



**HAL**  
open science

# Effets de l'acidose métabolique sur les troubles de l'homéostasie du glucose

Nawel Zaïbi

► **To cite this version:**

Nawel Zaïbi. Effets de l'acidose métabolique sur les troubles de l'homéostasie du glucose. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS023 . tel-04578654

**HAL Id: tel-04578654**

**<https://theses.hal.science/tel-04578654>**

Submitted on 17 May 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## **Université de Lille**

École Doctorale de Biologie-Santé de Lille

UMR1283/8199

« Épigénétique fonctionnelle et mécanismes du diabète de type 2 et des maladies associées »

Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de

**Docteur en Sciences de l'Université de Lille**

Discipline : Science de la Vie

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie

**Effets de l'acidose métabolique sur les troubles de l'homéostasie du glucose**

par

**Nawel Sara Zaïbi**

Soutenue publiquement le 11 mai 2023 devant le jury composé de :

Pr Anne MUHR-TAILLEUX, Présidente du jury

Pr Gilles MITHIEUX, Rapporteur

Pr Catherine POSTIC, Rapporteur

Pr Christophe BRETON, Co-directeur de thèse



# Remerciements

Je tiens à adresser mes premiers remerciements aux membres de mon jury. Tout d'abord au Pr Anne Muhr-Tailleux d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et d'avoir participé à mon comité de suivi de thèse, malgré les circonstances. Un grand merci au Dr Gilles Mithieux et au Dr Catherine Postic pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et pour l'analyse et les commentaires que vous avez apportés.

Un grand merci à Philippe et Amélie, qui m'ont permis de terminer ma thèse convenablement. Merci pour le support que vous m'avez apporté et pour l'écoute que vous avez pu avoir.

Je voudrais aussi remercier une personne que je ne citerai pas, mais qui m'a permis de travailler sur ma patience, sur la gestion de mes émotions et qui m'a permis de murir, car toute épreuve est une leçon de vie.

Je souhaite ensuite remercier le Pr Christophe Breton, mon directeur de thèse qui a rejoint ma direction en dernière année sous des circonstances compliquées, pour lui comme pour moi. Merci pour tout l'aide et le soutien que tu m'as apporté, je t'en suis éternellement reconnaissante. Les choses n'ont pas forcément été simples pour moi, mais tu as su me redonner confiance en moi et trouvé les bons mots pour que je puisse retrouver la motivation que j'ai pu avoir et la passion du métier.

Judith et Claire, je ne sais même pas par où commencer. Je pense vraiment que ce manuscrit n'aurait pas vu le jour sans votre présence au laboratoire. Je voudrais vous remercier, mais je pense que merci ne suffit pas. Ces trois dernières années ont été très dures pour moi, mais

vous avez su rendre cette étape de ma vie plus douce et je vous en remercie énormément. On dit toujours que les moments difficiles soudent les gens, et j'en suis maintenant convaincue. Il y a eu des larmes, beaucoup de larmes, mais aussi beaucoup de rires et je me souviendrais toujours de ces moments avec vous. Ne m'oubliez pas, car moi, je ne vous oublierai jamais.

Jess, ma biche. Un an en tête-à-tête à l'animalerie, ça rapproche ! Puis un an en tête-à-tête dans le bureau et là, tu es devenue mon épouse de laboratoire. Ta joie et ton humour m'ont donné envie de venir le matin. Quand on aime ce qu'on fait, cela ne paraît pas être du travail et avec toi, cela a été le cas. Tu m'as permis de tenir le coup quand ça n'allait pas, et tu m'as fait pleurer de rire quand ça allait. Tu es, comme tu le dis si bien, ma cerise sur le couscous.

À mes plus belles rencontres de Lille, Émilie, Laure et Maëva. Ces trois dernières années ont été un rollercoaster d'émotions, et j'ai toujours pu compter sur vous pour être là. Certaines personnes restent à vie, et je sais qu'on finira en maison de retraite à boire des Apéros et des St-Germains spritz ou des grosses pintas (d'ailleurs gros merci à La Cloche pour nous avoir approvisionnées). Vous êtes toutes les trois des femmes tellement extraordinaires et accomplies et je vous remercie de faire partie de ma vie.

Un gros merci à Cyril, Florine, Charlène, Jean-Sébastien, Jérôme, Nicolas, VV, Hélène et Constance pour tous les moments de rires et de soutiens que vous ayez pu m'apporter. Je ne pensais pas, en venant ici, rencontrer d'aussi belles personnes. Vous êtes tous des gens formidables avec une bienveillance incroyable. D'avoir des gens comme vous rend venir au travail beaucoup plus agréable.

MC Oliv, Émilie et Florent, un grand merci pour tout votre aide et votre soutien professionnel et moral. Ça peut paraître peut à vos yeux, mais vos mots de soutiens m'ont beaucoup aidé à tenir le coup. Merci aussi pour l'apport scientifique que vous avez apporté à mes travaux et tout le temps que vous m'avez consacré.

À ma famille. Maman, papa. Je vous aime. Merci de m'avoir inculqué les valeurs que j'ai aujourd'hui. Merci de m'avoir donné l'envie de travailler dur pour mériter ce que j'ai. Merci de m'avoir supporté ces 28 années, de m'avoir aidé comme vous l'avez pu, de m'avoir soutenu et de m'avoir encouragé pendant ces trois dernières années.

À ma grande sœur, la vie n'est pas un long fleuve tranquille avec toi, mais je ne le changerai pour rien au monde. Merci de m'avoir soutenu coûte que coûte, de m'écouter et de motiver.

J'espère que vous serez tous les trois, fier de moi.

# TABLE DES MATIÈRES

Liste des figures .....	8
Liste des tableaux .....	12
Liste des abréviations .....	13
Abstract .....	18
Introduction .....	20
1. L'homéostasie du glucose .....	20
1.1. Régulation de la normoglycémie.....	20
1.1.1. Le pancréas : un organe endocrine .....	20
1.1.2. La synthèse et sécrétion d'insuline.....	22
1.1.3. La capture de glucose .....	25
1.2. La néoglucogenèse .....	26
1.3. Excrétion urinaire du glucose.....	32
2. Physiopathologie du diabète de type 2 .....	34
2.1. Développement de la maladie rénale chronique et de l'intolérance au glucose.....	36
2.1.1. Résumé de la fonction et structure rénale .....	37
2.1.2. Le néphron.....	40
2.1.2.1. La filtration glomérulaire .....	40
2.1.2.2. La traversée tubulaire .....	41
2.1.2.3. La régulation des transporteurs du tubule proximal.....	42
II. Le cotransporteur de sodium/bicarbonate 1 .....	42
III. Le transporteur 3 d'acides aminés neutres couplé au sodium.....	43
IV. Le transporteur d'acides aminés neutres sodium-dépendent.....	43
V. Le transporteur d'acides aminés neutres larges 2.....	44
VI. Les cotransporteurs de sodium/glucose.....	45
VII. Les transporteurs de glucose .....	48

2.2.	Troubles de l'homéostasie du glucose associés à la maladie rénale chronique .....	50
2.3.	Homéostasie acide-base .....	52
2.3.1.	Régulation de la concentration plasmatique de $\text{HCO}_3^-$ par le rein .....	54
2.3.2.	L'ammoniogenèse .....	57
2.3.3.	La néoglucogenèse rénale .....	60
2.4.	L'acidose métabolique aiguë et les troubles du métabolisme du glucose.....	62
2.5.	Effets de l'acidose métabolique aiguë sur les tissus périphériques.....	68
	Objectifs du projet.....	71
	Méthodes .....	73
1.	Test de tolérance au glucose (ipGTT) .....	73
2.	Test de tolérance à l'insuline (ipITT).....	74
3.	Test de tolérance au pyruvate (ipPTT).....	75
4.	Test de tolérance à la glutamine (ipGluTT) .....	75
5.	Test de tolérance à l'alanine (ipAlaTT) .....	75
6.	Métabolisme énergétique .....	76
7.	Mesure des gaz du sang et autres paramètres biologiques sanguins .....	76
8.	Recueil des organes et de sang.....	77
9.	Recueil des urines.....	77
10.	Mesure du glucose urinaire en réponse à l'injection de glucose.....	78
11.	Extraction de protéines rénales .....	78
11.1.	Protéines de membranes plasmiques.....	78
11.2.	Lysats de reins.....	79
12.	Quantification et dénaturation des protéines .....	79
13.	Western blot .....	80
13.1.	Électrophorèse en gel de polyacrylamide.....	80
13.2.	Migration.....	81



13.3.	Transfert .....	81
13.4.	Immunoblot .....	81
14.	Histologie des reins .....	83
15.	Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS).....	83
16.	Traçage de capture de glucose par Tomographie par Émission de Positons (TEP).....	84
17.	Dosage des interleukines .....	84
18.	Statistiques .....	85
	Résultats .....	87
1.	Validation du modèle d'induction de l'acidose métabolique chronique.....	87
2.	L'acidose métabolique chronique induit une baisse du poids total et augmente la dépense énergétique .....	89
3.	Étude de l'homéostasie du glucose .....	97
3.1.	Conclusion.....	109
4.	Sensibilité à l'insuline des souris en acidose métabolique.....	110
4.1.	Conclusion.....	113
5.	Étude de la néoglucogenèse au cours de l'acidose métabolique .....	114
5.1.	Estimation de la production endogène de glucose globale.....	114
5.2.	Estimation de la production endogène de glucose hépatique.....	117
5.3.	Estimation de la production endogène de glucose extra-hépatique .....	120
5.4.	Expression des enzymes de la néoglucogenèse dans le rein, le foie et l'intestin.....	124
5.5.	Conclusion.....	130
6.	Augmentation de la glycosurie en acidose métabolique chronique et détermination de l'expression rénale des transporteurs de glucose .....	131
6.1.	Conclusion.....	137
7.	Dégradation des tubules proximaux due à l'acidose métabolique chronique sans infiltration de cellules immunitaires.....	138
7.1.	Conclusion.....	147

8. La capture de glucose est augmentée en acidose métabolique chronique.....	148
8.1. Conclusion.....	153
9. L'acidose métabolique chronique augmente la régulation des procédés métaboliques et de la phosphorylation oxydative dans les cellules rénales .....	154
9.1. Conclusion.....	161
10. Évaluation du phénotype des souris sous acidose métabolique chronique soumises à un régime riche en graisse .....	162
10.1. La tolérance au glucose est fortement améliorée chez les souris sous acidose métabolique chronique sous régime riche en graisse .....	162
10.2. L'acidose métabolique chronique n'altère pas la sensibilité à l'insuline chez les souris sous régime riche en graisse.....	167
10.3. La production endogène de glucose hépatique est diminuée chez les souris sous acidose métabolique chronique soumises à un régime riche en graisse.....	169
10.4. Conclusion.....	175
Conclusion et discussion .....	176
Références .....	187

# Liste des figures

Figure 1. Schéma de la structure du pancréas .....	21
Figure 2. La régulation de la sécrétion d'insuline dans la cellule bêta. (Castiello, 2013) .....	24
Figure 3. Voie de signalisation de l'insuline sur la capture de glucose (Leto and Saltiel, 2012) .....	26
Figure 4. Pourcentages de production endogène de glucose dans le foie, le rein et l'intestin, durant différents états physiologiques (Soty et al., 2017). .....	30
Figure 5. Coupe histologique d'un rein de souris, coloré avec de l'Hématoxyline & Éosine .	38
Figure 6. Localisation des segments du néphron dans le rein. (Source : nephro.unistra.fr) ....	39
Figure 7. Schéma du modèle mécanique de la réabsorption de glucose et de sodium par les SGLTs dans le tubule proximal.....	47
Figure 8. Pourcentage de bicarbonate réabsorbé par les différentes sections du tubule proximal .....	55
Figure 9. Schéma de l'ammoniogenèse et de la sécrétion d'ammonium par le tubule proximal (Source : Curthoys and Gstraunthaler, 2014).....	58
Figure 10. Schéma des mouvements de l'ammonium le long du tubule rénal (Source : Weiner and Verlander, 2011).....	59
Figure 11. Résumé schématique de la néoglucogenèse rénale et de la localisation des enzymes (Source : Sharma and Tiwari, 2021) .....	62
Figure 12. Effets de l'insuline et de l'acidose métabolique sur les organes périphériques.....	70
Figure 13. Schéma du protocole expérimental réalisé sur la souris .....	74
Figure 14. Gaz du sang, électrolytes et urée des souris au cours du traitement.....	88
Figure 15. L'acidose métabolique chronique induit une réduction du poids total avec une réduction de la masse maigre et fluidique .....	92
Figure 16. L'acidose métabolique chronique altère le métabolisme énergétique chez les souris .....	96

Figure 17. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement .....	98
Figure 18. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement .....	100
Figure 19. Glycémie basale et concentration d'insuline plasmatique (après 15 heures de jeûne) des souris sur 6 mois de traitement .....	101
Figure 20. Gaz du sang, électrolytes et urée des souris 6 heures après un gavage de $\text{NH}_4\text{Cl}$ de 1.5 mM .....	103
Figure 21. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique 6 heures après gavage oral de $\text{NH}_4\text{Cl}$ de 1.5 mM .....	105
Figure 22. Gaz du sang, électrolytes et urée des souris 15 heures après un gavage au $\text{NH}_4\text{Cl}$ de 1.5 mM .....	107
Figure 23. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique 15 heures après gavage oral de $\text{NH}_4\text{Cl}$ de 1.5 mM .....	108
Figure 24. Évaluation de la tolérance à l'insuline des souris sous acidose métabolique chronique.....	111
Figure 25. Glycémie et concentration d'insuline plasmatique (après 5 heures de jeûne) des souris sur 6 mois de traitement.....	112
Figure 26. Évaluation de la tolérance au pyruvate des souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement .....	115
Figure 27. Évaluation de la tolérance au pyruvate des souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement .....	116
Figure 28. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement .....	118
Figure 29. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement .....	119
Figure 30. Évaluation de la tolérance à la glutamine des souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement .....	121
Figure 31. Évaluation de la tolérance à la glutamine des souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement .....	123

Figure 32. Expression différentielle des ARNm des enzymes clés de la néoglucogenèse rénale à 3, 7, 14, 30 et 60 jours de traitement .....	126
Figure 33. Acteurs clés de la néoglucogenèse hépatique et extra-hépatique régulés d'une manière différentielle en fonction des tissus chez les souris sous acidose métabolique chronique.....	128
Figure 34. Excrétion urinaire de glucose urinaire au cours de l'acidose métabolique chronique .....	132
Figure 35. Évaluation de l'expression protéique et d'ARN des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique .....	136
Figure 36. Histologie des reins des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 17 jours, 3 mois et 7.5 mois de traitement.....	140
Figure 37. Quantification de protéines contenues dans l'urine des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 6 mois de traitement.....	142
Figure 38. Infiltration de cellules immunitaires analysée par FACS dans des suspensions de cellules préparées à partir des reins de souris contrôles et sous acidose métabolique chronique entre 3 jours et 6 mois de traitement .....	145
Figure 39. Production rénale d'interleukine-6 chez les souris témoins (noir) et sous acidose métabolique chronique (rouge) .....	146
Figure 40. Quantification de standard uptake values de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 17 jours de traitement .....	149
Figure 41. Quantification de standard uptake value de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 6.5 mois de traitement.....	151
Figure 42. Quantification de standard uptake value de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous AM chronique après 6.5 mois de traitement.....	152
Figure 43. L'activité mitochondriale, le métabolisme oxydatif et les voies de signalisations cataboliques sont augmentées dans le rein des souris sous acidose métabolique chronique .	159

Figure 44. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	164
Figure 45. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 30 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	166
Figure 46. Évaluation de la tolérance à l'insuline des souris sous acidose métabolique chronique après 21 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	167
Figure 47. Évaluation de la tolérance à l'insuline des souris sous acidose métabolique chronique après 40 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	168
Figure 48. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 60 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	170
Figure 49. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 90 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	171
Figure 50. Évaluation de la tolérance à la glutamine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	172
Figure 51. Évaluation de la tolérance à la glutamine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement sous régime riche en graisse .....	174
Figure 52. Effets de l'acidose métabolique chronique chez la souris.....	176

## Liste des tableaux

Tableau 1. Résumé des études examinant les effets de l'acidose métabolique sur l'homéostasie du glucose .....	66
Tableau 2. Composition des gels acrylamide.....	80
Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la quantification protéique.....	82

# Liste des abréviations

<sup>18</sup>FDG: 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose  
2-DOG : 2-deoxy-D-glucose  
3-OMG : 3-O-methyl-D-glucose  
AA° : Acides amines neutres  
ACE2 : Enzyme de conversion de l'angiotensine 2  
Acetyl-CoA : Acetyl-coenzyme A  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AKT/p-AKT : protéine kinase B/ protéine kinase B phosphorylée  
ALAT : Alanine amonitransférase  
α-KG : alpha-cetoglutarate  
AM/MA: Acidose métabolique/Metabolic acidosis  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
ARNm : acide ribonucléique messenger  
ASCT2 : Alanine, serine, cystéine transporteur 2  
ASIC : acid sensing ion channels  
ATP: Adenosine triphosphate  
AUC : Aire sous la courbe  
B°AT1 : Sodium-dependent neutral amino acid transporter  
CA IV : Carbonic anhydrase IV  
Ca<sup>2+</sup> : Calcium  
CCD : Canal collecteur cortical  
CD13 : Aminopéptidase N  
CDK: Chronic kidney disease  
Cl<sup>-</sup> : Chlore  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
CREB : cAMP response element-binding protein  
CRTC2 : Coactivateur de transcription régulé par CREB 2  
CT: Computed tomography  
CTE: Chaîne de Transport d'électrons  
DHAP : Dihydroxyacétone phosphate  
DT : Tubule distal  
DT1 : Diabète de type 1



DT2: Diabète de type 2  
DTT : Dithiothréitol  
EE : Energy expenditure  
EGP: Endogenous glucose production;  
ETC: Electron transport chain  
FACS : Fluorescent activated cell sorting  
FBP1: Fructose biphosphatase 1  
FBP2: Fructose biphosphatase 2  
FOXO1 : Forkhead box O1  
*G6pc/G6PC*: Glucose-6-phosphatase  
GCGR : Récepteur de glucagon  
GDH : Glutamate déshydrogénase  
GFR : Glomerular filtration rate  
GIR : Glucose infusion rate  
Gln : Glutamine  
GLNS : Glutamine synthase  
Gly3P : Glycérol-3-phosphate  
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G  
GPII : Glucose-6-phosphate isomerase 1  
GS : Glutamine synthase  
Gsalph : sous-unité alpha de la protéine G  
GTPase : enzyme catalysant la guanosine triphosphate  
GWAS : Genome-wide association study  
H&E : Hématoxyline et Éosine  
 $H^+$  : Proton  
 $H^+$  ATPase : Pompe à proton  
 $H_2O$  : Eau  
HCl : Acide chlorhydrique  
 $HCO_3^-$  : Bicarbonate  
HF : High Fat  
HIF-1beta : Hypoxic inducible factor 1 beta  
HNF1a/b: hepatic nuclear factor 1 alpha/beta  
HNF4a: hepatic nuclear factor 4 alpha  
IL-6 : Interleukin-6

IL-8 : Interleukin-8  
IMCD : Canal collecteur intra-médullaire  
ipAlaTT : intraperitoneal alanine tolerance test  
ipGluTT : intraperitoneal glutamine tolerance test  
ipGTT : intraperitoneal glucose tolerance test  
ipITT : intraperitoneal insulin tolerance test  
ipPTT : intraperitoneal pyruvate tolerance test  
IR : Récepteur à l'insuline  
IRC : Insuffisance rénale chronique  
IRS : Substrat du récepteur à l'insuline  
IRS1: Insulin receptor substrate 1  
K<sup>+</sup> : Potassium  
KDa : Kilodalton  
K<sub>m</sub> : Constante de Michaelis  
LAT2 : L-type amino acid transporter 2  
LDH : Lactate déshydrogénase  
MAPK : Mitogen activated protein kinase  
MCP-1 : Monocytes chemoattractant protein-1  
MDH1 : Malate dehydrogenase 1  
MDH2: Malate dehydrogenase 2  
MODY : Maturity-onset diabetes of the young  
MPC1 : Mitochondrial pyruvate carrier 1  
MPC2 : Mitochondrial pyruvate carrier 2  
MRC : Maladie rénale chronique  
Na<sup>2+</sup> : Sodium  
Na<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> ATPase : Pompe à sodium/proton  
NaCl : Chlorure de sodium  
NADH/NAD<sup>+</sup> : Nicotinamide adenine dinucleotide  
NaHCO<sub>3</sub> : Bicarbonate de sodium  
NBCe1-a : Co-transporteur électrogène de bicarbonate de sodium 1  
NF-κb: Nuclear factor kappa beta  
NH<sub>3</sub> : Ammonium  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> : Ammoniaque  
NH<sub>4</sub>Cl : Chlorure d'ammonium

NHE-3 : Échangeur de sodium-hydrogène 3  
NS : Non significatif  
OAA: Oxaloacétate  
OGR1 : Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1  
*Pck1*/PEPCK: Phosphoenolpyruvate carboxylase  
PCO<sub>2</sub> : pression partielle de gaz carbonique  
*Pcx*/*Pcx*: pyruvate carboxylase  
PDG : Phosphogluconate déshydrogénase  
PDH : Pyruvate déshydrogénase  
PDK-1 : Pyruvate déshydrogénase kinase 1  
PDK-2 : Pyruvate déshydrogénase kinase 2  
PEG : Production endogène de glucose  
PFK-1 : phosphofructokinase-1  
Pi3K: phosphoinol-3-phosphate  
PiP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol biphosphate  
PiP<sub>3</sub> : Phosphatidylinositol-3,4,5triphosphate  
PKA : Protéine kinase A  
PKC : Protéine kinase C  
PRS : Particules de reconnaissance du signal  
PVDF : polyfluorure de vinylidène  
RBP4 : retinol-binding protein 4  
RER : Ratio d'échange respiratoire  
REr : Réticulum endoplasmique rugueux  
RNAseq : Séquençage d'ARN  
RS : Rouge Sirius  
SDS : Dodécylsulfate de sodium  
SEM : Standard error of the mean  
*Slc2a1*/GLUT1: Glucose transporter 1  
*Slc2a2*/GLUT2: Glucose transporter 2  
*Slc5a1*/SGLT1: Sodium/glucose co-transporter 1  
*Slc5a2*/SGLT2: Sodium/glucose co-transporter 2  
SNAT3 : Sodium-coupled neutral amino acid transporter 3  
SUV: Standard uptake value  
TAL : Anse ascendante large (de Henlé)

TCA: acide tricarboxylique

TDM : Tomodensitométrie

TEP : Tomographie a émission de positrons

TGF- $\beta$ : Tumor growth factor beta

Tm : Capacité maximale de transport

UCP-1 : Protéine découplante 1

VCO<sub>2</sub> : Production de dioxyde de carbone

VO<sub>2</sub> : Consommation d'oxygène

# Abstract

**Objectifs :** L'incidence du diabète de type 2 (DT2) augmente chez les patients atteints de maladie rénale chronique (MRC) quand le taux de filtration glomérulaire diminue, suggérant une corrélation physiopathologique entre la réduction de la fonction rénale et l'homéostasie du glucose. L'acidose métabolique (AM) est un symptôme commun de la MRC qui se développe quand le taux de filtration glomérulaire est inférieur à  $60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ . L'AM est causée par une diminution de la capacité d'excrétion d'acide entraînant une augmentation de la charge acide et une diminution de la concentration plasmatique de bicarbonate. Des études sur l'AM aiguë ont montré une diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline. Par contre, les effets de l'AM chronique sur l'homéostasie du glucose sont peu connus.

**Méthodes :** Nous avons évalué l'homéostasie du glucose chez la souris présentant une AM chronique par administration de  $0.28\text{ M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur une durée de 6 mois. Les altérations rénales ont été étudiées par des approches complémentaires : histologie, tri cellulaire et analyse transcriptomique. Nous avons également caractérisé le phénotype métabolique de notre modèle souris ainsi que les voies de signalisation et mécanismes impliquées dans la dérégulation rénale chez nos souris sous AM chronique.

**Résultats :** Contrairement à l'AM aiguë, l'AM chronique entraîne une baisse du poids corporel, une augmentation de la dépense énergétique et une hypoglycémie basale chez la souris. L'AM chronique améliore la tolérance au glucose sans modification de la sécrétion ou de la sensibilité à l'insuline. La capture corporelle de glucose globale ne semble pas altérée. Une diminution de la néoglucogenèse hépatique est observée chez les souris sous AM chronique. Par contre, la néoglucogenèse rénale et intestinale est augmentée. La concentration de glucose urinaire chez les souris sous AM chronique est augmentée. Cette observation est corrélée avec une diminution de l'expression des co-transporteurs de

sodium/glucose dans le tubule proximal et des altérations morphologiques des tubules sans fibrose ni inflammation visible. Le séquençage d'ARN du transcriptome entier dans le rein a montré une forte augmentation des voies cellulaires impliquées dans la régulation de l'activité mitochondriale, du métabolisme oxydatif et dans le catabolisme global des souris sous AM chronique.

**Conclusion :** L'acidose métabolique chronique entraîne une augmentation de la tolérance au glucose, sans modification de la sécrétion et de la sensibilité à l'insuline. Ceci pourrait être dû, au moins en partie, à une réduction de la production endogène de glucose hépatique et de la réabsorption de glucose urinaire, associée à une augmentation globale de la demande énergétique comme observée dans le rein.

# Introduction

## 1. L'homéostasie du glucose

### 1.1. Régulation de la normoglycémie

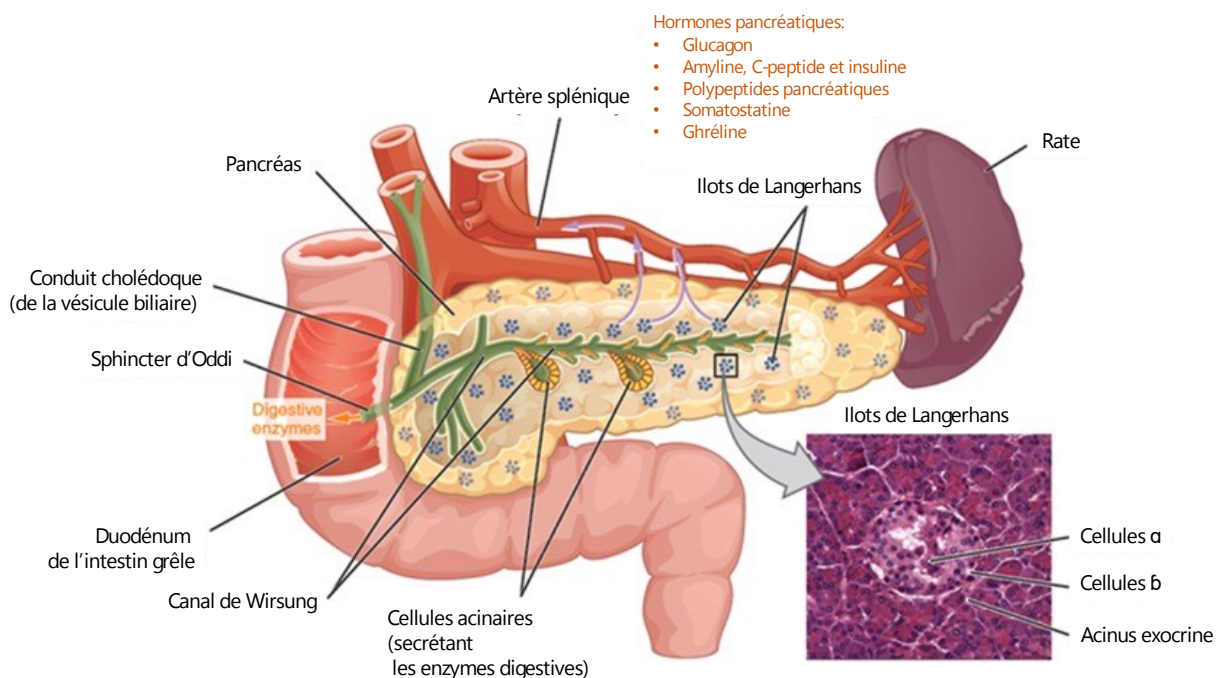
Le concept de l'homéostasie, décrit par Claude Bernard en 1865 et, plus tard, par Cannon Walter Bradford (Davies, 2016), est décrit comme une régulation des constantes physiologiques du milieu intérieur. Ce procédé est particulièrement important, car il permet de maintenir une stabilité de l'environnement interne pour le bon fonctionnement de la physiologie générale.

Le corps humain dépend d'une régulation stricte de la concentration plasmatique de glucose pour maintenir une physiologie saine. Cette régulation permet donc de maintenir la concentration plasmatique de glucose entre 0.7 mg/dL et 1.10 mg/dL en temps normal et en dessous de 1.4 mg/dL en condition postprandiale. La régulation de la glycémie est contrôlée par de nombreuses hormones et neuropeptides sécrétés par le cerveau et les tissus périphériques tels que le pancréas, le foie, les intestins, les reins, mais aussi les tissus adipeux et le muscle. Par communication intra- et inter-organes, ces derniers permettent de maintenir une homéostasie métabolique. Ces mécanismes seront donc détaillés dans les chapitres suivants.

#### 1.1.1. Le pancréas : un organe endocrine

Le pancréas a un rôle prépondérant dans la régulation du glucose, car il permet non seulement une digestion optimale des aliments ingérés par sa fonction exocrine, sécrétant des enzymes telles que la lipase, l'amylase ou le trypsinogène, mais permet la sécrétion de trois hormones clés dans l'homéostasie du glucose, l'insuline, le glucagon et la somatostatine. Le

pancréas, localisé derrière l'estomac, est composé de cellules acinaires impliquées dans sa fonction exocrine, et d'îlots de Langerhans associés à sa fonction endocrine. Les îlots de Langerhans sont des petits amas de cellules composés de cellules alpha, bêta, delta, gamma et epsilon, et sont entourés d'acinus exocrine. Ces îlots représentent 1-2% du pancréas total (Brissova *et al.*, 2005). Les cellules alpha sécrètent de glucagon et représentent environ 15-20% des îlots chez l'Homme (Brissova *et al.*, 2005). Les cellules bêta sécrètent l'insuline, mais aussi l'amyline et des peptides C et représentent 65-80% des îlots (Brissova *et al.*, 2005). Les cellules gamma produisent les polypeptides pancréatiques et représentent 3-5% des cellules totales des îlots (Katsuura *et al.*, 2002). Les cellules delta sécrètent la somatostatine et constituent 3-10% des îlots (Brissova *et al.*, 2005). Les cellules epsilon produisent la ghréline et représentent < 1% des cellules totales des îlots (Wierup *et al.*, 2002). Chez la souris, les îlots ont une composition cellulaire très semblable à celle de l'Homme, mais leur cytoarchitecture est différente (Mandarim-de-Lacerda, 2019)



**Figure 1. Schéma de la structure du pancréas**

(Source : foie-pancreas-strasbourg.eu/pathologies/pancreas. Visité le 20/02/2023)



Le pancréas contrôle la concentration plasmatique de glucose (ou glycémie) entre 4-6 mmol/L, c'est-à-dire 0.70 et 1.10 mg/dL. Pour ce faire, une régulation hormonale fine impliquant l'insuline et le glucagon est nécessaire.

L'insuline contrôle la capture de glucose dans les tissus périphériques (Zisman *et al.*, 2000), principalement en période postprandiale (Komatsu *et al.*, 2013). De plus, l'insuline stimule la glycogénogenèse (Vargas, Joy and Sepulveda, 2022), la lipogenèse (Manuel and Haeusler, 2020) et la synthèse des protéines (Krahl, 1964) alors qu'elle inhibe de la néoglucogenèse (Hatting *et al.*, 2018). À l'inverse, le glucagon active la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Goldstein and Hager, 2018) lorsque la glycémie diminue fortement en période inter-prandiale, durant le jeûne ou après un exercice (Freychet *et al.*, 1998).

### 1.1.2. La synthèse et sécrétion d'insuline

L'insuline est un polypeptide de 51 acides aminés dont le poids moléculaire est de 5.8 kDa. Son gène encode un précurseur de 110 acides aminés appelé préproinsuline. La préproinsuline contient un peptide hydrophobe possédant une partie N terminale qui interagit avec les particules de reconnaissance du signal (PRS) (Egea *et al.*, 2005). Les PRS facilitent la translocation de la préproinsuline de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (REr) vers la lumière de ce dernier, *via* les canaux conducteurs de peptides (Lomedico *et al.*, 1977). Ceci permet à la préproinsuline d'être clivée par une peptidase et de former la proinsuline (Liu *et al.*, 2018). La structure tridimensionnelle de la proinsuline due, en partie, à la formation de trois ponts disulfures s'établit par l'action de la protéine-thiol réductase (Arunagiri *et al.*, 2018). La proinsuline est ensuite transportée du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi ou elle est clivée pour former une molécule d'insuline et une molécule de C-peptide (Steiner, 2004). Ces dernières sont ensuite stockées dans des granules sécrétoires.

La concentration de glucose est le facteur le plus important concernant la biosynthèse de l'insuline, car elle stimule la transcription de son gène, mais aussi la traduction de son ARN messager (ARNm) (Gerber *et al.*, 2021 ; Evans-Molina *et al.*, 2007). De plus, le glucose est un facteur important concernant la stabilité de l'ARNm de l'insuline (Tillmar, Carlsson and Welsh, 2002). Chez la souris, environ 13000 granules d'insuline, occupant environ 10% du volume total des cellules bêta sont présents et chaque granule contient 200000 molécules d'insuline (Howell, 1984). Chez un patient sain, la sécrétion d'insuline est parfaitement régulée pour répondre aux besoins métaboliques. La structure entourant les îlots est conçue pour 'détecter' la concentration plasmatique de glucose dans les capillaires du pancréas. Pour ce faire, les capillaires sont formés d'un épithélium fenestré qui permet un échange de nutriments entre ces dernières et les tissus environnants, augmentant donc la perméabilité des vaisseaux. Ces fenestrations permettent aussi une diffusion plus rapide dans la circulation sanguine (Richards, Raines and Attie, 2010).

La première étape induisant la sécrétion d'insuline est l'entrée de glucose *via* le transporteur de glucose GLUT2, localisé dans la membrane de la cellule. Le glucose est ensuite phosphorylé par la glucokinase pour former du glucose-6-phosphate (G6P), ce dernier entre dans la voie de signalisation de la glycolyse pour former du pyruvate. La G6P peut aussi être métabolisée en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) pour former ensuite du glycérol-3-phosphate (Gly3P). Le Gly3P est un sécrétagogue important de la sécrétion d'insuline par la formation ultérieure de diacylglycerol et d'acyl-CoA à longues chaînes (Fu *et al.*, 2013).

Le pyruvate est métabolisé dans la mitochondrie pour former de l'acétyl-coenzyme A (acetyl-CoA) qui entre dans le cycle de Krebs. Ceci augmente ensuite le ratio d'ATP/ADP intracellulaire qui entraîne la fermeture des canaux  $K_{ATP}$ , puis la dépolarisation de la membrane plasmique. La dépolarisation de la membrane induit l'ouverture des canaux de

$\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendants (Fu *et al.*, 2013 ; Castiello, 2013). Le flux intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  permet enfin d'activation de l'exocytose des granules, contenant les molécules d'insuline.

