

mécanisme de l'insulino sécrétion induite par l'activation des récepteurs P2Y. A la concentration utilisée dans notre étude, l'amplitude de l'effet est en accord avec celle rapportée par H. Chevassus et ses collaborateurs (45) dans les cellules INS-1. Cependant, malgré l'équivalence de l'augmentation de l'insulino-sécrétion, l'ATP-α-S apparaît moins efficace que le GLP-1 en ce qui concerne l'accumulation d'AMPc dans les cellules β. Ainsi, si l'on compare le niveau d'accumulation en AMPc induit par l'activation des récepteurs P2Y ou GLP-1, il n'y a pas de relation entre le niveau d'accumulation d'AMPc et le niveau d'insulino sécrétion. Des études antérieures avaient montré, à des concentrations variables d'ATP-α-S, que la sécrétion d'insuline était significativement corrélée au niveau d'AMPc dans les cellules β (45). En outre, Green et ses collaborateurs (98), utilisant deux incrétines, le GLP-1 et le GIP, avaient retrouvé une relation directe entre le niveau d'AMPc et l'insulino-sécrétion des cellules β. Ainsi, nos résultats suggèrent que les récepteurs P2Y et GLP-1 ont des mécanismes de couplage stimulus-sécrétion différents et que, en comparaison au GLP-1, une ou plusieurs voies de signalisation supplémentaires sont impliquée(s) dans la réponse insulinique induite par les récepteurs P2Y.

Il est bien connu désormais que la voie de signalisation de l'AMPc est impliquée dans la régulation de la prolifération des cellules β pancréatiques (216), et que le GLP-1 stimule la prolifération dans différents modèles (168).

Nos travaux montrent une augmentation faible mais significative de la prolifération des cellules de la lignée INS-1E induite par le GLP-1 en présence

de glucose 8,3 mmol/l. La faible amplitude de cet effet dans notre étude peut être liée au niveau de concentration du glucose, qui avait été choisi pour induire une réponse insulinique fonctionnelle mais également entraîner une prolifération comme observé par Buteau et ses collaborateurs (35). Plusieurs études sur l'effet du GLP-1 ont été réalisées en présence de concentrations basses de glucose (35, 244). En outre, l'agoniste du récepteur GLP-1, l'exendine-4, était inefficace sur la prolifération des cellules INS-1E en présence d'une concentration de glucose élevée à 11 mmol/l (154). Contrairement au GLP-1, l'agoniste spécifique des récepteurs P2Y, l'ATP-α-S, est sans effet aucun sur la prolifération des cellules β.

En conclusion, à une concentration en glucose qui induit une réponse insulinique comparable, l'ATPαS et le GLP-1 diffèrent quant à la stimulation de l'AMPc intracellulaire et à la prolifération cellulaire induite. Malgré les similitudes existant entre certaines propriétés fonctionnelles et mécanistiques des récepteurs P2Y et GLP-1, nos résultats montrent des différences significatives, qui pourraient être d'un intérêt potentiel pour la recherche de nouveaux insulino-sécrétagogues.

Enfin, nous avons collaboré avec l'équipe du Pr C. Gachet et étudié l'insulino-sécrétion chez des souris déficientes en récepteur P2Y1, et ce, dans le modèle expérimental des îlots isolés. Nous avons ainsi montré l'implication des récepteurs P2Y1 dans l'homéostasie glucidique chez la Souris.

Le système purinergique est extrêmement complexe et intéressant ; il offre des possibilités thérapeutiques prometteuses, et la recherche doit se poursuivre pour développer des molécules adaptées à chaque situation pathologique (33).

De nombreux résultats de recherches montrent l'interêt de developper des agonistes de récepteurs P2Y en tant que nouveaux agents antidiabétiques.

Nous avons montré dans nos travaux que des ligands sélectifs des récepteurs purinergiques P2Y1 des cellules β pancréatiques sont des insulino-sécrétagogues puissants augmentant fortement la sécrétion insulinique, et cela de façon gluco-dépendante (74). Certains ligands explorés sont également spécifiques et deviennent dès lors de très bons candidats pour des antidiabétiques potentiels.

Certains agonistes des récepteurs sont efficaces *in vivo* sur l'insulino-sécrétion et la glycémie. Il a été montré d'abord que le 2-méthylthio ATP stimulait l'insulino-sécrétion et diminuait légèrement la glycémie chez le chien (198). D'autres études ont été effectuées avec l'ADPβS, qui augmente l'insulino-sécrétion chez les chiens et améliore la tolérance au glucose après une administration intraveineuse ou même orale (113). Ce composé augmente également l'insulino-sécrétion des rats anesthésiés, l'effet étant clairement dépendant de l'état nutritionnel et de la concentration plasmatique de glucose ; il améliore également la tolérance au glucose (113). En outre, les études dans les différents modèles de pancréas isolé de rat diabétique indiquent que l'activation des récepteurs P2Y augmente la réponse insulinique dans des conditions physiologiques et pathologiques (118, 228). Finalement, les études dans les îlots

pancréatiques humains et les cellules insulino-sécrétrices isolées humaines (126, 139, 220) montrent une réponse fonctionnelle à l'ATP externe des tissus humains, avec une amplification de l'insulino-sécrétion glucose-dépendante via l'activation de récepteurs P2Y (77), dont différents sous-types sont exprimés (160).

Récemment, une équipe a développé des agonistes des récepteurs P2 très stables et spécifiques (69).

Cependant, un obstable au développement de molécules basées sur le système purinergique sera peut être dû au fait que cette famille de récepteurs a une localisation tissulaire ubiquitaire, mais aussi qu'il y a de nombreux sous types de récepteurs exprimés dans un tissu donné ou même dans une cellule isolée. En outre, l'hétéro-oligomérisation des sous types de récepteurs peut moduler la fonction et la sélectivité des ligands pour un récepteur, ce qui est un mécanisme moléculaire supplémentaire augmentant la diversité de la signalisation purinergique, comme cela a été établi par exemple pour l'association des récepteurs A_1 ou des récepteurs P2Y11 avec les récepteurs P2Y1 (65, 253). Puisqu'une sélectivité optimale est nécessaire pour le développement d'un médicament, il faudra pouvoir définir de nouvelles approches pharmacologiques pour surmonter cette complexité. Pour déterminer cette sélectivité, il faudra prendre en compte non seulement le récepteur en tant que cible, mais aussi l'ensemble du profil d'expression des sous types de récepteurs ainsi que les associations particulières de récepteurs au niveau cellulaire.

Ces molécules devront également être résistantes à la dégradation par les ectonucléotidases, au moins en partie, pour pouvoir avoir une utilisation clinique. En outre, ces composés devront avoir des propriétés correctes de solubilité, ce qui peut parfois poser des problèmes (104).

Enfin, une autre voie de développement serait d'exploiter les autres effets du système purinergique comme par exemple l'implication de ce système dans le transport périphérique du glucose (80, 218).