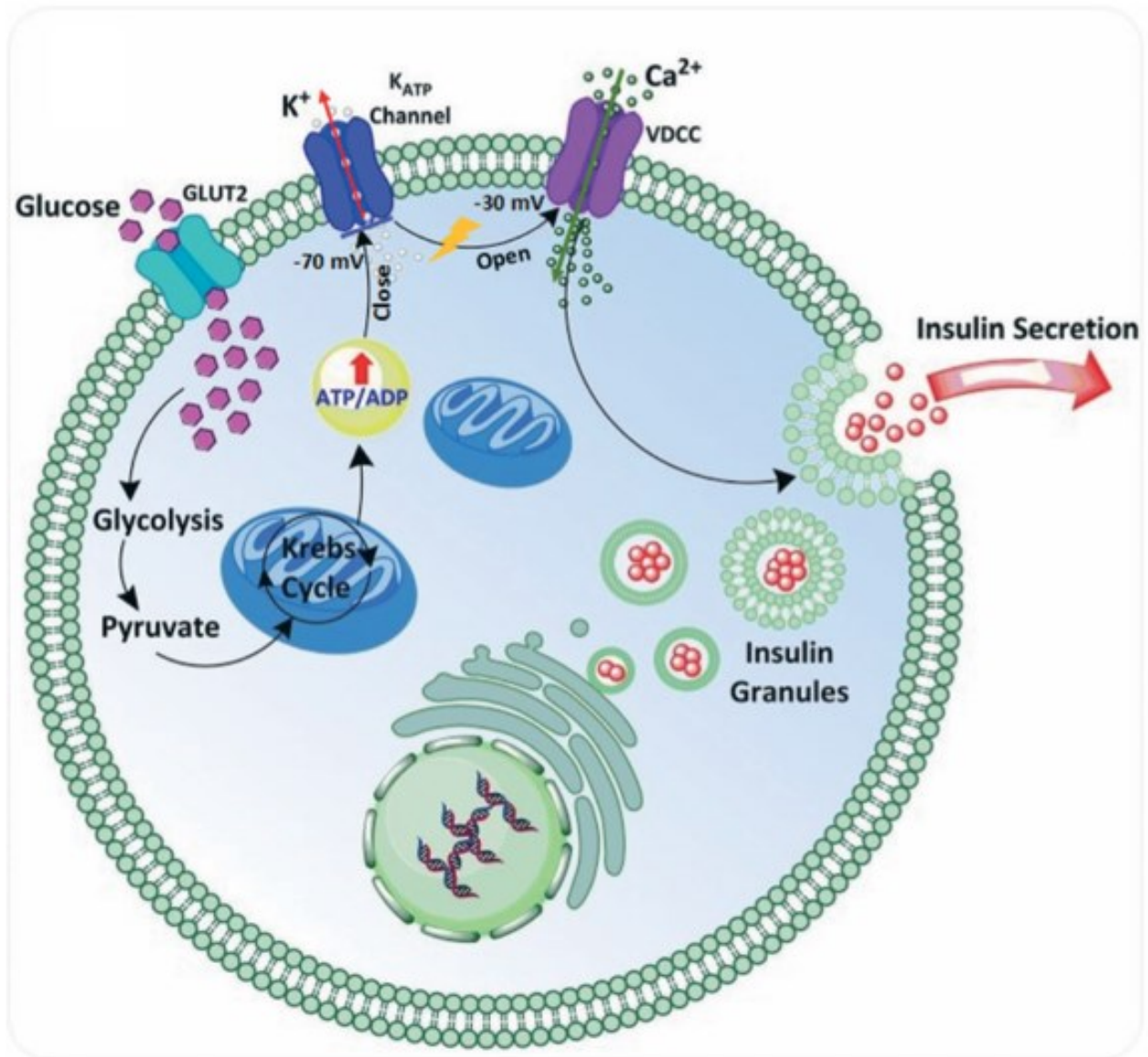


Figure 2. La régulation de la sécrétion d'insuline dans la cellule bêta. (Castiello, 2013)

### 1.1.3. La capture de glucose

La capture de glucose par les tissus périphériques se fait par deux principaux mécanismes d'actions. Cette capture peut être insulino-dépendante ou insulino-indépendante. Le mécanisme insulino-dépendant est dû principalement à la présence de GLUT4, un transporteur de glucose spécifique du tissu adipeux et du muscle (Olson, 2012). La transmission de signal de l'insuline est un procédé complexe et parfaitement régulé. L'insuline se lie sur son récepteur (IR) qui est une glycoprotéine hétérotrimérique constitutive transmembranaire est composée de 4 complexes, deux complexes extracellulaires (nommées chaînes  $\alpha$ ) et deux complexes intracellulaires (nommées chaînes  $\beta$ ) (Scapin *et al.*, 2018). Après la liaison de l'insuline aux chaînes  $\alpha$  extracellulaires, le récepteur change de conformation, permettant la liaison d'une molécule d'ATP dans la partie intracellulaire de la chaîne  $\beta$  de l'IR. Cette liaison permet ensuite l'activation des domaines catalytiques de type protéine kinase tyrosine. Cette activation conduit à l'autophosphorylation de l'IR, puis la phosphorylation en cascade de plusieurs substrats, incluant l'insulin receptor substrate (IRS).

Lors ce que l'IRS est phosphorylé, au moins 2 voies de signalisations peuvent être activées. La première est la voie de signalisation mitogen-activated protein kinases (MAPK) qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation et prolifération cellulaire. La deuxième est la voie de signalisation phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), résumée dans la Figure 3. Celle-ci induit la phosphorylation des kinases AKT et active l'action métabolique de l'insuline (Swiderska *et al.*, 2018). Par cette voie, IRS se lie à la sous-unité régulatrice de la PI3K *via* son domaine SH2. Puis la PI3K est activée et phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) pour former le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP<sub>3</sub>) (Swiderska *et al.*, 2018). La formation du PIP<sub>3</sub> permet ensuite l'activation des kinases PIP<sub>3</sub>-dépendantes, PDK-1 et PDK-2, puis l'activation des protéines kinases AKT ou PKb et C (PKC). La translocation des vésicules cytoplasmiques vers la surface

membranaire du transporteur de glucose GLUT4 est ensuite stimulée par la phosphorylation AS160, catalysée par AKT, permettant le transport de glucose intracellulaire (Swiderska *et al.*, 2018).

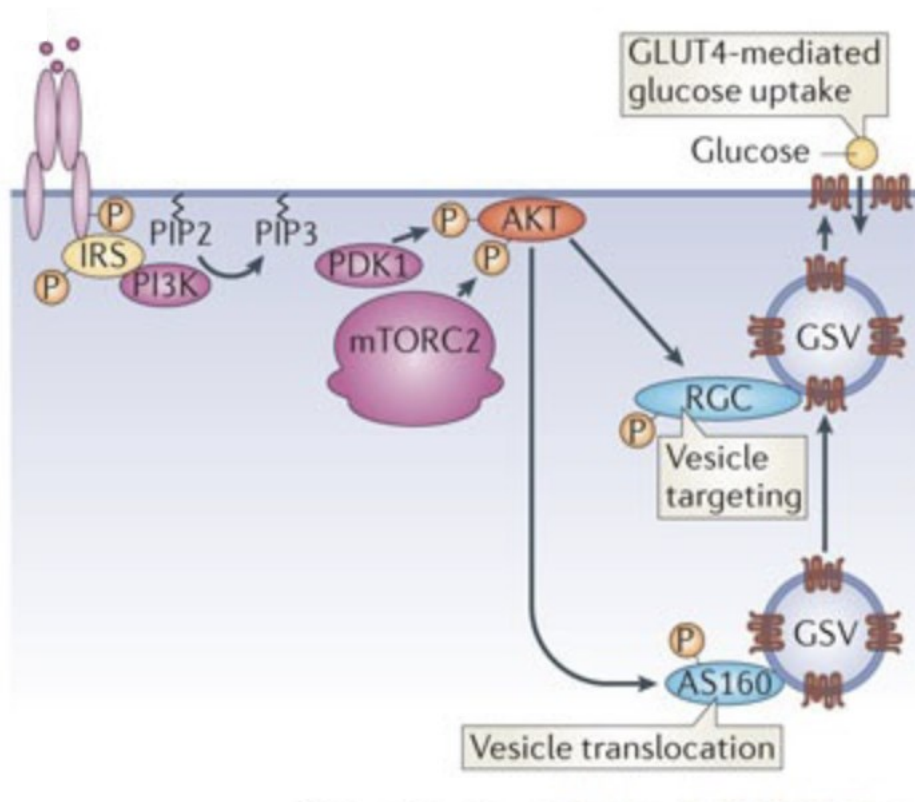


Figure 3. Voie de signalisation de l'insuline sur la capture de glucose (Leto and Saltiel, 2012)

## 1.2. La néoglucogenèse

La production endogène de glucose (PEG) est caractérisée par la formation de glucose dans l'organisme à partir d'un substrat appelé substrat néoglucoformateur (substrat permettant la formation de glucose *via* une chaîne de réactions enzymatique). Plusieurs substrats dans l'organisme permettent une PEG.

- Le lactate – produit de la glycolyse anaérobie, principalement utilisé dans le foie (Melkonian, Asuka et Schury, 2002)
- Le pyruvate – substrat utilisé par le foie et le rein (Mithieux, 2001 ; Mithieux *et al.*, 2004)
- Les acides aminés néoglucogéniques
  1. l'alanine – provient des myocytes squelettiques à partir du pyruvate en présence de glutamate par la transamination (Garber, Karl and Kipnis, 1976). Ce substrat est principalement utilisé dans le foie.
  2. la glutamine – provient, elle aussi, des myocytes squelettiques, et est synthétisée par la glutamine synthase (Taylor et Curthoys, 2004). Ce substrat est principalement utilisé dans le rein et l'intestin grêle.
- le propionate – Ce substrat est un acide gras volatile et est utilisé dans le foie et l'intestin grêle (Weidemann *et al.*, 1970 ; De Vadder *et al.*, 2016)
- le succinate - Ce substrat est un composant du cycle de Krebs et est utilisé dans l'intestin grêle (De Vadder *et al.*, 2016)
- Le glycérol – provient principalement du tissu adipeux *via* la décomposition des triglycérides et est principalement utilisé dans le foie et l'intestin grêle (Melkonian, Asuka et Schury, 2002).

La PEG permet donc une homéostasie de la glycémie chez un patient sain durant les périodes inter-prandiales, de jeûne prolongé ou lors d'un exercice physique. Dans la fonction métabolique « normale », trois organes ont la capacité de produire du glucose endogène : le foie, le rein et l'intestin (plus précisément dans l'intestin grêle, au niveau du duodénum et du jéjunum). Ces organes expriment donc les enzymes clés de la néoglucogénèse : la pyruvate carboxylase (PC), la phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPCK), la fructose-bi-phosphatase 1 (FBP1) et la glucose-6-phosphatase (G6PC). Le fructose-2,6-biphosphatase 2 (FBP2) est-

elle crucial, car il permet la régulation protéique de FBP1. Étant donné l'importance de ces enzymes dans la voie de signalisation de la néoglucogenèse, une dérégulation de ces derniers entraîne une dérégulation de l'homéostasie glucidique. Par exemple, une inhibition de la PC dans le foie non seulement diminue la synthèse de glycérol dans le foie et le tissu adipeux (*via* une réduction de lipogenèse due à une inhibition de conversion de pyruvate en OAA par la PC qui permet ensuite une chaîne de réactions enzymatique pour la formation de glycérol-3-phosphate), mais aussi améliore la signalisation de l'insuline. Au contraire, une augmentation de l'activité de la PC entraîne une augmentation de la néoglucogenèse globale et donc, une hyperglycémie (Kumashiro *et al.*, 2013). Une déficience en PEPCK et FBP contribue à une hypoglycémie marquée (Vidnes *et al.*, 2010). Une déficience en G6PC entraîne non seulement une hypoglycémie, mais aussi une perturbation de stockage de glycogène, une acidose lactique, une hyperlipidémie et une hyperuricémie (Chou *et al.*, 2010). Comme mentionné dans le chapitre 1.1.1, la néoglucogenèse est stimulée par le glucagon et est inhibée par l'insuline. Dans un état de jeûne ou en période postprandiale, les concentrations plasmatiques des deux hormones varient, ainsi la néoglucogenèse varie également selon ces états physiologiques. La phosphorylation de AKT lors de la capture de glucose insulino-dépendante permet la phosphorylation du facteur de transcription Forkhead box O1 (FoxO1) et du co-activateur de transcription CREB2 (CRTC2) inhibant l'expression de *pck1* et *g6pc* par leur exclusion nucléaire et leur rétention cytoplasmique (Zhang *et al.*, 2019). Au contraire, la sécrétion de glucagon par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans entraîne une activation de la production endogène de glucose hépatique par sa liaison à son récepteur hépatique (GCGR), qui fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Le GPCR change ensuite de conformation, entraînant l'activation d'une sous-unité de la protéine-G ( $G_{\alpha}$ ). Ceci permet ensuite l'activation de l'enzyme membranaire, l'adénylate cyclase, qui génère le second messenger, l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) pour

stimuler la protéine kinase dépendante de la cAMP (PKA) qui phosphoryle la cAMP-response element-binding protein (CREB) (Gonzales *et al.*, 1989). pCREB se lie donc à la CRE et active la transcription des gènes liés à cette dernière, comme la *pck1* ou la *g6pc*.

La réduction de la néoglucogenèse hépatique aurait un effet métabolique bénéfique (Iles *et al.*, 1977 ; Beech *et al.*, 1993). Une étude de She *et al.*, (2003) sur la souris *pck1*<sup>-/-</sup> uniquement dans le foie, qui exprime partiellement PEPCCK montre une réduction de 40% de la production de glucose endogène hépatique comparée aux souris contrôles. Chez les patients ayant un diabète de type 2 (DT2), la production endogène de glucose est augmentée, due à une dérégulation de la sécrétion de glucagon, contribuant à l'hyperglycémie (D'alessio, 2011 ; Magnusson *et al.*, 1992). Chez ces patients, la néoglucogenèse a une contribution plus importante en période de jeûne comparée aux patients sains (Wajngot *et al.*, 2001). De plus, la capacité de ces patients à stocker du glycogène est diminuée, potentialisant l'hyperglycémie postprandiale (Hwang *et al.*, 1995). En réduisant la néoglucogenèse hépatique par invalidation de *g6pc* chez la souris nourrie par un régime hypercalorique, Abdul-Wahed *et al.* (2014) ont montré une augmentation de l'utilisation périphérique de glucose et de l'oxydation des lipides dans le muscle.



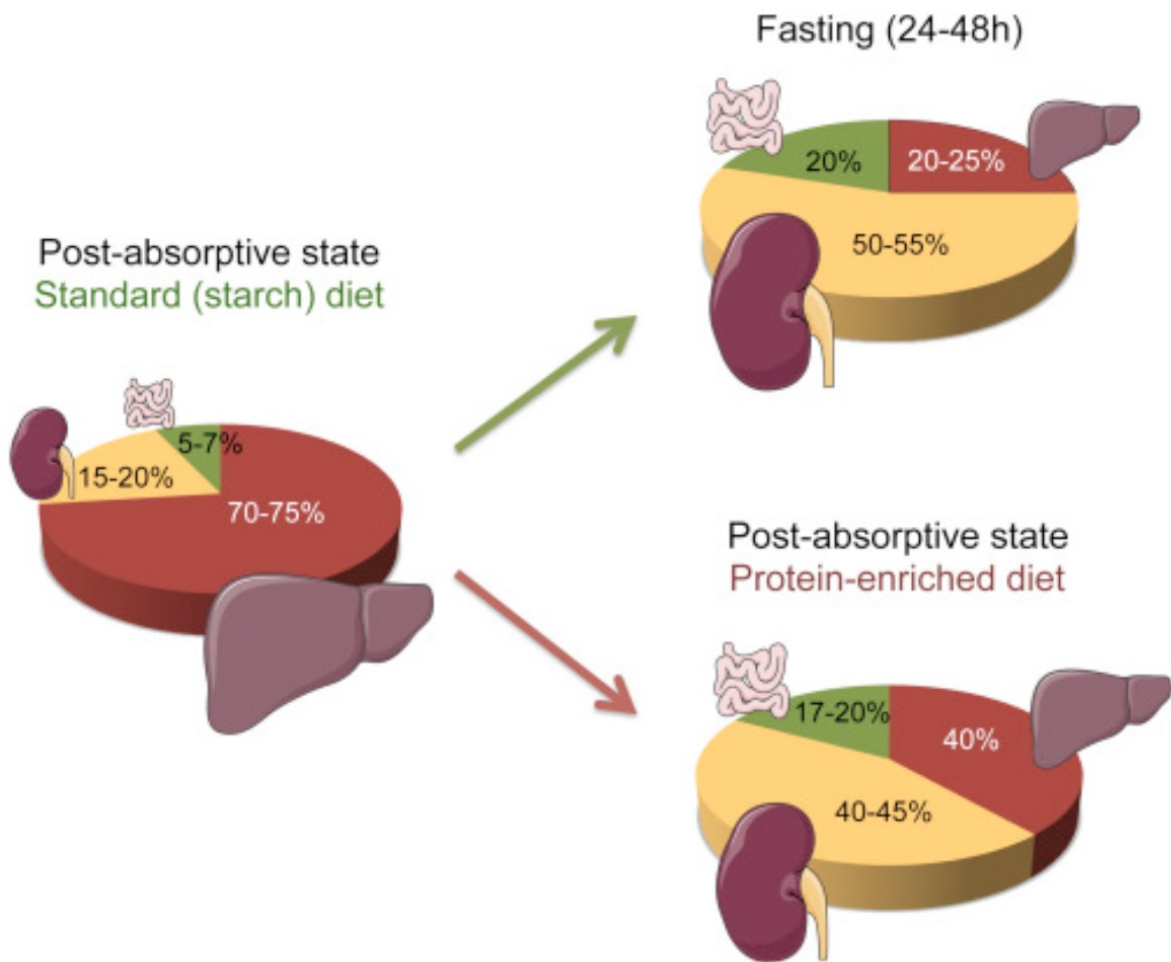


Figure 4. Pourcentages de production endogène de glucose dans le foie, le rein et l'intestin, durant différents états physiologiques (Soty *et al.*, 2017).

Récemment, la néoglucogénèse intestinale ainsi que les effets bénéfiques de la production endogène de glucose intestinale ont été mis en évidence (Mithieux, 2022 ; Soty *et al.*, 2017 ; Mithieux *et al.*, 2005). L'importance de la néoglucogénèse intestinale a été particulièrement soulignée chez la souris ou la production endogène de glucose hépatique a été inhibée en presque totalité par invalidation de la PEPCK-C spécifiquement dans le foie. Cette étude montre une régulation de l'homéostasie du glucose et un maintien d'une normoglycémie à la suite d'un doublement de la concentration plasmatique de glutamine (She *et al.*, 2003) et donc, de l'augmentation de la néoglucogénèse rénale et intestinale (substrat

principal des deux organes). Le glucose produit dans l'intestin est libéré dans la veine porte, détecté par des capteurs portaux qui eux, transmettent l'information par les afférences nerveuses au cerveau, ce qui va permettre au cerveau d'activer des zones cérébrales impliquées dans la satiété (Delaere *et al.*, 2012 ; Delaere *et al.*, 2013). Cette activation de zones cérébrales permet aussi l'activation d'un arc réflexe centrale, augmentant ainsi la sensibilité à l'insuline et diminuant la production endogène de glucose hépatique (Pillot *et al.*, 2009 ; De Vadder *et al.*, 2014). Le substrat principal de la néoglucogenèse intestinale est la glutamine, car contrairement au foie, la glutaminase dans l'intestin grêle possède une haute affinité pour ce substrat (Mithieux, 2001). De plus, l'activité élevée de l'alanine aminotransférase (ALAT) est un déterminant clés dans l'utilisation de la glutamine pour la production de glucose dans l'intestin grêle (Mithieux, 2001). L'ALAT convertit la glutamine en alpha-cétoglutarate pour sa conversion en malate, puis en oxaloacétate (OAA). Le transport de glutamine dans l'intestin s'établit par plusieurs transporteurs. Le transporteur SLC1A5 (aussi connu sous le nom ASCT2) est exprimé dans l'intestin, le rein, le muscle et le tissu adipeux et permet aux acides aminés neutres (y compris la glutamine), ainsi qu'au  $\text{Na}^{2+}$ , une entrée et sortie de l'espace intracellulaire dépendant du gradient de concentration (Buthia and Ganapathy, 2015). De plus, le transporteur d'acides aminés B<sup>o</sup>AT1 (aussi connu sous le nom SLC6A19) est, lui aussi, exprimé sur la membrane apicale des entérocytes intestinaux et permet le transport l'acides aminés neutres, tel que la glutamine (Jando *et al.*, 2017). L'expression de ce transporteur dans l'intestin dépend de la co-expression de la peptidase angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) et est augmentée par l'aminopeptidase N (CD13). L'expression de ces trois protéines est augmentée lors d'un régime riche en protéines (Jando *et al.*, 2017), qui est corrélée avec l'augmentation de la production endogène de glucose intestinale lors de ce type de régime (Figure 4 ; Soty *et al.*, 2017)

Durant la production endogène de glucose intestinale, le transport de ce dernier est assuré par deux transporteurs. SGLT1, le co-transporteur de sodium-glucose 1, localisé sur la membrane en brosse apical, permet donc le transport de glucose de la lumière de l'intestin vers l'espace intracellulaire. Un transport de glucose passif est aussi présent dans l'intestin grâce au transporteur de glucose GLUT2. Ce dernier est localisé sur la membrane basolatérale de l'intestin et permet le transport de glucose de l'espace intracellulaire vers la circulation sanguine (Thorens, 1996)

Dans l'intestin grêle des rongeurs, la G6PC ainsi que la PEPCK sont exprimées dans le duodénum et le jéjunum, mais pas dans l'iléon, contrairement à l'Homme. La régulation de l'expression du gène de la G6PC est insulino-indépendante. En effet, chez les rats en période d'allaitement, période hypoinsulinémique, l'expression du gène *g6pc* est fortement augmentée (Chatelain *et al.*, 1998).

### 1.3. Excrétion urinaire du glucose

Comme décrit dans le chapitre 2.1.2.1, le glomérule filtre environ 180 litres/jour de sang. Ce dernier permet aussi la filtration de glucose, qui est, chez un patient sain, réabsorbée dans le tubule proximal par les SGLT et les GLUT. Ceci étant, il est considéré normal chez un patient sain d'avoir une glycosurie inférieure à 25 mg/dL d'urine, ce qui est équivalent à 0.1% de la totalité du glucose filtré (Liman and Jialal, 2022). La capacité de réabsorption du rein permet donc, d'éviter une hypoglycémie et donc, de maintenir la balance homéostatique du glucose. Une glycosurie supérieure à 25 mg/dL peut être due à 2 phénomènes : soit une incapacité de réabsorption totale de glucose par le tubule proximal, soit une augmentation de la concentration plasmatique de glucose, dépassant la capacité maximale de réabsorption ( $T_m$ ) dans le rein (environ 200 mg/dL de glucose plasmatique) sans utilisation de médicaments antidiabétiques tels que les inhibiteurs de SGLT.

Plusieurs pathologies liées au tubule proximal peuvent entraîner une glycosurie. Par exemple, le syndrome de Fanconi (Foreman, 2019), peut entraîner non seulement une glycosurie, mais aussi une protéinurie, une baisse de la concentration de bicarbonate et de phosphate plasmatique et une excrétion urinaire élevée d'acides aminés. De la même façon, une altération de l'expression des co-transporteurs de sodium-glucose entraîne une forte glycosurie. La glycosurie peut aussi apparaître lorsque la glycémie dépasse la capacité maximale de réabsorption du rein. Ceci peut être dû à une pathologie, tel que le diabète, mais aussi chez des individus sans trouble de l'homéostasie du glucose, mais qui ont consommé un excès de carbohydrates/glucides. Ceci est connu sous le nom de glycosurie alimentaire (Liman and Jialal, 2022).

Certaines pathologies ou facteurs sont capables d'altérer la capacité maximale de réabsorption de glucose ( $T_m$ ). L'âge par exemple, est connu pour augmenter le  $T_m$  sans pathologie secondaire. La glomérulosclérose diabétique est, elle aussi, capable d'augmenter le  $T_m$ . Les insuffisances cardiaques et l'hyperglycémie chronique sont, elles aussi, capable d'augmenter le  $T_m$  du rein chez certains patients. Au contraire, l'hyperthyroïdisme, la fièvre, l'exercice physique et la grossesse peuvent diminuer le  $T_m$  rénal. Certaines molécules telles que le chlore, l'iode, le bromure et le nitrate de sodium peuvent également entraîner une glycosurie (Liman and Jialal, 2022). Diminuer la réabsorption du glucose rénal chez les patients diabétiques a démontré être un bon moyen de réguler la glycémie, mais aussi d'améliorer la qualité de vie de ces patients. En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation de gliflozines, tels que la dapagliflozine, la canagliflozine ou encore l'empagliflozine diminuait la masse corporelle des patients atteints de DT2 (Huh and Kim, 2022 ; Sugiyama *et al.*, 2018 ; Bolinder *et al.*, 2014 ; Blonde *et al.*, 2016 ; Neeland *et al.*, 2016), mais aussi améliorait la fonction cardiaque et diminuait l'apparition de problèmes cardiovasculaires (Neeland *et al.*, 2016 ; Saleem, 2017).

## 2. Physiopathologie du diabète de type 2

Lorsque l'homéostasie glucidique n'est plus maintenue, une insulino-résistance peut se développer et mener à un DT2. Selon les chiffres de la fédération mondiale du diabète, en 2021, 541 millions d'adultes présentaient une intolérance au glucose et 537 millions étaient atteints de DT2. Ce nombre ne cesse d'augmenter et les projections sur l'avenir prévoient que 643 millions d'individus seront atteints de DT2 en 2030 et 783 millions en 2045 (IDF Diabetes Atlas 2022 reports). Cette prévalence exponentielle est un réel problème de santé et d'économie mondiale car en 2021, la mortalité due à cette pathologie fut de 6.7 millions. La pathologie du DT2, à elle seule, a coûté plus de 966 billions de dollars américains en 2021 (IDF Diabetes Atlas 2022 reports).

Le diabète est une pathologie métabolique principalement caractérisée par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire à une concentration de glucose plasmatique physiologiquement supérieure à la norme (environ 1.0 mg/dL). Cette hyperglycémie peut être due à une sécrétion anormale d'insuline et/ou une action anormale de cette dernière et entraîne donc une dérégulation du métabolisme énergétique. Cette pathologie affecte de nombreux organes et peut entraîner des complications métaboliques sévères, causées par une hyperglycémie chronique. Le « diabète » englobe plusieurs types, le plus commun mondialement étant le diabète de type 2, car il touche environ 90% de la population diabétique. D'autres formes de diabètes existent tel que le diabète de type 1 (DT1), le diabète gestationnel, le maturity-onset diabetes of the young (MODY), Ce chapitre se focalisera sur le diabète de type 2, car ce dernier est le plus pertinent en rapport aux études décrites ultérieurement.

Chez un patient sain, la normoglycémie est maintenue, car la sécrétion et la sensibilité à l'insuline sont toutes deux normales. Une intolérance au glucose s'installe chez les patients pré-diabétiques, due à une hyperinsulinémie et une diminution de la sensibilité à

l'hormone. Cette hyperinsulinémie contribue à l'épuisement des cellules bêtas, et donc, la sécrétion d'insuline diminue. De plus, la sensibilité à l'insuline du patient est d'autant plus réduite, entraînant une incapacité de maintenir une glycémie à concentration « normale » et donc, un DT2 s'installe (Bailey *et al.*, 2004). Chez un patient atteint de DT2, un grand nombre de complications peuvent se développer si la concentration de glucose plasmatique n'est pas correctement maintenue sur le temps, mesuré par l'hémoglobine glyquée (HbA1C). un HbA1C supérieur à 7% indique que la normoglycémie n'est pas correctement maintenue avec un régime de vie sain ou des médicaments antidiabétiques. De plus, la résistance à l'insuline contribue à la production endogène de glucose et diminue la capture de glucose dans les tissus périphériques. Ces deux perturbations de la fonction métabolique normale entraînent donc un DT2. Une minorité de la population atteint de DT2 ont aussi un diagnostic d'auto-immunité de leurs îlots, touchant donc la viabilité des cellules bêta (Tiberti *et al.*, 2008).

L'obésité, définie avec un indice de masse corporelle supérieure à 30 Kg/m<sup>2</sup>, est le premier facteur de susceptibilité au DT2 (Chan *et al.*, 1994 ; Colditz *et al.*, 1995). Cependant, la composante génétique prédispose aussi une majorité de ces patients. Un grand nombre de Genome-Wide Association Studies (GWAS) ont révélé plusieurs gènes de prédisposition en lien avec le DT2 tels que *FTO*, *MC4R*, *TCF7L2*, *HHEX*, *SLC30A8*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2* (Ali, 2013). De plus, il a été démontré que certaines ethnies, telles que la population Nord-africaine/Moyen-Orient (IDF Diabetes Atlas 2022 reports) ou Hispanique (Dabelea *et al.*, 2009), par l'implication de facteurs génétiques, mais aussi socio-économiques et environnementaux étaient plus susceptibles de développer un DT2.

En plus de l'obésité, un grand nombre de pathologies, tels que le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK ; Livadas *et al.*, 2022), une dystrophie myotonique (Winters, 2021), et

la maladie rénale chronique (Spoto, Pisano and Zoccali, 2016) peuvent entraîner une résistance à l'insuline et potentiellement, un DT2.

## 2.1. Développement de la maladie rénale chronique et de l'intolérance au glucose

L'incidence de la maladie rénale chronique (MRC) a atteint des proportions épidémiques et continue de progresser en France et dans le monde avec l'augmentation de l'incidence du diabète, de l'obésité, des maladies cardiovasculaires, ainsi que le vieillissement de la population. En 2017, 11,1% de la population mondiale était atteint d'insuffisance rénale chronique (IRC), ce qui équivaut à 843,6 millions de patients (Jager *et al.*, 2019). La prévalence de la maladie ne cesse d'augmenter chaque année, entraînant une augmentation de la morbidité liée à cette pathologie (1,2 millions de décès attribués à l'IRC en 2017, représentant une augmentation de 41.5% entre 1990 et 2017). Le registre REIN (Réseau Épidémiologie et Information en Néphrologie) rapporte pour 2019 en France une incidence de l'IRC terminale (IRCT) de 169 par million d'habitants (pmh), une prévalence de 1355 pmh et un taux de mortalité de 9,8%. Compte tenu du nombre important de patients en IRC mondialement, cette pathologie constitue un problème économique, social et de santé publique majeure.

La MRC est caractérisée par la perte progressive de la fonction rénale. La maladie débute par l'agression d'un des constituants du rein (glomérules, tubules, vaisseaux intrarénaux, interstitium) dont l'origine peut être toxique, immunologique, infectieuse ou métabolique. Après cette phase initiale d'agression qui est très spécifique à chaque pathologie, toutes les néphropathies évoluent vers le développement d'une fibrose qui va

progressivement détruire les reins (généralement le compartiment tubulo-interstitiel). La progression de cette fibrose est indépendante de la lésion initiale qui peut être guérie alors que la destruction du parenchyme rénal continue à évoluer. Au stade ultime de destruction des reins (IRCT), les options thérapeutiques sont la dialyse qui est associée à une morbidité et une mortalité augmentée, et la transplantation rénale qui est limitée par l'offre d'organes compatibles. Par conséquent, de nouvelles approches thérapeutiques sont requises pour freiner l'évolution de la MRC afin d'améliorer la survie et la qualité de vie des patients.

### 2.1.1. Résumé de la fonction et structure rénale

Les reins jouent un rôle primordial dans le corps humain, car ils permettent un équilibre du milieu intérieur (volume, osmolarité, concentration plasmatique d'anions et de cations, mais aussi du pH sanguin). Ils permettent aussi une excrétion des toxines provenant d'organes ou de procédés métaboliques en excès. Pour assurer cette homéostasie, le rein filtre en moyenne 180 litres de plasma chez l'Homme. De plus, les cellules épithéliales rénales modifient la composition de cet ultrafiltrat en modifiant l'osmolarité et la concentration de solutés pour permettre une quantité excrétée d'eau et d'ions que celle ingérée quotidiennement. Le rein est constitué de deux parties majoritaires : la médulla et le cortex.



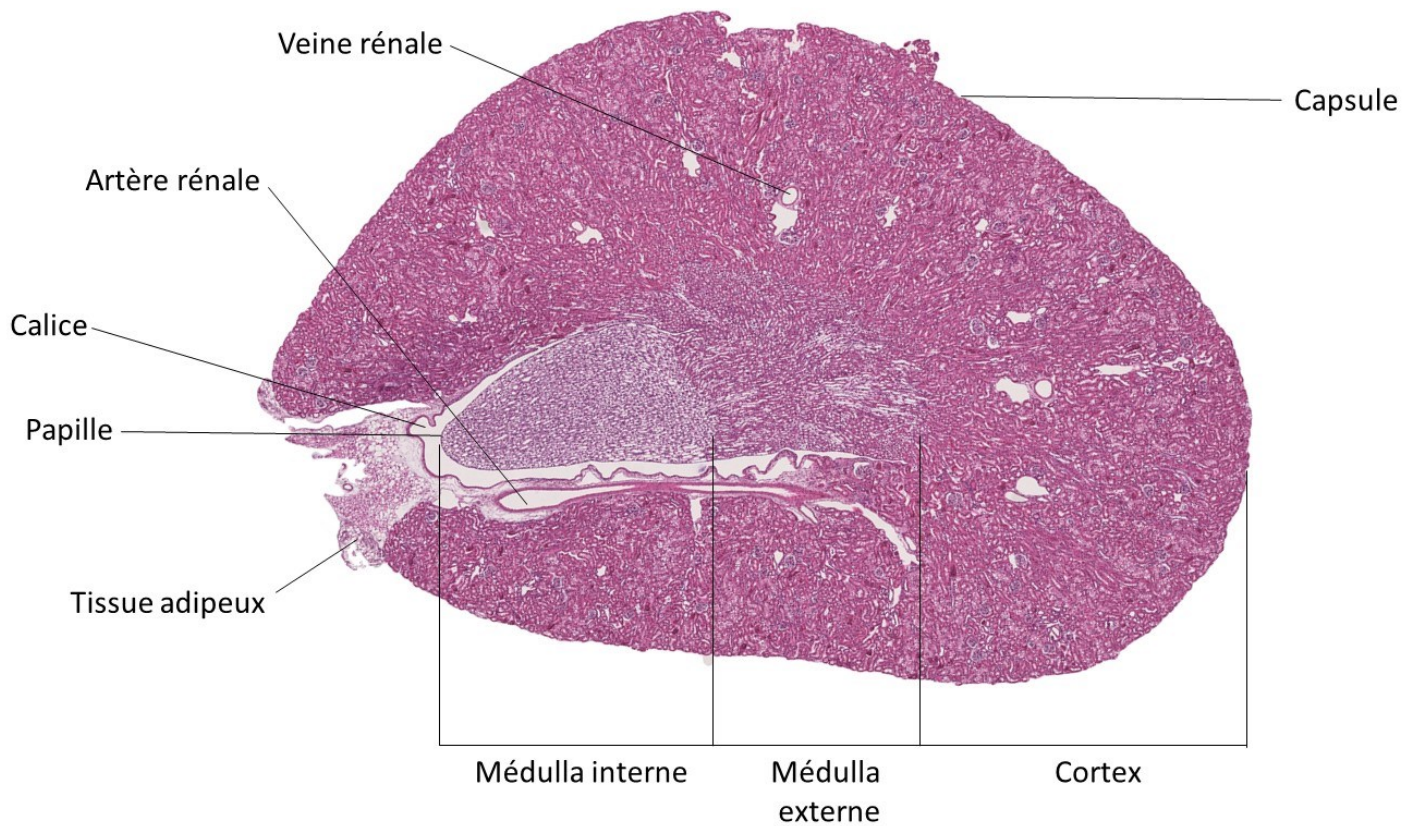


Figure 5. Coupe histologique d'un rein de souris, coloré avec de l'Hémathoxyline & Éosine

La médulla, partie interne du rein, est composée des segments des néphrons responsables du maintien de l'équilibre sanguin en sel et en eau comprenant les vasa recta (spuria et vera), les venulae rectae, le plexus capillaire médullaire, l'anse de Henlé et le canal collecteur médullaire. Le cortex lui, est la partie la plus externe du rein. Cette dernière est composée des tubules distaux et proximaux, des glomérules, des vaisseaux rénaux et du canal collecteur cortical

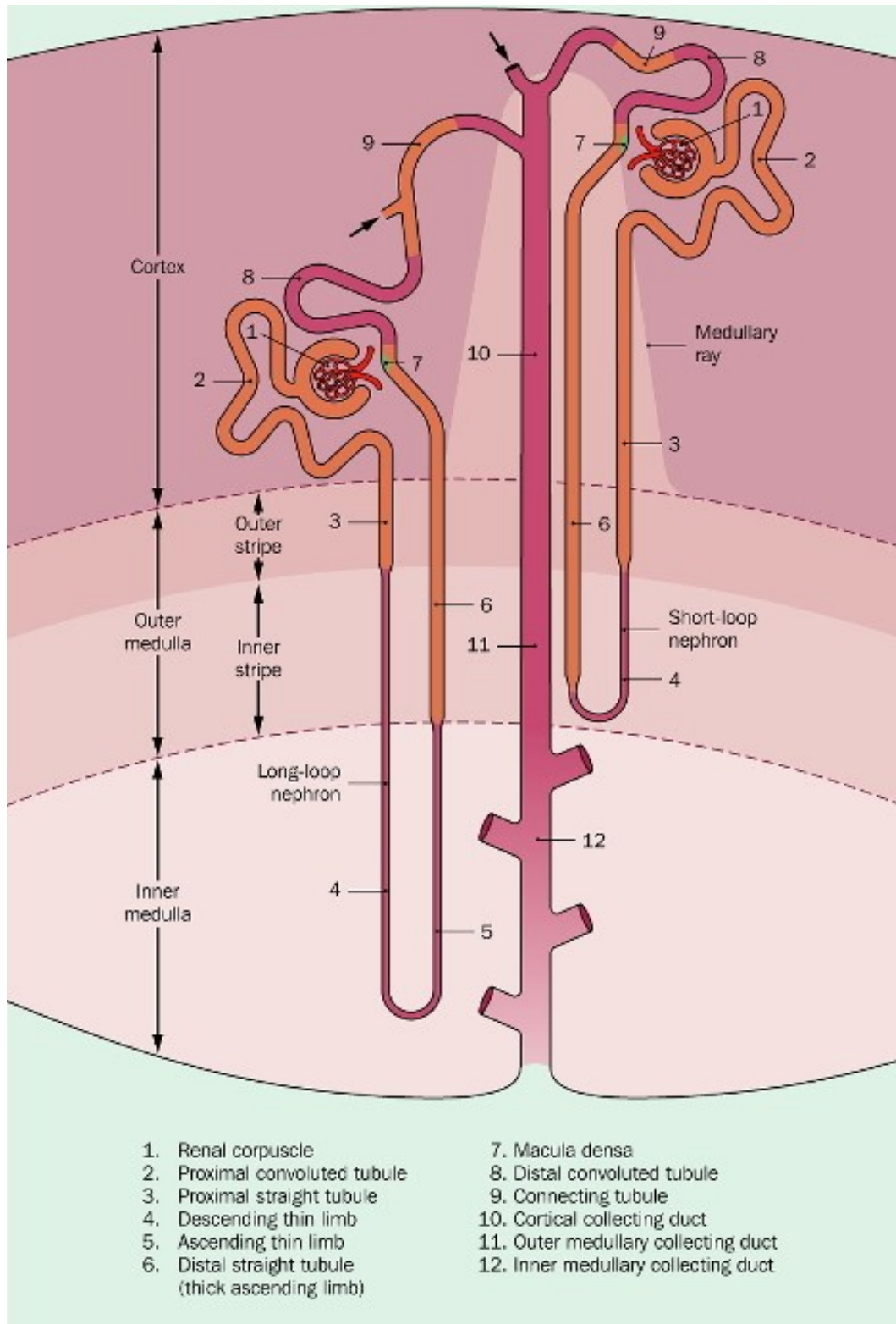


Figure 6. Localisation des segments du néphron dans le rein. (Source : nephro.unistra.fr)

## 2.1.2. Le néphron

Chez l'Homme, le rein est composé d'environ 1 million de néphrons, mais chez la souris, ce nombre est d'environ 15000. Le néphron est constitué d'un glomérule et d'un tubule rénal consistant de plusieurs segments tubulaires. Le tubule proximal est la partie la plus longue du néphron, car la partie droite du tubule proximale plonge dans la médullaire externe et se poursuit dans l'anse de Henlé. Cette dernière a une branche ascendante fine qui forme une boucle dans la médullaire et reprend un trajet ascendant, en s'élargissant pour devenir la branche large de l'anse de Henlé.

### 2.1.2.1. La filtration glomérulaire

Le taux de filtration glomérulaire (GFR) chez un patient sain est de 180 litres/jour, ce qui correspond à environ 120 mL/min. Le taux de filtration glomérulaire représente le flux de plasma du glomérule vers la capsule de Bowman sur une durée de temps spécifique. Ceci correspond à la mesure « gold standard » de la fonction rénale. Le glomérule est composé par une multitude de capillaires contournés par la capsule de Bowman. Les capillaires du glomérule sont irrigués par deux vaisseaux, l'artère afférente et l'artère efférente, qui tous deux, régulent la pression intra-glomérulaire. Ces capillaires ont des particularités spécifiques pour permettre une filtration d'un large volume de sang. La barrière de filtration est composée de trois structures qui permettent le support et les propriétés sélectives, cruciales à la formation du filtrat glomérulaire premier, l'ultrafiltrat. La première structure est l'endothélium fenestré des capillaires du glomérule, qui, comme son nom l'indique, est caractérisé par la présence de nombreuses perforations de contour régulier au travers des cellules endothéliales. Ces « fenêtres » permettent une sélectivité de la taille des filtrats, car leurs diamètres sont entre 70 et 100 nm (Madrazo-Ibarra and Vaitla, 2021). Le deuxième composé est une membrane basale glomérulaire qui est une structure épaisse consistant de

protéines extracellulaires incluant des protéoglycans, des laminines, des fibronectines et du collagène de type IV. Cette membrane permet une sélectivité concernant la charge des particules filtrées. La troisième structure de la barrière de filtration est constituée par les podocytes, qui forment un épithélium viscéral qui contourne la membrane basale glomérulaire, localisée vers la couche externe de la barrière de filtration. Cet épithélium sert donc à maintenir l'intégrité structurelle des capillaires. Lors de la filtration sanguine par le glomérule, l'ultrafiltrat est localisé entre l'épithélium viscéral et la capsule de Bowman. De là, l'ultrafiltrat circule ensuite vers le tubule proximal convoluté.

#### 2.1.2.2. La traversée tubulaire

La traversée tubulaire consiste en plusieurs parties très distinctes les unes des autres. Le tubule proximal convoluté suit structurellement le glomérule, car il est adjacent à ce dernier dans le cortex rénal. Le tubule proximal est formé d'un épithélium cubique simple, consacré à l'absorption et le transport des fluides, des électrolytes et du glucose. Ces cellules sont caractérisées par une bordure en brosse de microvillosités présentent pour augmenter la surface de contact avec l'ultrafiltrat glomérulaire. Cette bordure en brosse présente une abondance de mitochondries longues et fines qui longent la base des cellules et plusieurs vésicules participant au transport trans-cellulaire de 60 à 80 % de l'ultrafiltrat. Le tubule proximal est entouré de capillaires peritubulaires permettant l'approvisionnement de sang vers les tubules, mais aussi la réabsorption de l'eau, des ions et d'autres constituants du plasma tels que les acides aminés ou le glucose. Pour cela, le tubule proximal possède sur les membranes apicales et basolatérales, un certain nombre de transporteurs et ATPases. Ces derniers seront décrits plus en détails dans le chapitre suivant.

### 2.1.2.3. La régulation des transporteurs du tubule proximal

#### I. L'échangeur sodium-hydrogène 3

Le  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  échangeur 3 (NHE3, aussi appelé solute carrier family 9 member A3 ; SLC9A3) est un des neuf isoformes de la famille des NHE. Le gène de ce dernier est localisé sur le chromosome 5 (région p15.33) et est composé de 17 exons chez l'Homme (Brant *et al.*, 1993). Chez la souris, le gène de NHE3 est localisé sur le chromosome 13 (région 13 C1) et est composé de 18 exons (Bosse *et al.*, 2000). Il est exprimé dans plusieurs organes, tels que le gros intestin et l'intestin grêle, le colon et le rein, particulièrement au niveau du tubule proximal et les branches larges et fines de Henlé (Xue *et al.*, 2020 ; Hoogerwerf *et al.*, 1996). Dans le rein, NHE3 est localisé au niveau de la membrane apicale (dans la membrane de la lumière du néphron) pour permettre l'échange de  $\text{Na}^+$  provenant de la lumière du néphron contre un proton de l'espace intracellulaire. Cette protéine est cruciale au bon fonctionnement de la régulation acide-base, car l'échange de proton permet à l'ammoniaque ( $\text{NH}_3^+$ ) dans la lumière du tubule proximal et de la branche de Henlé de se fixer au proton pour former une molécule d'ammonium, permettant une excrétion d'acide.

#### II. Le cotransporteur de sodium/bicarbonate 1

Le cotransporteur de  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  (NBCe1-A, aussi appelé solute carrier family 4 member 4 ; SLC4A4) est une isoforme de la famille des NBC. Son gène est localisé sur le chromosome 4 (région q13.3) chez l'Homme (Parker, 2018) et sur le chromosome 5 (région 15 E1) chez la souris (Parker, 2018). Sa protéine est exprimée dans plusieurs organes chez la souris, particulièrement le cervelet, le lobe frontal du cerveau, l'intestin grêle ainsi que le tubule proximal et les branches larges et fines de Henlé. Ce cotransporteur est très important pour maintenir l'homéostasie acide-base, car elle permet la réabsorption totale de bicarbonate

filtré par le glomérule. Ceci est très important, car le bicarbonate joue un rôle de tampon en tant d'alcalin. De plus, sa capacité de réabsorption de  $\text{Na}^+$  en parallèle avec NHE3, permet aussi de maintenir une concentration plasmatique de  $\text{Na}^+$  normale.

### III. Le transporteur 3 d'acides aminés neutres couplé au sodium

Le cotransporteur de  $\text{Na}^+$ /glutamine (SNAT3, aussi appelé solute carrier family 38 member 3 ; SLC38A3) est une isoforme de la famille des transporteurs de sodium et d'acides aminés neutres. Son gène est localisé sur le chromosome 3 (région p21.31) et est composé de 16 exons chez l'Homme (Kholodnyuk *et al.*, 2006). Chez la souris, il est localisé sur le chromosome 9 (région F1 ; 9 58.69) et est composé de 18 exons (Gene : Slc38a3, Ensembl, 2023). SNAT3 est exprimé dans les astrocytes du cerveau, le foie, les ovaires et le rein chez la souris. La protéine de ce gène permet le transport de  $\text{Na}^+$  et de glutamine de l'espace interstitiel du tubule proximal vers l'espace intracellulaire de ce dernier, en une stœchiométrie de 1:1 (Machenzie an Erickson, 2004). Ceci permet donc le métabolisme de la glutamine pour la production d'ammonium, mais aussi de production endogène de glucose rénale.

### IV. Le transporteur d'acides aminés neutres sodium-dépendent

Le cotransporteur de  $\text{Na}^+$ /glutamine ( $\text{B}^\circ\text{AT1}$ , aussi appelé solute carrier family 6 member 19 ; SLC6A19) est une isoforme de la famille des transporteurs de sodium et d'acides aminés neutres, localisé dans la membrane apicale de cellules épithéliales. Chez l'Homme, son gène est localisé sur le chromosome 5 (région p15.33) et comporte 12 exons (Seow *et al.*, 2004). Chez la souris, son gène est localisé sur le chromosome 13 (région 13C1) et comporte 13 exons (Kleta *et al.*, 2004). Sa protéine est exprimée dans l'intestin large et grêle, mais aussi sur le néphron rénal et permet un transport de  $\text{Na}^+$  et d'acides aminés libres, mais à la différence de SNAT3,  $\text{B}^\circ\text{AT1}$  permet ce transport de la lumière du tubule jusqu'à

l'espace intracellulaire. B<sup>o</sup>AT1 permet le transport de Na<sup>+</sup>/glutamine en une stœchiométrie de 1:1 (Böhmet *et al.*, 2005).

## V. Le transporteur d'acides aminés neutres larges 2

Le transporteur d'acides aminés neutres larges (LAT2, aussi appelé solute carrier family 7 member 8 ; SLC7A8) est une isoforme de la famille des LAT. Le gène de ce dernier chez l'Homme est localisé sur le chromosome 14 (région q11.2) et est composé de 13 exons (Espino Guarch *et al.*, 2018). Chez la souris *Slc7a8* est localisé sur le chromosome 14 (région 14C2) et est composé de 12 exons (Espino Guarch *et al.*, 2018). LAT2 est exprimé dans de nombreux organes chez la souris, y compris l'intestin large et grêle, le cerveau, le tissu adipeux, les glandes mammaires, les ovaires, le placenta, les testicules et le rein. LAT2 est localisé sur la membrane apicale du tubule proximal et permet donc un transport de la glutamine de la lumière tubulaire vers l'espace intracellulaire.

Comme décrit dans le chapitre précédent, le glomérule filtre environ 180g/jour de glucose, qui circule ensuite vers le tubule proximal. Chez un patient sain, la totalité du glucose filtré est réabsorbé par les sodium/glucose co-transporteurs 1 (SGLT1) et les sodium/glucose co-transporteurs 2 (SGLT2), en concordance avec leurs transporteurs de glucose respectifs, GLUT1 et GLUT2. Le rein a une capacité maximale de réabsorption de glucose (T<sub>m</sub>) approximative de 200 mg/dL (Poudel, 2013), ce qui est bien plus que la concentration plasmatique (ou glycémie) chez un patient sain. Au contraire, un patient qui présente une pathologie dérégulant l'homéostasie du glucose, par exemple un diabète de type 1 ou 2, aura une glycémie supérieure à ce seuil. Chez ces patients, la totalité du glucose filtré n'est donc pas réabsorbée. Il a aussi été démontré que le T<sub>m</sub> des patients diabétiques était

supérieur aux patients sains (Poudel, 2013). Les mécanismes d'actions de ce phénomène seront décrits dans les chapitres suivants.

## VI. Les cotransporteurs de sodium/glucose

Le co-transporteur de Na<sup>+</sup>/glucose 1 (SGLT1 ; aussi appelé solute carrier family 5 member 1 ; SLC5A1) est une protéine transmembranaire de 75-kDa de la famille des SGLT. Le gène de ce dernier est localisé sur le chromosome 22 (région q12.3) chez l'Homme (Turk *et al.*, 1993) et sur le chromosome 5 (région 5 B1) chez la souris (SLC5A1 solute carrier family 5, NCBI, 2023). SGLT1 présente une haute affinité et une faible capacité (constant apparent d'affinité = 2mmol/L) en tant que transporteur de glucose et possède une stœchiométrie de 2 Na<sup>+</sup>:1 glucose (ce dernier peut aussi transporter le galactose dans l'intestin grêle) (Han *et al.*, 2022). Ce co-transporteur de Na<sup>+</sup>/glucose est localisé dans l'intestin large et l'intestin grêle (particulièrement dans le duodénum) et dans le tubule proximal du rein chez la souris. Dans le rein, SGLT1 est localisé dans la partie S3 du tubule proximal (localisée entre le cortex et la médulla) et permet la réabsorption de 10-20% du glucose filtré par le glomérule (Norton *et al.*, 2017), le reste étant réabsorbé par l'autre isoforme présent sur le tubule proximal, SGLT2.

Le co-transporteur de Na<sup>+</sup>/glucose 2 (SGLT2 ; aussi appelé solute carrier family 5 member 2 ; SLC5A2) est, lui aussi, une protéine transmembranaire de la famille des SGLT. Le gène de cette protéine est localisé sur le chromosome 16 (région p11.2) et est composé de 14 exons chez l'Homme (Wells, Mohandas and Hediger, 1993). Chez la souris, son gène est localisé sur le chromosome 7 (région 7 F3) et contient 14 exons (Thraillkill *et al.*, 2020). Contrairement à SGLT1, SGLT2 possède une faible affinité et une haute capacité au glucose (constant apparent d'affinité = 5 mmol/L) et possède une stœchiométrie de 1 Na<sup>+</sup>:1 glucose.



SGLT2 est localisé sur les parties S1/S2 du tubule proximal, qui sont les parties les plus proches du glomérule et réabsorbe 80-90% du glucose filtré par ce dernier.

Récemment, ce co-transporteur de  $\text{Na}^+$ /glucose a montré un regain d'intérêt scientifique, car étant la cible des gliflozines, qui est une classe de drogue antidiabétique, inhibant la réabsorption de glucose de SGLT2. Cette classe de médicament permet non seulement une baisse de la concentration plasmatique de glucose chez les patients diabétiques, mais permet aussi une perte de poids. Les gliflozines induisent une diminution de la progression de la maladie rénale chronique et réduit la probabilité de développer des troubles cardiaques chez les patients atteints de DT2 et de MRC. Les SGLT sont impliquées dans le co-transport du  $\text{Na}^+$ /glucose grâce au sodium qui se fixe sur la partie extracellulaire (partie localisée vers la lumière du tubule) pour permettre au « portail » externe de s'ouvrir, ce qui laisse l'entrée au glucose (Wright, 2020). La colocalisation des substrats induit ensuite un changement conformationnel qui permet l'ouverture du deuxième « portail », menant au transport du sodium et du glucose dans le cytosol des cellules du tubule proximal (Wright, 2020). Les gliflozines se lient au niveau du deuxième « portail » pour inhiber la réabsorption de  $\text{Na}^+$  et de glucose.

La régulation de l'expression protéique des SGLT est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription. Les plus étudiés sont les hépatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  (HNF1 $\alpha$ ) et hépatocyte nuclear factor 1 $\beta$  (HNF1 $\beta$ ). Ces deux isoformes comprennent un domaine de dimérisation terminal-NH<sub>2</sub>, ce qui permet une liaison à l'ADN en tant qu'hétérodimère ou homodimère (Balakrishnan *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2000 ; Vayro *et al.*, 2001). Ceci est particulièrement important concernant la transcription de SGLT1, car au niveau du promoteur de Slc5a1 se trouve deux éléments cis-régulateurs pour HNF-1 $\alpha/\beta$ . Les homodimères HNF-1 $\alpha$

augmentent la transcription d'SGLT1 alors qu'au contraire, les hétérodimères HNF-1 $\alpha/\beta$  diminuent son activité transcriptionnelle (Rhoads *et al.*, 1998). Une étude de Pontoglio *et al.* (2000) ont démontré le rôle direct d'HNF1 $\alpha$  sur l'activation de la transcription d'SGLT2. Les régions de contrôle de l'activité transcriptionnelle de Slc5a2 ont été étudiées et l'analyse séquentielle sur les fragments d'ADN a révélé la présence d'au moins 2 sites de liaison correspondant à HNF1 (position -45 et -1876). Cette étude démontre aussi que les 2 sites de liaisons sont eux-mêmes liés par une moitié de HNF-1 $\alpha$  *via* un terminal N, confirmant le lien direct d'HNF-1 $\alpha$  sur la transcription de SGLT2 (Freitas *et al.*, 2008 ; Takesue *et al.*, 2018). Des études sur l'Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) ainsi que le nuclear factor kappa b (NF- $\kappa$ b) ont montré que tous deux sont liés à la transcription des SGLT-1 et -2.

Le sodium est représenté en cercle vert et le glucose est représenté en hexagone jaune.

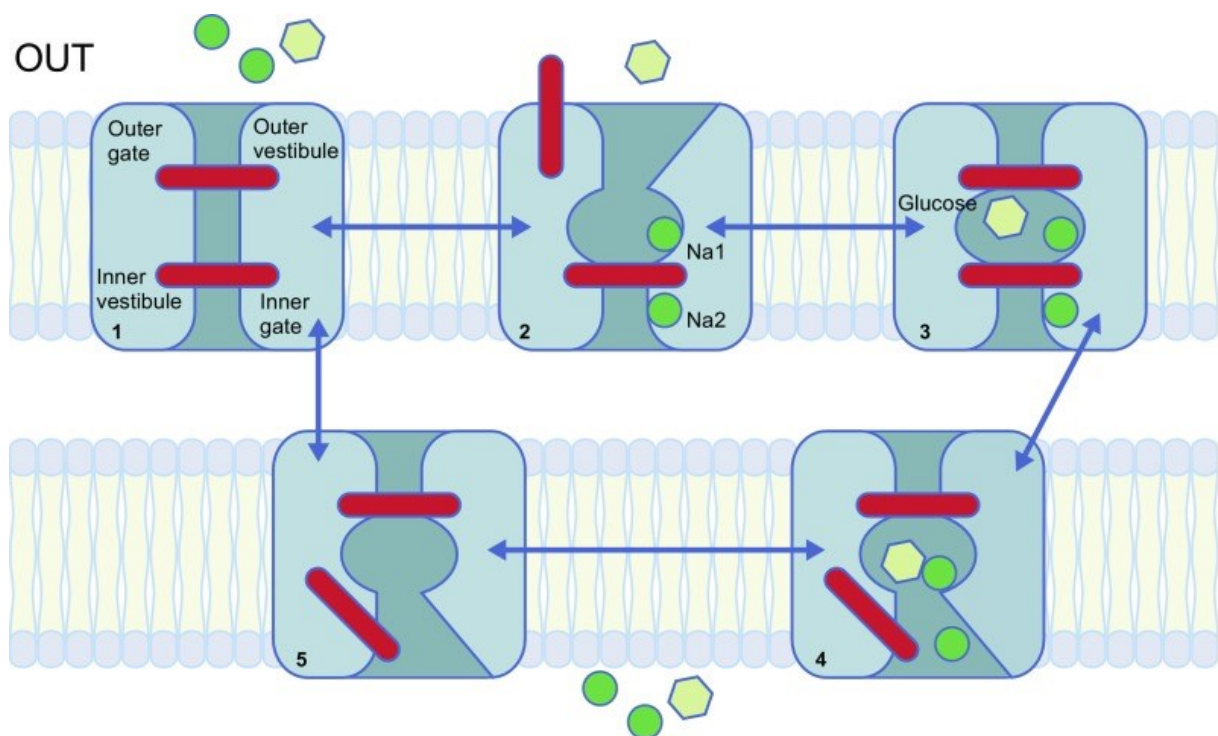


Figure 7. Schéma du modèle mécanique de la réabsorption de glucose et de sodium par les SGLTs dans le tubule proximal.

(Source : Wright, 2020)

## VII. Les transporteurs de glucose

Le transporteur de glucose 1 (GLUT-1 ; aussi appelé solute carrier family 2 member 1 ; SLC2A1) est l'un des 14 isoformes de la famille des GLUT (Thorens, 2015). Ce dernier est un uniporteur de 55kDa. Le gène de ce transporteur transmembranaire est localisé sur le chromosome 1 (région 1p34.2) chez l'Homme et comprend 10 exons (Aktas *et al.*, 2010). Chez la souris, ce dernier est localisé sur le chromosome 4 (région 4 D2.1 ; 4) et comprend 11 exons (SLC2A1, NCBI, 2023). GLUT1 est exprimé dans une multitude de tissus, comme le système central nerveux, le foie, le colon, le placenta, le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cerveau et le rein. Il permet un transport passif de D-glucose, D-galactose, D-glucosamine et des analogues 2-deoxy-D-glucose (2-DOG) et 3-O-méthyl-D-glucose (3-OMG) (Long and Cheeseman, 2015). Dans le rein, GLUT1 est localisé dans la partie S3 du tubule proximal, sur la membrane basolatérale des cellules proximales et permet la réabsorption du glucose transporté par SGLT1 vers l'espace interstitiel. Composé de 492 acides aminés, avec une conformation comprenant 12 segments transmembranaires (TM1-TM12), il comprend aussi un terminal-N et un terminal-C, tous deux localisés dans le cytoplasme. GLUT1 comprend aussi une boucle intracellulaire (entre TM6 et TM7) contenant un site de liaison d'ATP et un site de phosphorylation, mais aussi un site de glycosylation sur la boucle extracellulaire entre TM1 et TM2. Le site de liaison du glucose est lui, localisé sur le TM8 (position N317). Le rôle principal du terminal-N (TM1 à TM6) est de modifier la conformation de la protéine lors du transport de glucose (Deng *et al.*, 2014). Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) facilite la transcription de GLUT1 en permettant sa propre phosphorylation par AKT1 et est ensuite transloquer vers le noyau, où il se lie avec HIF-1 $\beta$  pour former un dimère. Celui-ci se lie ensuite à la région promotrice de *Slc2a1* pour permettre la translocation de son ARNm (Semenza, 2001).

Le transporteur de glucose 2 (GLUT2, aussi appelé solute carrier family 2 member 2 ; SLC2A2) est la seconde isoforme de la famille des GLUT qui est uniporteur transmembranaire de 60kDa. Le gène encodant GLUT2 (*Slc2a2*) est localisé sur le chromosome 3 (région 3q26.2) chez l'Homme et comporte 12 exons (Al-Haggar *et al.*, 2011). Chez la souris, ce dernier est présent sur le chromosome 3 (région 3 A3 ; 3 12. 19 cM) et est composé de 11 exons (SLC2A2, NCBI, 2023). GLUT2 est principalement exprimé chez la souris dans l'intestin large et grêle, le foie, le placenta et le rein (SLC2A2, NCBI, 2023) ce qui est aussi le cas chez l'Homme en plus des cellules bêta des îlots de Langerhans et les neurones, astrocytes et tanocytes du système central nerveux (Thorens, 2015). GLUT2 a une faible affinité pour le glucose ( $K_m \sim 17$  mmol/L) le mannose ( $K_m \sim 125$  mmol/L), le galactose ( $K_m \sim 92$  mmol/L) et le fructose ( $K_m \sim 76$  mmol/L) (Schmild *et al.*, 2021). Cependant, GLUT2 a une haute affinité pour la glucosamine ( $K_m \sim 0.8$  mmol/L) (Uldry *et al.*, 2002). Dans le rein, GLUT2 est le transporteur de glucose le plus abondant, présent principalement dans les parties S1/S2 du tubule proximal où il permet le transport de glucose intracellulaire vers l'espace interstitiel du néphron. La structure de la protéine GLUT2 est semblable à celle de GLUT1, comprenant aussi une boucle extracellulaire entre TM1 et TM2 (Schmild *et al.*, 2021), une extrémité N-terminale et une extrémité C-terminale et 12 segments transmembranaires (Guillemain *et al.*, 2000) et une boucle intracellulaire entre TM6 et TM7 (Guillemain *et al.*, 2000). HNF-4 $\alpha$ , HNF-1 $\alpha$  et NF- $\kappa$ b sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle du gène GLUT2. Une étude a démontré chez les souris diabétiques ainsi que sous régime riche en graisses, une augmentation de la liaison de ces deux facteurs de transcription sur la séquence promotrice du gène *Slc2a2* (David-Silva *et al.*, 2020). Cette augmentation transcriptionnelle serait donc due à une concentration de glucose intracellulaire élevée, ce qui a été corroboré par plusieurs études (Lee *et al.*, 2007 ; Ahmad *et al.*, 2022 ; Umino *et al.*, 2018).

D'autres transporteurs de glucose sont aussi exprimés dans le rein, tels que GLUT5, GLUT9 et GLUT10. GLUT5 est exprimé dans la membrane apicale de la partie S3 du tubule proximal et permet majoritairement la réabsorption de fructose urinaire filtré, malgré sa faible affinité pour ce glucide ( $K_m = 12.6 \text{ mM}$ ) (Mate *et al.*, 2001). GLUT9 (comprenant deux isoformes, GLUT9a et GLUT9b) est aussi exprimé dans le tubule proximal. GLUT9a est localisé dans la membrane basolatérale et GLUT9b est lui présent au niveau de la membrane apicale. Cette protéine a une haute affinité pour le glucose ( $K_m = 0.6 \text{ mM}$ ) mais aussi pour le fructose ( $K_m = 0.4 \text{ mM}$ ) (Augustin and Mayoux, 2014). Le transporteur GLUT10, est également exprimé dans le tubule proximal et permet le transport du déoxy-D-glucose ( $K_m \sim 0.3 \text{ mM}$ ) et D-galactose (Dawson *et al.*, 2001). Ces 3 GLUT sont très faiblement exprimés dans le tubule proximal et donc, contribuent très faiblement à la réabsorption de glucose dans la circulation sanguine.

## 2.2. Troubles de l'homéostasie du glucose associés à la maladie rénale chronique

Une intolérance au glucose, et plus particulièrement une insulino-résistance est fréquemment associée à la MRC. La résistance à l'insuline est identifiée comme une réponse biologique altérée à la stimulation par l'insuline des tissus cibles, principalement le foie, les muscles et le tissu adipeux. Une euglycémie peut être maintenue initialement par une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques pour compenser cette résistance à l'insuline (Freeman and Pennings, 2021). Chez certains patients, ce système de compensation ne suffit pas et entraîne une intolérance au glucose pouvant conduire au développement du DT2 (Pham *et al.*, 2012). Par ailleurs, le DT2 peut aussi être dû à une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques. 415 millions de la

population mondiale était diabétique en 2015, et 90% de ces patients ont un DT2. Ce nombre augmente chaque année et inclut les patients en IRC avec un DT2.

Chez les patients présentant des maladies rénales chroniques (MRC), l'insulino-résistance est souvent secondaire à un DT2 mais une altération de la sensibilité à l'insuline est aussi souvent observée chez les patients sans DT2. De plus, le pourcentage de patients diabétiques augmente avec le degré d'altération de la fonction rénale. Ceci suggère que la MRC elle-même pourrait induire une diminution de la sensibilité à l'insuline. En 1981, DeFronzo *et al.* ont étudié les causes de la résistance à l'insuline chez les patients urémiques. La technique du clamp euglycémique hyperinsulinémique a été réalisée chez 17 patients urémiques en insuffisance rénale et 36 volontaires sains à jeun. Les auteurs ont montré que la diminution de la captation de glucose par les tissus périphériques était la cause de la résistance à l'insuline observée chez les patients urémiques, la production de glucose hépatique et la capture du glucose dépendante de l'insuline par le foie n'étant pas altérées chez ces patients. L'effet de la MRC sur la résistance à l'insuline a également été étudié chez l'animal. La néphrectomie des 5/6ème chez des rats normaux et des rats Zucker (qui présente un syndrome métabolique) entraîne respectivement une insulino-résistance sans toutefois conduire à un DT2 (Dion *et al.*, 2015). Une autre étude menée chez la souris montre un déficit de sécrétion d'insuline dans le même modèle d'insuffisance rénale (Koppe *et al.*, 2016).

Les mécanismes qui sous-tendent la diminution de la sensibilité à l'insuline dans la MRC restent peu connus. La prévalence de l'acidose métabolique (AM) qui comme le DT2 augmente avec le degré d'altération de la fonction rénale laisse supposer que l'AM pourrait favoriser l'apparition de l'insulino-résistance chez les patients insuffisants rénaux. Une supplémentation orale en bicarbonate de sodium qui est généralement prescrit chez les

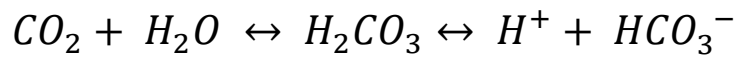
patients en IRC ayant une AM entraîne non seulement une diminution de la progression de l'insuffisance rénale, mais aussi une diminution de l'insulino-résistance, ce qui est en faveur d'un lien entre l'AM et les troubles du métabolisme du glucose (Bellasi *et al.*, 2016). Une corrélation négative entre la concentration plasmatique de bicarbonate et une prédisposition à un DT2 a été observée chez 630 femmes atteintes de DT2 et 730 femmes saines (Mandel *et al.* 2012).

### 2.3. Homéostasie acide-base

L'homéostasie de l'équilibre acide-base et la régulation du pH sont deux éléments critiques à un fonctionnement physiologique et un métabolisme cellulaire normal. Ceci est particulièrement le cas lorsque le pH plasmatique est soit trop élevé ou trop faible. Chez le sujet sain, l'alimentation génère une charge acide quotidienne équivalente à 50-100 mmol d'acide provenant principalement du catabolisme des acides aminés soufrés (cystine, cystéine, et méthionine) que l'organisme doit éliminer pour maintenir le pH sanguin entre 7.35 et 7.45 (pH artériel entre 7.36 et 7.44, pH intracellulaire 7.2). Les tampons intra- et extracellulaires, provenant principalement des muscles et de la masse osseuse, sont les premiers mécanismes d'action régulant le changement de pH systémique. Toutefois, le système de tampon le plus important physiologiquement est le  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  via sa capacité quantitative de tamponner les surcharges acides ou alcalines et de régulation indépendante de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) et de pression partielle de gaz carbonique ( $\text{PCO}_2$ ) par le rein et les poumons. L'équation d'Henderson-Hasselbach décrit la relation entre le pH, le bicarbonate (en milliéquivalent par litre) et la  $\text{PCO}_2$  (en millimètres de mercure).

$$pH = 6.1 + \log \frac{\text{HCO}_3^-}{0.03 \times \text{PCO}_2}$$

La formule ci-dessous représente la réaction en question :



Il est donc important que les taux de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de bicarbonate soient tous deux dans la norme pour maintenir une homéostasie de la balance acide-base. Une dérégulation de la concentration de CO<sub>2</sub> est due à un trouble respiratoire et une dérégulation de la concentration de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou d'acides fixes est due à un trouble métabolique. Le taux de CO<sub>2</sub> artériel est principalement contrôlé par ventilation alvéolaire après sa production dans les tissus périphériques. Le CO<sub>2</sub> est souvent nommé un acide gazeux car, lors de son addition à une solution aqueuse, ce dernier produit de l'acide carbonique, qui ensuite produit un proton et du bicarbonate (formule 2). Le taux de bicarbonate plasmatique est principalement contrôlé par le système rénal, qui permet une réabsorption, une production et dans certaines circonstances une expression de bicarbonate. Le taux de bicarbonate plasmatique est généralement utilisé quotidiennement par les acides provenant du régime alimentaire et des acides métaboliques. Comme décrit dans l'équation numéro 1, si le taux de bicarbonate augmente ou la PCO<sub>2</sub> diminue, alors le pH systémique augmentera, entraînant une alcalose. Au contraire, si le taux de bicarbonate diminue ou si la PCO<sub>2</sub> augmente, alors le pH diminuera, entraînant une acidose. Un régime riche en protéines animales dit « Western diet » couplé au métabolisme endogène produit généralement autour d'1 mEq/kg (poids total) de charge acide par jour. L'acide phosphorique et l'acide sulfurique sont des produits importants de ce métabolisme classique des nutriments du régime, tel que les protéines et les phospholipides. Pour maintenir cet équilibre acido-basique, ces acides non volatils doivent être excrétés par les reins. De ce fait, deux mécanismes d'action sont principalement impliqués, l'ammoniagenèse et la régulation de la concentration plasmatique de bicarbonate.



### 2.3.1. Régulation de la concentration plasmatique de $\text{HCO}_3^-$ par le rein

La production de  $\text{HCO}_3^-$  rénale est équivalente quantitativement à l'excrétion nette d'acide urinaire. De ce fait, une augmentation de la charge acide, due à une pathologie rénale ou une surconsommation d'acide entraîne une excrétion nette d'acide supérieure à la norme par le rein et donc, une augmentation de la production de bicarbonate. Les reins éliminent cette charge acide dans les urines avant tout sous forme d'ammoniac ( $\text{NH}_4^+$ ) et, plus accessoirement, sous forme d'acides organiques tels que le phosphate et le sulfate qui constituent l'acidité titrable. L'excrétion nette d'acide est donc calculée par :

$$\text{excrétion d'acide nette} = \text{acides titrables} + \text{NH}_4^+ - \text{HCO}_3^- \text{ urinaire}$$

Les reins ont un rôle prédominant dans la régulation de la concentration systémique de  $\text{HCO}_3^-$  et donc, dans la composante métabolique de la balance acide-base. Cette fonction du rein a deux volets. La première est la réabsorption de la totalité du bicarbonate filtré et la deuxième, la production de bicarbonate pour compenser l'utilisation de ce dernier par les acides. Cette production de bicarbonate est donc induite par l'excrétion nette d'acide. Le bicarbonate est filtré par le glomérule (environ 4.5 mmol par jour) et est ensuite réabsorbé par le tubule proximal à ~80%. La branche ascendante large du tubule distal réabsorbe environ 15 % et les 5 derniers % par le canal collecteur. Le tubule proximal a donc une capacité élevée pour la réabsorption de bicarbonate.

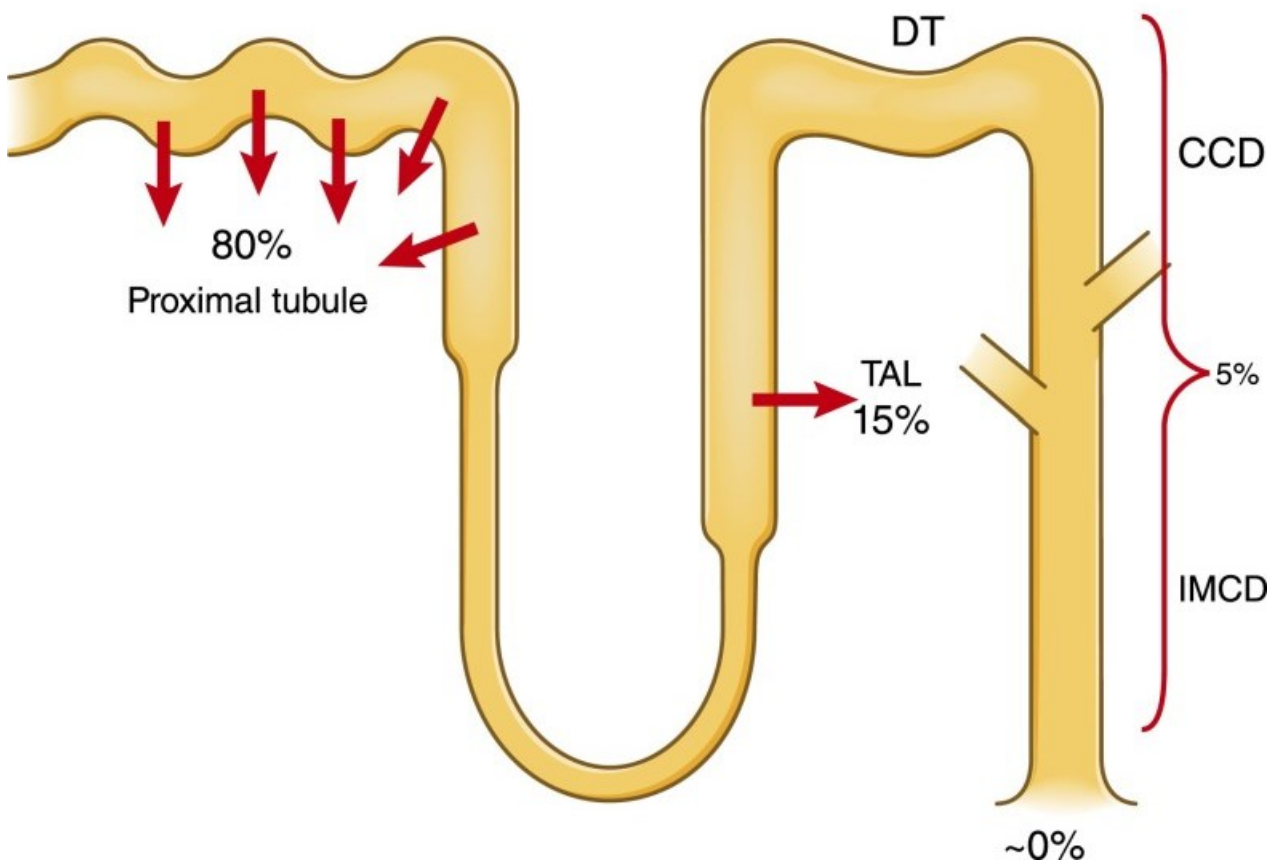


Figure 8. Pourcentage de bicarbonate réabsorbé par les différentes sections du tubule proximal  
(Source : Hamm *et al.*, 2015)

Cette réabsorption est principalement due à la sécrétion de proton au niveau de la membrane apicale du tubule par le sodium-hydrogen exchanger 3 (NHE3). Ce dernier échange un ion de  $\text{Na}^+$  pour un  $\text{H}^+$  intracellulaire, conduisant le  $\text{Na}^+$  de la lumière du tubule pour maintenir la concentration basse intracellulaire de  $\text{Na}^+$  (140 mEq/L dans la lumière contre 15-20 mEq/L intracellulaire). Cette concentration est aussi maintenue par le  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ATPase, présent au niveau de la membrane basolatérale. Le reste de la sécrétion de proton et donc, de la réabsorption de  $\text{HCO}_3^-$  est principalement due à une  $\text{H}^+$ ATPase sur la membrane apicale du tubule. Dans la lumière du tubule proximal, les protons sécrétés forment, avec le bicarbonate présent, du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{H}_2\text{O}$ , comme indiqué précédemment. Cette réaction est généralement catalysée par la carbonic anhydrase IV (CA IV). À l'inverse,

la formation de proton et de  $\text{HCO}_3^-$  intracellulaire à partir de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{H}_2\text{O}$  est due à la CA II cytosolique. Le  $\text{HCO}_3^-$  est donc réabsorbé dans la circulation sanguine par le sodium  $\text{HCO}_3^-$  co-transporteur NBCe1-A (ou SLC4A4), localisé sur la membrane basolatérale du tubule proximal. Cette protéine est donc cruciale à l'équilibre acide-base.