5 Bibliographie

1. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. Pharmacol Rev, 58: 281-341.
2. Abbracchio MP, Burnstock G (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? Pharmacol Ther, 64: 445-475.
3. Abbracchio MP, Burnstock G (1998) Purinergic signalling: pathophysiological roles. Jpn J Pharmacol, 78: 113-45.
4. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA (1995) Cloning of the β-cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. Science, 268: 423-426.
5. Aguilar-Bryan L, Bryan J (1999) Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. Endocr Rev, 20: 101-135.
6. Amisten S, Meidute-Abaravecien S, Tan C, Olde B, Lundquist I, Salehi A, Erlinge D (2010) ADP mediates inhibition of insulin secretory by activation of P2Y13 receptors in mice. Diabetologia, 53: 1927-1934.
7. Amori RE, Lau J, Pittas AG (2007) Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. JAMA, 298: 194-206.
8. Arkhammar P, Hallberg A, Kindmark H, Nilsson T, Rorsman P, Berggren PO (1990) Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in clonal insulin-producing RINm5F cells. Biochem J, 265: 203-211.
9. Baggio LL, Kim JG, Drucker DJ (2004b) Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. Diabetes, 53 Suppl 3: S205-14.
10. Balasubramanian R, de Azua IR, Wess J, Jacobson KA (2010) Activation of distinct P2Y receptor subtypes stimulates insulin secretion in MIN6 mouse pancreatic beta cells. Biochem Pharmacol, 79: 1317-26.
11. Balfour JA, McTavish D (1993) Acarbose. An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. Drugs, 46: 1025-54.
12. Banerjee M, Younis N, Soran H (2009) Vildagliptin in clinical practice: a review of literature. Expert Opin Pharmacother, 10: 2745-57.

13. Berdeu D, Gross R, Ribes G, Loubatieres-Mariani MM, Bertrand G (1994) Effects of imidazolines and derivatives on insulin secretion and vascular resistance in perfused rat pancreas. Eur J Pharmacol, 254: 119-25.
14. Bertrand G, Chapal J, Loubatieres-Mariani MM (1986) Potentiating synergism between adenosine diphosphate or triphosphate and acetylcholine on insulin secretion. Am J Physiol, 251: E416-21.
15. Bertrand G, Chapal J, Loubatières-Mariani MM, Roye M (1987) Evidence for two different P2-purinoceptors on β cell and pancreatic vascular bed. Br J Pharmacol, 91: 783-787.
16. Bertrand G, Chapal J, Puech R, Loubatières-Mariani MM (1991) Adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) is a potent agonist at P2 purinoceptors mediating insulin secretion from perfused rat pancreas. Br J Pharmacol, 102: 627-630.
17. Bertrand G, Gross R, Chapal J, Loubatières-Mariani MM (1989) Difference in the potentiating effect of adenosine triphosphate and alpha, beta-methylene ATP on the biphasic insulin response to glucose. Br J Pharmacol, 98: 998-1004.
18. Bertrand G, Petit P, Bozem M, Henquin JC (1989) Membrane and intracellular effects of adenosine in mouse pancreatic beta-cells. Am J Physiol, 257: E473-8.
19. Blachier F, Malaisse WJ (1988) Effect of exogenous ATP upon inositol phosphate production, cationic fluxes and insulin release in pancreatic islet cells. Biochem Biophys Acta, 970: 222-229.
20. Blonde L, Russell-Jones D (2009) The safety and efficacy of liraglutide with or without oral antidiabetic drug therapy in type 2 diabetes: an overview of the LEAD 1-5 studies. Diabetes Obes Metab, 11: 26-34.
21. Bokvist K, Efanov A, Sandusky G, Sewing S, Treinies I and Gromada J (2003) The P2Y4 pyrimidinergic receptor is important for nucleotide stimulation of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. Diabetes Metab, 29, pp. 4S77–74S78.
22. Bosi E (2009) Metformin-the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? Diabetes Obes Metab, 11 Suppl 2: 3-8.
23. Boyle CD (2008) Recent advances in the discovery of 11beta-HSD1 inhibitors. Curr Opin Drug Discov Devel, 11: 495-511.
24. Brayden JE (2002) Functional roles of KATP channels in vascular smooth muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol, 29: 312–316.

25. Broca C, Gross R, Petit P, Sauvaire Y, Manteghetti M, Tournier M, Masiello P, Gomis R, Ribes G (1999) 4-Hydroxyisoleucine: experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. Am J Physiol, 277: E617-E623.
26. Brooks AM, Thacker SM (2009) Dapagliflozin for the treatment of type 2 diabetes. Ann Pharmacother, 43: 1286-93.
27. Brown GC, Cooper CE (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. FEBS Lett, 356: 295-8.
28. Brubaker PL, Drucker DJ (2004) Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. Endocrinology, 145: 2653-9.
29. Burnstock G (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. Neuropharmacology, 36: 1127-1139.
30. Burnstock G (2004) Introduction: P2 receptors. Curr Top Med Chem, 4: 793-803.
31. Burnstock G, Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. Int Rev Cytol, 240: 31-304.
32. Burnstock G (2006) Purinergic signalling. Br J Pharmacol, 147: S172-81.
33. Burnstock G (2006) Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. Pharmacol Rev, 58: 58-86.
34. Buse JB, Drucker DJ, Taylor KL, Kim T, Walsh B, Hu H, Wilhelm K, Trautmann M, Shen LZ, Porter LE; DURATION-1 Study Group (2010) DURATION-1: exenatide once weekly produces sustained glycemic control and weight loss over 52 weeks. Diabetes Care. 33: 1255-61.
35. Buteau J, Foisy S, Joly E, Prentki M (2003) Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor. Diabetes, 52: 124-32.
36. Calado J (2009) Dapagliflozin, an oral sodium glucose cotransporter type 2 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. IDrugs, 12: 785-98.
37. Campbell IL and Taylor KW (1982) Effects of adenosine, 2-deoxyadenosine and N6-phenylisopropyladenosine on rat islet function and metabolism. Biochem J, 204: 689-696.
38. Candela J, Garcia-Fernandez M (1963) Stimulation of secretion of insulin by adenosine-triphosphate. Nature, 197: 1210 (abstract).

39. Cao D, Lin G, Westphale EM, Beyer EC, Steinberg TH (1997) Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signaling in insulin-secreting cells. J Cell Sci, 110: 497-504.
40. Chan SL, Dunne MJ, Stillings MR, Morgan NG (1991) The alpha 2-adrenoceptor antagonist efaroxan modulates K+ATPchannels in insulin-secreting cells. Eur J Pharmacol, 204: 41-48.
41. Chapal J, Hillaire-Buys D, Bertrand G, Pujalte D, Petit P, Loubatières-Mariani MM (1997) Comparative effects of adenosine-5'-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. Fundam Clin Pharmocol, 11: 537-545.
42. Chapal J, Bertrand G, Hillaire-Buys D, Gross R, Loubatières-Mariani MM (1993) Prior glucose deprivation increases the first phase of glucose-induced insulin response: possible involvement of endogenous ATP and (or) ADP. Can J Physiol Pharmacol, 71: 611-4.
43. Chapal J, Loubatières-Mariani MM (1981) Effects of phosphate-modified adenine nucleotide analogues on insulin secretion from perfused rat pancreas. Br J Pharmacol, 73: 105-110.
44. Chapal J, Loubatières-Mariani MM (1981) Attempt to antagonize the stimulatory effect of ATP on insulin secretion. Eur J Pharmacol, 74: 127-134.
45. Chevassus H, Roig A, Belloc C, Lajoix AD, Manteghetti M, Petit P (2002) P2Y-receptor activation enhances insulin release from pancreatic β-cells by triggering the cyclic AMP/ protein kinase A pathway. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 366: 464-9.
46. Christensen M, Knop FK (2010) Once-weekly GLP-1 agonists: How do they differ from exenatide and liraglutide? Curr Diab Rep, 10: 124-32.
47. Christensen M, Knop FK, Holst JJ, Vilsboll T (2009) Lixisenatide, a novel GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus. IDrugs, 12: 503-13.
48. Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM (1997) Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. J Biol Chem, 272: 31969-31973.
49. Communi D, Robaye B, Boeynaems JM (1999) Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. Br J Pharmacol, 128: 1199-1206.
50. Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Burnstock G (2001) Changes in expression of P2 receptors in rat and mouse pancreas during development and ageing. Cell Tissue Res, 306: 373-83.