Dans le cas d'une mutation de ce co-transporteur, une AM du tubule proximal peut être engendrée. La régulation de la réabsorption de  $\text{HCO}_3^-$  est contrôlée par le pH. Il a été démontré qu'une baisse du pH lors d'une AM aiguë entraînait une augmentation de transporteurs clés dans la réabsorption de  $\text{HCO}_3^-$ , cela est particulièrement vrai pour NHE3 et NBCe1-A. De nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression d'ARNm et de protéines, mais aussi une augmentation de l'activité de la protéine due à une AM et une réduction de masse rénale chez le rat, (Ambühl *et al.*, 1996 ; Lucioni *et al.*, 2002 ; Capasso *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 1996). L'importance du co-transporteur de bicarbonate/ $\text{Na}^+$  dans la régulation de l'acide-base est particulièrement soulignée dans de nombreuses études. En effet, Lee *et al.* (2018) démontrent qu'une délétion de la protéine chez la souris non seulement entraînait une AM sévère ( $\text{HCO}_3^-$  sérique de  $12 \pm 0.8$  mmol/L vs  $22.7 \pm 1.2$  mmol/L pour les souris Wild type), mais entraînait aussi une forte diminution de l'expression de protéines clés dans la production rénale d'ammoniac.

### 2.3.2. L'ammoniogenèse

La production d'ammoniaque et son métabolisme jouent un rôle central dans l'homéostasie acide-base. Par opposition avec la majorité des solutés rénaux, la quasi-totalité de l'excrétion urinaire d'ammoniaque est dérivée de la production intra-rénale. L'ammoniaque retrouvée dans l'urine est synthétisée dans les cellules du tubule proximal à partir de la glutamine qui rentre dans ces cellules par le cotransporteur basolatéral SNAT3 (Figure 1). La glutamine est convertie en glutamate et  $\text{NH}_4^+$  par la glutaminase dépendante du phosphate (PDG). Le glutamate est lui-même transformé par le glutamate déshydrogénase en  $\alpha$ -cétooglutarate qui entre dans le cycle de Krebs comme substrat de la néoglucogenèse. Du glucose est produit dans les cellules tubulaires proximales *via* l'activation des enzymes clés de la néoglucogenèse, la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-bisphosphatase (FBP1) et la glucose-6-phosphatase (G6PC). Ainsi, l'ammoniogenèse est couplée à la production de glucose.

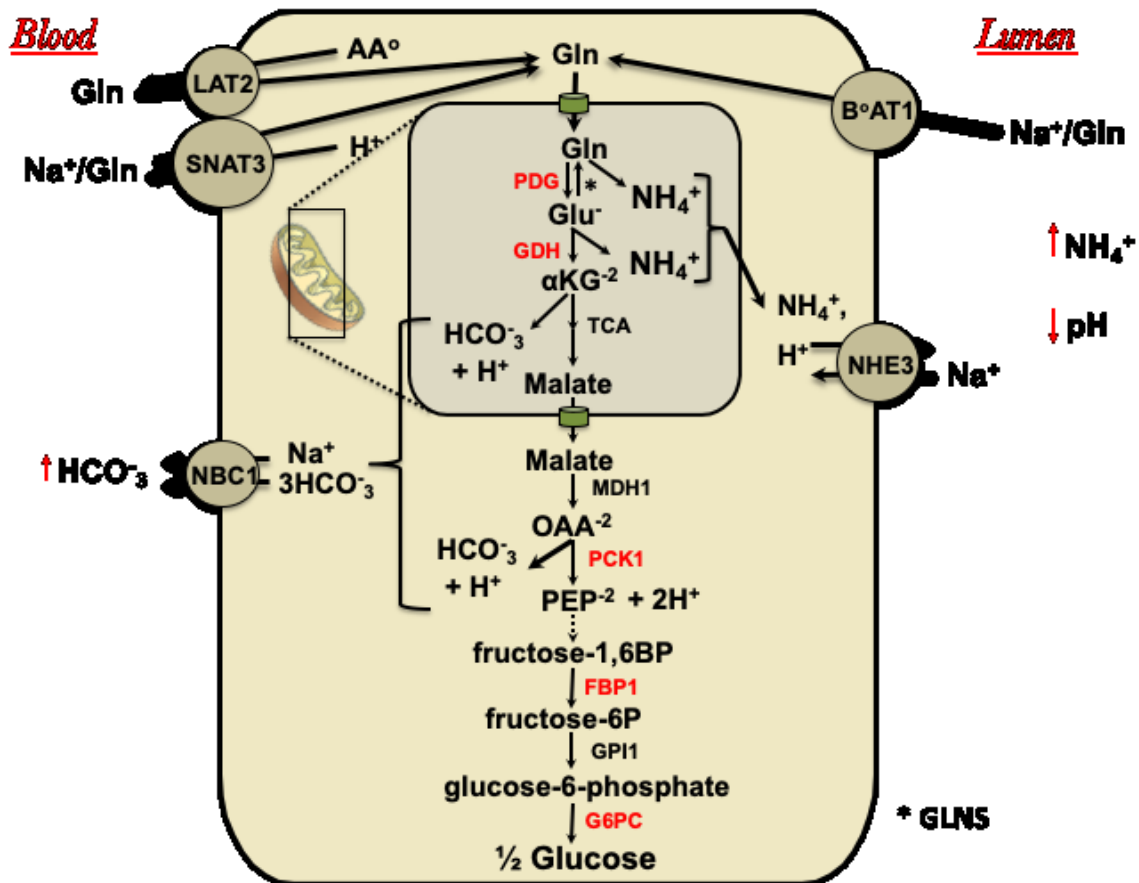


Figure 9. Schéma de l'ammoniagenèse et de la sécrétion d'ammonium par le tubule proximal (Source : Curthoys and Gstraunthaler, 2014)

Dans la cellule du tubule proximal, la glutamine (Gln) est métabolisée en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par la glutaminase phosphate-dépendante (PDG); à travers une série d'étapes, le squelette carboné de la glutamine peut être métabolisé en  $\text{HCO}_3^-$ . Le  $\text{NH}_3$  est sécrété dans la lumière tubulaire soit par diffusion de  $\text{NH}_3$  soit par mouvement de  $\text{NH}_4^+$  sur l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3.  $\text{AA}^\circ$ , acides aminés neutres ;  $\text{B}^\circ\text{AT1}$ , transporteur d'acides aminés neutres de type B; GDH, glutamate déshydrogénase; GLNS, glutamine synthase (catalyse la réaction inverse de la glutaminase);  $\alpha\text{-KG}$ , alpha-cétoglutarate; LAT2, transporteur d'acides aminés de type L-2; OAA, oxaloacétate; PEP, phosphoénol-pyruvate; PEPCK, phosphoénol-pyruvate carboxykinase; MDH1, malate déhydrogenase 1; TCA, acide tricarboxylique, SNAT3, transporteur d'acides aminés neutres couplé au sodium 3.

Comme illustré dans la figure 9, le  $\text{NH}_4^+$  produit par les cellules tubulaires proximales est sécrété dans la lumière tubulaire *via* l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  NHE3 ( $\text{NH}_4^+$  à la place du  $\text{H}^+$ ) puis réabsorbé dans la branche large ascendante de Henlé pour s'accumuler dans l'interstitium médullaire sous forme de  $\text{NH}_3$ . Il va ensuite diffuser sous forme de  $\text{NH}_3$  dans le canal collecteur et se lier aux ions  $\text{H}^+$  sécrétés par les cellules intercalaires  $\alpha$  pour être enfin

éliminé dans les urines sous forme de  $\text{NH}_4^+$ . Quant au  $\text{HCO}_3^-$  filtré par les glomérules, il est complètement réabsorbé au niveau tubulaire. Une balance acide-base normale est maintenue même si la charge acide est augmentée grâce à l'augmentation appropriée de l'excrétion nette d'acide par le rein

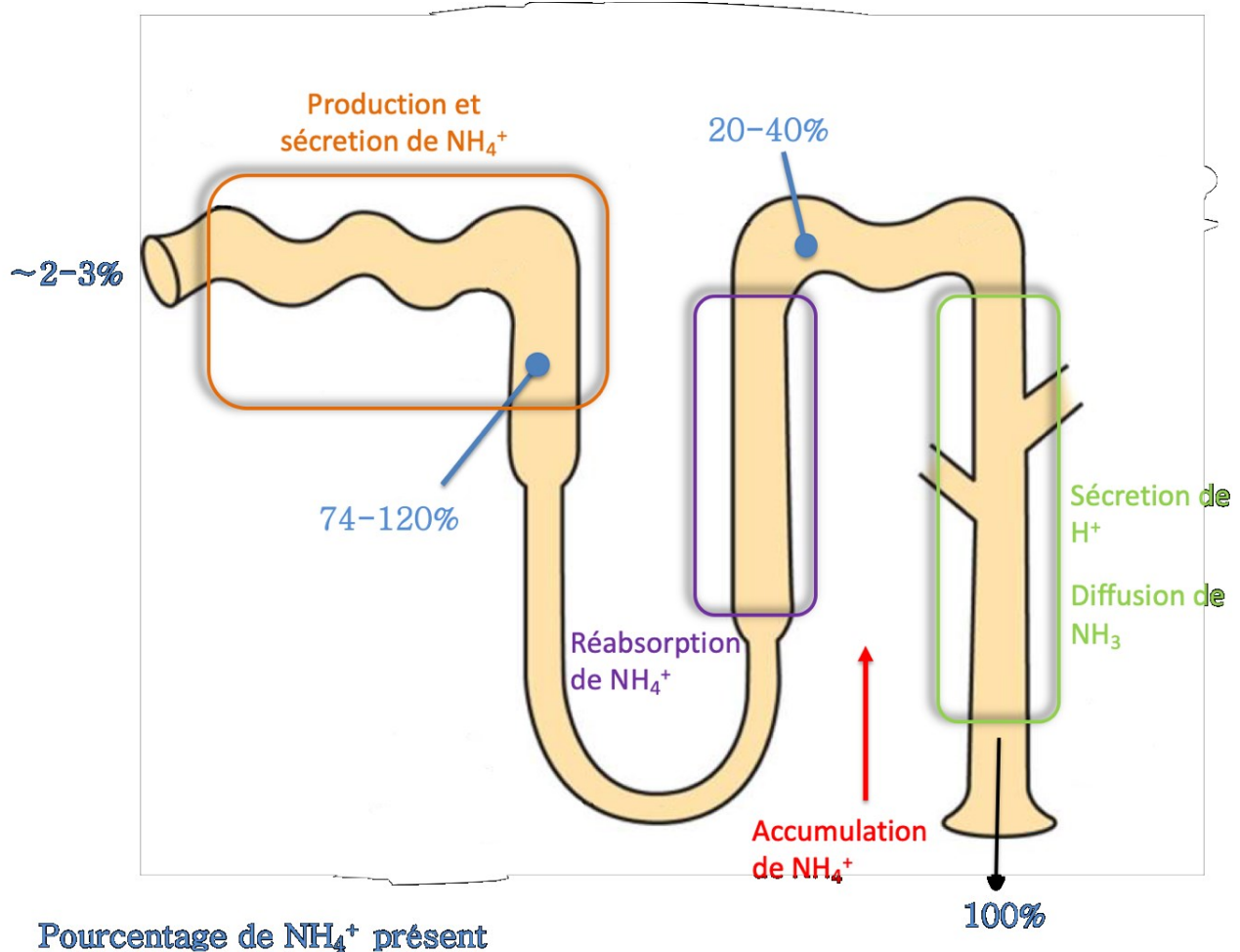


Figure 10. Schéma des mouvements de l'ammonium le long du tubule rénal (Source : Weiner and Verlander, 2011)

L'ammonium est produit par les cellules du tubule proximal et sécrété dans la lumière tubulaire. Il est ensuite réabsorbé dans la branche large ascendante de Henlé pour s'accumuler dans l'interstitium médullaire sous forme de  $\text{NH}_3$ . Il va ensuite diffuser sous forme de  $\text{NH}_3$  dans le canal collecteur et se lier aux ions  $\text{H}^+$  sécrétés par les cellules intercalaires  $\alpha$  pour être enfin éliminé dans les urines sous forme de  $\text{NH}_4^+$ . Les chiffres en bleu représentent la proportion d'ammonium totale excrétée.

### 2.3.3. La néoglucogenèse rénale

Comme précisé dans le chapitre précédent, la néoglucogenèse rénale est couplée à la production d'ammoniaque dans les cellules du tubule proximal. De ce fait, une augmentation de l'ammoniagenèse entraîne donc une augmentation de production de glucose rénale. Jusqu'à récemment, il était acquis que seul le foie avait la capacité de production endogène de glucose, mais le rein, comme décrit dans la figure 11 exprime également la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose-6-phosphatase (G6PC), deux enzymes clés de la néoglucogenèse. Au cours de la voie de synthèse, différents substrats néoglucoformateurs tels que le pyruvate/lactate, le glycérol et des acides aminés sont incorporés à différents niveaux de la réaction pour donner au final du glucose. Dans un premier temps, le rein était considéré comme un organe néoglucogénique participant peu à la production endogène de glucose globale (PEG). Cependant, suite de nombreuses études *in vivo*, le rein est maintenant considéré comme un organe clé pouvant contribuer jusqu'à 20 % à la PEG en état interprandial et jusqu'à 50-55% en état de jeun (Soty *et al.*, 2017 ; Sharma and Tiwari, 2021). Bien sûr, ce pourcentage varie en réponse à plusieurs états physiologiques, tel que le jeûne, l'état nutritionnel, l'exercice, le stress et les stimuli pathologiques tel que l'AM.

Plusieurs substrats sont utilisés dans le rein pour la PEG rénale. Le lactate, converti en pyruvate par le lactate déshydrogénase (LDH) et la glutamine sont les substrats les plus utilisés. Ces substrats entrent dans la mitochondrie des cellules du tubule proximal par les mitochondrial pyruvate carrier 1 (MPC1) et mitochondrial pyruvate carrier 2 (MPC2) pour le pyruvate et par un variant de l'alanine, sérine, cystéine transporteur 2 (ASCT2/SLC1A5) pour la glutamine. La glutamine est convertie en glutamate par la glutaminase phosphate dépendante (PDG) et le glutamate est ensuite convertie en  $\alpha$ -cétoglutarate par le glutamate

déshydrogénase (GDH) entrant donc dans le cycle de Krebs. Le pyruvate, lui, est directement converti en acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase (PDH) pour entrer lui aussi dans le cycle de Krebs. À partir de ces deux substrats sont formés du malate, puis de l'oxaloacétate (OAA) par les malate déshydrogénase 1 (MDH1) et malate déshydrogénase 2 (MDH2). L'une des enzymes clés de la néoglucogenèse, le phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK) convertie ensuite l'OAA en phosphoénol pyruvate.

De nombreuses enzymes sont incluses dans la voie de signalisation de la néoglucogenèse pour convertir le phosphoénol pyruvate en fructose-1,6 biphosphate qui lui-même est converti en fructose-6-phosphate par les fructoses biphosphatase 1 (FBP1) et fructose biphosphatase 2 (FBP2). Le glucose-6-phosphate est ensuite formé à partir du fructose-6-phosphate par la glucose-6-phosphate isomérase 1 (GPI1), qui finalement, permet la formation de glucose par la glucose-6-phosphatase (G6PC). Cette voie de signalisation est parfaitement régulée dans le rein puisque les enzymes, permettant une conversion irréversible, sont localisées exclusivement dans le tubule proximal. La PEPCK possède deux isoformes, une cytosolique et une mitochondriale.



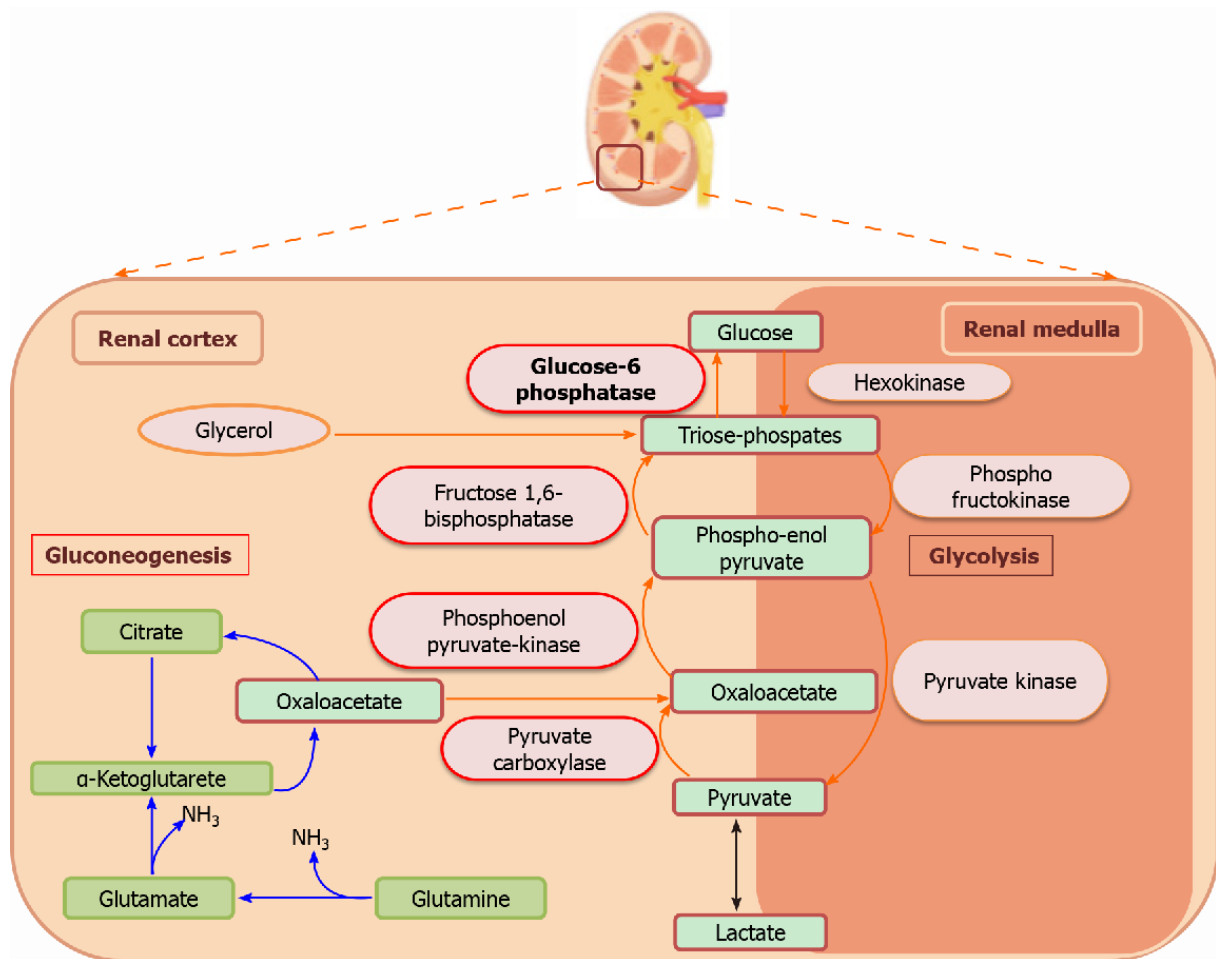


Figure 11. Résumé schématique de la néogluconèse rénale et de la localisation des enzymes (Source : Sharma and Tiwari, 2021)

## 2.4. L'acidose métabolique aiguë et les troubles du métabolisme du glucose

Au cours de la MRC, le nombre de néphrons sains diminue progressivement. Au début de la maladie, la réduction du nombre de néphrons fonctionnels est compensée par une augmentation de l'excrétion de  $\text{NH}_4^+$  par néphron, ce qui permet de maintenir le pH du sang dans une gamme très étroite de valeurs ( $7.4 \pm 0.04$ ). Lorsque la maladie progresse jusqu'à un débit de filtration glomérulaire  $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$  (stade 3 de la maladie), la réduction du nombre de néphrons fonctionnels dépasse les capacités d'adaptation du rein, et une acidose s'installe, c'est-à-dire que l'excès de  $\text{H}^+$  accumulé (du fait de la diminution de l'excrétion de

$\text{NH}_4^+$  et de l'acidité titrable) consomme les  $\text{HCO}_3^-$  dont la concentration plasmatique s'abaisse (généralement entre 12 et 20 mmol/l). La rétention d'acide par les reins et à terme une AM est donc une complication inéluctable de la MRC. D'après Kraut & Madias (2016), l'AM est présente chez 2.3 % à 13 % des patients atteints d'IRC de stade 3 et chez 19 à 37 % des patients atteints d'IRC de stade 4.

Les conséquences principales de l'AM dans la MRC sont la déminéralisation osseuse, la dénutrition et la perte de masse maigre (par protéolyse), ainsi que l'accélération du déclin de la fonction rénale. Des études chez l'Homme montrent une corrélation entre un risque plus important de progression de la perte de la fonction rénale chez des patients insuffisants rénaux non-dialysés avec une concentration plasmatique en bicarbonate basse, une forte production d'acide endogène, une charge alimentaire en acide élevée et une incapacité à excréter des acides (Vallet *et al.*, 2015). Plusieurs études de cohorte montrent que la supplémentation orale en composés alcalins (bicarbonate de sodium) ralentit la progression de la maladie (De Brito-Ashurst *et al.*, 2009 ; Mahajan *et al.*, 2010 ; Goraya *et al.*, 2014). De plus, une étude récente montre qu'un régime riche en acide est associé à un risque plus élevé de déclin de la fonction rénale chez des patients transplantés rénaux. Cette association est médiée par la concentration en bicarbonate plasmatique, l'excrétion urinaire de  $\text{NH}_4^+$  et l'excrétion nette d'acide (Yeung *et al.*, 2021).

Plusieurs études ont été réalisées chez l'animal et l'Homme afin de confirmer ce lien entre AM et altération de l'homéostasie du glucose (Tableau 1). La première étude sur le sujet a été réalisée par Haldane *et al.* (1924). Les auteurs ont démontré une diminution de la tolérance au glucose chez l'Homme après ingestion de chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) qui entraîne le développement d'une AM. En 1952, Mackler *et al.* ont étudié les effets de

l'acidose sur la tolérance au glucose et à l'insuline chez des chiens. Ces auteurs ont induit une acidose par perfusion continue de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  entre 46 et 72 heures chez 5 chiens et ont observé une glycémie initiale plus élevée, une diminution de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les chiens en acidose sans baisse des taux de phosphore et de potassium plasmatique. Ils ont ainsi conclu que l'absorption de glucose était diminuée par une inhibition de la phosphorylation du récepteur de l'insuline. Guest *et al.* (1952) ont étudié les effets de l'AM chez le chien en induisant une acidose sévère par perfusion intraveineuse de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Ces auteurs montrent que l'acidose entraîne une intolérance au glucose, une diminution de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la capture de glucose par les tissus périphériques.

DeFronzo *et al.* (1979) ont étudié les effets de l'AM par traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  d'une durée de 3 jours (0,1g/kg/jour) sur le métabolisme du glucose chez 16 volontaires sains par les techniques du clamp euglycémique hyperinsulinémique et du clamp hyperglycémique. L'utilisation de ces deux techniques a montré une diminution du débit de perfusion de glucose (GIR) correspondant à la capture de glucose par les tissus insulino-dépendants et une diminution de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. En 1972, Weisinger *et al.* ont étudié la tolérance au glucose chez des chiens présentant une AM modérée ou sévère induite par administration de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et chez des chiens urémiques et conclut qu'une AM même sévère ne peut rendre compte de la diminution de la tolérance au glucose observée chez les chiens urémiques et donc que l'AM ne serait pas le seul facteur responsable des troubles du métabolisme du glucose des patients insuffisants rénaux. Une étude récente montre que l'urée dont la concentration augmente dans le sang dans la MRC entraîne un défaut de sécrétion de l'insuline par les cellules bêta du pancréas *in vitro* (Koppe *et al.*, 2016). L'urée agirait en augmentant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et en stimulant une glycosylation excessive (O-glcNacylation), inhibant la phosphofructokinase 1 dans les îlots (PFK-1) et réduisant donc la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, entraînant une

réduction de l'utilisation de glucose, de son oxydation et de la production d'ATP. L'urée induirait la résistance à l'insuline des adipocytes 3T3-L1 par une augmentation de la production de DRO, de l'expression de l'adipokine retinol binding protein 4 (RBP4) et de la résistine. L'urée a aussi stimulé la modification des enzymes de la voie de signalisation de l'insuline par O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) (D'Apolito *et al.*, 2010).

Tableau 1. Résumé des études examinant les effets de l'acidose métabolique sur l'homéostasie du glucose

Auteurs	Étude	Journal	Patients	Traitement(s)	Méthodes	Conclusion
<b>Haldane et al., 1924</b>	The effect of reaction changes on human carbohydrate and oxygen metabolism	Royal Society Publishing	1 patient sain	50 g/jour de NH <sub>4</sub> Cl sur 2 jours et 65 g/jour sur 3 jours	Mesure de glucose sanguin and urinaire	Glycosurie présente et intolérance au glucose
<b>Mackler et al., 1952</b>	Effects of ammonium chloride acidosis on glucose tolerance in dogs	American journal of physiology	5 chiens sains	NH <sub>4</sub> Cl (M/6 – entre 46 et 72 h)	GTT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Tolérance au glucose</li> <li>• Inhibition de la phosphorylation de la capture de glucose</li> </ul>
<b>Guest et al., 1952</b>	Effects of acidosis on insulin action and on carbohydrate and mineral metabolism	Diabetes	1 chien diabétique induit par alloxan 5 chiens sains 5 chiens en acidose métabolique sévère	IV solution de M/6 NH <sub>4</sub> Cl	Mesure de gazes et d'électrolytes sanguines ITT GTT Mesure de glycolyse in vitro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AM induit une hyperglycémie, ↓ la tolérance et la capture de glucose, inhibe l'action de l'insuline et la glycolyse</li> <li>• L'AM ↓ [potassium] et [phosphore]</li> </ul>

<p><b>Walker et al., 1963</b></p>	<p>Inhibition of insulin by acidosis</p>	<p>The Lancet</p>	<p>6 patients diabétiques en cétoacidose diabétique sévère</p>	<p>1. ½ litres de M/6 lactate de sodium en IV 2. 100-200 U d'insuline</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• [pH] sanguin/[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] mesuré</li> <li>• IR index calculé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrélation négative entre la résistance à l'insuline et le pH sanguin</li> </ul>
<p><b>Weisinger et al., 1972</b></p>	<p>Comparison of the effects of metabolic acidosis and acute uremia on carbohydrate tolerance</p>	<p>Diabetes</p>	<p>18 chiennes entre 16 et 27 kg</p>	<p>1. NH<sub>4</sub>Cl – 7-10 gm/jour sur 3 jours 2. NH<sub>4</sub>Cl – 10-15 gm/jour sur 3 jours 3. Cystectomie totale</p>	<p>Estimation de la capture de glucose par inhibition de la production endogène d'insuline et de glucose et perfusion constante de glucose/insuline</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Tolérance au glucose – AM sévère</li> <li>• ↓↓↓ Tolérance au glucose – Urémie</li> <li>• Intolérance non due à l'AM seule</li> </ul>
<p><b>De Fronzo et al., 1979</b></p>	<p>Glucose intolerance following chronic metabolic acidosis in men</p>	<p>American journal of physiology</p>	<p>16 patients sains</p>	<p>NH<sub>4</sub>Cl (0,1g/Kg/jour)</p>	<p>Clamp hyperglycémique/euglycémique hyperinsulinémique</p>	<p>AM réduit la sensibilité à l'insuline des tissus</p>

## 2.5. Effets de l'acidose métabolique aiguë sur les tissus périphériques

Depuis ces études, de nombreuses équipes ont étudié les mécanismes par lesquels l'AM altère l'homéostasie du glucose et plus particulièrement la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline.

Wittaker *et al.*, (1982) ont démontré que la correction de l'acidose chez des rats diabétiques avec une acidocétose par une perfusion de  $\text{NaHCO}_3$  (3 mmol/kg/h pendant 5h) augmente la liaison de l'insuline à son récepteur sur les adipocytes du fait d'une augmentation du nombre des récepteurs à l'insuline. Au contraire, une perfusion de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  chez des rats normaux (2.7 mmol/kg/h pendant 15h) entraîne une diminution de la liaison de l'insuline aux adipocytes du fait de la diminution du nombre de récepteurs à l'insuline. Il est établi qu'un pH acide (6.6) inhibe la lipolyse et que le taux de  $\text{K}^+$  joue un rôle important dans ce processus (Hjemdahl et Fredholm, 1977). La leptine et l'adiponectine, deux adipocytokines secrétées par les adipocytes, impliquées dans le métabolisme du glucose du fait de leur propriété hypoglycémiant, sont dérégulés à la suite d'une baisse de pH. Sur des adipocytes en culture 3T3-L1, un pH acide diminue la capture de glucose et la sécrétion de leptine sans modification du niveau d'expression du gène codant pour la leptine (Teta *et al.*, 2003). Un effet similaire a été observé avec l'adiponectine. Il a en effet été montré chez des volontaires sains que l'administration de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pendant 7 jours entraînait une diminution de la concentration sanguine en adiponectine. De plus, sur des adipocytes en culture provenant de cellules souches mésenchymateuses humaines, un pH acide diminue la sécrétion d'adiponectine et le niveau d'expression du gène codant pour l'adiponectine (Disthabanchong *et al.*, 2011).

Le muscle est également impacté par l'AM. Une étude menée *in vitro* sur des myoblastes L6 montre qu'un pH acide accélère la dégradation protéique en altérant la signalisation post-récepteur à l'insuline *via* la diminution de l'activité PI3K associée à IRS-1 et de la phosphorylation de Akt (Franch *et al.*, 2004), un mécanisme également impliqué dans la protéolyse musculaire observée dans l'insuffisance rénale (Bailey *et al.* 2006). Iles *et al.* (1977) ont étudié les effets de l'acidose chez le rat sur la production de glucose par des foies isolés et perfusés avec une solution de pH 6.8 ou 7.4. Une nette diminution de la néoglucogenèse a été observée dans les foies perfusés avec une solution de pH acide. La diminution de la néoglucogenèse en acidose est due à une réduction de la concentration en oxaloacétate, le substrat de la PEPCCK. Inversement, Beech *et al.* (1993) a montré une augmentation de la néoglucogenèse à partir des foies isolés de rats acidotiques et perfusés avec une solution de bicarbonate.

Plusieurs études font état de l'implication des récepteurs OGR1 et GPR (GPR4 et GPR68 ou capteurs de pH) dans la sécrétion d'insuline, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Tous deux sont des récepteurs couplés aux protéines G et détectent les protons extracellulaires *via* des résidus d'histidines localisées sur les régions extracellulaires de ces récepteurs. OGR1 et GRP mènent à une variété de modifications des fonctions cellulaires. (Ludwig *et al.*, 2003 ; Seuwen *et al.*, 2006). Les voies de signalisation de ces capteurs de pH, stimulée par l'acidification du milieu extracellulaire incluent l'activation de phospholipase C, la formation de l'inositol triphosphate et donc, de l'efflux de  $Ca^{2+}$  (Ludwig *et al.*, 2003) mais aussi de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Mogi *et al.*, 2005 ; Tomura *et al.*, 2005)

En effet, l'inactivation du récepteur OGR1 chez la souris entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline dépendante du glucose (Nakakura *et al.*, 2012) et l'inactivation de



OGR4 améliore la tolérance au glucose *via* une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Giudici *et al.*, 2013).

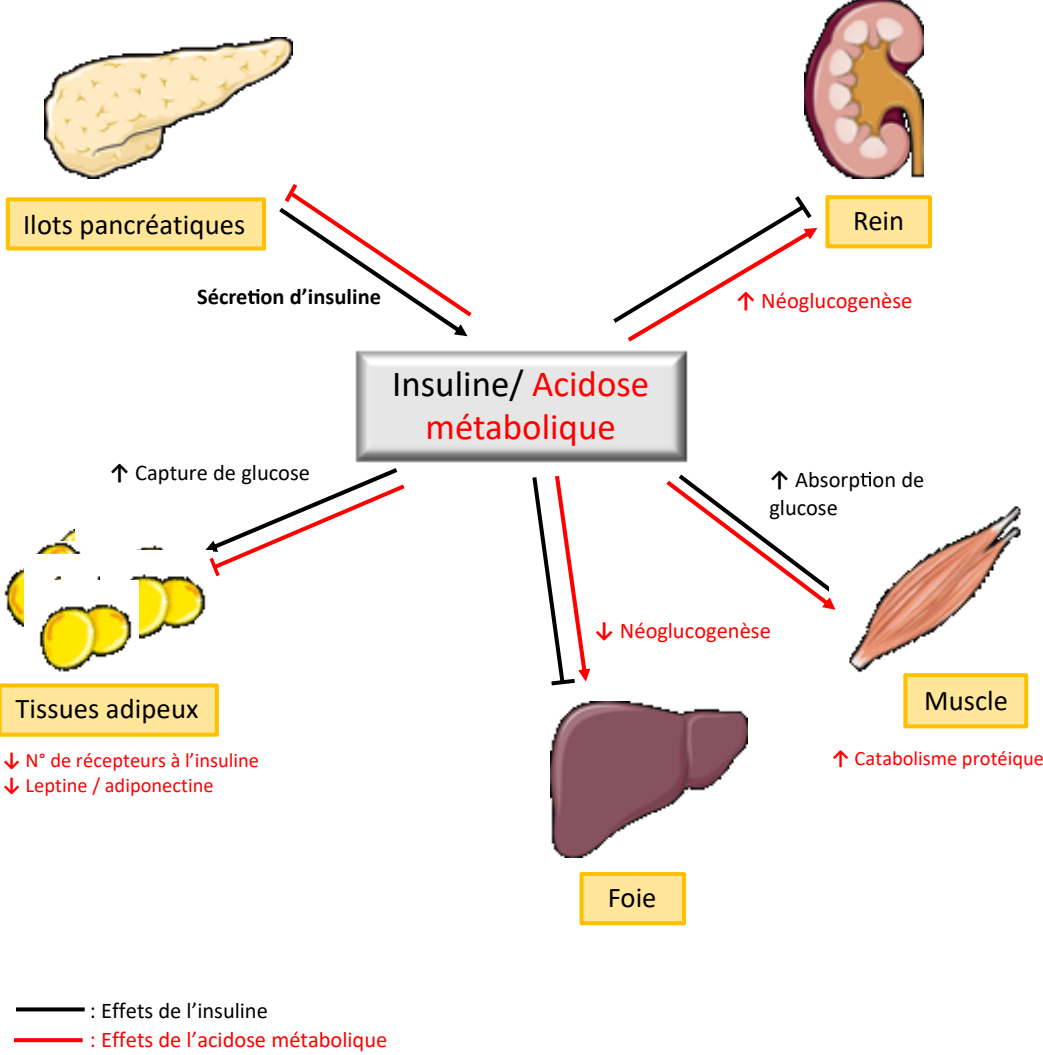


Figure 12. Effets de l'insuline et de l'acidose métabolique sur les organes périphériques

## Objectifs du projet

Les données de la littérature décrites dans l'introduction de ce manuscrit démontrent une forte association entre l'AM aiguë et les effets délétères sur la tolérance au glucose et la sécrétion/sensibilité à l'insuline. Ces études apportent des éléments précieux dans la compréhension des voies de signalisations et des mécanismes sous-tendant les effets de l'AM aiguë sur l'homéostasie du glucose. Par contre, très peu de données sont disponibles concernant l'AM chronique. Le rein est un organe qui, face à un trouble de la balance acido-basique aiguë, a une réponse adaptative. Ce dernier ne présente pas les mêmes mécanismes d'action lors ce qu'il entre dans une réponse maladaptative de cette dérégulation. Il semble donc crucial de connaître comment le rein, mais aussi les autres organes impliqués dans l'homéostasie du glucose, réagissent face à une AM chronique.

La prévalence du DT2 augmente considérablement chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique lorsque le taux de filtration glomérulaire diminue en dessous de 30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, suggérant que des facteurs associés à la réduction néphrétique peuvent perturber l'homéostasie du glucose. Conformément à cette hypothèse, il a été rapporté que la correction de l'AM, une complication fréquente de l'insuffisance rénale chronique, améliore la résistance à l'insuline dans la MRC.