51. Coutinho-Silva R, Parsons M, Robson T, Lincoln J, Burnstock G (2003) P2X and P2Y purinoceptor expression in pancreas from streptozotocin-diabetic rats. Mol Cell Endocrinol, 204: 141-54.
52. Culy CR, Jarvis B (2001) Repaglinide: a review of its therapeutic use in type 2 diabetes mellitus. Drugs, 61: 1625-60.
53. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. Diabetes, 44: 1126-31.
54. Deacon CF (2004) Therapeutic Strategies Based on Glucagon-Like Peptide 1. Diabetes, 53: 2181-2189.
55. Deacon CF, Holst JJ (2009) Saxagliptin: a new dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. Adv Ther, 26: 488-99.
56. DeFronzo RA (2010) Current issues in the treatment of type 2 diabetes. Overview of newer agents: where treatment is going. Am J Med, 123: S38-48.
57. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG, Guerre-Millo M, Wong K, Saladin R, Hamann LG, Staels B, Briggs MR, Auwerx J (1996) Thiazolidinediones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. J Clin Invest, 98: 1004-9.
58. Dimmeler S, Lottspeich F, Brüne B (1992) Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J Biol Chem, 267: 16771-4.
59. Dornhorst A (2001) Insulinotropic meglitinide analogues. Lancet, 358: 1709-1716.
60. Dostálová I, Haluzíková D, Haluzík M (2009) Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator with potential therapeutic properties in obesity/type 2 diabetes mellitus. Physiol Res, 58: 1-7.
61. Doyle ME, Egan JM (2003) Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. Pharmacol Rev, 55: 105-31.
62. Drouin P, Blickle JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, Daninos JM, Balarac N, Sauvanet JP (1999) Diagnosis and classification of diabetes mellitus: the new criteria. Diabetes Metab, 25: 72-83.
63. Dryselius S, Grapengiesser E, Hellman B, Gylfe E (1999) Voltage-dependent entry and generation of slow Ca^{2+} oscillations in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. Am J Physiol, 276: E512-8.

64. Dubyak GR, el-Moatassim C (1993) Signal transduction via P2-purinergic receptor for extracellular ATP and other nucleotides. Am J Physiol Cell Physiol, 265: C577-C606.
65. Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schäfer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G (2008) Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. Biochem J, 409: 107-16.
66. Efanov AM, Zaitsev SV, Mest HJ, Raap A, Appelskog IB, Larsson O, Berggren PO, Efendic S (2001) The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic β-cells in the absence of modulation of K(ATP) channel activity. Diabetes, 50: 797-802.
67. Efendic S, Efanov AM, Berggren PO, Zaitsev SV (2002) Two generations of insulinotropic imidazoline compounds. Diabetes, 51: S448-54.
68. Elbrond B, Jakobsen G, Larsen S, Agersø H, Jensen LB, Rolan P, Sturis J, Hatorp V, Zdravkovic M (2002) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects. Diabetes Care, 25: 1398-1404.
69. Eliahu S, Barr HM, Camden J, Weisman GA, Fischer B (2010) A novel insulin secretagogue based on a dinucleoside polyphosphate scaffold. J Med Chem, 53: 2472-81.
70. Emilien G (1999) BTS-67582 (Knoll Pharmaceuticals Co). IDrugs, 2: 355-9.
71. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP (1992) Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from Heloderma suspectum venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. J Biol Chem, 267: 7402-5.
72. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA (2006) P2 receptors: intracellular signaling. Pflugers Arch, 452: 552- 62.
73. Farret A, Chevassus H, Roux B, Petit P, Galtier F (2007) Direct rosiglitazone-induced modifications in insulin secretion, action and clearance: a single-dose hyperglycaemic clamp study. Diabetologia, 50: 1384-7.
74. Farret A, Filhol R, Linck N, Manteghetti M, Vignon J, Gross R, Petit P (2006) P2Y receptor mediated modulation of insulin release by a novel generation of 2-substituted-5'-O-(1-boranotriphosphate)-adenosine analogues. Pharm Res, 23: 2665-71.
75. Farret A, Lugo-Garcia L, Galtier F, Gross R, Petit P (2005) Pharmacological interventions that directly stimulate or modulate insulin secretion from pancreatic β-

cell: implications for the treatment of type 2 diabetes. Fundam Clin Pharmacol, 19: 647-56.

76. Farret A, Vignaud M, Dietz S, Vignon J, Petit P, Gross R (2004) P2Y purinergic potentiation of glucose-induced insulin secretion and pancreatic β-cell metabolism. Diabetes, 53 Suppl 3: S63-6.

77. Fernandez-Alvarez J, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Gomis R, Petit P (2001) P2 receptor agonists stimulate insulin release from human pancreatic islets. Pancreas, 22: 69-71.

78. Ferner RE, Neil HA (1988) Sulphonylureas and hypoglycaemia. Br Med J Clin Res, 296: 949-950.

79. Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D, Baron AD (2003) Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonylurea treatment in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care, 26: 2370-7.

80. Fischer Y, Becker C, Löken C (1999) Purinergic inhibition of glucose transport in cardiomyocytes. J Biol Chem, 274: 755-61.

81. Fischer B, Boyer JL, Hoyle CH, Ziganshin AU, Brizzolara AL, Knight GE, Zimmet J, Burnstock G, Harden TK, Jacobson KA (1993) Identification of potent, selective P2Y-purinoceptor agonists: structure-activity relationships for 2-thioether derivatives of adenosine 5'-triphosphate. J Med Chem, 36: 3937-46.

82. Fischer B, Chulkin A, Boyer JL, Harden KT, Gendron FP, Beaudoin AR, Chapal J, Hillaire-Buys D, Petit P (1999) 2-thioether 5'-O-(1-thiotriphosphate)adenosine derivatives as new insulin secretagogues acting through P2Y-Receptors. J Med Chem, 42: 3636-46.

83. Foretz M, Viollet B (2010) Mechanism of inhibition of hepatic glucose production by metformin: a new concept for an old remedy. Med Sci (Paris), 26: 663-6.

84. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U, and Williams M (1997) Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. Trends Pharmacol Sci, 18: 79-82.

85. Fumagalli M, Trincavelli L, Lecca D, Martini C, Ciana P, Abbracchio MP (2004) Cloning, pharmacological characterisation and distribution of the rat G-protein-coupled P2Y(13) receptor. Biochem Pharmacol, 68: 113-24.

86. Gallwitz B (2010) Benefit-risk assessment of exenatide in the therapy of type 2 diabetes mellitus. Drug Saf, 33: 87-100.

87. Gembal M, Gilon P, Henquin JC (1992) Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K+channels in mouse B cells. J Clin Invest, 89: 1288-1295.

88. Geschwind JF, Hiriart M, Glennon MC, Najafi H, Corkey BE, Matschinsky FM, Prentki M (1989) Selective activation of Ca^{2+} influx by extracellular ATP in a pancreatic β-cell line (HIT). Bioch Biophys Acta, 1012: 107-115.

89. Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC (1993) Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. J Biol Chem, 268: 22265-8.

90. Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Pyle L, Staten MA, Shoelson SE; TINSAL-T2D (Targeting Inflammation Using Salsalate in Type 2 Diabetes) Study Team (2010) The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. Ann Intern Med, 152: 346-57.

91. Gong Q, Kakei M, Koriyama N, Nakazaki M, Morimitsu S, Yaekura K, Tei C (2000) P2Y-purinoceptor mediated inhibition of L-type Ca^{2+} channels in rat pancreatic beta-cells. Cell Struct Funct, 25: 279-89.

92. Goodner CJ, Sweet IR, Harrison HC Jr (1988) Rapid reduction and return of surface insulin receptors after exposure to brief pulses of insulin in perifused rat hepatocytes. Diabetes, 37: 1316-23.

93. Goodner CJ, Walike BC, Koerker DJ, Ensinck JW, Brown AC, Chideckel EW, Palmer J, Kalnasy L (1977) Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. Science, 195: 177-9.

94. Grapengiesser E, Dansk H, Hellman B (2004) Pulses of external ATP aid to the synchronization of pancreatic beta-cells by generating premature Ca(2+) oscillations. Biochem Pharmacol, 68: 667-74.

95. Grapengiesser E, Dansk H, Hellman B (2005) External ATP triggers Ca^{2+} signals suited for synchronization of pancreatic beta-cells. J Endocrinol, 185: 69-79.

96. Grapengiesser E, Gylfe E, Dansk H, Hellman B (2001) Nitric oxide induces synchronous Ca^{2+} transients in pancreatic beta cells lacking contact. Pancreas, 23: 387-92.

97. Grapengiesser E, Gylfe E, Hellman B (1999) Synchronization of glucose-induced Ca^{2+} transients in pancreatic beta-cells by a diffusible factor. Biochem Biophys Res Commun, 254: 436-9.

98. Green BD, Gault VA, Flatt PR, Harriott P, Greer B, O'Harte FP (2004) Comparative effects of GLP-1 and GIP on cAMP production, insulin secretion, and in vivo antidiabetic actions following substitution of Ala8/Ala2 with 2-aminobutyric acid. Arch Biochem Biophys, 428: 136-43.

99. Greig AV, Linge C, Burnstock G (2008) Purinergic receptors are part of a signalling system for proliferation and differentiation in distinct cell lineages in human anagen hair follicles. Purinergic Signal, 4: 331-8.

100. Gribble FM, Reimann F (2003) Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. Diabetologia, 46: 875-891.

101. Gromada J, Brock B, Schmitz O, Rorsman P (2004) Glucagon-like peptide-1: regulation of insulin secretion and therapeutic potential. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 95: 252-62.

102. Gruzman A, Babai G, Sasson S (2009) Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations. Rev Diabet Stud, 6: 13-36.

103. Guertin KR, Grimsby J (2006) Small molecule glucokinase activators as glucose lowering agents: a new paradigm for diabetes therapy. Curr Med Chem, 13: 1839-1843.

104. Guile SD, Ince F, Ingall AH, Kindon ND, Meghani P, Mortimore MP (2001) The medicinal chemistry of the P2 receptor family. Prog Med Chem, 38: 115-87.

105. Guns PJ, Korda A, Crauwels HM, Van Assche T, Robaye B, Boeynaems JM, Bult H. (2005) Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. Br J Pharmacol, 146: 288-95.

106. Gylfe E, Hellman B (1987) External ATP mimics carbachol in initiating calcium mobilization from pancreatic β-cells conditionned by previous exposure to glucose. Br J Pharmacol, 92: 281-289.

107. Hale C, Wang M (2008) Development of 11beta-HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. Mini Rev Med Chem, 8: 702-710.

108. Hellman B, Dansk H, Grapengiesser E (2004) Pancreatic beta-cells communicate via intermittent release of ATP. Am J Physiol Endocrinol Metab, 286: E759-65.

109. Hellman B, Gylfe E, Grapengiesser E, Lund PE, Berts A (1992) Cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in pancreatic beta-cells. Biochim Biophys Acta, 1113: 295-305.

110. Hellman B, Gylfe E, Wesslén N, Hallberg A, Grapengiesser E, Marcström A (1989) Plasma membrane associated ATP as a regulator of the secretory activity of the pancreatic beta-cell. Exp Clin Endocrinol, 93: 125-35.

111. Henquin JC (2000) Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. Diabetes, 49: 1751-1760.

112. Herbert V, Law KS, Gotlieb CW, Blachier SJ (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. J Clin Endocrinol Metab, 25: 1375-1384.

113. Hillaire-Buys D, Bertrand G, Chapal J, Puech R, Ribes G, Loubatières-Mariani MM (1993) Stimulation of insulin secretion and improvement of glucose tolerance in rat and dog by the P2Y purinoceptor agonist, adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate). Br J Pharmacol, 109: 183-187.

114. Hillaire-Buys D, Bertrand G, Gross R, Loubatières-Mariani MM (1987) Evidence for an inhibitory A1 subtype adenosine receptor on pancreatic insulin-secreting cells. Eur J Pharmacol, 136: 109-12.

115. Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, Petit P, Loubatieres-Mariani MM (1994) Purinergic receptors on insulin-secreting cells. Fundam Clin Pharmacol, 8: 117-27.

116. Hillaire-Buys D, Chapal J, Petit P, Loubatieres-Mariani MM (1991) Dual regulation of pancreatic vascular tone by P2X and P2Y purinoceptor subtypes. Eur J Pharmacol, 199: 309-314.

117. Hillaire-Buys D, Gross R, Loubatieres-Mariani MM, Ribes G (1989) Effect of pertussis toxin on A1-receptor-mediated inhibition of insulin secretion. Br J Pharmacol, 96: 3-4.

118. Hillaire-Buys D, Gross R, Chapal J, Ribes G, Loubatieres-Mariani MM (1992) P2y purinoceptor responses of β cells and vascular bed are preserved in diabetic rat pancreas. Br J Pharmacol, 106: 610-5.

119. Hillaire-Buys D, Shahar L, Fischer B, Chulkin A, Linck N, Chapal J, Loubatières-Mariani MM, Petit P (2001) Pharmacological evaluation and chemical stability of 2-benzylthioether-5'-O-(1-thiotriphosphate)-adenosine, a new insulin secretagogue acting through P2Y receptors. Drug Dev Res, 53: 33-43.

120. Hiramoto T, Nonaka Y, Inoue K, Yamamoto T, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Gohda K, Fujita N (2004) Identification of endogenous surrogate ligands for human P2Y receptors through an in silico search. J Pharmacol Sci, 95: 81-93.

121. Holst JJ, Deacon CF (1998) Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. Diabetes, 47: 1663-70.

122. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000) Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. Diabetes, 49: 2063-9.

123. Ikenoue T, Okazaki K, Fujitani S, Tsuchiya Y, Akiyoshi M, Maki T, Kondo N (1997) Effect of a new hypoglycemic agent, A-4166 [(-)-N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-phenylalanine], on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. Biol Pharm Bull, 20: 354-9.

124. International Diabetes Federation: Diabetes Atlas 2003. Brussels, International Diabetes Federation, 2003.

125. Jacobson KA, Costanzi S, Joshi BV, Besada P, Shin DH, Ko H, Ivanov AA, Mamedova L (2006) Agonists and antagonists for P2 receptors. Novartis Found Symp, 276: 58-68; discussion 68-72, 107-12, 275-81.

126. Jacques-Silva MC, Correa-Medina M, Cabrera O, Rodriguez-Diaz R, Makeeva N, Fachado A, Diez J, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Pileggi A, Molano RD, Berggren PO, Caicedo A (2010) ATP-gated P2X3 receptors constitute a positive autocrine signal for insulin release in the human pancreatic beta cell. Proc Natl Acad Sci U S A, 107: 6465-70.

127. Jay MA, Ren J (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Curr Diabetes Rev, 3: 33-9.

128. Jetté L, Harvey L, Eugeni K, Levens N (2009) 4-Hydroxyisoleucine: a plant-derived treatment for metabolic syndrome. Curr Opin Investig Drugs, 10: 353-8.

129. Johansen OE, Birkeland KI (2007) Defining the role of repaglinide in the management of type 2 diabetes mellitus: a review. Am J Cardiovasc Drugs, 7: 319-35.

130. Johnson KM (2010) Dutogliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. Curr Opin Investig Drugs, 11: 455-63.

131. Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG (2003) Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release and exocytosis in pancreatic β-cells. J Biol Chem, 278: 8279-85.

132. Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S (2001) Critical role of cAMP-GEFII.Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. J Biol Chem, 276: 46046-46053.

133. Kawazu S, Suzuki M, Negishi K, Ishii J, Seto H., Katagiri H., Kanazawa Y, Yamanouchi S, Akanuma Y, Kajinuma H. and al. (1987) Initial phase II clinical studies on midaglizole (DG-5128). A new hypoglycemic agent. Diabetes, 36: 221-6.
134. Kemp DM, Habener JF (2002) Synergistic effect of dimethyl sulfoxide on glucagon-like peptide 1 (GLP-1)-stimulated insulin secretion and gene transcription in INS-1 cells: characterization and implications. Biochem Pharmacol, 64: 689-97.
135. Kharitonenkov A, Shanafelt AB (2008) Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. BioDrugs, 22: 37-44.
136. Kikuchi M (1996) Modulation of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus by two novel oral hypoglycaemic agents, NN623 and A4166. Diabet Med, 13: S151-5.
137. Kim D, MacConell L, Zhuang D, Kothare PA, Trautmann M, Fineman M, Taylor K. (2007) Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes. Diabetes Care, 30: 1487-93.
138. Kim JG, Baggio LL, Bridon DP, Castaigne JP, Robitaille MF, Jette L, Benquet C, Drucker DJ (2003) Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: the ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. Diabetes, 52: 751-759.
139. Kindmark H, Köhler M, Nilsson T, Arkhammar P, Wiechel KL, Rorsman P, Efendic S, Berggren PO (1991) Measurements of cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in human pancreatic islets and insulinoma cells. FEBS Lett, 291: 310-314.
140. King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care, 21: 1414-31.
141. Kirby M, Yu DM, O'Connor S, Gorrell MD (2009) Inhibitor selectivity in the clinical application of dipeptidyl peptidase-4 inhibition. Clin Sci (Lond), 118: 31-41.
142. Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A, Noguchi K (2006) Neurons and glial cells differentially express P2Y receptor mRNAs in the rat dorsal root ganglion and spinal cord. J Comp Neurol, 498: 443-54.
143. Kodra JT, Jørgensen AS, Andersen B, and al. (2008) Novel glucagon receptor antagonists with improved selectivity over the glucose dependent insulinotropic polypeptide receptor. J Med Chem, 51: 5387-5396.
144. Kolterman OG, Buse JB, Fineman MS, Gaines E, Heintz S, Bicsak TA, Taylor K, Kim D, Aisporna M, Wang Y, Baron AD (2003) Synthetic exendin-4 (exenatide)

significantly reduces postprandial and fasting plasma glucose in subjects with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab, 88: 3082-3089.

145. Lacy PE, Kostianovsky M (1967) Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes, 16: 35-9.

146. Laplante MA, Monassier L, Freund M, Bousquet P, Gachet C (2010) The Purinergic P2Y1 Receptor Supports Leptin Secretion in Adipose Tissue. Endocrinology, 151: 2060-70.

147. Lavoie EG, Fausther M, Kauffenstein G, Kukulski F, Künzli BM, Friess H, Sevigny J (2010) Identification of the ectonucleotidases expressed in mouse, rat and human Langerhans islets: Potential role of NTPDase3 in insulin secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab, in press.

148. Lazarowski ER, Boucher RC and Harden TK (2003) Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. Mol Pharmacol, 64: 785-795.

149. Lee DH, Kim EG, Park KS, Jeong SW, Kong ID, Lee JW (2007) Characteristics of P2X7-like receptor activated by adenosine triphosphate in HIT-T15 cells. Pancreas, 35: 53-62.

150. Lee DH, Park KS, Kim DR, Lee JW, Kong ID (2008) Dual effect of ATP on glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. Pancreas, 37: 302-8.

151. Leitner JW, Sussman KE, Vatter AE, Schneider FM (1975) Adenine nucleotides in the secretory granule fraction of rat islets. Endocrinology, 96: 662-677.

152. Léon C, Freund M, Latchoumanin O, Farret A, Petit P, Cazenave JP, Gachet C (2005) The P2Y(1) receptor is involved in the maintenance of glucose homeostasis and in insulin secretion in mice. Purinergic Signal, 1: 145-51.

153. Levine RA, Oyama S, Kagan A, Glick SM (1970) Stimulation of insulin and growth hormone secretion by adenine nucleotides in primates. J Lab Clin Med, 75: 30-6.

154. Li L, El-Kholy W, Rhodes CJ, Brubaker PL (2005) Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B. Diabetologia, 48: 1339-49.

155. Li G, Milani D, Dunne MJ, Pralong WF, Theler JM, Petersen OH, Wollheim CB (1991) Extracellular ATP causes Ca2(+)-dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca^{2+} mobilization but not Ca^{2+} influx and membrane depolarization. J Biol Chem, 266: 3449-3457.

156. Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB: Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. Mol Endocrinol, 16: 2135–2144.

157. Loubatières-Mariani MM, Chapal J, Lignon F, Valette G (1979) Structural specificity of nucleotides for insulin secretory action from the isolated perfused rat pancreas. Eur J Pharmacol, 59: 277-286.

158. Loubatières-Mariani MM, Demalbosc H, Ribes G, Chapal J (1969) Etude expérimentale d'un nouveau sulfamide hypoglycémiant particulièrement actif, le HB 419 ou glibenclamide. Diabetologia, 5: 1-10.

159. Lugo-Garcia L, Filhol R, Lajoix AD, Gross R, Petit P, Vignon J (2007) Expression of purinergic P2Y receptor subtypes by INS-1 insulinoma beta-cells: a molecular and binding characterization. Eur J Pharmacol, 568: 54-60.

160. Lugo-Garcia L, Nadal B, Gomis R, Petit P, Gross R, Lajoix AD (2008) Human pancreatic islets express the purinergic P2Y11 and P2Y12 receptors. Horm Metab Res, 40: 827-30.

161. Lundquist I, Alm P, Salehi A, Henningsson R, Grapengiesser E, Hellman B (2003) Carbon monoxide stimulates insulin release and propagates Ca^{2+} signals between pancreatic beta-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285: E1055-63.

162. Madsen P, Kodra JT, Behrens C, Nishimura E, Jeppesen CB, Pridal L, Andersen B, Knudsen LB, Valcarce-Aspegren C, Guldbrandt M, Christensen IT, Jørgensen AS, Ynddal L, Brand CL, Bagger MA, Lau J (2009) Human glucagon receptor antagonists with thiazole cores. A novel series with superior pharmacokinetic properties. J Med Chem, 52: 2989-3000.

163. Malviya N, Jain S, Malviya S (2010) Antidiabetic potential of medicinal plants. Acta Pol Pharm, 67: 113-8.

164. Mark M, Grell W (1997) Hypoglycaemic effects of the novel antidiabetic agent repaglinide in rats and dogs. Br J Pharmacol, 121: 1597-604.

165. Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS (2003) Pharmacological Characterization of the Human P2Y13 Receptor Mol Pharmacol, 64: 104-112.

166. Matthews JE, Stewart MW, De Boever EH, Dobbins RL, Hodge RJ, Walker SE, Holland MC, Bush MA; Albiglutide Study Group (2008) Pharmacodynamics, pharmacokinetics, safety, and tolerability of albiglutide, a long-acting glucagon-like

peptide-1 mimetic, in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab, 93: 4810-7.

167. Mears D, Sheppard NF Jr, Atwater I, Rojas E (1995) Magnitude and modulation of pancreatic beta-cell gap junction electrical conductance in situ. J Membr Biol, 146: 163-76.