Les objectifs sont :

- Évaluer les effets d'une charge acide exogène (administration de NH<sub>4</sub>Cl à court et long terme) sur l'homéostasie du glucose de la souris.
- Identifier les mécanismes impliqués.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés au phénotype métabolique et à l'étude du métabolisme énergétique de nos souris, car aucune étude n'a étudié les effets de l'AM chez la souris C57Bl6/J sur une durée de 6 mois. Nous avons évalué la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline, mais également estimer la production endogène de glucose globale, puis hépatique et extra-hépatique. Suite à l'évaluation de la néoglucogenèse dans le rein, le foie et l'intestin, nous avons effectué des analyses protéomiques et transcriptomiques associées aux voies de signalisation de la production endogène de glucose. Le transport et l'excrétion urinaire de glucose, facteurs insulinoindépendant et insulinoindépendant, sont aussi cruciaux dans l'homéostasie du glucose. Nous avons évalué si l'induction de l'AM chronique entraînait une altération de ces derniers et si oui, comment. Pour cela, une quantification de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose (<sup>18</sup>FDG) chez nos souris a été réalisée, ainsi que l'analyse protéomique et transcriptomique de transporteurs de glucose. Nous avons également étudié les effets de l'AM chronique sur la structure rénale. Pour cela, des analyses histologiques des reins, ainsi que des tris cellulaires de population immunitaires et des dosages de cytokines et chimiokines ont été réalisés. Enfin, une analyse transcriptomique de l'ARN totale des souris sous AM chronique entre 3 et 60 jours a été réalisée pour évaluer les effets sur l'expression relative de gènes impliqués dans la régulation de glucose, et analyser les voies de signalisations altérées par le traitement.

# Méthodes

Pour ce projet, une étude de la cinétique des effets de l'AM sur l'homéostasie du glucose a été mise en place. Tous les tests ont été réalisés aux temps indiqués sur la Figure 1. L'AM est induite par l'administration de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans l'eau de boisson à une concentration de 0.28M.

## 1. Test de tolérance au glucose (ipGTT)

Après un jeûne de 15h, les souris sont pesées et  $\sim 30\mu\text{L}$  de sang sont prélevés dans un tube hépariné afin de déterminer l'insulinémie à T0 ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose de 2g/Kg de glucose par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 pour toutes les souris à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-Chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre). Un volume de sang est aussi prélevé ( $\sim 30\mu\text{L}$ ) à T15, 30 et 60 pour la mesure de l'insuline plasmatique (Mercodia mouse insulin ELISA kit, Mercodia AB, Uppsala, Suède).

Pour le test de tolérance, les souris ont été gavées par voie orale à l'aide d'eau stérile (contrôles) ou de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (acidotiques) à une concentration de 1,5M. Après 6 heures de jeûne, les souris sont pesées et  $\sim 30\mu\text{L}$  de sang sont prélevés dans un tube hépariné afin de déterminer l'insulinémie à T0 ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose de 2g/Kg de glucose par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-Chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre).  $\sim 30\mu\text{L}$  de sang est aussi prélevé à T15, 30 et 60 pour la mesure de l'insuline plasmatique (Mercodia mouse insulin ELISA kit, Mercodia AB, Uppsala, Suède).

## 2. Test de tolérance à l'insuline (ipITT)

Après un jeûne de 5h les souris sont pesées et  $\sim 30\mu\text{L}$  de sang est prélevé dans un tube hépariné ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose d'insuline de  $0,75\text{U/Kg}$  par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 pour toutes les souris à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-Chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre).

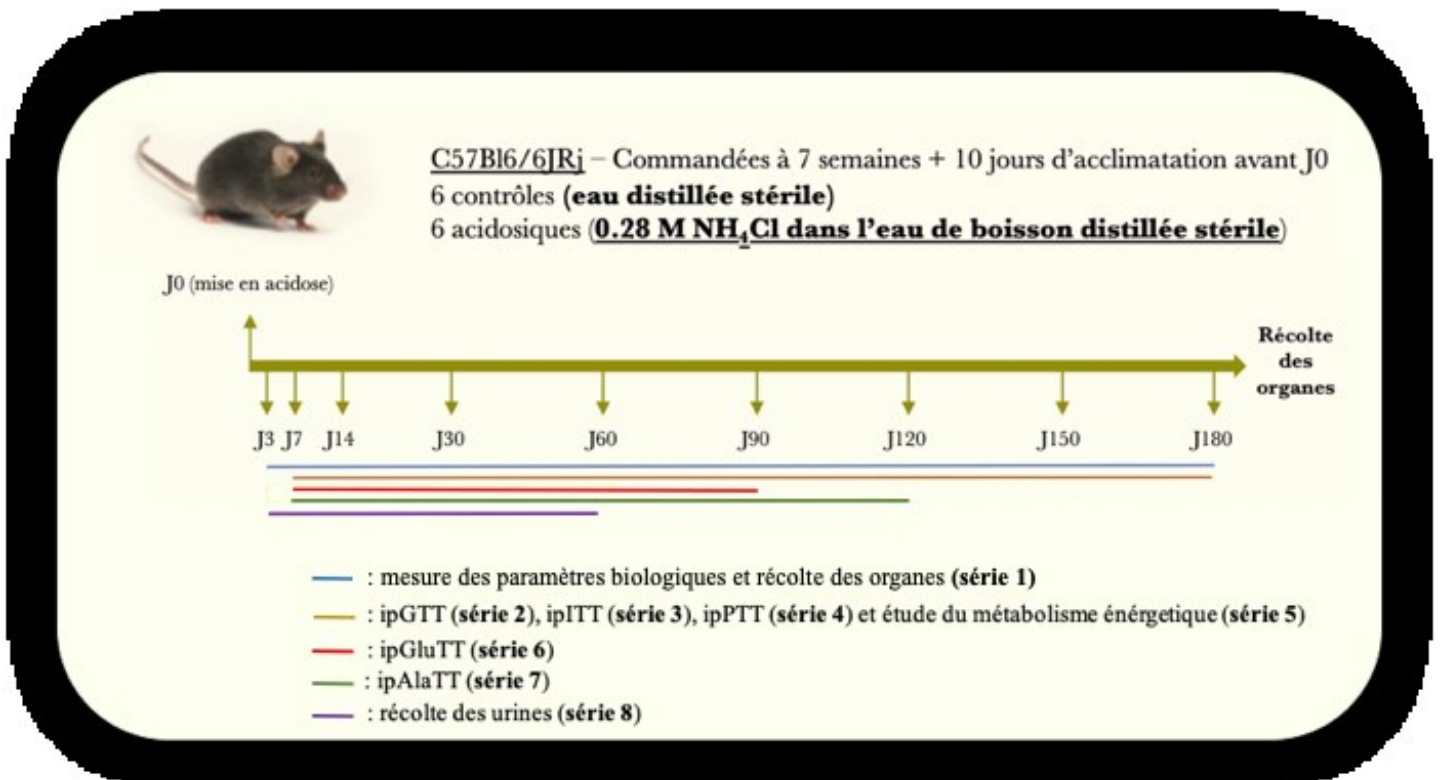


Figure 13. Schéma du protocole expérimental réalisé sur la souris

Des souris de 7 semaines ont été réceptionnées et placées 10 jours en hébergement pour l'acclimatation à l'environnement. Cinq séries d'expériences ont été réalisées : Série 1 – mesure des paramètres biologiques et récolte des organes, série 2 – test de tolérance au glucose (ipGTT), série 3 – test de tolérance à l'insuline (ipITT), série 4 – test de tolérance au pyruvate (ipPTT), série 5 – étude du métabolisme énergétique, série 6 – test de tolérance à la glutamine (ipGluTT), série 7 – test de tolérance à l'alanine (ipAlaTT) et série 8 – récolte des urines. Pour chaque série, les souris ont été séparées en deux groupes, l'eau de boisson a été remplacée au jour 0 par de l'eau distillée stérile pour les souris contrôles et de l'eau distillée stérile contenant  $0,28\text{ M}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pour les souris sous AM chronique. Les temps de cinétique pour chaque série sont indiqués sur la figure.

### 3. Test de tolérance au pyruvate (ipPTT)

Après un jeûne de 15h les souris sont pesées et ~ 30µL de sang est prélevé dans un tube hépariné ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose de pyruvate de 1g/Kg par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 pour toutes les souris à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-Chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre).

### 4. Test de tolérance à la glutamine (ipGluTT)

Après un jeûne de 15h les souris sont pesées et ~ 30µL de sang est prélevé dans un tube hépariné ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose de glutamine de 1g/Kg par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 pour toutes les souris à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-Chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre).

### 5. Test de tolérance à l'alanine (ipAlaTT)

Après un jeûne de 15h les souris sont pesées et ~ 30µL de sang est prélevé dans un tube hépariné ainsi que la glycémie à T0. Les souris sont ensuite injectées avec une dose d'alanine de 1g/Kg par voie intrapéritonéale à un intervalle de 2 minutes et les glycémies sont prises à T15, 30, 45, 60, 90 et 120 pour toutes les souris à l'aide d'un glucomètre mobile (Accu-chek Performa, Roche Diabetes Care Limited, West Sussex, Angleterre).

## 6. Métabolisme énergétique

Les souris sont placées dans les cages métaboliques (TSE systems, PhenoMaster V5.6.4, Bad Homburg vor der Höhe, Allemagne) 3 jours avant le premier temps de la cinétique pour une première acclimatation. Durant les premiers temps de la cinétique (J7 et J14), les souris sont dans les cages métaboliques pour un total de 12 jours. Pour le reste de la cinétique, les souris sont placées un jour avant et sortie un jour après le jour voulu pour obtenir des résultats sur une moyenne de 3 jours. Les données enregistrées sont les suivantes : La  $pO_2$ , la  $pCO_2$ , le rapport d'échange respiratoire (RER), l'activité locomotrice, la consommation d'eau et de nourriture. La composition corporelle des souris (masse grasse, masse maigre et masse fluide) est déterminée à l'aide d'un MiniSPEC (MQ-60, Bruker, Massachusetts, USA) avant et après chaque enregistrement métabolique.

## 7. Mesure des gaz du sang et autres paramètres biologiques sanguins

Le sang des souris est prélevé par ponction rétro-orbitale sous anesthésie (isofluorane 2%). Les gaz du sang et autres paramètres biologiques sont mesurés à l'aide de l'analyseur i-STAT (Abbott). Les cartouches i-STAT EC8+ permettent de mesurer le pH, la  $pCO_2$  les concentrations en  $Na^+$  ( $[Na^+]$ ),  $K^+$  ( $[K^+]$ ),  $Cl^-$  ( $[Cl^-]$ ), urée, glucose, ainsi que l'hématocrite. La concentration en  $HCO_3^-$  est calculée selon l'équation de Henderson-Hasselbach ( $pH \text{ sang} = 6,1 + \log_{10} ([HCO_3^-] / 0,03 \times PCO_2 \text{ sang})$ ). Les glycémies obtenues par cette méthode étant anormalement élevées (1,5 fois supérieures à celles obtenues avec le glucomètre mobile Accu-chek). La créatinine plasmatique est mesurée par chromatographie ionique.

## 8. Recueil des organes et de sang

Environ 1 ml de sang est prélevé par ponction cardiaque pour le dosage de la créatinine par exemple. Les organes (rein, foie, tissus adipeux (epididymal et inguinal), muscle, pancréas, intestin (duodénum, jéjunum et iléon) sont ensuite rapidement prélevés et immédiatement congelés par immersion dans l'azote liquide. Les échantillons sont destinés aux analyses de type RNA-seq et Western blot. Sur d'autres souris, les organes sont prélevés après perfusion intracardiaque d'une solution de paraformaldéhyde 4% sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane.

Le but de cette procédure est de préserver une bonne structure des reins pour leur observation en microscopie. Les morceaux d'organes sont ensuite congelés dans l'isopentane ou inclus en paraffine pour la réalisation de coupes fines.

## 9. Recueil des urines

La cinétique a été réalisée sur deux mois (3, 7, 14, 30 et 60 jours). Nous avons étudié 5 lots de 16 souris dont 8 souris contrôles et 8 souris traitées. Le premier lot est étudié à 3 jours, le second à 7 jours, le troisième à 14 jours, le quatrième à 30 jours et le dernier à 60 jours. Pour le recueil des urines, les souris sont placées individuellement dans des cages métaboliques (Techniplast, France) pour une durée journalière maximale de 14 heures (18h-8h) et ce, pendant 3 nuits consécutives. Les souris, la nourriture et la boisson reçues sont pesées à l'entrée des souris dans les cages et à la sortie des souris des cages.

Les urines sont recueillies le matin de la troisième nuit passée en cage métabolique qui coïncide avec la durée du traitement étudiée. La veille, un cristal d'azide de sodium (antibactérien) et 100  $\mu$ l d'huile de paraffine sont disposés dans chaque collecteur à urines afin de limiter l'évaporation et la prolifération bactérienne.



Les 3 séjours consécutifs dans les cages métaboliques sont justifiés par la nécessité d'acclimater les souris à l'isolement. La stabilisation de la prise de nourriture et de boisson, et du poids des souris sur cette période atteste de la bonne acclimatation des souris qui est essentielle à la validité des mesures effectuées sur les urines (pH,  $\text{NH}_4^+$ , phosphate, glucose, créatinine) ainsi recueillies. Les souris sont ensuite replacées dans leurs cages d'origine pour les procédures suivantes.

## 10. Mesure du glucose urinaire en réponse à l'injection de glucose

Une solution de glucose est injectée par voie intrapéritonéale (2g/kg). Les urines de chaque souris ont été récoltées sur parafilm avant l'injection de glucose et 2-4 heures après l'injection. La concentration de glucose dans les urines a été déterminée par dosage enzymatique (Mouse Glucose Assay kit, Crystal Chem, USA). La densité optique (OD) a été mesurée à 505 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (Biotek, synergy HTX). La concentration en créatinine dans les urines a été mesurée par chromatographie ionique et spectrophotométrie (235 nm). L'excrétion de glucose dans les urines a été calculée par le rapport concentration de glucose sur concentration de créatinine.

## 11. Extraction de protéines rénales

### 11.1. Protéines de membranes plasmiques

Un demi-rein de chaque souris cryoconservé a été placé dans 1mL de tampon d'homogénéisation à 4°C contenant 250 mM de sucrose, 100 mM de Tris-Hepes (pH 7,4) et des inhibiteurs de protéases (FisherScientific, #A32963) et de phosphatases (FisherScientific, #A32957) dans des tubes contenant la Matrice de lyse D (MPbio, #116913100). Les reins ont

ensuite été homogénéisés à l'aide de l'homogénéisateur FastPrep 24G (MPBio) puis l'homogénat a été transféré dans des tubes Eppendorf de 2mL pour une centrifugation de 15 minutes à 4000 g à 4°C. Pour isoler les protéines de membranes plasmiques, le surnageant a été centrifugé à 17000 g à 4°C pendant 30 minutes. Le culot a ensuite été resuspendu dans le tampon d'homogénéisation. Des aliquots ont été congelés à -80°C.

## 11.2. Lysats de reins

Un demi-rein de chaque souris cryoconservé a été placé dans 750µl de tampon de lysat contenant 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7,8) et des inhibiteurs de protéases (FisherScientific, #A32963) et de phosphatases (FisherScientific, #A32957) dans des tubes contenant la matrice D (MPbio, #116913100). Les reins ont ensuite été homogénéisés à l'aide de l'homogénéisateur FastPrep 24G (MPBio) et le lysat a été transféré dans des tubes eppendorf de 2mL pour une centrifugation de 10 minutes à 14000 rpm à 4°C. Le surnageant a ensuite été aliquoté et congelé à -80°C.

## 12. Quantification et dénaturation des protéines

La concentration en protéines des homogénats et des lysats de rein a été déterminée par un dosage colorimétrique (Bio-Rad protein assay, Biorad, #500-0006) avec des concentrations variables d'albumine sérique bovine pour la gamme d'étalonnage. Pour cela, chaque échantillon a été dilué dans une solution de NaOH 0,1N à 2 concentrations différentes. La densité optique a été mesurée à 595 nm dans un lecteur de plaques (Biotek, synergy HTX).

Pour les expériences de Western blot, les échantillons sont préalablement dénaturés dans le tampon de Laemmli (0,12 M Tris HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glycérol, 0,005% bleu

de bromophénol et 0,2M DTT) à une concentration finale de 1,5 µg/µl. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie pour vérifier que les quantités de protéines déposées dans chaque puits sont homogènes. L'intensité des bandes a été mesurée pour chaque puits à l'aide du logiciel ImageJ. Dans le cas où les quantités de protéines entre les puits ne sont pas homogènes, un ajustement des volumes à déposer est effectué.

### 13. Western blot

#### 13.1. Électrophorèse en gel de polyacrylamide

Des gels de séparation (7,5% ou de 10% d'acrylamide) et de concentration (4% d'acrylamide) ont été préparés dans des cassettes criterion de 26 puits (Biorad, #3459903). La composition des gels a été décrite ci-dessous.

Tableau 2. Composition des gels acrylamide

	Gel de séparation (7.5%)	Gel de séparation (10%)	Gel de concentration (4%)
30% Acrylamide/Bis solution, 37,5 :1	7,5mL	10mL	2mL
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	-	3,75mL
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	7,5mL	7,5mL	-
ddH <sub>2</sub> O	14,6mL	12mL	9mL
10% SDS	300µl	300µl	150µl
TEMED	15µl	15µl	15µl
10% Ammonium Persulfate	150µl	150µl	75µl

Les gels de séparation sont versés dans les cassettes puis immédiatement après, une couche d'isopropanol est délicatement versée sur les gels. Après 45 minutes de polymérisation, l'isopropanol est enlevé et les cassettes rincées à l'eau distillée puis le gel de

concentration est coulé dans les cassettes et le peigne est placé pour une polymérisation de 30 minutes.

### 13.2. Migration

Les cassettes sont ensuite placées dans la cuve d'électrophorèse, les échantillons dénaturés sont déposés (10  $\mu$ l soit 15  $\mu$ g de protéines par puits) et 1L de tampon d'électrophorèse contenant 74.3mM de Tris, 575.4mM de glycine et 10.4mM de SDS est versé dans la cuve. L'électrophorèse est programmée à 150V pour 1 heure et 20 minutes.

### 13.3. Transfert

Les gels sont rééquilibrés dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol et 0,1% de SDS 10%. Les membranes PVDF immobilon-E (Merck millipore, USA) sont réhydratées dans du méthanol 100%, puis rincées dans le tampon de transfert. Les papiers Whatman (Biorad, USA) ainsi que les éponges (Biorad, USA) sont imbibées de tampon de transfert avant le montage du sandwich puis le transfert est programmé à 100V pour 42 minutes. Le transfert est ensuite vérifié par une coloration au Rouge Ponceau (Thermo Fisher Scientific, USA) et l'acquisition colorimétrique est faite avec un imager Amersham 600 (GE healthcare, USA).

### 13.4. Immunoblot

Les sites aspécifiques des membranes sont saturés dans du PBS contenant 5% de lait écrémé pendant 1 heure et incubées dans l'anticorps primaire dilué dans du PBS contenant 1% de lait écrémé sur la nuit à 4°C. Le matin, les membranes sont lavées au PBS-Tween 0,1% 5 fois 5 minutes puis incubées pendant 2 heures avec l'anticorps secondaire dilué dans

le PBS contenant 5% de lait écrémé. Les anticorps primaires utilisés et leurs anticorps secondaires correspondants sont listés dans le tableau ci-dessous. Les membranes sont ensuite lavées au PBS-Tween 0,1% 5 fois 5 minutes puis 1x au PBS avant incubation de 5 minutes avec le réactif ECL (West Pico plus, Thermo Fisher Scientific, USA). L'acquisition de la chimioluminescence des membranes est faite avec l'imager Amersham 600 (GE healthcare, USA).

Tableau 3. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour la quantification protéique

Anticorps primaire	Référence/ fournisseur	Dilution	Lait	Échantillons utilisés	Anticorps secondaire	Référence/ fournisseur	Dilution
SGLT-2	sc393350/ Santa Cruz	1/100	1 %	Membranes plasmiques	m-IgG1 BP-HRP	sc525408/ Santa Cruz	1/10000
SGLT-1	07-1417/ Merck	1/1600 + 0,1% tween	1 %	Membranes plasmiques	Goat anti-rabbit IgG HRP	1706515 / Biorad	1/10000
GLUT-2	sc518022/ Santa Cruz	1/100	1 %	Membranes plasmiques	m-IgG1 BP-HRP	sc525408/ Santa Cruz	1/10000
GLUT-1	Université de Lyon	1/10000	1 %	Membranes plasmiques	Goat anti-rabbit IgG HRP	1706515 / Biorad	1/10000
PCK1	16754 – 1 – AP/ Proteinintech	1/10000	1%	Lysats de reins	Goat anti-rabbit IgG HRP	1706515 / Biorad	1/10000
G6PC	22169-1-AP/ Proteinintech	1/200000 + 0,2% tween	5%	Lysats de reins	Goat anti-rabbit IgG HRP	1706515 / Biorad	0000
$\beta$ -actin	8227/ Abcam	1/200000	1%	Membranes plasmiques/ Lysats de reins	Goat anti-rabbit IgG HRP	1706515 / Biorad	1/10000

## 14. Histologie des reins

Après la récolte des reins des souris contrôles et sous AM chronique perfusées avec une solution de paraformaldéhyde 4%, les organes ont été stockés dans de l'éthanol 70% avant inclusion en paraffine. Des coupes ont ensuite été préparées à une épaisseur de 4µm puis déparaffinées. Les colorations Hematoxylin & Eosine (HE), Periodic-Acid Schiff (PAS), Trichrome de Masson (TM) et au Rouge Sirius (RS) ont été réalisées. Puis, les lames ont été scannées à l'aide d'un scanner de lames Nanozoomer S60 (Hamamatsu, Chine). La quantification des vacuoles ainsi que la formation de fibrose et la surface totale des reins ont été réalisées par macro sur le logiciel ImageJ.

## 15. Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS)

Les souris ont été sacrifiées à chaque temps de la cinétique et les organes, ainsi que le sang et l'urine récoltés. Le rein droit ainsi que le pancréas ont été clampés, puis les souris ont été vidées de leur sang par une perfusion intracardiaque de PBS. Ensuite, une solution enzymatique à 4 °C a été injectée en intracardiaque (98b, DNAase et Liberase TM Research grade 1mg/ml (Sigma, ref # 5401119001).

Le rein perfusé de solution enzymatique a ensuite été récolté, coupé en cubes de 1mm<sup>3</sup>, puis transféré dans un tube Eppendorf de 2mL avec de la solution enzymatique. Après agitation dans un thermoshaker (20 min, 850 rpm, 37°C), la suspension cellulaire rénale a manuellement été homogénéisée avec une pipette de 1mL puis replacés dans le thermoshaker pour 2 x 5min à 850rpm avec une homogénéisation manuelle entre les deux agitations.

Les homogénats sont ensuite centrifugés (5 min, 1000 rpm, 4°C), le surnageant éliminé et les cellules resuspendues dans le tampon de FACS (0.2% BSA, 5mM EDTA) à 4°C

(500µL). Les cellules sont ensuite comptées suite d'une coloration au bleu de trypan, puis diluées pour obtenir une solution de 100000 cellules/100uL.

## 16. Traçage de capture de glucose par Tomographie par Émission de Positons (TEP)

Les souris sont injectées avec le <sup>18</sup>FDG à une concentration de 0,5 MBq/gramme de souris par voie intrapéritonéale puis remises en cage durant 45 minutes pour obtenir une bio-distribution complète du glucose. L'acquisition par TEP est ensuite faite pendant 15 minutes puis une acquisition par tomodensitométrie (TDM) pour obtenir les repères anatomiques de la souris. Les valeurs de standard uptake value (SUV) du <sup>18</sup>FDG sont obtenues grâce à un tracé de la région d'intérêt en enlevant le bruit de fond.

## 17. Dosage des interleukines

Les lysats de reins ont été préparés avec le même protocole que pour les protéines. Les échantillons ont ensuite été passés sur un kit de détection de facteur de croissance et d'angiogenèse Milliplex (ref # MAGPMAG-24K-09, Merck, USA) selon les instructions du fabricant. Brièvement, 25µL d'échantillon, de standard et de contrôles ont été déposés dans la plaque ainsi que 25µL de tampon d'essai par puits. La solution de billes magnétiques (25µL) a ensuite été ajoutée dans chaque puits. Après une incubation sur la nuit à 4°C, la plaque a été lavée 3x avec un block magnétique sous la plaque. Une solution de détection d'anticorps a été ajoutée dans les puits, puis après 1 heure d'incubation, une solution de Streptavidin-Phycoerythrin. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et 3 lavages, 150 µL de tampon de lecture par puit ont été ajoutés puis la plaque a été lue avec un système MAGPIX Luminex (ref # 40-072, Merck, USA)

## 18. Séquençage d'ARN (RNAseq)

L'ARN total a été extrait des reins entiers à l'aide du kit RNeasy Lipid Tissue, en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage de l'ARN a été réalisé à l'aide du kit Kapa mRNA Hyperprep (Roche) en combinaison avec le système de séquençage HiSeq 4000 (Illumina). Le démultiplexage des données du séquençage a été effectué à l'aide du logiciel de conversion bcl2fastq (Illumina; bcl2fastq v2.20.0). Le découpage des séquences adaptatrices et des lectures de faible qualité ont été effectués à l'aide du logiciel trimmomatic (version 0.39). Le contrôle de la qualité des lectures a été évalué à l'aide de FastQC (v0.11.9). Par la suite, les lectures de séquences des fichiers FASTQ ont été alignées sur le génome de la souris (GRCm39), téléchargé à partir de la version GENCODE M27. L'alignement a été effectué à l'aide du logiciel STAR aligner (version 2.7.3a). En moyenne, 20 millions de lectures appariées de 75 paires de bases ont été générées par échantillon. Les comptages normalisés des différents gènes et isoformes ont été effectués à l'aide de RSEM (version 1.3.1) en utilisant un GTF de GENCODE M27 et Ensembl 104 pour l'annotation des noms de gènes. Enfin, l'expression différentielle a été réalisée à l'aide de R version 3.6.3 et du package DESeq2 v1.24.0. Quatre réplicats biologiques par condition ont été utilisées.

## 19. Statistiques

Les données ont été analysées sur GraphPad Prism version 9. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. L'analyse statistique des données entre 2 groupes a été réalisée par un test t non apparié, si le F test était significatif, alors une correction de Welch a été appliquée. Pour les analyses des données avec 2 variantes (traitement et temps), un ANOVA à 2 facteurs a été appliqué, si le facteur traitement était significatif, alors un test de comparaisons par paire (test LSD de Fisher) ou de comparaisons multiples (Bonferroni) a été



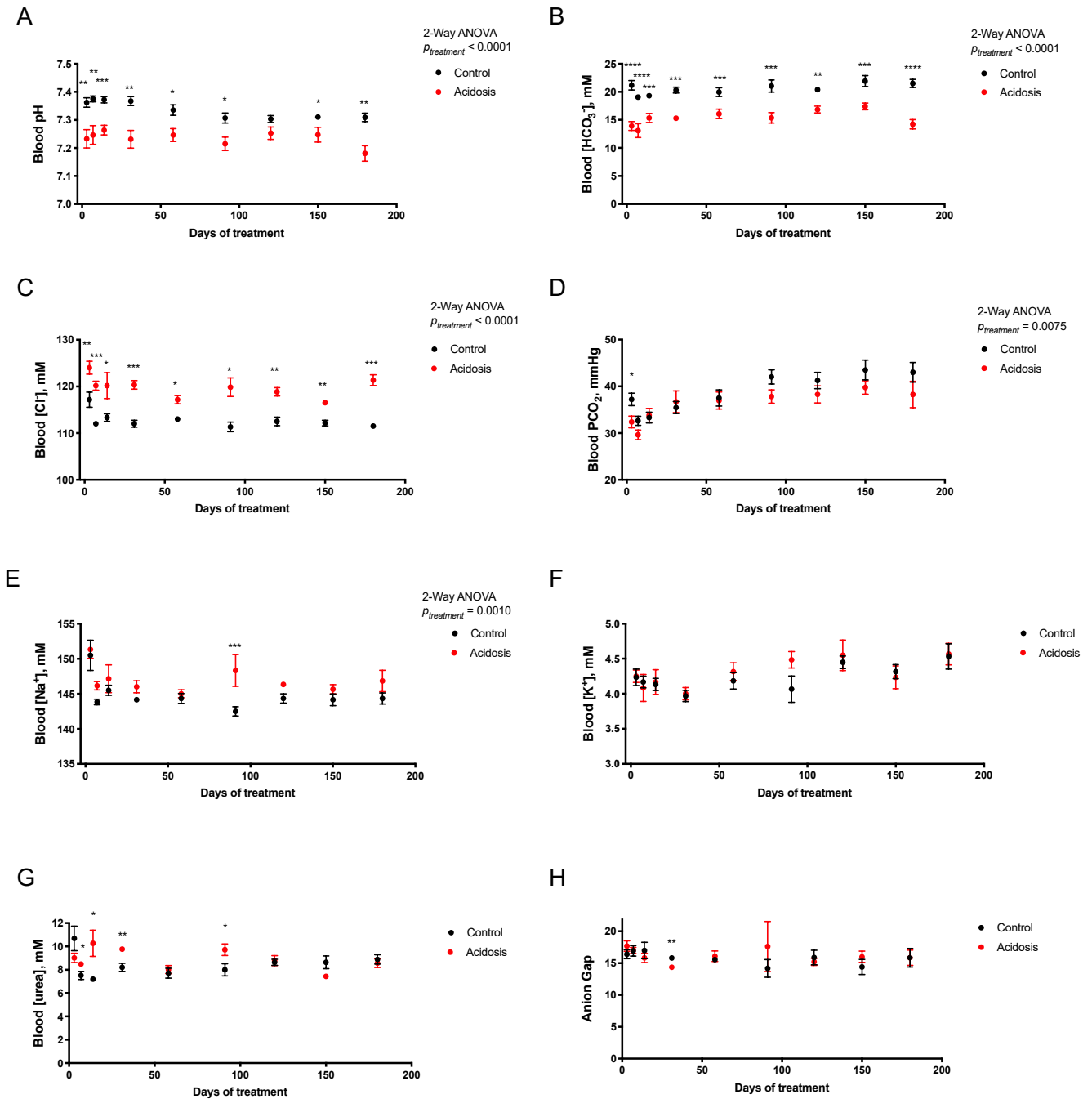
réalisé. Pour les séquençages d'ARN, un ANOVA à 1 facteur a été appliqué suivi d'un test FDR. La significativité statistique a été définie comme  $P < 0.05$ .

# Résultats

## 1. Validation du modèle d'induction de l'acidose métabolique chronique

Pour valider notre modèle de souris, nous avons prélevé du sang chez les souris par ponction rétro-orbitale sous anesthésie (isoflurane 2%) afin de mesurer les gaz du sang. Ces mesures nous permettent de déterminer si les souris qui ont reçu le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sont bien en AM.

Nous avons constaté que les souris traitées développent bien une AM avec un pH et une concentration plasmatique de  $\text{HCO}_3^-$  plus bas que chez les souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figures 14 A et 14 B). Comme attendue, une nette augmentation de la  $[\text{Cl}^-]$  est observée chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 14 C). La teneur en  $\text{pCO}_2$  est légèrement plus basse chez les souris traitées (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0075$  ; Figure 14 D). La concentration de  $\text{Na}^{2+}$  est significativement augmentée sur la cinétique due au traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0010$  ; Figure 14 E). De plus, les concentrations de  $\text{K}^+$ , d'urée et le trou anionique ne diffèrent pas significativement entre les deux groupes (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.389$ ,  $P = 0.106$  et  $P = 0.604$  respectivement, Figures 14 F-H)



**Figure 14. Gaz du sang, électrolytes et urée des souris au cours du traitement**

Le sang des souris a été prélevé par ponction rétro-orbitale sous isoflurane. Les données sont représentées sous la forme de la moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 6$  souris par groupe).

L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples (Fisher's LSD) si approprié. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

## 2. L'acidose métabolique chronique induit une baisse du poids total et augmente la dépense énergétique

Au cours de la cinétique, les souris présentent une masse corporelle qui augmente de semaine en semaine, comme observée dans la figure 15 A. Entre J0 et J60, une croissance assez similaire dans les deux groupes est observée. Mais contrairement aux souris contrôles qui elles, continuent leur prise de masse corporelle jusqu'à la fin des 180 jours, le poids total des souris sous AM chronique reste stable en plateau et donc, une différence significative entre les deux groupes s'installe (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$  ; Figure 15 A). A partir de J141, nous pouvons observer une différence significative entre le poids des souris contrôles et sous AM chronique ( $29.433 \pm 0.533$  g vs  $31.550 \pm 1.008$  g pour les souris contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0497$ ). Ceci est aussi le cas après 148 jours de traitement ( $28.200 \pm 0.626$  g vs  $31.450 \pm 1.169$  g pour le groupe contrôle; Multiple t-test,  $P = 0.0027$ ), 155 jours ( $29.233 \pm 0.472$  g vs  $32.017 \pm 1.235$  g pour le groupe contrôle; Multiple t-test,  $P = 0.0101$ ), 164 jours ( $29.667 \pm 0.445$  g vs  $32.450 \pm 1.380$  g pour le groupe contrôle; Multiple t-test,  $P = 0.0101$ ), 171 jours ( $29.633 \pm 0.462$  g vs  $32.867 \pm 1.337$  g pour le groupe contrôle ; Multiple t-test,  $P = 0.0028$ ), 178 jours ( $30.250 \pm 0.443$  g vs  $32.983 \pm 1.335$  g pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0115$ ) et enfin, 182 jours de traitement ( $30.150 \pm 0.510$  g vs  $33.483 \pm 1.159$  g pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0021$ )

Malgré ceci, les souris en AM chronique ont une consommation hebdomadaire de nourriture supérieure aux souris contrôles (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$  ; Figure 15 B) qui est associée à une consommation d'eau de boisson plus élevée (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$  ; Figure 15 C) comparée aux souris contrôles.

Nous avons ensuite mesuré la masse grasse, la masse maigre et la masse fluidique de nos souris. Nous observons que chez nos souris sous AM chronique, le pourcentage de masse

grasse rapporté au poids total des souris est beaucoup plus important comparé aux souris contrôles (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$  ; Figure 15 D). Ceci est observable dès J3 de la cinétique ( $12.620 \pm 0.227$  % vs  $9.114 \pm 0.341$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00102$ ), mais aussi après 18 jours ( $11.836 \pm 0.644$  % vs  $6.356 \pm 1.383$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0229$ ), 32 jours ( $12.055 \pm 0.542$  % vs  $9.110 \pm 0.573$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0203$ ), 59 jours ( $11.557 \pm 0.247$  % vs  $9.240 \pm 0.124$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00111$ ) 120 jours ( $17.522 \pm 1.220$  % vs  $9.497 \pm 0.239$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00297$ ) 150 jours ( $18.958 \pm 1.585$  % vs  $13.624 \pm 1.068$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0493$ ) et 180 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $17.770 \pm 1.343$  % vs  $9.526 \pm 0.573$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00485$ ).

Au contraire, le pourcentage de masse maigre sur le poids total des souris sous AM chronique est statistiquement inférieur à celui des souris contrôles (ANOVA à 2 voies,  $P = 0.00080$  ; Figure 15 E). Cette nette différence de masse maigre entre les 2 groupes de souris est visible dès 3 jours de traitement ( $70.742 \pm 0.476$  % vs  $73.768 \pm 0.124$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00354$ ), et perdure après 18 jours ( $70.883 \pm 0.408$  % vs  $74.730 \pm 0.830$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0142$ ). Cette différence est particulièrement visible après 59 jours ( $71.448 \pm 0.170$  % vs  $75.447 \pm 0.277$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.000250$ ).

Le pourcentage de masse fluïdique chez les souris en AM chronique est lui aussi, statistiquement inférieur au pourcentage des souris contrôles (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$  ; Figure 15 F). Cette diminution de la masse fluïdique des souris sous AM chronique est visible dès le 3 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $6.334 \pm 0.093$  % vs  $8.699 \pm 0.685$  % pour les souris

contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0267$ ) et continue après 59 jours ( $6.943 \pm 0.091$  % vs  $7.519 \pm 0.159$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0345$ ), 120 jours ( $7.704 \pm 0.246$  % vs  $9.177 \pm 0.392$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0336$ ), 150 jours ( $7.188 \pm 0.070$  % vs  $8.160 \pm 0.185$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00793$ ) et enfin, 180 jours ( $7.803 \pm 0.386$  % vs  $9.913 \pm 0.455$  % pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0241$ ).