168. Meier JJ, Nauck MA (2005) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. Diabetes Metab Res Rev, 21: 91-117.

169. Merglen A, Theeter S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P (2004) Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. Endocrinology, 145: 667-78.

170. Miura Y, Matsui H (2003) Glucagon-like peptide-1 induces a cAMP-dependent increase of [Na+]i associated with insulin secretion in pancreatic β-cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, 285: 1001-9.

171. Montanya E, Sesti G (2009) A review of efficacy and safety data regarding the use of liraglutide, a once-daily human glucagon-like peptide 1 analogue, in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Clin Ther, 31: 2472-88.

172. Nahum V, Zündorf G, Levesque SA, Beaudoin AR, Reiser G, Fischer B. (2002) Adenosine 5'-O-(1-boranotriphosphate) derivatives as novel P2Y(1) receptor agonists. J Med Chem, 45: 5384-96.

173. Nauck MA, Kleine N, Orskov C, Holst JJ, Willms B, Creutzfeldt W (1993) Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. Diabetologia, 36: 741-4.

174. Nauck MA, Meininger G, Sheng D, Terranella L, Stein PP. Sitagliptin Study 024 Group (2007) Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, compared with the sulfonylurea, glipizide, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin alone: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. Diabetes Obes Metab, 9: 194-205.

175. Novak I (2008) Purinergic receptors in the endocrine and exocrine pancreas. Purinergic signal, 4: 237-253.

176. Obermüller S, Lindqvist A, Karanauskaite J, Galvanovskis J, Rorsman P, Barg S. (2005) Selective nucleotide-release from dense-core granules in insulin-secreting cells. J Cell Sci, 118: 4271-82.

177. Ohtani M, Suzuki J, Jacobson KA, Oka T (2008) Evidence for the possible involvement of the P2Y(6) receptor in Ca (2+) mobilization and insulin secretion in mouse pancreatic islets Purinergic Signal, 4: 365-75.

178. Omatsu-Kanbe M, Inoue K, Fujii Y, Yamamoto T, Isono T, Fujita N, Matsuura H (2006) Effect of ATP on preadipocyte migration and adipocyte differentiation by activating P2Y receptors in 3T3-L1 cells. Biochem J, 393: 171-80.

179. Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR (2010) Purinergic signalling and bone remodelling. Curr Opin Pharmacol, 10: 322-30.

180. Owyang AM, Maedler K, Gross L, Yin J, Esposito L, Shu L, Jadhav J, Domsgen E, Bergemann J, Lee S, Kantak S (2010) XOMA 052, an Anti-IL-1{beta} Monoclonal Antibody, Improves Glucose Control and β-Cell Function in the Diet-Induced Obesity Mouse Model. Endocrinology, 151: 2515-27.

181. Pal M (2009) Recent advances in glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes. Drug Discov Today, 14: 784-92.

182. Parandeh F, Abaraviciene SM, Amisten S, Erlinge D, Salehi A (2008) Uridine diphosphate (UDP) stimulates insulin secretion by activation of P2Y6 receptors. Biochem Biophys Res Commun, 370: 499-503.

183. Pathak R, Bhatnagar S, Dubey AK (2008) Mechanisms underlying the opposing effects of P2Y receptors on the cell cycle. J Recept Signal Transduct Res, 28: 505-29.

184. Peiris AN, Stagner JI, Vogel RL, Nakagawa A, Samols E (1992) Body fat distribution and peripheral insulin sensitivity in healthy men: role of insulin pulsatility. J Clin Endocrinol Metab, 75: 290-4.

185. Perfetti R, Merckel P (2000) Glucagon-like peptide-1: a major regulator of pancreatic β-cell function. Eur J Endocrinol, 143: 717-725.

186. Petit P, Bertrand G, Schmeer W, Henquin JC (1989) Effects of extracellular adenine nucleotides on the electrical, ionic and secretory events in mouse pancreatic β-cells. Br J Pharmacol, 98: 875-882.

187. Petit P, Hillaire-Buys D, Loubatières-Mariani MM, Chapal J (2001) Purinergic receptors and the pharmacology of type 2 diabetes. In: Abbrachio MP, Williams M (eds) Handbook of Experimental Pharmacology: “Purinergic and pyrimidinergic signalling”, Springer-Verlag, Berlin, pp. 377-391.

188. Petit P, Hillaire-Buys D, Manteghetti M, Debrus S, Chapal J, Loubatières-Mariani MM (1998) Evidence for two different types of P2-receptors stimulating insulin secretion from pancreatic B cell. Br J Pharmacol, 125: 1368-1374.

189. Petit P, Lajoix AD, Gross R (2009) P2 purinergic signalling in the pancreatic beta-cell: control of insulin secretion and pharmacology. Eur J Pharm Sci, 37: 67-75.
190. Petit P, Manteghetti M, Loubatières-Mariani MM (1988) Differential effects of purinergic and cholinergic activation on the hydrolysis of membrane polyphosphoinositides in rat pancreatic islets. Biochem Pharmacol, 37: 1213-1217.
191. Petit P, Manteghetti M, Puech R, Loubatières-Mariani MM (1987) ATP and phosphate-modified adenine nucleotide analogues: effects on insulin secretion and calcium uptake. Biochem Pharmacol, 36: 377-380.
192. Plant TD, Henquin JC (1990) Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K+ channels in mouse pancreatic β-cells. Br J Pharmacol, 101: 115-120.
193. Porto I, Giubilato S, De Maria GL, Biasucci LM, Crea F (2009) Platelet P2Y12 receptor inhibition by thienopyridines: status and future. Expert Opin Investig Drugs, 18: 1317-32.
194. Poulsen CR, Bokvist K, Olsen HL, Hoy M, Capito K, Gilon P, Gromada J (1999) Multiple sites of purinergic control of insulin secretion in mouse pancreatic β-cells. Diabetes, 48: 2171-2181.
195. Pratley RE, Reusch JE, Fleck PR, Wilson CA, Mekki Q. Alogliptin Study 009 Group (2009) Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin added to pioglitazone in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Curr Med Res Opin, 25: 2361-71.
196. Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacol Rev, 50: 413-92.
197. Retterstøl K (2009) Taspoglutide: a long acting human glucagon-like polypeptide-1 analogue. Expert Opin Investig Drugs, 18: 1405-11.
198. Ribes G, Bertrand G, Petit P, Loubatières-Mariani MM (1988) Effects of 2-methylthio ATP on insulin secretion in the dog in vivo. Eur J Pharmacol, 155: 171-4.
199. Richards-Williams C, Contreras JL, Berecek KH, Schwiebert EM (2008) Extracellular ATP and zinc are co-secreted with insulin and activate multiple P2X purinergic receptor channels expressed by islet beta-cells to potentiate insulin secretion. Purinergic Signal, 4: 393-405.
200. Rizos CV, Liberopoulos EN, Mikhailidis DP, Elisaf MS (2008) Pleiotropic effects of thiazolidinediones. Expert Opin Pharmacother, 9: 1087-108.
201. Robles GI, Singh-Franco D (2009) A review of exenatide as adjunctive therapy in patients with type 2 diabetes. Drug Des Devel Ther, 3: 219-40.

202. Rosenstock J, Reusch J, Bush M, Yang F, Stewart M; Albiglutide Study Group (2009) Potential of albiglutide, a long-acting GLP-1 receptor agonist, in type 2 diabetes: a randomized controlled trial exploring weekly, biweekly, and monthly dosing. Diabetes Care, 32: 1880-6.

203. Rossi MC, Nicolucci A (2009) Liraglutide in type 2 diabetes: from pharmacological development to clinical practice. Acta Biomed, 80: 93-101.

204. Sak K, Webb TE (2002) A retrospective of recombinant P2Y receptor subtypes and their pharmacology. Arch Biochem Biophys, 397: 131-136.

205. Salehi A, Qader SS, Grapengiesser E, Hellman B (2005) Inhibition of purinoceptors amplifies glucose-stimulated insulin release with removal of its pulsatility. Diabetes, 54: 2126-2131.

206. Salehi A, Qader S.S., Grapengiesser E, Hellman B (2007) Pulses of somatostatin release are slightly delayed compared with insulin and antisynchronous to glucagon. Regul Pept, 144: 43-49.

207. Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter Posthumous EE (2010) Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus Cochrane Database Syst Rev, 20: CD002967.

208. Saltiel AR, Olefsky JM (1996) Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. Diabetes, 45: 1661-9.

209. Sauvaire Y, Petit P, Broca C, Manteghetti M, Baissac Y, Fernandez-Alvarez J, Gross R, Roye M, Leconte A, Gomis R, Ribes G (1998) 4-Hydroxyisoleucine: a novel amino acid potentiator of insulin secretion. Diabetes, 47: 206-10.

210. Scheen AJ, Paquot N, Lefebvre PJ (1991) La cellule β dans le diabète de type 2: coupable ou victime? In: Journées annuelles de Diabétologie de l'Hôtel-Dieu Flammarion médecine-Sciences. Paris, 153-169.

211. Seino Y, Nakajima H, Miyahara H, Kurita T, Bush MA, Yang F, Stewart MW (2009) Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of albiglutide, a long-acting GLP-1-receptor agonist, in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. Curr Med Res Opin, 25: 3049-57.

212. Seri K, Sanai K, Kurashima K, Imamura Y, Akita H (2000) (R)-ACX is a novel sufonylurea compound with potent, quick and short-lasting hypoglycemic activity. Eur J Pharmacol, 389: 253-6.

213. Shubrook JH, Colucci RA, Schwartz FL (2009) Exploration of the DPP-4 inhibitors with a focus on saxagliptin. Expert Opin Pharmacother, 10: 2927-34.

214. Silva AM, Rodrigues RJ, Tomé AR, Cunha RA, Misler S, Rosário LM, Santos RM (2008) Electrophysiological and immunocytochemical evidence for P2X purinergic receptors in pancreatic beta cells. Pancreas, 36: 279-83.

215. Simon J, Barnard EA (2003) The P2Y nucleotide receptors in the human genome. Acta Biol Hung, 54: 191-201.

216. Sjöholm A (1992) Intracellular signal transduction pathways that control pancreatic beta-cell proliferation. FEBS Lett, 311: 85-90.

217. Sloop KW, Michael MD, Moyers JS (2005) Glucagon as a target for the treatment of Type 2 diabetes. Expert Opin Ther Targets, 9: 593-600.

218. Solini A, Chiozzi P, Morelli A, Passaro A, Fellin R, Di Virgilio F (2003) Defective P2Y purinergic receptor function: A possible novel mechanism for impaired glucose transport. J Cell Physiol, 197: 435-44.

219. Springett GM, Kawasaki H, Spriggs DR (2004) Non-kinase second messenger signaling: new pathways with new promise. BioEssays, 26: 730-738.

220. Squires PE, James RF, London NJ, Dunne MJ (1994) ATP-induced intracellular Ca^{2+} signals in isolated human insulin-secreting cells. Pflügers Arch, 427: 181-183.

221. Stagner JI, Samols E (1985) Role of intrapancreatic ganglia in regulation of periodic insular secretions. Am J Physiol, 248: E522-30.

222. Stagner JI, Samols E, Weir GC (1980) Sustained oscillations of insulin, glucagon, and somatostatin from the isolated canine pancreas during exposure to a constant glucose concentration. J Clin Invest, 65: 939-42.

223. Stam NJ, Klomp J, Van de Heuvel N, Olijve W (1996) Molecular cloning and characterization of a novel orphan receptor (P2P) expressed in human pancreas that shows high structural homology to the P2U purinoceptor. FEBS Lett, 384: 260-4.

224. Storey DA, Bailey CJ (1998) Biphasic insulin-releasing effect of BTS 67 582 in rats. J Pharm Pharmacol, 50: 1357-60.

225. Suga S, Kanno T, Ogawa Y, Takeo T, Kamimura N, Wakui M (2000) cAMP-independent decrease of ATP-sensitive K+ channel activity by GLP-1 in rat pancreatic β-cells. Pflugers Arch, 440: 566-72.

226. Tahrani AA, Piya MK, Kennedy A, Barnett AH (2010) Glycaemic control in type 2 diabetes: targets and new therapies. Pharmacol Ther, 125: 328-61.

227. Tan C, Salehi A, Svensson S, Olde B, Erlinge D (2010) ADP receptor P2Y(13) induce apoptosis in pancreatic beta-cells.Cell Mol Life Sci, 67: 445-53.

228. Tang J, Pugh W, Polonsky KS, Zhang H (1996) Preservation of insulin secretory responses to P2 purinoceptor agonists in Zucker diabetic fatty rats. Am J Physiol, 270: E504-12.

229. Theler JM, Mollard P, Guérineau N, Vacher P, Pralong WF, Schlegel W, Wollheim CB (1992) Video imaging of cytosolic Ca^{2+} in pancreatic β-cells stimulated by glucose, carbachol, and ATP. J Biol Chem, 267: 18110-18117.

230. Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, Widmann C (1993) Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. Diabetes, 42: 1678-82.

231. Thorens B, Waeber G (1993) Glucagon-like peptide-1 and the control of insulin secretion in the normal state and NIDDM. Diabetes, 42: 1219-1225.

232. Tiessen RG, Castaigne JP, Dreyfus JF, Nemansky M, Kruizinga HH, van Vliet AA (2008) Pharmacokinetics and tolerability of a novel long-acting glucagon-like peptide-1 analog, CJC-1131, in healthy and diabetic subjects. Int J Clin Pharmacol Ther, 46: 443-52.

233. Tiwari A (2009) Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. Curr Opin Investig Drugs, 10: 1091-104.

234. Tiwari A (2010) GPR43: an emerging target for the potential treatment of type 2 diabetes, obesity and insulin resistance. Curr Opin Investig Drugs, 11: 385-93.

235. Toeller M (1994) alpha-Glucosidase inhibitors in diabetes: efficacy in NIDDM subjects. Eur J Clin Invest, 24 Suppl 3: 31-5.

236. Trube G, Rorsman P, Ohno-Shosaku T (1986) Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K+ channel in mouse pancreatic β cells. Pflügers Arch, 407: 493-499.

237. Tsuura Y, Ishida H, Shinomura T, Nishimura M, Seino Y (1998) Endogenous nitric oxide inhibits glucose-induced insulin secretion by suppression of phosphofructokinase activity in pancreatic islets. Biochem Biophys Res Commun, 252: 34-8.

238. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet, 352: 837-853.

239. Ulmann L, Hatcher JP, Hughes JP, Chaumont S, Green PJ, Conquet F, Buell GN, Reeve AJ, Chessell IP, Rassendren F (2008) Up-regulation of P2X4 receptors in spinal

microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. J Neurosci, 28: 11263-8.

240. Urusova IA, Farilla L, Hui H, D'Amico E, Perfetti R (2004) GLP-1 inhibition of pancreatic islet cell apoptosis. Trends Endocrinol Metab, 15: 27-33.

241. Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH, Rutten GE, Van Weel C (2005) Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. Cochrane Database Syst Rev, 18: CD003639.

242. Verspohl EJ, Johannwille B, Waheed A, Neye H (2002) Effect of purinergic agonists and antagonists on insulin secretion from INS-1 cells (insulinoma cell line) and rat pancreatic islets. Can J Physiol Pharmacol, 80: 562-8.