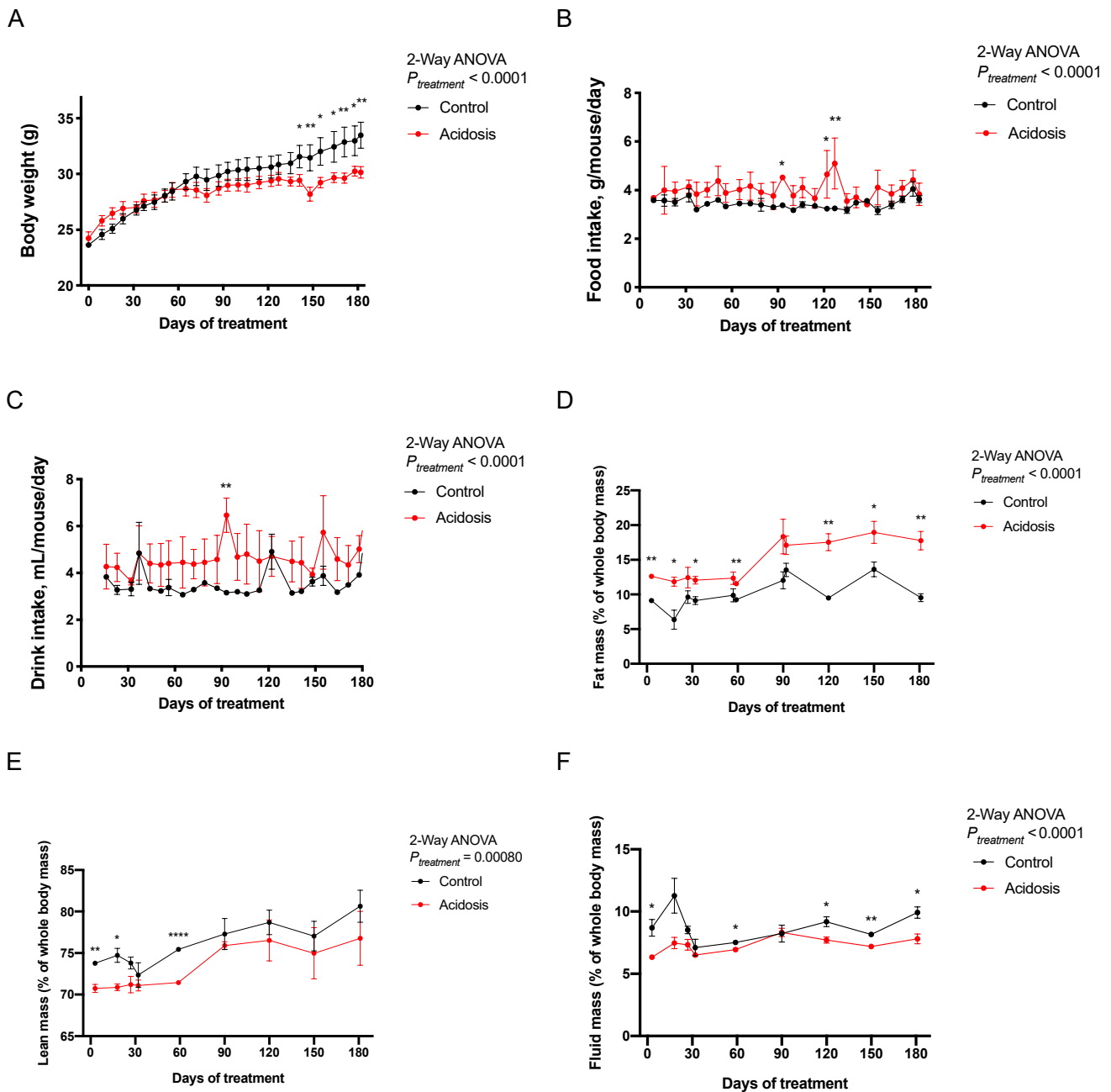


Figure 15. L'acidose métabolique chronique induit une réduction du poids total avec une réduction de la masse maigre et fluïdique

**A.** Poids total des souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) sous régime standard entre J0 et J180 de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $n = 6$  par groupe). **(B,C)** Consommation moyenne de nourriture **B.** et d'eau de boisson **C.** des souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) sous régime standard entre J0 et J180 de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $n = 2$  cages par groupe). **(D-F)** Pourcentage de masse grasse **D.**, maigre **E.** et fluïdique **F.**, relative au poids total des souris contrôles et sous AM chronique entre 0 et 180 jours de traitement. ( $n = 3$  par groupe). Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Avant de commencer les expérimentations sur le phénotype métabolique de nos souris, nous voulions établir si leur métabolisme énergétique était altéré comparé aux souris contrôles. Pour ceci, nous avons donc étudié la dépense énergétique, le ratio d'échange respiratoire à partir de la consommation d'oxygène et de la production de dioxyde de carbone et l'activité ambulatoire à l'aide de cages métaboliques.

Après 7 jours de traitement au NH<sub>4</sub>Cl, les souris sous AM chronique montrent un rapport d'échange respiratoire (RER) supérieur aux souris contrôles (ANOVA à 2-facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 16 A). Durant la phase de jour (entre 7 heures et 19 heures), le RER des souris sous AM chronique contrôles ne présentent pas de différence significative en comparant chaque mesure temps par temps. Mais dès le début de la phase nocturne, nous pouvons observer une augmentation significative du RER des souris sous AM chronique comparée aux souris contrôles (19 heures ;  $0.973 \pm 0.017$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.904 \pm 0.012$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0311$  ; Figure 16 A) ce qui indique une utilisation préférentielle des glucides en substrat de la respiration oxydative comparée aux souris contrôles (90.6% comparé à 66.9% pour les souris contrôles, calculée avec la formule de contribution de lipides (en %) =  $100 \times (1 - \text{RER}) / 0.29$  (Malin *et al.*, 2010)). Mais ceci veut aussi dire que les souris traitées utilisent moins les lipides en tant que substrat (9.4% comparé à 30.1% pour les contrôles). Cet écart est aussi visible à 20 heures ( $0.994 \pm 0.006$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.931 \pm 0.009$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0023$  ; Figure 16 A), mais aussi à 21 heures ( $1.010 \pm 0.001$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.945 \pm 0.007$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0007$  ; Figure 16 A), 22 heures ( $1.014 \pm 0.002$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.950 \pm 0.002$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.000024$  ; Figure 16 A), 23 heures ( $1.018 \pm 0.002$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.941 \pm 0.007$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00052$  ; Figure 16 A), 24 heures ( $1.015 \pm 0.003$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> vs  $0.951 \pm 0.008$  VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub> pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0015$  ; Figure 16 A), 1 heures ( $1.009 \pm$



0.008  $VO_2/VCO_2$  vs  $0.946 \pm 0.020$   $VO_2/VCO_2$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0415$  ; Figure 16 A) et 2 heures ( $1.012 \pm 0.008$   $VO_2/VCO_2$  vs  $0.946 \pm 0.020$   $VO_2/VCO_2$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0406$  ; Figure 16 A). Au contraire, après 120 jours de traitement, les souris sous AM chronique montrent un RER sur la journée significativement plus faible que les souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0116$  ; Figure 16 B) mais nous n'observons pas de différence significative en comparaison temps par temps.

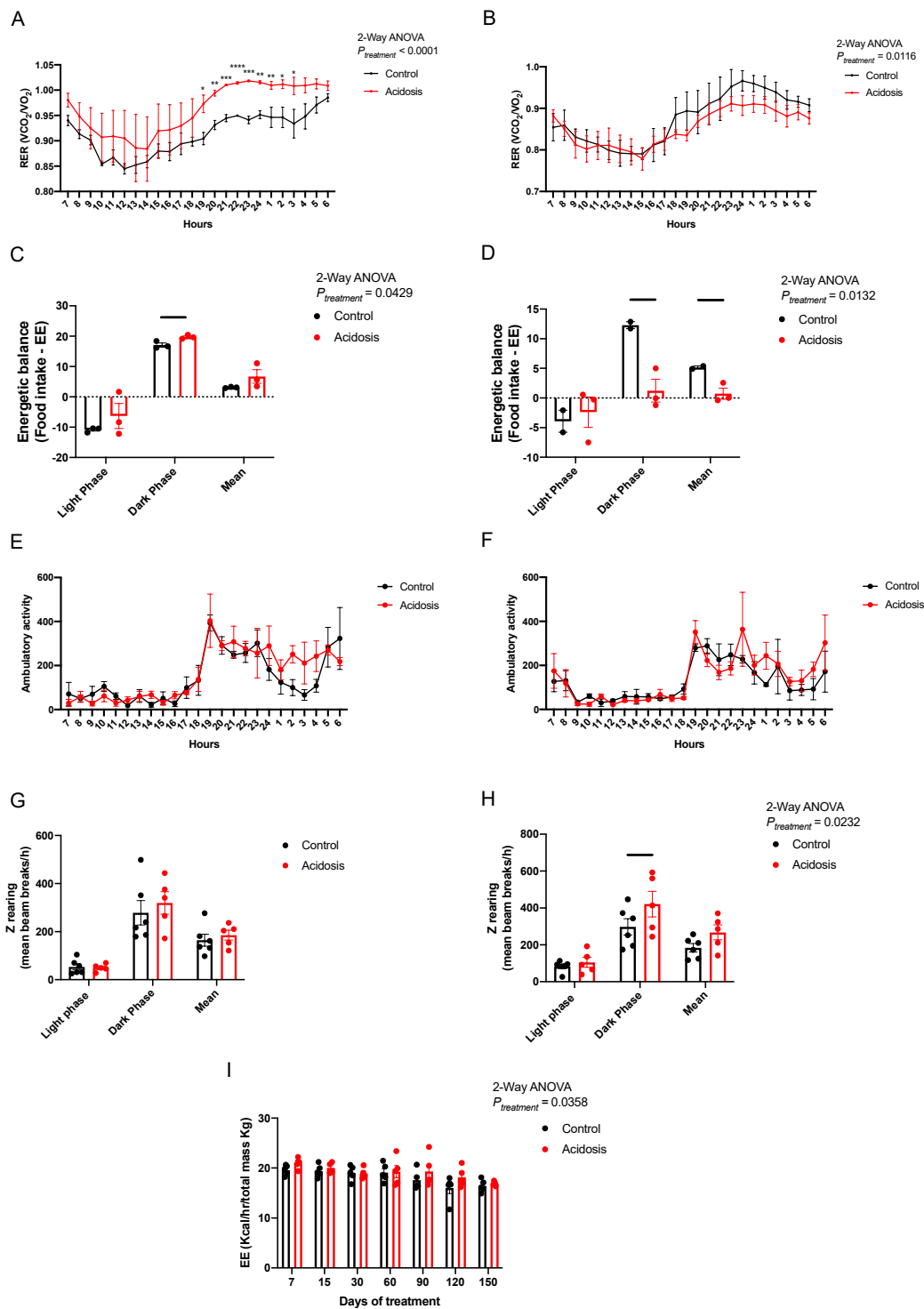
La balance énergétique (consommation de nourriture – dépense énergétique) des souris traitées est altérée par le traitement en  $NH_4Cl$  après 7 jours, (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0429$  ; Figure 16 C). Ceci étant, la balance est équivalente entre les deux groupes dans la phase de jour ( $-6.3 \pm 4.128$  vs  $-10.9 \pm 0.446$  pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.333$  ; Figure 16 C). En contrepartie, durant la phase nocturne, les souris sous AM chronique montrent une balance énergétique positive (due à leur activité nocturne) significativement plus élevée que celle des souris contrôles ( $19.7 \pm 0.370$  vs  $17.1 \pm 0.660$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.025$  ; Figure 16 C) démontrant une dépense énergétique plus faible car on observe sur la Figure 15 B que la consommation de nourriture ne diffère pas après 7 jours entre les deux groupes.

De plus, le redressement des souris (analysé par les lectures du plan Z des cages) ne diffère pas entre les souris contrôles et sous AM chronique durant la phase jour et/ou nuit (Figure 16 G).

Après 120 jours de traitement, les souris contrôles et sous AM chronique ont une balance énergétique équivalente durant la phase jour ( $-2.39 \pm 2.557$  vs  $-3.924 \pm 1.857$  pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.697$  ; Figure 16 D) mais durant la phase nocturne, contrairement au début de la cinétique, les souris traitées ont une balance proche de 0 ( $1.239 \pm 1.914$ ) alors que les souris contrôles ont une balance énergétique positive ( $12.3 \pm 0.576$  ;

Figure 16 D). Ceci pourrait donc partiellement expliquer la différence de poids observée à partir de J141 de la cinétique.

Nous n'observons pas de différence significative sur l'activité ambulatoire des deux groupes de souris, que ce soit sur la moyenne des 24 heures, sur la phase de jour ou la phase nocturne séparément (Figures E,F). Ceci étant, les souris sous AM chronique se redressent significativement plus que les souris contrôles durant la phase nocturne (Figure 16 H), ce qui pourrait donc expliquer cette balance énergétique proche de 0 après 120 jours et donc, cette stabilisation du poids des souris traitées. Le traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  conduit donc à une augmentation significative de la dépense énergétique (moyenne de dépense calorique par heure) sur la durée de la cinétique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0358$  ; Figure 16 I)



**Figure 16. L'acidose métabolique chronique altère le métabolisme énergétique chez les souris**

Les paramètres énergétiques des souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) ont été analysés par cages métaboliques. **(A-B)** Moyenne de RER sur 3 jours après **A.** 7 et **B.** 120 jours de traitement. **(C-D)** La balance énergétique a été calculée par la moyenne de consommation de nourriture sur 3 jours des souris moins la moyenne de la dépense énergétique. Balance énergétique après **C.** 7 et **D.** 120 jours de traitement. **(E-F)** Moyenne de l'activité locomotrice sur 3 jours des souris après **E.** 7 et **F.** 120 jours de traitement. **(G-H)** Moyenne sur 3 jours des redressements des souris après **G.** 7 et **H.** 120 jours de traitement, quantifiés par interruption du faisceau Z. **I.** Dépense énergétique des souris, normalisée par leurs poids totaux. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) : \* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique sauf pour la dépense énergétique, n = 3 par groupe).

### 3. Étude de l'homéostasie du glucose

Pour confirmer les effets de l'AM chronique sur l'homéostasie du glucose, nous avons réalisé une série de tests métaboliques, évaluant la tolérance au glucose, au pyruvate, à la glutamine et à l'alanine à différents temps du traitement (Figure 13).

#### 1.1 La tolérance au glucose est fortement améliorée chez les souris sous acidose métabolique chronique sous régime standard

Une amélioration significative de la tolérance au glucose chez les souris sous AM chronique est observable après 7 jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . La figure 17 A montre une glycémie basale légèrement plus basse chez les souris sous AM chronique ( $81,5 \pm 4,0$  mg/dL vs  $95,3 \pm 3,6$  mg/dL;  $P = 0.028$ ) après 15 heures de jeûne. La glycémie augmente de façon similaire chez les souris sous AM chronique et contrôles en réponse à l'injection de glucose mais redescend, une fois le pic atteint, plus rapidement chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$ ).

Cette amélioration de la tolérance au glucose chez les souris sous AM chronique est confirmée par l'aire sous la courbe (AUC) de glucose qui est significativement plus basse chez les souris sous AM chronique (Figure 17 B).

Malgré cette amélioration de la tolérance au glucose, la concentration plasmatique d'insuline est identique chez les souris contrôles et sous AM chronique avant l'injection de glucose et augmente de façon similaire dans les deux groupes entre 0 et 30 min après l'injection de glucose (Figure 17 C).

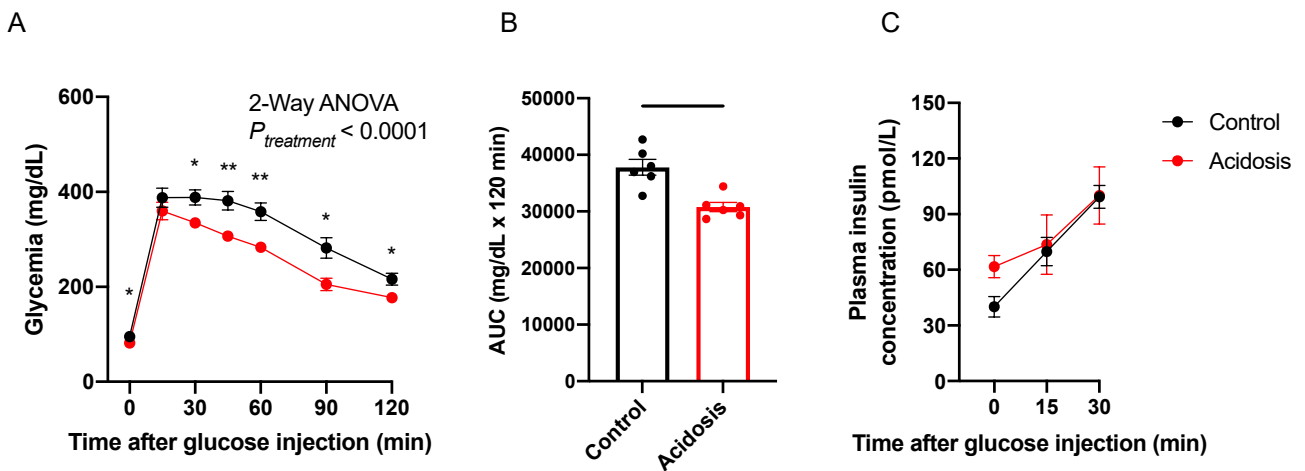


Figure 17. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement

**A.** Glycémies des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) : \* $P < 0.05$  ; \*\* $P < 0.01$  vs contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimée en mg/dLx120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié, \*\* $P < 0.01$ . **C.** Concentration d'insuline plasmatique avant et 15 et 30 minutes après injection de glucose. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs. NS vs contrôles.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 6$  souris par groupe).

Les souris sous AM chronique présentent le même phénotype après 120 jours de traitement car l'amélioration de la tolérance au glucose est toujours présente (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0005$  ; Figure 18 A). Les glycémies moyennes à jeun ne sont pas différentes significativement ( $88 \pm 2.025$  mg/dL vs  $82.17 \pm 2.626$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.123$  ; Figure 18 A). Après 15 minutes, les souris contrôles et traitées ont une réponse glycémique similaire ( $347 \pm 41.942$  mg/dL vs  $367 \pm 21.321$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.664$  ; Figure 18 A) et ceci est aussi le cas après 30 minutes ( $424.2 \pm 29.916$  mg/dL vs  $445 \pm 18.877$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.557$  ; Figure 18 A). Les souris sous AM chronique montrent une utilisation du

glucose injecté plus rapide que les souris contrôles après 45 minutes post-injection ( $373.8 \pm 19.096$  mg/dL vs  $442.3 \pm 21.487$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0444$ ; Figure 18 A). Cet écart significatif est maintenu après 60 minutes ( $341 \pm 22.763$  mg/dL vs  $413.3 \pm 21.347$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0471$ ; Figure 18 A). Cette différence significative entre les deux groupes n'est plus visible après 90 minutes ( $290.2 \pm 21.962$  mg/dL vs  $368.3 \pm 34.494$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.102$  ; Figure 18 A) et après 120 minutes ( $243.2 \pm 18.164$  mg/dL vs  $319.2 \pm 28.253$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0597$ ; Figure 18 A) post injection.

Cette amélioration de la tolérance au glucose n'est pas visible après détermination des AUCs car, malgré la tendance à la baisse chez les souris traitées, cette dernière n'est pas significative ( $37871 \pm 2090$  mg/dL x 120 min vs  $44569 \pm 2440$  mg/dL x 120 min ; Unpaired t-test,  $P = 0.0723$  ; Figure 18 B).

L'amélioration de la tolérance au glucose n'est pas due à une augmentation de la sécrétion d'insuline car nous n'observons pas de différence significative entre les deux groupes lors de la quantification de sa concentration plasmatique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.606$  ; Figure 18 C).

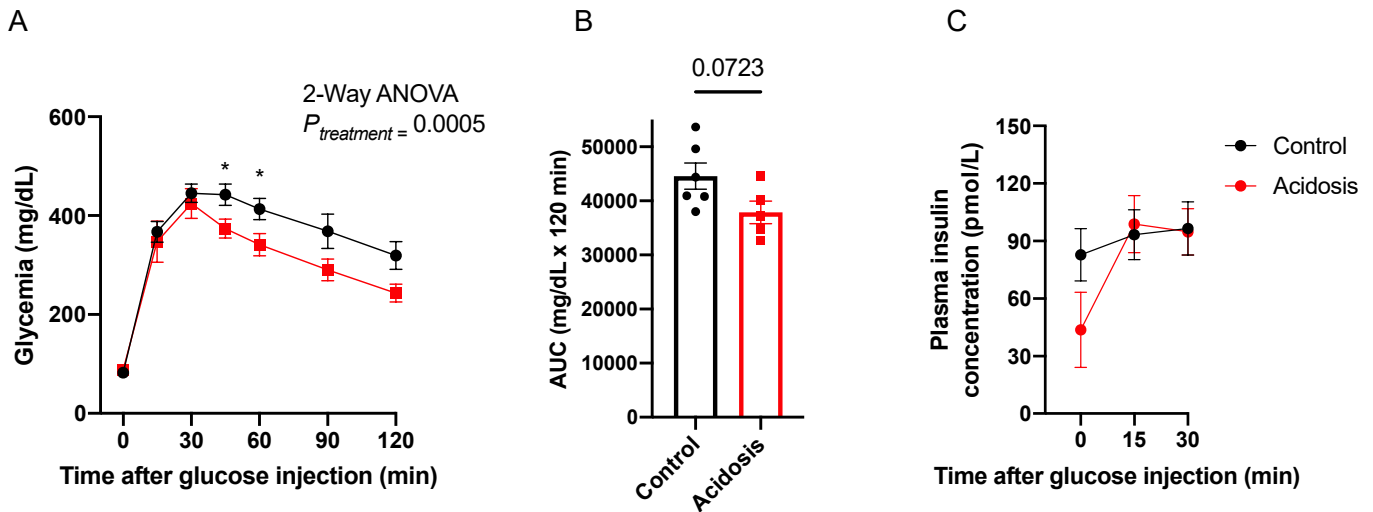


Figure 18. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et acidose (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dLx120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié. **C.** Concentration d'insuline plasmatique avant et 15, 30 et 60 min après injection de glucose. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs : NS vs les souris contrôles.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 souris contrôles et 5 souris sous AM chronique).

Ce phénotype perdure sur la longueur de la cinétique. Seules les données de J7 et J120 sont présentées mais celles-ci sont représentatives de la cinétique sur sa totalité.

Les figures 19 A et B montrent les glycémies et les concentrations d'insuline basales après 15 heures de jeûne à différents temps du traitement, mesurées lors des tests de tolérance au glucose et au pyruvate. Les glycémies basales sont significativement plus basses chez les souris sous AM chronique comparé aux contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 19 A) mais les concentrations d'insuline basales ne diffèrent pas (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.224$  ; Figure 19 B). A 7 et 150 jours de traitement, les glycémies basales sont plus basses

chez les souris sous AM chronique ( $97 \pm 3.165$  mg/dl vs  $85.25 \pm 2.697$  mg/dl et  $102.9 \pm 3.156$  mg/dl vs  $88.9 \pm 3.137$  mg/dl respectivement ; Multiple t-test, J7,  $P = 0.018$  et J150,  $P = 0.005$ ; Figure 19 A).

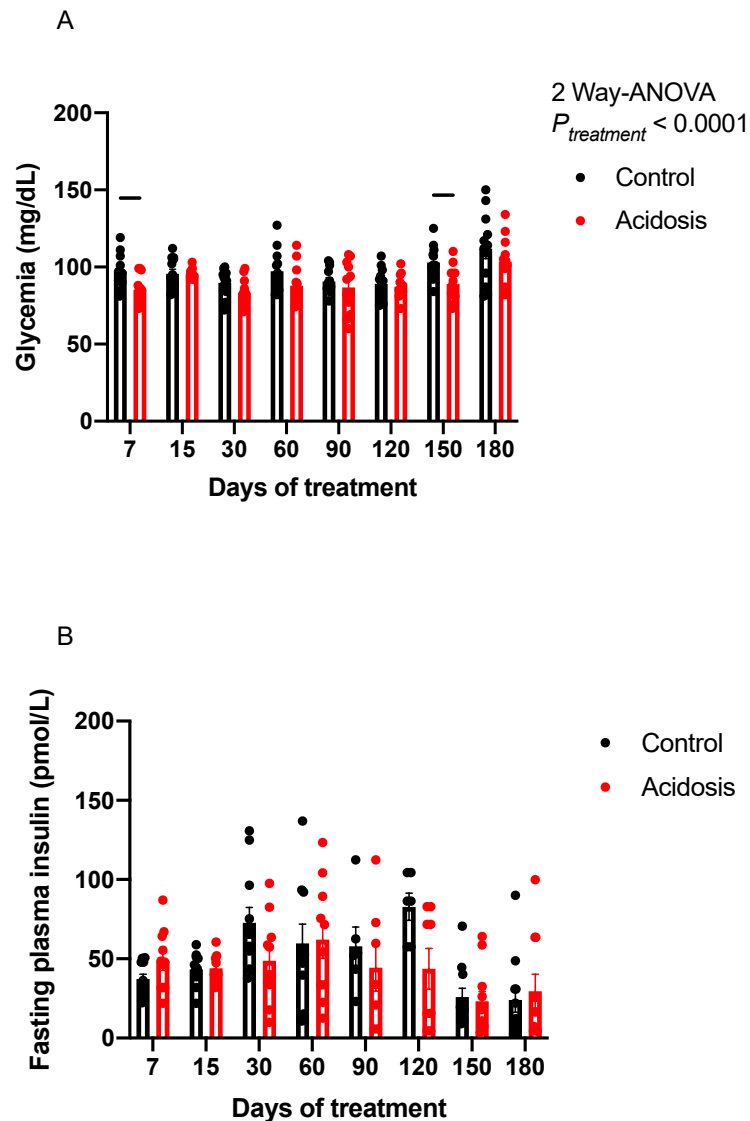


Figure 19. Glycémie basale et concentration d'insuline plasmatique (après 15 heures de jeûne) des souris sur 6 mois de traitement

**A.** Glycémies des souris contrôles (rond noir) et acidose (rond rouge) des séries 2 et 4 à différents jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivis d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) :  $*P < 0.05$  ;  $**P < 0.01$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 12$  par groupe) **B.** Concentration plasmatique d'insuline des souris contrôles (rond noir) et acidose (rond rouge) des séries 2 et 4 à différents jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 12$  par groupe)



Les résultats de notre étude sont en désaccord avec les données de la littérature qui montrent une diminution de la tolérance au glucose en réponse à l'administration aiguë de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (maximum 72h) qui entraîne une acidose plus sévère. Notre étude s'intéresse aux effets à long terme de l'AM (7 à 180 jours) sur l'homéostasie du glucose. Il devenait donc important que nous explorions les effets aigus de l'acidose sur la tolérance au glucose de nos souris C57Bl6/JRj.

Une AM a été induite par gavage avec une solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les paramètres sanguins sont présentés dans la figure 20. L'AM est très sévère avec un pH sanguin de  $7.038 \pm 0.018$  (comparé à  $7.25 \pm 0.01$  pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P < 0.0001$  ; Figure 20 A), une concentration de bicarbonate de  $10.06 \pm 0.24$  mM (comparé à  $19.83 \pm 0.4$  mM pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P < 0.0001$  ; Figure 20 C) et une concentration plasmatique de chlore de  $126.1 \pm 0.39$  mM (comparé à  $112.4 \pm 0.59$  mM pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P < 0.0001$  ; Figure 20 F). La teneur en  $\text{PCO}_2$  des souris sous AM chronique est aussi plus faible que celle des souris contrôles ( $37.53 \pm 1.36$  mmHg vs  $45.13 \pm 1.11$  mmHg pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0007$  ; Figure 20 B). La concentration plasmatique des souris sous AM de sodium (Figure 20 D), potassium (Figure 20 E), d'urée (Figure 20 G), le pourcentage d'hématocrite (Figure 20 H), la glycémie (Figure 20 I) et le poids total des souris ne diffèrent pas comparés aux souris contrôles.

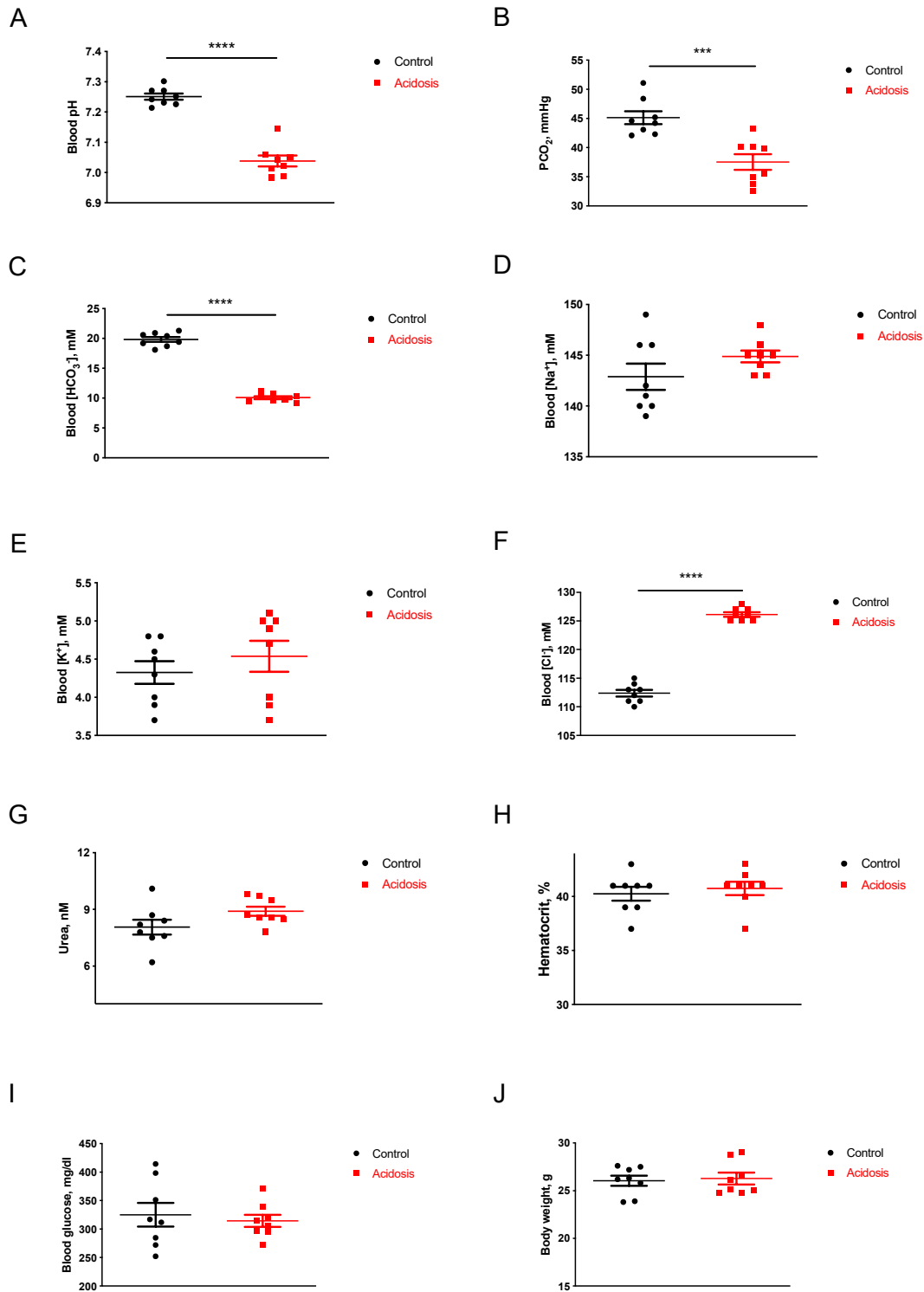


Figure 20. Gaz du sang, électrolytes et urée des souris 6 heures après un gavage de NH<sub>4</sub>Cl de 1.5 mM

Mesures sanguines chez les souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) de **A.** pH, **B.** PCO<sub>2</sub>, **C.** concentration de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, **D.** de Na<sup>2+</sup>, **E.** de K<sup>+</sup>, **F.** de Cl<sup>-</sup>, **G.** d'urée, **H.** Pourcentage d'hématocrite, **I.** Concentration de glucose et **J.** Poids total des souris. Le sang des souris a été prélevé par ponction rétro-orbitale après anesthésie sous isoflurane. Les données sont représentées sous la forme de : moyenne ± SEM (n = 8 souris par groupe).

L'analyse statistique des données a été réalisée par un t-test non-apparié., \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

Nous avons testé la tolérance au glucose des souris 6 heures après le gavage de la solution de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les souris sous acidose aiguë présentent une diminution de la tolérance au glucose (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 21 A). Les glycémies moyennes des souris contrôles et sous acidose sont pratiquement identiques ( $161.3 \pm 6.931$  mg/dL vs  $160.7 \pm 5.706$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.95$ , Figure 21 A). Les souris sous AM chronique montrent une glycémie moyenne significativement plus élevée après 45 minutes ( $406.33 \pm 47.192$  mg/dL vs  $290.6 \pm 15.068$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0296$ , Figure 21 A) et après 60 minutes post-injection de glucose ( $386.8 \pm 47.265$  mg/dL vs  $278.4 \pm 12.063$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0359$ , Figure 21 A).

Les AUCs ne reflètent pas cette intolérance au glucose car malgré une moyenne plus élevée chez les souris sous AM chronique, la différence entre les deux groupes n'est pas significative ( $1135 \pm 252.2$  mg/dL x 120 min vs  $692.9 \pm 56.73$  md/dL x 120 min pour les souris contrôles ; Welch's t-test,  $P = 0.143$  ; Figure 21 B). Ce test a été réalisé 2 fois et les 2 résultats ont été similaires sur chaque manipulation.

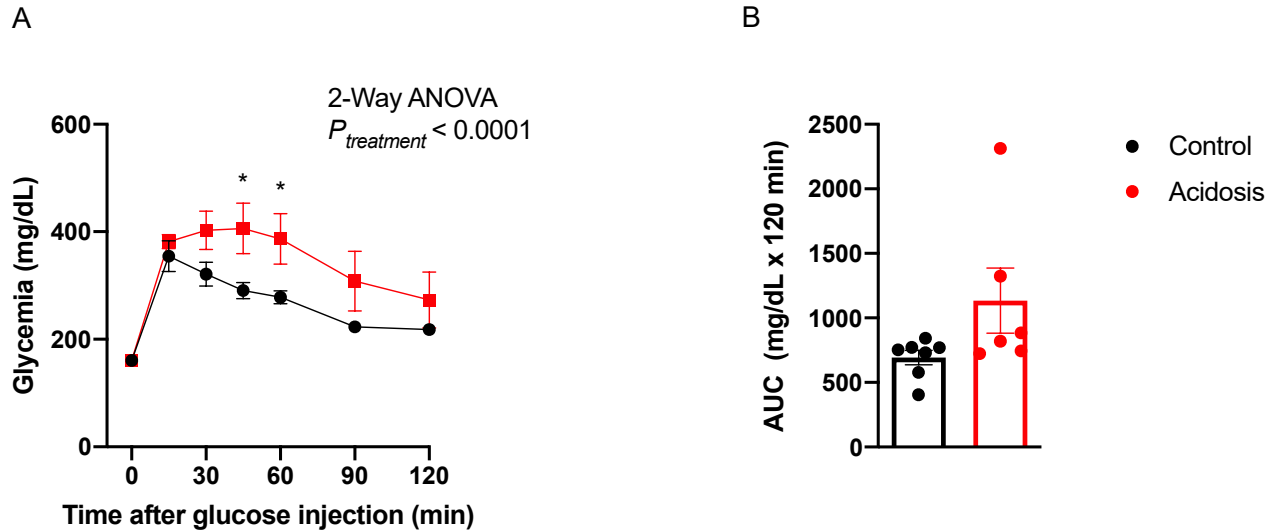


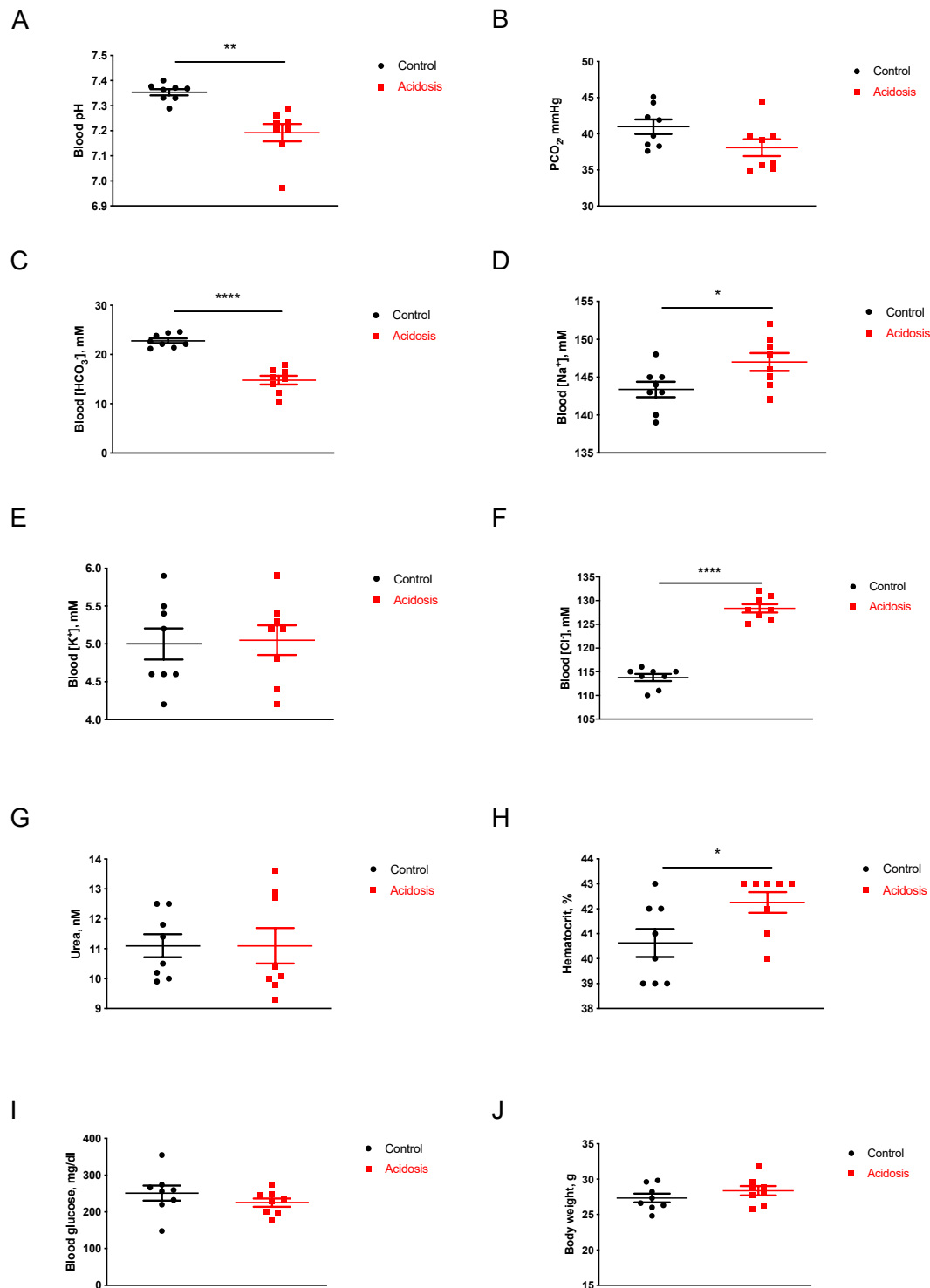
Figure 21. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique 6 heures après gavage oral de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de 1.5 mM

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dLx120min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test non apparié et une correction Welch a été appliquée. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 7 pour les contrôles et 6 pour les sous AM chronique).