243. Von Kügelgen I (2006) Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. Pharmacol Ther, 110: 415-32.

244. Wang Q, Li L, Xu E, Wong V, Rhodes C, Brubaker PL (2004) Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells. Diabetologia, 47: 478-87.

245. Wang M, Matheson S, Picard J, Pezzullo J (2009) PC-DAC(TM): Exendin-4 (CJC-1134-PC) Significantly Reduces HbA1c and Body Weight as an Adjunct Therapy to Metformin: Two Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, 12 Week, Phase II Studies in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Abstract 553-P. Presented at the 69th Scientific Sessions of the American Diabetes Association. New Orleans, LA; June 5-9.

246. Wang CZ, Namba N, Gonoi T, Inagaki N, Seino S (1996) Cloning and pharmacological characterization of a fourth P2X receptor subtype widely expressed in brain and peripheral tissues including various endocrine tissues. Biochem Biophys Res Commun, 220: 196-202.

247. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G and Barnard EA (1993) Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP réceptor. FEBS Lett, 324: 219-225.

248. Werner U, Haschke G, Herling AW, Kramer W (2010) Pharmacological profile of lixisenatide: A new GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes. Regul Pept, 164: 58-64.

249. Wheeler MB, Lu M, Leng XH, Chen C, Boyd AE 3rd (1993) Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C. Endocrinology, 133: 57-62.

250. Wong AK, Howie J, Petrie JR, Lang CC (2009) AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. Clin Sci (Lond), 116: 607-20.

251. Xie L, Zhang M, Zhou W, Wu Z, Ding J, Chen L, Xu T (2006) Extracellular ATP stimulates exocytosis via localized Ca(2+) release from acidic stores in rat pancreatic beta cells.Traffic, 7: 429-39.

252. Yang C, Chang TJ, Chang JC, Liu MW, Tai TY, Hsu WH, Chuang LM (2001) Rosiglitazone (BRL 49653) Enhances Insulin Secretory Response via Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. Diabetes, 50: 2598–2602.

253. Yoshioka K, Saitoh O, Nakata H (2001) Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 7617-22.

254. Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N (1998) ATP-sensitive K+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. Am J Physiol, 274: C25-37.

255. Yu LF, Qiu BY, Nan FJ, Li J (2010) AMPK Activators as Novel Therapeutics for Type 2 Diabetes. Curr Top Med Chem, 10: 397-410.

256. Zaitsev SV, Efanov AM, Efanova IB, Larsson O, Ostenson CG, Gold G, Berggren PO, Efendic S (1996) Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K(ATP) channels and interaction with the exocytotic machinery. Diabetes, 45: 1610-1618.

257. Zaitsev SV, Efanov AM, Raap A, Efanova IB, Schloos J, Steckel-Hamann B, Larsson O, Ostenson CG, Berggren PO, Mest HJ, Efendic S (1999) Different modes of action of the imidazoline compound RX871024 in pancreatic β-cells. Blocking of K+ channels, mobilization of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum, and interaction with exocytotic machinery. Ann N Y Acad Sci, 881: 241-252.

258. Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Palmer K, Qiao X, Fan X, Yang S, Laz TM, Bayne M, Monsma F Jr (2002) P2Y(13): identification and characterization of a novel Galphai-coupled ADP receptor from human and mouse. J Pharmacol Exp Ther, 301: 705-13.

259. Zhou SY, Mamdani M, Qanud K, Shen JB, Pappano AJ, Kumar ST, Jacobson KA, Hintze T, Recchia F, Liang B (2010) Treatment of Heart Failure by a Methanocarba Derivative of Adenosine Monophosphate. Implication for a Role of Cardiac P2X Purinergic Receptors. J Pharmacol Exp Ther, 333: 920-8.

260. Zhou Y, Murthy JN, Zeng D, Belardinelli L, Blackburn MR (2010) Alterations in adenosine metabolism and signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. PLoS One, 5: e9224.

RESUME

Les récepteurs purinergiques P2Y ont un rôle modulateur de la sécrétion d'insuline et constituent une cible potentielle pour la recherche de nouveaux antidiabétiques.
Dans le modèle du pancréas isolé perfusé de Rat, dans des conditions fonctionnelles proches de la physiologie, nous avons montré que l'activation de ces récepteurs potentialise l'effet insulino-sécrétoire d'une stimulation glucosée. Cet effet requiert le métabolisme du glucose ; il est probablement lié à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}, et est indépendant d'un effet direct sur les canaux potassiques ATP dépendants.
Nous avons également étudié les effets pancréatiques de nouveaux agonistes des récepteurs P2Y, synthétisés par l'équipe du Pr B. Fischer : parmi ces dérivés, le 2-méthylthio-ATP-α-S (isomère A) est un insulino-sécrétagogue gluco-dépendant, hautement efficace et puissant (CE_{50} de 28,1 nmol/l), avec une très bonne sélectivité tissulaire.
Par ailleurs, nous avons exploré l'implication des récepteurs P2Y dans la prolifération cellulaire en utilisant un modèle de lignée cellulaire insulino-sécrétrice issue d'insulinome de Rat (lignée INS-1E) : aux doses utilisées, l'ATP-α-S (agoniste du récepteur P2Y) et le GLP-1 entraînent une réponse insulinique comparable, mais une augmentation de l'AMPc intracellulaire d'amplitude différente ; de plus, contrairement au GLP-1, l'ATP-α-S est sans effet sur la prolifération des cellules.
Enfin, en collaboration avec l'équipe du Pr C. Gachet, nous avons montré l'implication des récepteurs de sous-type P2Y1 dans la réponse insulinique d'îlots pancréatiques de Souris.
Nos travaux ont donc permis d'améliorer les connaissances sur les récepteurs purinergiques P2Y des cellules β pancréatiques en ce qui concerne leurs mécanismes d'action, leurs effets sur l'insulino-sécrétion et sur la prolifération cellulaire ; nous avons également contribué au développement d'agonistes spécifiques, potentiellement intéressants pour le traitement du diabète de type 2.

SUMMARY

P2Y purinergic receptors play a role in the modulation of insulin secretion and represent a potential therapeutic target for new antidiabetic drugs.
In the model of isolated perfused rat pancreas, in functional conditions close to physiology, we have shown that the activation of these receptors amplify the glucose-induced insulin secretion. This effect requires the metabolism of glucose; it is probably related to a rise in intracellular Ca^{2+} concentration, and is independent from a direct effect on ATP-dependent potassium channels.
We have also studied the pancreatic effects of new P2Y receptor agonists, synthet
ized by the group of Prof. B. Fischer: among these compounds, 2-methylthio-ATP-α-S (A isomer) is a glucose-dependent insulin secretagogue, with high efficacy and potency (EC_{50} at 28.1 nmol/l), and with very good tissue selectivity.
On the other hand, we have investigated the implication of P2Y receptors in cell proliferation, using a model of insulin secreting cell line from rat insulinoma (INS-1E cell line): at the doses used, ATP-α-S (a P2Y receptor agonist) and GLP-1 induce a similar insulin response, but an increase in intracellular cAMP of different magnitude; moreover, in contrast to GLP-1, ATP-α-S is ineffective on cell proliferation.
Finally, in collaboration with the group of Prof. C. Gachet, we have shown that the P2Y1 receptor subtype was involved in the insulin response of mice pancreatic islets.
Thus, our studies contributed to the improvement of knowledge on P2Y purinergic receptors of pancreatic β-cells, as regards their mechanisms of action, their effects on insulin secretion and on cell proliferation; we also contributed to the development of specific agonists, potentially interesting for the treatment of type 2 diabetes.