Après un gavage de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et un jeun de 15 heures, nous observons une acidose plus modérée qu'après 6 heures post gavage, mais les souris traitées présentent bien une acidose car le pH est bien plus bas que les souris contrôles ( $7.19 \pm 0.0346$  vs  $7.35 \pm 0.0123$  pour les souris contrôles, Welch's t-test,  $P = 0.0019$  ; Figure 22 A) et la concentration de bicarbonate plasmatique est aussi significativement bien plus faible ( $14.78 \pm 0.89$  mM vs  $22.78 \pm 0.47$  mM pour les souris contrôles, Unpaired t-test,  $P < 0.0001$  ; Figure 22 C). La teneur en  $\text{PCO}_2$  et la concentration de potassium ne diffèrent pas entre les deux groupes (Unpaired t-test,  $P = 0.083$  et  $P = 0.863$  respectivement ; Figures 22 B et 22 E) mais la concentration plasmatique de sodium est significativement plus élevée chez les souris traitées ( $147 \pm 1.180$  mM vs  $143.4$

$\pm 1.017$  mM, Unpaired t-test,  $P = 0.0355$  ; Figure 22 D) et est légèrement supérieure à concentration physiologique (entre 135 et 145 mM). La concentration plasmatique de chlore est bien plus élevée que la concentration physiologiquement 'normale' ( $128.4 \pm 0.865$  mM vs  $113.8 \pm 0.75$  mM pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P < 0.0001$  ; Figure 22 F). Le pourcentage d'hématocrite est lui aussi, plus élevé chez les souris traité ( $42.25 \pm 0.412$  % vs  $40.63 \pm 0.565$  % pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0357$ , Figure 22 H).

L'urée, la glycémie et le poids des souris ne diffèrent pas entre les deux groupes (Figures 22 G, I et J)

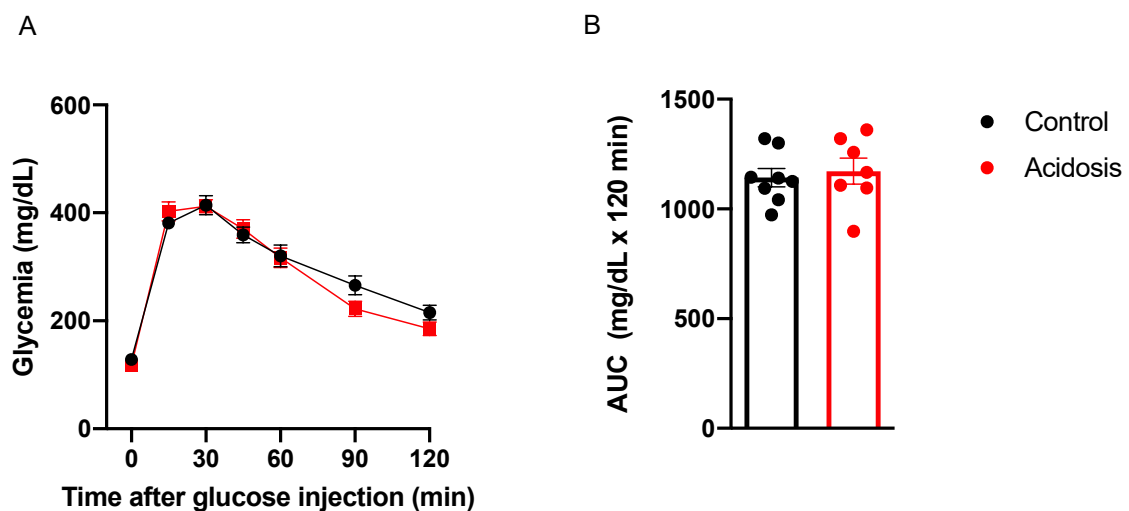


**Figure 22.** Gaz du sang, électrolytes et urée des souris 15 heures après un gavage au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de 1.5 mM

Mesures sanguines chez les souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) de **A.** pH, **B.**  $\text{PCO}_2$ , **C.** concentration de  $\text{HCO}_3^-$ , **D.** de  $\text{Na}^{2+}$ , **E.** de  $\text{K}^+$ , **F.** de  $\text{Cl}^-$ , **G.** d'urée, **H.** Pourcentage d'hématocrite, **I.** Concentration de glucose et **J.** Poids total des souris. Le sang des souris a été prélevé par ponction rétro-orbitale après anesthésie sous isofluorane. Les données sont représentées sous la forme de : moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 souris par groupe).

L'analyse statistique des données a été réalisée par t-test non-apparié. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

Nous avons donc réalisé un test de tolérance au glucose sur les souris après 15h de gavage et avons observé que le phénotype des souris sous AM chronique est similaire que celui des souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.298$  ; Figure 23 A). Les glycémies moyennes à jeun sont pratiquement identiques ( $117.14 \pm 3.370$  mg/dL vs  $128.25 \pm 8.687$  mg/dL pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.279$  ; Figure 23 A) et la réponse des deux groupes de souris face au bolus intrapéritonéale de glucose était similaire car les courbes se juxtaposent. Les AUCs des souris contrôles et sous AM chronique reflètent ce phénotype car la moyenne de ces dernières est très similaire ( $1172 \pm 59.66$  mg/dL x 120 min vs  $1143 \pm 41.96$  mg/dL x 120 min pour les souris contrôles ; unpaired t-test,  $P = 0.685$  ; Figure 23 B).



**Figure 23.** Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique 15 heures après gavage oral de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  de 1.5 mM

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD): *ns* vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dLx120min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test non apparié et une correction Welch a été appliquée. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 8$  pour les contrôles et 7 pour les sous AM chronique).

### 3.1. Conclusion

L'AM chez les souris sous régime standard améliore la tolérance au glucose dès 7 jours et jusqu'à 180 jours de traitement, sans modification de la sécrétion d'insuline (non testée pour l'AM aiguë). Après le bolus de glucose injecté aux souris, nous observons, une fois le pic de glycémie atteint, une baisse de la glycémie plus rapide chez les souris sous AM chronique, malgré une sécrétion d'insuline inchangée chez les souris sous CD.

Il est important de noter que l'insuline plasmatique est peu stable (demi-vie de quelques minutes) et peut possiblement se dégrader assez rapidement, malgré des conditions de prélèvement et de stockage optimales du plasma.

Nous avons ensuite décidé d'évaluer la sensibilité à l'insuline chez les souris acidotiques sous régime standard, car une nette amélioration de la tolérance au glucose est observable sans changement sur la sécrétion d'insuline. La glycémie basale à jeun était légèrement plus basse chez les souris sous AM chronique alors que la concentration plasmatique d'insuline n'était pas significativement altérée.



#### 4. Sensibilité à l'insuline des souris en acidose métabolique

Afin d'évaluer la sensibilité à l'insuline des souris sous AM chronique, nous avons effectué une série de tests de tolérance à l'insuline entre 7 et 180 jours de traitement, comme indiqué sur la figure 13. La réponse glycémique à l'injection d'insuline n'est pas significativement différente chez les souris contrôles et sous AM chronique, suggérant que les souris sous AM chronique ne sont pas plus sensibles à l'insuline que les souris contrôles quelle que soit la durée du traitement (Figures 24 A et D).

Les AUCs confirment bien que le traitement n'altère pas la sensibilité à l'insuline car aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes au fur et à mesure de la cinétique (Figures 24 B et E). De plus, la concentration plasmatique d'insuline à jeun ne diffère pas entre les deux groupes sur la longueur de la cinétique (Figure 24 C et F), malgré un effet du traitement à la baisse sur la glycémie à jeun des souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0390$  ; Figure 25 A).

Les concentrations plasmatiques basales d'insuline des souris sous AM chronique de cette même série ne varient pas comparées à celles des souris contrôles, mais nous observons tout de même un effet en fonction du temps en ANOVA à 2 facteurs ( $P = 0.0097$ ), ce qui peut être due au vieillissement des souris (Figure 25 B).

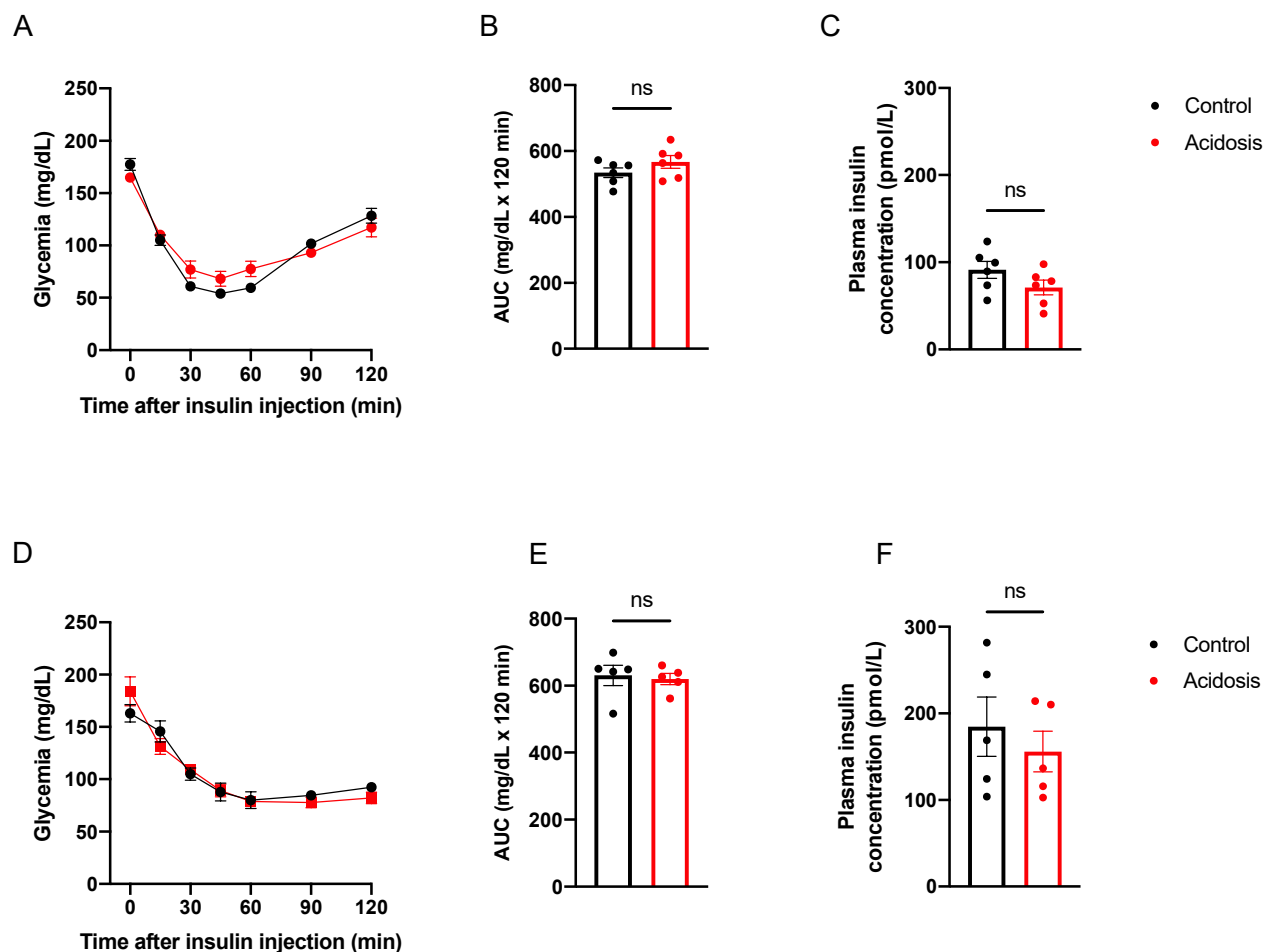


Figure 24. Évaluation de la tolérance à l'insuline des souris sous acidose métabolique chronique

(A, D) Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) après A. 7 jours et D. 120 jours de traitement à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'insuline de 0,75g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD). (B, E) L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0 des tests de tolérances après B. 7 jours et E. 120 jours de traitement, exprimée en mg/dL x 120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié, *ns* vs les contrôles. (C, F) Concentration d'insuline plasmatique basale avant l'injection d'insuline après C. 7 jours et F. 120 jours de traitement. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (J7,  $n = 6$  par groupe ; J120,  $n = 5$  par groupe).

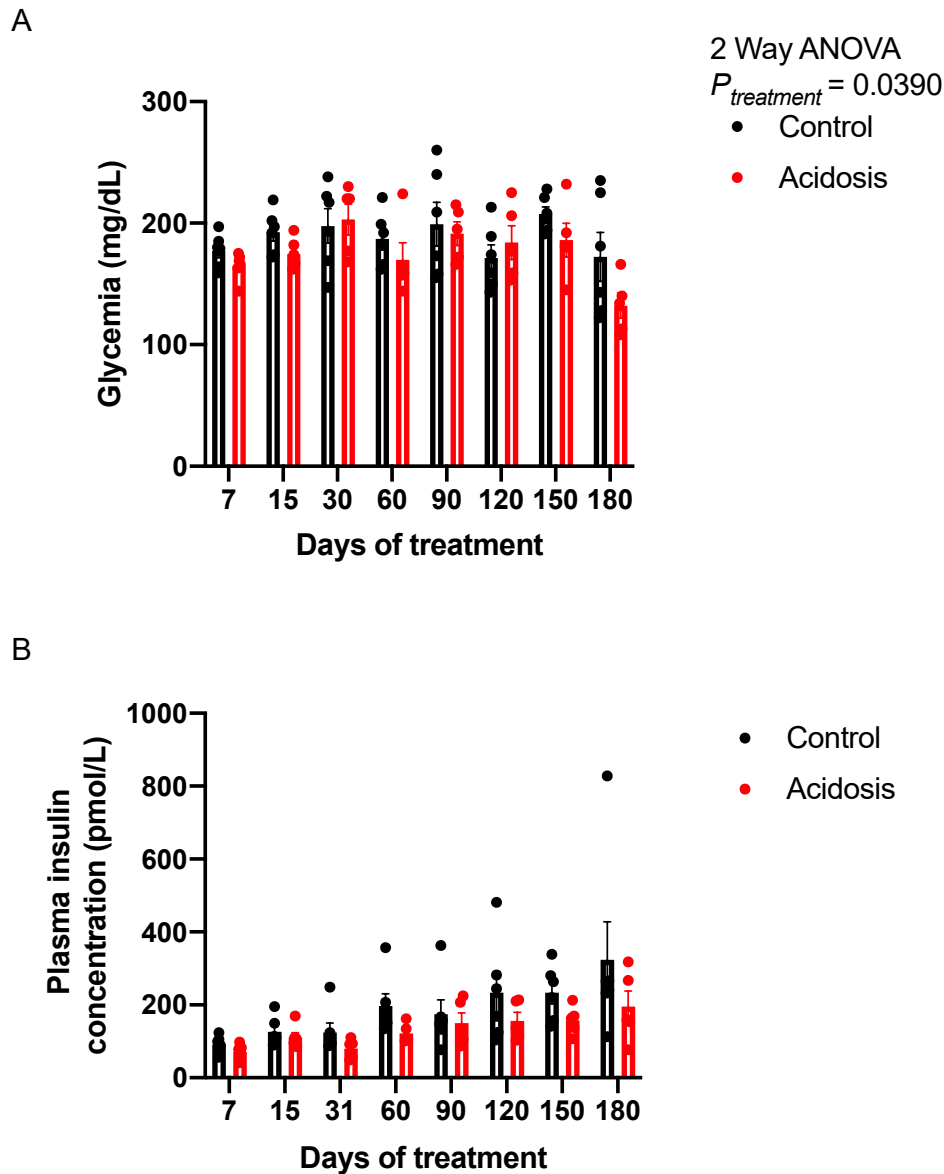


Figure 25. Glycémie et concentration d'insuline plasmatique (après 5 heures de jeûne) des souris sur 6 mois de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et acidose (rond rouge) de la série 3 à différents jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) : NS vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique) **B.** Concentration plasmatique d'insuline des souris contrôles (rond noir) et acidose (rond rouge) de la série 3 à différents jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) : NS vs les souris contrôles.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique).

#### 4.1.Conclusion

La sensibilité à l'insuline n'est pas affectée par l'AM chez les souris sous régime standard. L'augmentation de la tolérance au glucose observée au cours de l'AM chez les souris sous régime standard ne peut s'expliquer ni par une augmentation de la sécrétion d'insuline ni par une augmentation de la sensibilité à l'insuline.

## 5. Étude de la néoglucogenèse au cours de l'acidose métabolique

### 5.1. Estimation de la production endogène de glucose globale

Afin de déterminer si l'amélioration de la tolérance au glucose est due à une dérégulation de la néoglucogenèse, une série de tests de tolérance au pyruvate a été réalisée sur les souris sous AM chronique et contrôles.

La réponse glycémique à l'injection de pyruvate des souris sous charge acide pendant 7 jours est la même que celle des souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.780$  ; Figure 26 A). La production endogène de glucose induite par l'injection de pyruvate représentée jusqu'au pic de glycémie (entre T0 et T30) est identique et l'utilisation de glucose produit est également la même dans les deux groupes. Ceci était aussi représenté par l'AUC car nous n'observons pas de différence entre les souris contrôles et sous AM chronique ( $16233 \pm 906.2$  mg/dL x 120 min vs  $17004 \pm 1363$  mg/dL x 120 min pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.647$  ; Figure 26 B).

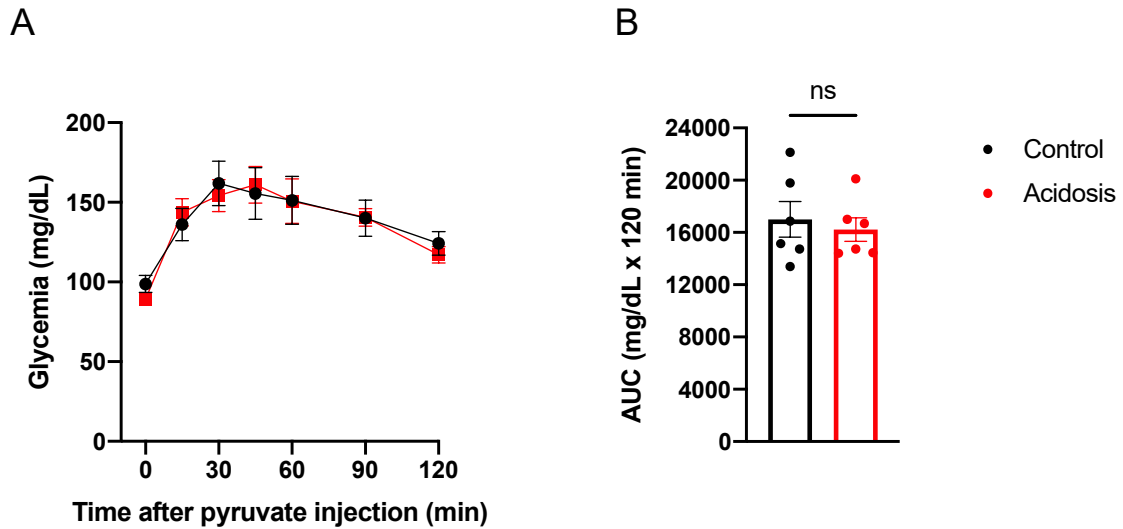


Figure 26. Évaluation de la tolérance au pyruvate des souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement

**A.** Glycémies des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de pyruvate de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD): NS vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié. ns vs les contrôles.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 6$  par groupe).

La PEG estimée par injection de pyruvate est diminuée après 120 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (NOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0251$  ; Figure 27 A). La glycémie moyenne à jeun des deux groupes est similaire ( $83.3 \pm 3.242$  mg/dL vs  $88.3 \pm 4.349$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.378$  ; Figure 27 A). Quinze minutes après injection de pyruvate, l'augmentation de la concentration plasmatique de glucose chez les souris sous AM chronique et contrôles est semblable ( $150.2 \pm 8.031$  mg/dL vs  $163.7 \pm 7.424$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.245$  ; Figure 27 A). Entre 30 et 60 minutes, la glycémie moyenne des souris traitées stagne, alors que les souris contrôles atteignent leur pic de glycémie après 30 minutes, sans différence significative entre les deux groupes (T30 ;  $170.7 \pm 9.482$  mg/dL vs

192 ± 6.547 mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0938$  ; Figure 27 A).

L'utilisation du glucose produit est ensuite similaire chez les deux groupes.

Cette altération de la PEG causée par l'acidose n'est pas reflétée par l'AUC car nous n'observons pas de différence significative entre les groupes, malgré une légère tendance à la baisse des souris traitées (18374 ± 804.5 mg/dL x 120 min vs 19575 ± 673.7 mg/dL x 120 min ; Unpaired t-test,  $P = 0.279$  ; Figure 27 B)

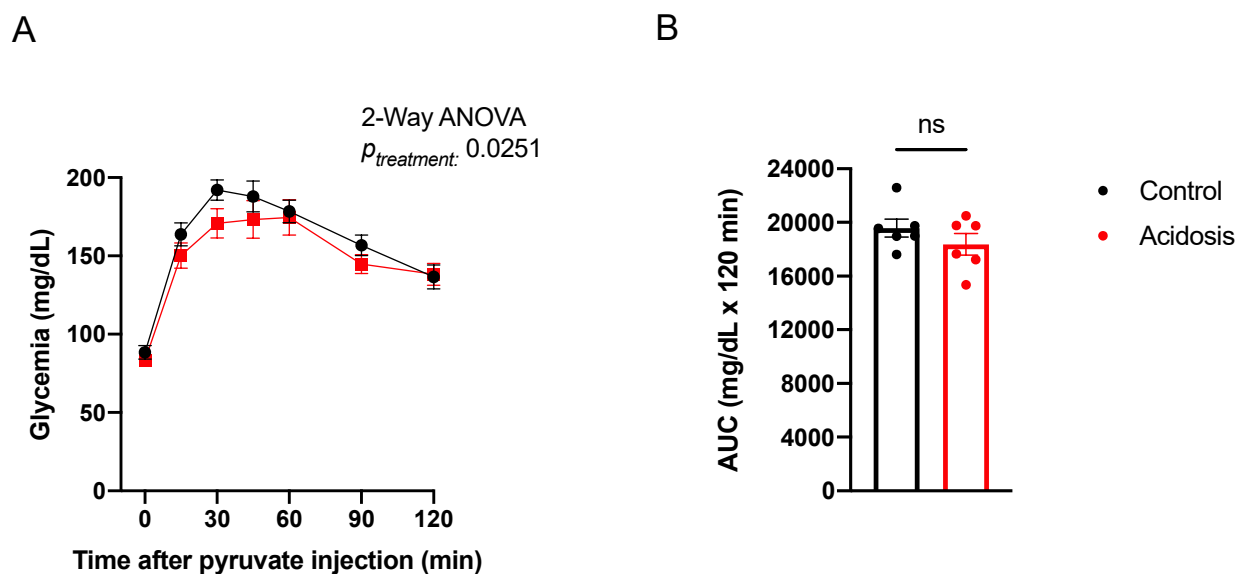


Figure 27. Évaluation de la tolérance au pyruvate des souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de pyruvate de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD): *ns* vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié. *ns* vs les contrôles.

Les données sont représentées sous la forme : moyenne ± SEM ( $n = 6$  par groupe).

## 5.2. Estimation de la production endogène de glucose hépatique

Les effets variables de l'AM sur la néoglucogénèse nous ont orientés à réaliser des tests de tolérance à l'alanine (préférentiellement utilisée par le foie) et à la glutamine (un substrat préférentiellement utilisé par les reins et l'intestin) pour évaluer la néoglucogénèse hépatique ou extra-hépatique (rénale/intestinale) chez les souris sous AM chronique. Les tests ont été réalisés après 7, 30, 60, 90, et 135 jours de traitement.

La néoglucogénèse hépatique chez les souris est nettement diminuée par l'AM à 7 jours. En effet, nous avons observé une réponse glycémique à l'injection d'alanine plus faible chez les souris sous AM chronique que chez les souris contrôles après 7 jours de traitement avec des glycémies basales identiques ( $97.5 \pm 4.15 \text{ mg/dL}$  vs  $98.87 \pm 5.83 \text{ mg/dL}$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.85$  ; Figure 28 A). Une légère augmentation de la glycémie est observable dès 15 minutes post-injection d'alanine et cet écart s'accroît après 30 minutes mais sans différence significative en comparant temps par temps. Par contre, les souris sous AM chronique ont une glycémie moyenne significativement plus faible après 45 minutes ( $156.5 \pm 5.898 \text{ mg/dL}$  vs  $184.875 \pm 9.927 \text{ mg/dL}$  pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0277$  ; Figure 28 A). Le pic de glycémie des deux groupes est atteint 60 minutes après injection et l'écart est maintenu, mais il n'est pas statistiquement significatif. Les souris traitées ont toujours une glycémie moyenne plus faible lors de l'utilisation du glucose après 90 ( $136.5 \pm 4.736 \text{ mg/dL}$  vs  $160 \pm 8.177 \text{ mg/dL}$  pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0261$  ; Figure 28 A) et 120 minutes ( $120.6 \pm 3.173 \text{ mg/dL}$  vs  $135.7 \pm 3.886 \text{ mg/dL}$  pour les souris contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00927$  ; Figure 28 A). Cette réduction de la néoglucogénèse hépatique chez les souris en AM chronique est illustrée sur la Figure 28 B,



car l'AUC est significativement plus faible que celle des souris contrôles ( $16563 \pm 399$  mg/dL x 120 min vs  $19033 \pm 751.3$  mg/dL x 120 min ; Unpaired t-test,  $P = 0.0116$ ).

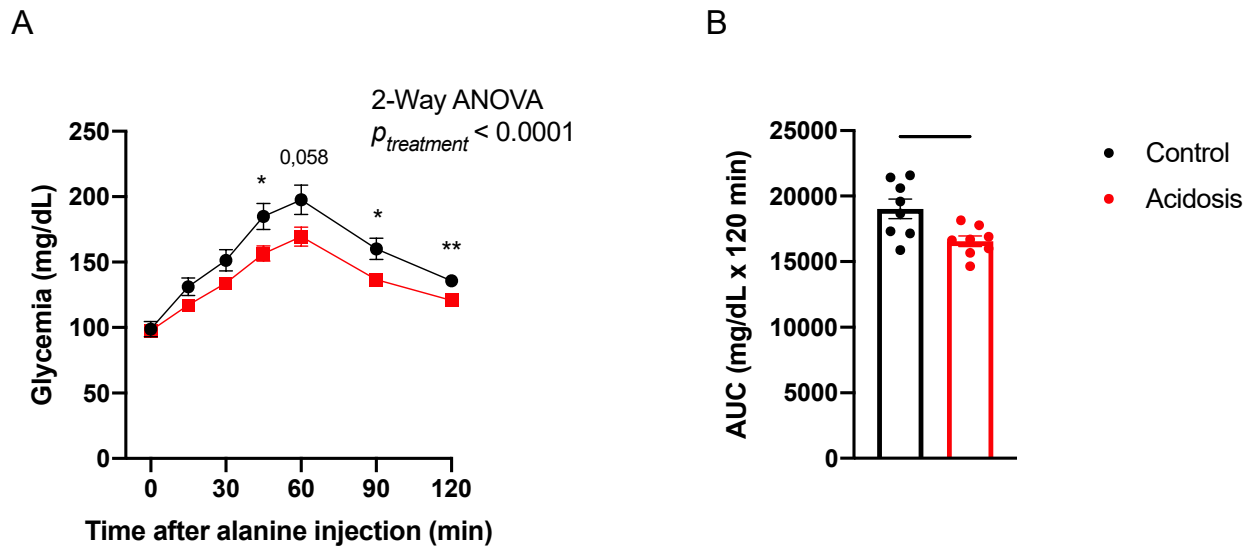


Figure 28. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'alanine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié:  $*P < 0.05$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 8$  par groupe).

Cette réduction est d'autant plus flagrante après 120 jours de traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0004$  ; Figure 29 A). Les souris sous AM chronique présentent une glycémie à jeun significativement inférieure à celle des contrôles ( $84 \pm 1.673$  mg/dL vs  $110.667 \pm 6.825$  mg/dL ; Multiple t-test,  $P = 0.00710$  ; Figure 29 A). Alors que les souris sous AM chronique atteignent leur pic de glycémie après 45 minutes ( $191.8 \pm 12.994$  mg/dL), les souris contrôles atteignent une glycémie maximale après 60 minutes ( $224.7 \pm 16.159$  mg/dL). Une diminution

de la glycémie moyenne est observable chez les souris en AM chronique après 90 minutes alors que celle des contrôles stagne ( $169.2 \pm 8.800$  mg/dL vs  $217.7 \pm 17.078$  mg/dL pour les contrôles, Multiple t-test,  $P = 0.0422$  ; Figure 29 A). A 120 minutes post-injection, les souris sous AM chronique ont une glycémie significativement plus faible que celle des souris non-traitées ( $149.2 \pm 12.085$  mg/dL vs  $188.5 \pm 11.454$  mg/dL pour les contrôles, Multiple t-test,  $P = 0.0432$  ; Figure 29 A).

L'AUC des souris en AM chronique n'est pas inférieure à celle des souris contrôles ( $19326 \pm 1066$  mg/dL x 120 min vs  $22828 \pm 1645$  mg/dL x 120 min, Unpaired t-test,  $P = 0.123$ ; Figure 29 B), due à la différence significative de la glycémie basale des deux groupes (qui est soustraite lors du calcul des AUCs).

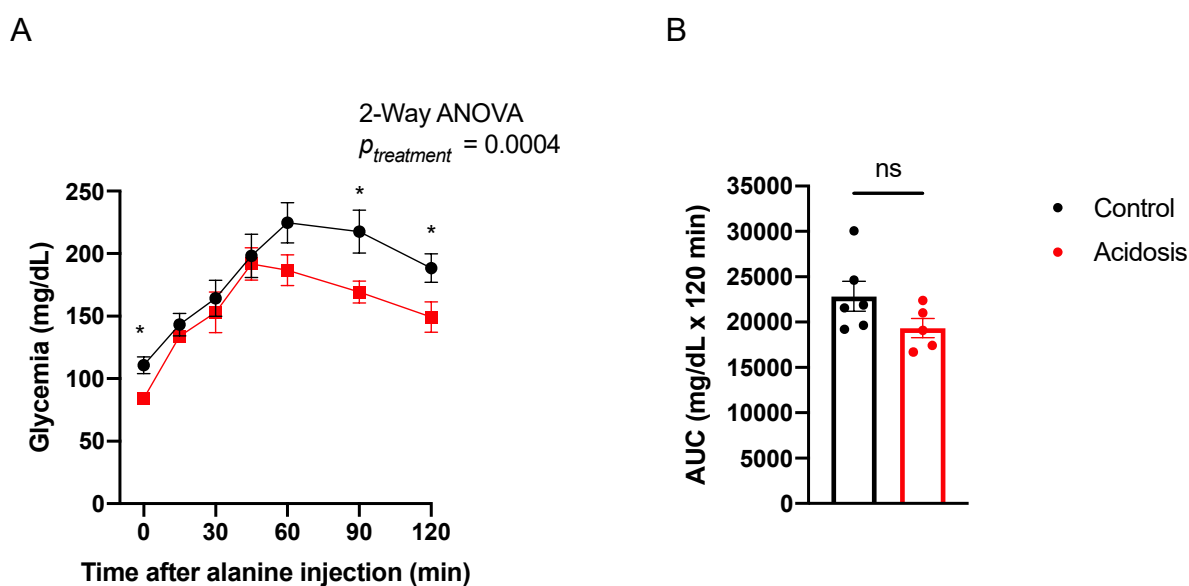


Figure 29. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'alanine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0.05$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié : NS vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 6$  pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique).

### 5.3. Estimation de la production endogène de glucose extra-hépatique

La réponse glycémique à l'injection de glutamine est nettement plus faible chez les souris sous AM chronique que chez les souris contrôles à 7 et 120 jours de traitement (Figures 30 et 31). L'acidose induite par  $\text{NH}_4\text{Cl}$  entraîne une baisse de la PEG extra-hépatique induite par injection de glutamine après 7 jours de cinétique (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$ ; Figure 30 A). De plus, la glycémie à jeun des souris traitées est significativement plus faible que celle des souris contrôles ( $84.1 \pm 3.142$  mg/dL vs  $107.9 \pm 4.616$  mg/dL ; Multiple t-test,  $P = 0.000794$  ; Figure 30 A). Après 15 minutes post injection de glutamine, les souris en AM chronique ont une production de glucose endogène plus élevée quantitativement car les deux groupes de souris ont une glycémie moyenne équivalente ( $131.4 \pm 6.514$  mg/dL vs  $131.7 \pm 3.759$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.966$  ; Figure 30 A). L'inverse se produit après 30 minutes car les souris contrôles ont une glycémie moyenne supérieure à celle des souris sous AM chronique ( $148 \pm 7.620$  mg/dL vs  $174.1 \pm 7.136$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0207$ ; Figure 30 A). Cette différence persiste après 45 minutes ( $163 \pm 6.293$  mg/dL vs  $187.1 \pm 10.070$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0568$  ; Figure 30 A) et 60 minutes post-injection ( $159.9 \pm 6.867$  mg/dL vs  $179.7 \pm 6.271$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0548$ ; Figure 30 A) mais sans différence statistiquement significative. Les souris contrôles et sous AM chronique ont ensuite une glycémie similaire après 90 ( $142.1 \pm 4.037$  mg/dL vs  $150 \pm 5.798$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.276$ ; Figure 30 A) et 120 minutes ( $124.4 \pm 3.950$  mg/dL vs  $134.9 \pm 2.738$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0540$  ; Figure 30 A).

Les AUCs des deux groupes reflètent cette différence de PEG extra-hépatique car l'aire moyenne des souris sous AM chronique est significativement plus faible que celle des souris contrôles ( $16993 \pm 551.4$  mg/dL x 120 min vs  $18771 \pm 384.7$  mg/dL x 120 min pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0234$  ; Figure 30 B)

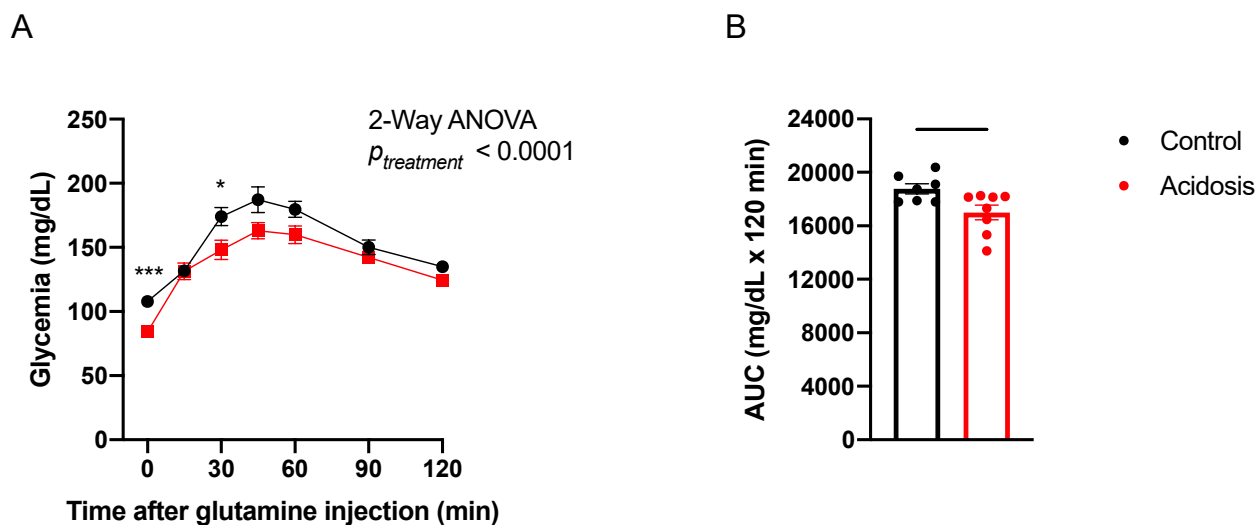


Figure 30. Évaluation de la tolérance à la glutamine des souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de pyruvate de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ . **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié.  $*P < 0.05$

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 par groupe).

La production endogène de glucose extra-hépatique est aussi réduite après 120 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 31 A). Les souris des deux groupes ont une glycémie moyenne équivalente ( $80.2 \pm 4.362$  mg/dL vs  $83.5 \pm 4.794$  mg/dL ; Multiple t-test,  $P = 0.618$  ; Figure 31 A). Après 15 minutes, les souris contrôles ont une PEG rénale/intestinale légèrement plus élevée que les souris contrôles, mais cette écart n'est pas significatif ( $128 \pm 9.664$  mg/dL vs  $150.5 \pm 4.581$  mg/dL ; Multiple t-test,  $P = 0.0617$  ; Figure 31 A). A 30 minutes post-injection, la PEG extra-hépatique des souris sous AM chronique stagne alors que la glycémie des souris contrôles continue d'augmenter face à la stimulation néoglucogénique du pyruvate ( $133 \pm 7.174$  mg/dL vs  $186.5 \pm 8.721$  mg/dL pour les contrôles, Multiple t-test,  $P = 0.000795$  ; Figure 31 A). Le

pic de glycémie des souris contrôles est atteint après 45 minutes post-injection ( $203.8 \pm 8.796$  mg/dL vs  $155.3 \pm 9.348$  mg/dL pour les souris traitées, Multiple t-test,  $P = 0.00361$  ; Figure 31 A), alors que le pic des souris n'est atteint qu'après 60 minutes et surtout, est beaucoup plus faible comparé aux contrôles ( $162.8 \pm 6.063$  mg/dL vs  $197.8 \pm 4.483$  mg/dL , Multiple t-test,  $P = 0.000920$  ; Figure 31 A). Lors de la diminution de la glycémie entre 60 et 90 minutes, la différence de glycémie est toujours présente, indiquant une clairance de glucose similaire ( $145.7 \pm 6.365$  mg/dL vs  $177.3 \pm 6.581$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00614$  ; Figure 31 A) puis après 120 minutes, les glycémies des deux groupes se stabilisent. Les souris sous AM chronique maintiennent une glycémie plus faible que les souris contrôles ( $144.3 \pm 2.871$  mg/dL vs  $168.8 \pm 5.419$  mg/dL pour les contrôles, Multiple t-test,  $P = 0.00254$  ; Figure 31 A). Les AUCs renforcent bien cette diminution significative de la PEG extra-hépatique chez les souris traitées ( $17045 \pm 610.5$  mg/dL x 120 min vs  $21043 \pm 627.2$  mg/dL x 120 min ; Unpaired t-test,  $P = 0.0010$  ; Figure 31 B)

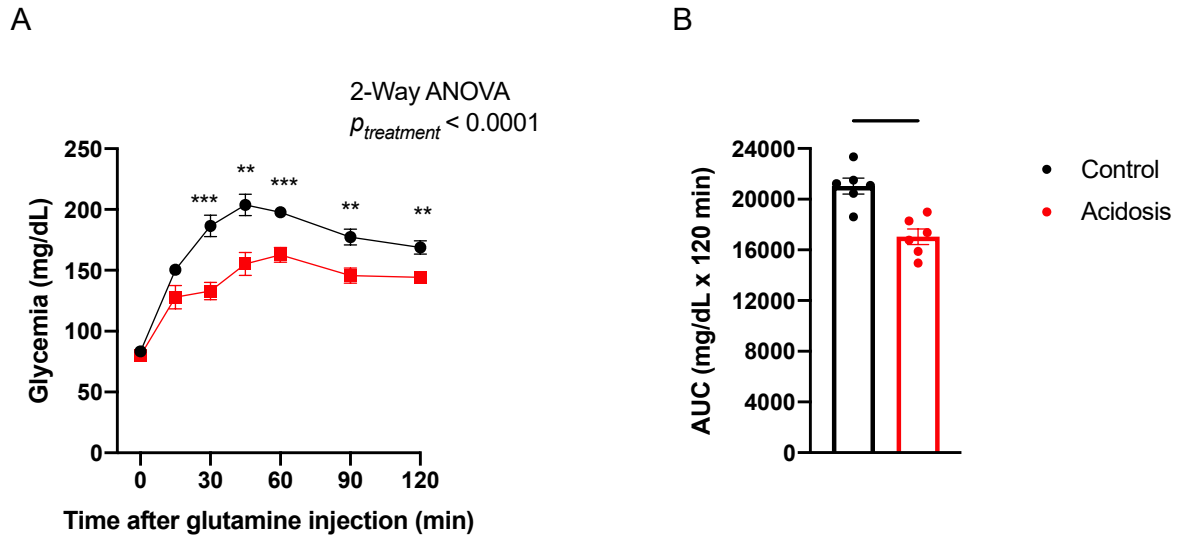


Figure 31. Évaluation de la tolérance à la glutamine des souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement

**A.** Glycémie des souris contrôles (rond noir) et sous AM chronique (rond rouge) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de pyruvate de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$ ). **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié.  $**P < 0.01$

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 6$  par groupe).

#### 5.4.Expression des enzymes de la néoglucogenèse dans le rein, le foie et l'intestin

Comme décrit précédemment, l'ammoniogenèse (synthèse d'ammonium et d'alpha-cétoglutarate à partir de la glutamine) et la néoglucogenèse (synthèse de glucose à partir d'alpha-cétoglutarate) sont augmentées dans le tubule proximal en réponse à une acidose.

Un séquençage d'ARN (RNAseq) à partir d'ARN extrait du rein des souris contrôles et traitées suivie d'une analyse ciblée de l'expression des gènes codant pour les enzymes clés de l'ammoniogenèse et de la néoglucogenèse a été réalisé (Figure 32).

Une nette augmentation de l'expression des ARNm codant pour le transporteur de la phosphoenol-pyruvate carboxylase (*Pck1*) (One sample t-test,  $P = 0.0014$ ) et de la fructose biphosphatase 1 (*Fbp1*) (One sample t-test,  $P = 0.0447$ ) est observée chez les souris en AM vs contrôles au moins jusqu'à 60 jours de traitement (Figure 32). De plus, l'expression de l'ARNm de la *Pck1* est aussi significativement augmentée après 90 jours et jusqu'à 180 jours de traitement comparé aux souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 33 D). Cette augmentation de l'expression de la protéine encodée par la *Pck1*, la PEPCK, est aussi observée dans le rein au niveau protéique, comme illustré sur les Figures 33 A et C. Le traitement augmente significativement l'expression protéique de PEPCK (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$ ). L'augmentation significative de l'abondance protéique de PEPCK dans le rein est observable dès 3 jours de traitement ( $2.853 \pm 0.206$  vs  $1 \pm 0.090$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.0394$  ; Figure 33 A) et continue après 14 jours ( $3.235 \pm 0.164$  vs  $1 \pm 0.088$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.0136$  ; Figure 33 A), 30 jours ( $3.510 \pm 0.239$  vs  $1 \pm 0.080$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.00588$  ; Figure 33 A) 120 jours ( $3.575 \pm 0.729$  vs  $1 \pm 0.249$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P$

= 0.000657; Figure 33 A) et 150 jours de traitement ( $7.401 \pm 1.749$  vs  $1 \pm 0.345$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P < 0.000001$  ; Figure 33 A).

Une diminution de l'expression de l'ARNm de la fructose biphosphate 2 (Fbp2) (One sample t-test,  $P = 0.0053$ ) et de la glucose-6-phosphatase (G6pc) (One sample t-test,  $P = 0.0370$ ) est également présente dans le rein des souris sous AM chronique.

Cette diminution de l'expression d'ARNm de G6PC est aussi reflétée sur l'expression protéique car nous observons une diminution significative chez les souris sous AM chronique dans les reins comparée aux contrôles (ANOVA à 2 voies,  $P = 0.0001$  ; Figure 33 B, C), particulièrement durant les derniers mois de la cinétique ou nous observons une baisse significative de l'abondance protéique de la G6PC après 150 jours ( $0.424 \pm 0.113$  vs  $1 \pm 0.309$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.0117$  ; Figure 33 B) et 180 jours de traitement ( $0.207 \pm 0.038$  vs  $1 \pm 0.218$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.000671$  ; Figure 33 B).

Étonnamment, sur le long terme de la cinétique, l'expression d'ARNm de la *G6pc* est significativement augmentée due au traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.013$  ; Figure 33 D) mais cette dernière n'est pas significative en comparant l'expression temps par temps. De plus, une légère diminution de l'expression de l'ARNm de la *G6pc* relative aux contrôles est observée après 150 jours de traitement. Malgré la baisse de l'expression de la *G6pc* induite par l'AM chronique, cette dernière n'a pas de répercussion sur la traduction de la protéine car les valeurs de log2 fold changes sont trop peu diminuées.



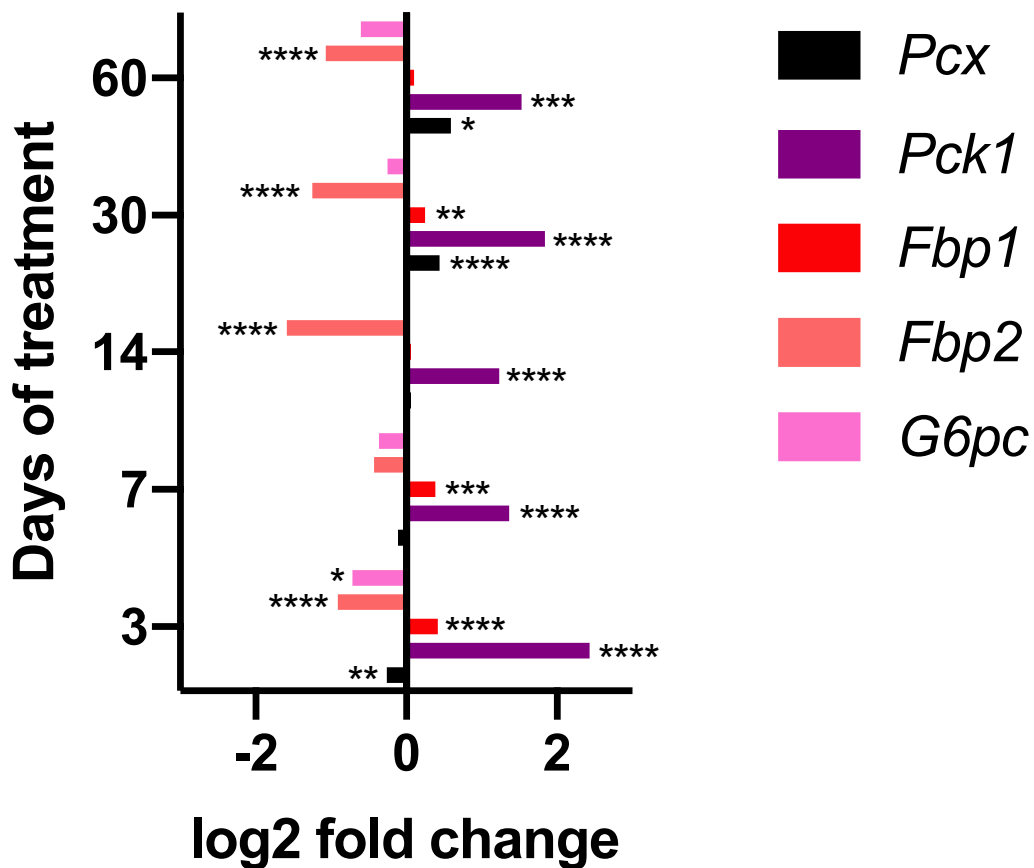


Figure 32. Expression différentielle des ARNm des enzymes clés de la néogluco-genèse rénale à 3, 7, 14, 30 et 60 jours de traitement

Log2 fold change de l'expression des ARNm de Pcx, Pck1, Fbp1, Fbp2 et G6pc dans les reins des souris contrôles et sous AM chronique entre 3 et 60 jours de traitement. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples FDR: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : Log2 fold change ( $n = 4$  par groupe). Quand Log2fold change  $> 0$ , l'expression est plus élevée chez les souris sous AM chronique ; quand Log2fold change est  $< 0$ , l'expression est plus faible chez les souris sous AM chronique.

L'expression protéique de la PCK1 dans le foie est aussi diminuée chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0002$  ; Figure 33 F). Cette diminution est particulièrement visible après 7 jours de traitement ( $1.335 \pm 0.188$  vs  $1 \pm 0.111$  ; Multiple t-test,  $P = 0.0423$  ; Figure 33 F, H). L'abondance protéique de la PCK1 dans le foie après 30 jours de traitement diminue de presque 3 fois chez les souris sous AM chronique ( $0.368 \pm$

0.039 vs  $1 \pm 0.139$  pour les souris contrôles, multiple t-test,  $P = 0.00235$  ; Figure 33 F) et de presque 2 fois après 60 jours de traitement ( $0.594 \pm 0.048$  vs  $1 \pm 0.105$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.00975$  ; Figure 33 F). Cette diminution de l'expression protéique est maintenue chez les souris sous AM chronique après 90 jours de traitement ( $0.597 \pm 0.077$  vs  $1 \pm 0.060$  pour les contrôles, Multiple t-test,  $P = 0.00232$ , Figure 33 F) mais n'est plus présente à 120 jours ( $1.001 \pm 0.092$  vs  $1 \pm 0.176$ , multiple t-test,  $P = 0.997$  ; Figure 33 F, H).

Aucune différence significative sur l'expression protéique de la G6PC, enzyme essentielle à la dernière étape de la néoglucogenèse (la conversion de la glucose-6-phosphate en glucose), n'est visible sur la durée de la cinétique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.667$  ; Figure 33 G et H).

Concernant l'expression des ARNm des enzymes clés de la néoglucogenèse, la *Pck1* est aussi augmentée par le traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 33 I) mais contrairement à son expression protéique, l'ARNm de la *G6pc* est elle aussi altérée par le traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0009$  ; Figure 33 I). On observe très nettement une augmentation significative de l'expression d'ARNm des deux enzymes après 60 jours (Fisher's LSD multiple comparaison test,  $P < 0.0001$  pour les deux enzymes ; Figure 33 I) mais aussi après 120 jours de traitement (Fisher's LSD multiple comparaison test,  $P = 0.0380$  pour la *Pck1* et  $P = 0.0017$  pour la *G6pc* ; Figure 33 I).

Dans l'intestin grêle, plus particulièrement dans le duodénum, nous n'observons pas d'altération de l'abondance protéique de la PCK1 entre 17 et 120 jours de traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.8852$  ; Figure 33 J). Par contre, la PCK1 est significativement altérée par le traitement dans le jéjunum (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0477$  ; Figure 33 K) et est significativement augmentée après 90 jours de traitement chez les souris sous AM chronique ( $1.997 \pm 0.638$  vs  $1 \pm 0.178$  pour les souris contrôles, Fisher's LSD multiple comparaison test,  $P = 0.0305$  ; Figure 33 K)

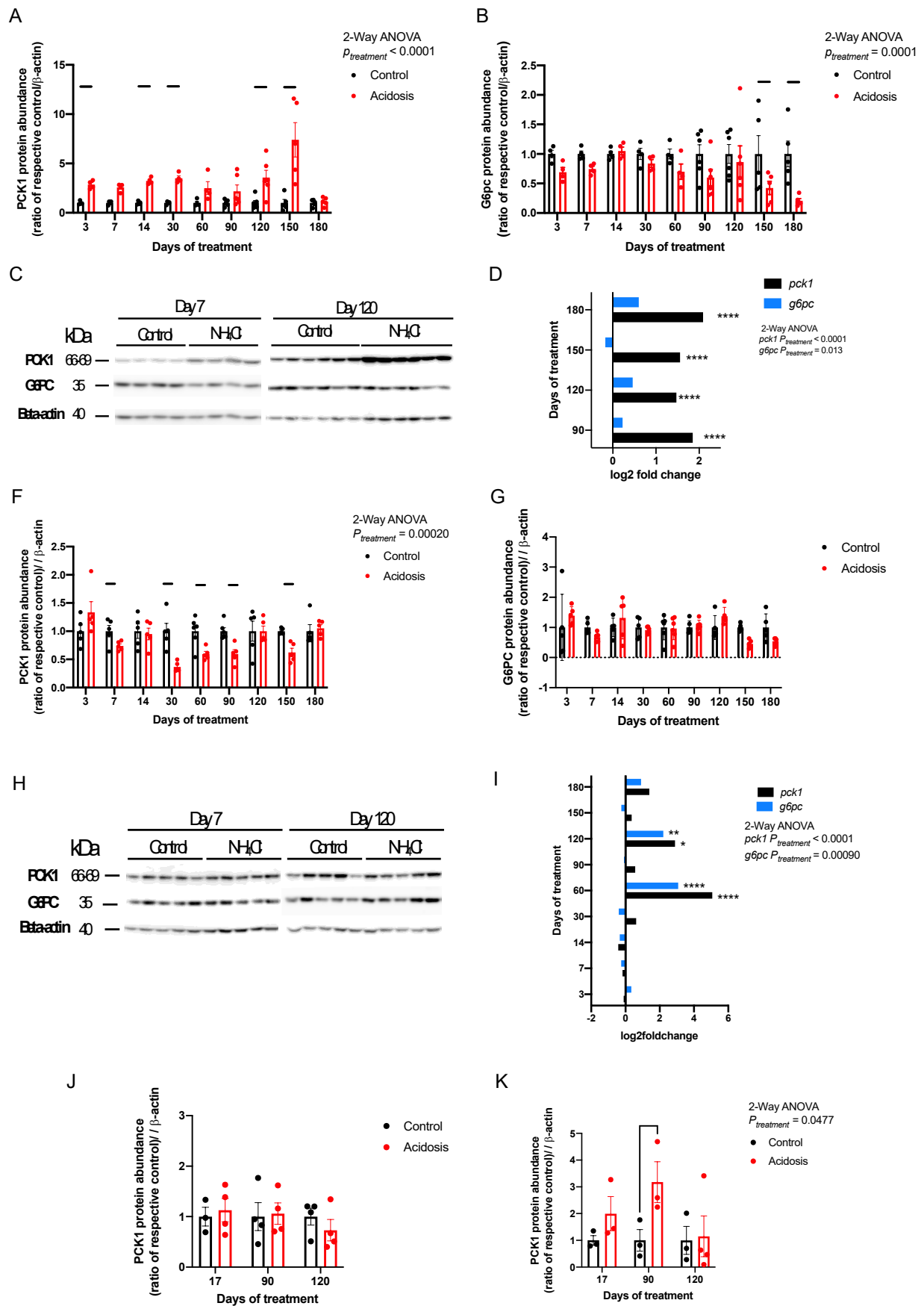


Figure 33. Acteurs clés de la néoglycogénèse hépatique et extra-hépatique régulés d'une manière différentielle en fonction des tissus chez les souris sous acidose métabolique chronique

(A-C) Quantification de la PCK1 **A.**, de la G6PC **B.** des Western Blots **C.**, représentant l'abondance protéique dans les lysats de reins chez les souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) (n = 4 par groupe). La bêta-actine a été utilisée comme contrôle. **D.** "Log2 fold change" de l'expression d'ARNm de *Pck1* et *G6pc* dans les foies des souris contrôles et sous AM chronique entre 90 et 180 jours de traitement analysé par RT-qPCR. La *Gapdh* a été utilisée en tant que gène de ménage (n = 6 par groupe). (F-H) Quantification de la PCK1 **F.**, de la G6PC **G.** des Western Blots **H.**, représentant l'abondance protéique dans les lysats de foie chez les souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) (n = 6 par groupe). La bêta-actine a été utilisée comme contrôle. **I.** "Log2 fold change" de l'expression d'ARNm de *Pck1* et *G6pc* dans les foies des souris contrôles et sous AM chronique entre 3 et 180 jours de traitement analysé par RT-qPCR. La *Gapdh* a été utilisée en tant que gène de ménage (n = 6 par groupe). (J,K) Quantification de la PCK1 dans le duodénum **J.** et le jéjunum **K.** des Westerns Blots représentant l'abondance protéique dans les homogénats d'intestins grêle chez les souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) (n = 4 par groupe). La bêta-actine a été utilisée comme contrôle. La quantification a été réalisée avec le logiciel ImageQuant. Les valeurs sont représentées sous la forme : Moyenne  $\pm$  SEM sauf pour les valeurs de "log2 fold change". \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 et \*\*\*\*P < 0.0001 vs les souris contrôles, ns : non significatif

## 5.5. Conclusion

La production de glucose hépatique est diminuée chez les souris sous AM chronique. Cela pourrait rendre compte, au moins en partie, de l'augmentation de la tolérance au glucose au cours de l'AM. Au contraire, nous avons une nette augmentation de la PEG rénale chez les souris sous AM chronique sur la durée de la cinétique, due à l'augmentation de la production endogène d'ammonium, couplée à la néoglucogenèse rénale.

Il est bien établi qu'au cours de l'AM aiguë, la néoglucogenèse est augmentée dans le tubule proximal rénal. Nous avons d'ailleurs observé une augmentation de l'expression de PEPCK au niveau de l'ARNm et de la protéine sur la durée de la cinétique, et des ARNm codant pour la FBP1 à 3, 7 et 30 jours de traitement. Or la production de glucose en réponse à l'injection de glutamine à 7 jours d'acidose n'est que légèrement augmentée. Cela aurait pu s'expliquer par la diminution de la néoglucogenèse intestinale, mais nous observons bien une augmentation de l'enzyme PCK1 dans le jéjunum. La diminution de la néoglucogenèse hépatique observée sur la majorité de la cinétique viendrait aussi contrebalancer l'augmentation de la néoglucogenèse rénale, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence observée au cours du test de tolérance au pyruvate.

## 6. Augmentation de la glycosurie en acidose métabolique chronique et détermination de l'expression rénale des transporteurs de glucose

Chez les souris sous AM chronique, nous observons une augmentation de la glycosurie ( $P < 0.0001$  ; ANOVA à 2 facteurs) à partir de 7 jours de traitement, et ce à glycémie constante (Figure 34 A).

Nous avons recueilli les urines des souris avant un bolus par voie orale de 2g/kg de glucose et après 2-4 heures pour observer la capacité de réabsorption de glucose urinaire post-challenge de nos souris. Comme attendu, les souris des deux groupes démontrent une concentration urinaire de glucose très faible ( $0.5 \pm 0.062$  mg/dL glucose/mM créatinine vs  $0.830 \pm 0.151$  mg/dL glucose/mM créatinine ; Multiple t-test,  $P = 0.128$  ; Figure 34 B). Mais après le bolus de glucose oral, les souris sous AM chronique ont une glycosurie significativement plus élevée comparée aux souris témoins ( $10.8 \pm 4.093$  mg/dL glucose/mM créatinine vs  $1.2 \pm 0.260$  mg/dL glucose/mM créatinine ; Multiple t-test,  $P = 0.0382$  ; Figure 34 B).

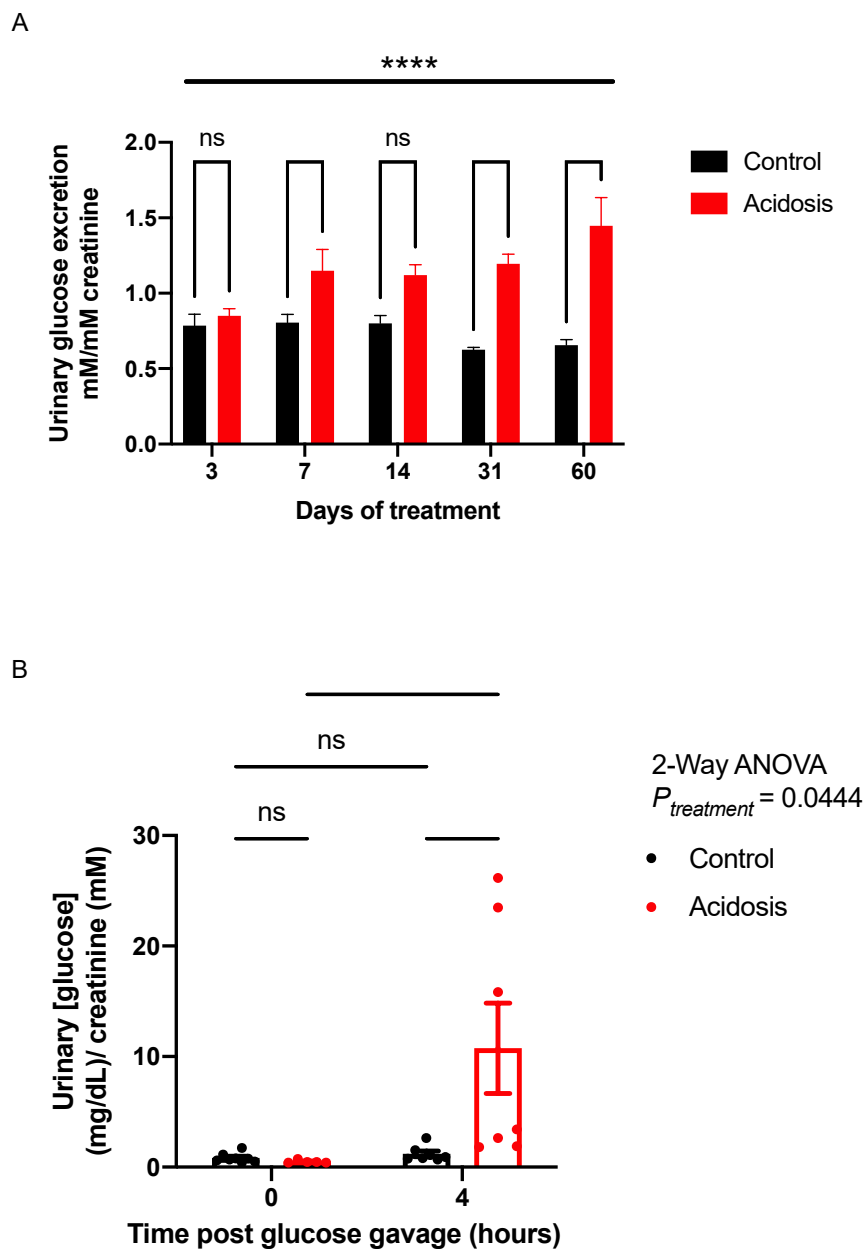


Figure 34. Excrétion urinaire de glucose urinaire au cours de l'acidose métabolique chronique

**A.** L'excrétion de glucose est exprimée par le rapport de la concentration de glucose sur la concentration de créatinine dans les urines. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Bonferroni):  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$ ,  $****P < 0.0001$  vs les souris contrôles. **B.** L'urine a été récoltée avant et 2-4 heures après un bolus oral de glucose de 2g/kg sur les souris contrôles et sous AM chronique après 84 jours de traitement. L'excrétion de glucose est exprimée par le rapport de la concentration de glucose sur la concentration de créatinine dans les urines. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher's LSD test):  $*P < 0.05$ . Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe).

Le glucose filtré par le glomérule est réabsorbé au niveau du tubule proximal. Quatre transporteurs membranaires sont impliqués : les co-transporteurs sodium-glucose SGLT1 et SGLT2, dans la membrane apicale, et GLUT1 et GLUT2 au niveau de la membrane basolatérale.

L'analyse par Western blot montre une diminution de l'expression protéique de SGLT-2 due au traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0067$  ; Figure 35 A) qui est particulièrement visible après 90 jours ( $0.4 \pm 0.104$  vs  $1 \pm 0.295$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0015$  ; Figure 35 A) et 120 jours de traitement ( $0.49 \pm 0.133$  vs  $1 \pm 0.174$  pour les contrôles ; Fisher's LSD multiple comparaison test,  $P = 0.0061$  ; Figure 35 A, E).

L'expression de GLUT2 est augmentée par l'AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0470$  ; Figure 35 B). Une légère tendance est observable dès J60, mais cette dernière n'est pas significative ( $1.45 \pm 0.136$  vs  $1 \pm 0.189$  ; Multiple t-test,  $P = 0.0585$  ; Figure 35 B). Par contre, une augmentation statistiquement significative de l'expression protéique de GLUT2 est bien présente après 90 jours ( $1.53 \pm 0.286$  vs  $1 \pm 0.017$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0287$  ; Figure 35 B), mais aussi après 120 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $2.24 \pm 0.225$  vs  $1 \pm 0.049$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.000004$  ; Figures 35 B, E).

Contrairement à l'isoforme 2 de la famille des SGLT, l'abondance protéique de SGLT1 chez les souris sous AM chronique est significativement inférieure comparée aux souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 35 C). Une baisse de l'expression relative de la protéine après 7 jours est observé ( $0.76 \pm 0.012$  vs  $1 \pm 0.042$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0386$  ; Figure 35 C, E), et également une baisse d'environ 2 fois après 90 ( $0.59 \pm 0.066$  vs  $1 \pm 0.041$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.000758$  ; Figure 35 C) et 120 jours ( $0.58 \pm 0.085$  vs  $1 \pm 0.249$  pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.000610$  ; Figure 35 C, E).



L'abondance protéique relative aux contrôles de GLUT1 est elle aussi, augmentée par l'AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0012$  ; Figure 35 D), notamment à 14 jours de cinétique, où nous observons une augmentation de plus d'1.5 fois de l'abondance protéique de GLUT1 chez les souris traitées ( $1.67 \pm 0.050$  vs  $1 \pm 0.051$  ; Multiple t-test,  $P = 0.000015$  ; Figure 35 D).

L'expression protéique relative aux contrôles chez les souris sous AM chronique de NBCe1a et NHE3 est significativement augmentée (ANOVA à 2 voies,  $P < 0.0001$ ), ce qui est attendu lors d'une AM (données non présentées).

Un séquençage d'ARN (RNA-seq) à partir d'ARN extrait du rein des souris contrôles et traitées et une analyse ciblée de l'expression des gènes codant pour les transporteurs de glucose ont été réalisées (Figure 35 F). Une forte diminution de l'expression de Slc5a2 est visible chez les souris sous AM chronique comparée aux contrôles (ANOVA à 2 facteurs :  $P = 0.0008$  ; Figure 35 F) car l'expression de l'ARNm codant SLC5A2 est significativement diminuée après 3 jours ( $\log_2$  fold change =  $-0.39596$  ;  $P = 1.243 \times 10^{-8}$ ), 7 jours ( $\log_2$  fold change =  $-0.20551$  ;  $P = 0.00983$ ), 14 jours ( $\log_2$  fold change =  $-0.69884$  ;  $P = 1.36 \times 10^{-13}$ ), 30 jours ( $\log_2$  fold change =  $-0.61214$  ;  $P = 3.99 \times 10^{-5}$ ) et 60 jours de traitement ( $\log_2$  fold change =  $-0.60201$  ;  $P = 0.0136$ ).

L'expression de l'ARNm de Slc5a1 est aussi altérée par le traitement. Nous pouvons observer que dès J3, une augmentation de l'expression relative de l'ARNm codant la protéine SGLT1 comparé aux contrôles ( $\log_2$  fold change =  $0.32599$  ;  $P = 0.00557$ ). Ceci est également le cas après 7 jours de traitement ( $\log_2$  fold change =  $0.31016$  ;  $P = 0.000529$ ). Cette augmentation pourrait suggérer un système de compensation de ce dernier pour diminuer la perte de glucose dans l'urine.

De plus, l'expression relative aux contrôles de l'ARNm de Slc2a2, codant la protéine GLUT2, est fortement diminuée après 3 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $\log_2$  fold change = -

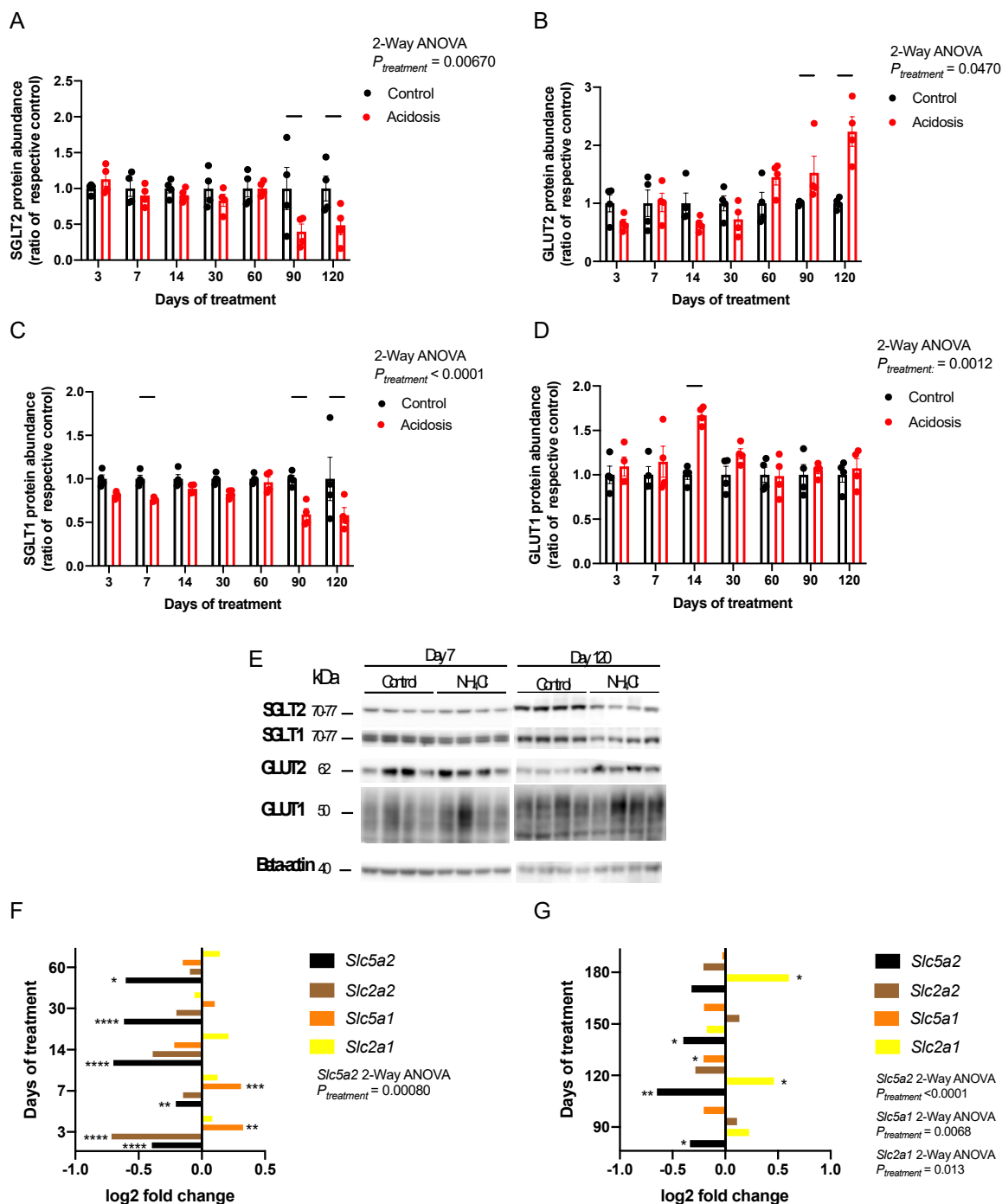
0.71410 ;  $P = 2.18 \times 10^{-5}$ ). Malgré ceci, aucune différence n'est observable sur l'expression d'ARNm de Slc2a1.

Des RT-qPCR ont été réalisées pour évaluer l'expression relative d'ARNm des transporteurs de glucose entre 90 et 180 jours de traitement. Comme illustré dans la figure 35 G, l'expression de l'ARNm de Slc5a2 est aussi diminuée par le traitement sur les temps longs de la cinétique comparé aux souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 35 G). Cette différence significative est visible à 90 jours ( $\log_2$  fold change = -0.33538 ;  $P = 0.0222$ ) mais aussi à 120 jours ( $\log_2$  fold change = -0.64837 ;  $P = 0.00280$ ) et 150 jours ( $\log_2$  fold change = -0.39870 ;  $P = 0.0270$ ) ce qui corrèle avec l'analyse protéique de SGLT2 sur le long terme de la cinétique.

De plus, l'expression relative de l'ARNm de la Slc5a1 est significativement réduite chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0068$  ; Figure 35 G). En comparant temps par temps, cette expression est principalement diminuée après 120 jours d'AM ( $\log_2$  fold change = -0.20580 ;  $P = 0.0249$ ), corrélant ainsi avec l'expression protéique sur le même temps de cinétique.

L'expression de l'ARNm du transporteur GLUT1 est significativement augmentée par l'AM (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.013$  ; Figure 35 G), particulièrement après 120 jours ( $\log_2$  fold change = 0.46257 ;  $P = 0.0246$ ) et à la fin de la cinétique ( $\log_2$  fold change = 0.60258 ;  $P = 0.0128$ ).

L'augmentation de GLUT1 au niveau de l'ARN corrèle aussi avec les résultats obtenus sur les temps plus courts de la cinétique au niveau protéique.



**Figure 35.** Évaluation de l'expression protéique et d'ARN des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique

Quantification de l'abondance protéique de **A.** SGLT2, **B.** GLUT2, **C.** SGLT1 et **D.** GLUT1 des **E.** Westerns Blots sur les protéines de membranes plasmiques de reins de souris contrôles (noir) et sous AM chronique (rouge) entre 3 et 120 jours de traitement au NH<sub>4</sub>Cl. La quantification a été réalisée par ImageQuant et la  $\beta$ -actine a été utilisée comme contrôle. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher's LSD). Expression relative des transporteurs de glucose entre **F.** 3 et 60 jours réalisé par RNAseq et **G.** 90 et 180 jours réalisé par RT-qPCR. Pour le RNAseq, les données ont été analysées par R version 3.6.3 et DESeq2 version 1.24.0. Pour la RT-qPCR, La *Gapdh* a été utilisée en tant que gène de ménage. Les valeurs sont représentées sous la forme : Moyenne  $\pm$  SEM sauf pour les valeurs de log<sub>2</sub> fold change. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs les souris contrôles,  $n = 4$  par groupe.

## 6.1. Conclusion

La glycosurie observée en condition basale et après un bolus oral de glucose chez nos souris sous AM chronique démontre bien une diminution de la réabsorption de glucose urinaire de ces dernières.

Quatre protéines membranaires sont responsables de la réabsorption du glucose à partir du filtrat glomérulaire dans le tubule proximal : les co-transporteurs sodium-glucose SGLT1 et SGLT2, dans la membrane apicale, et GLUT1 et GLUT2, au niveau de la membrane basolatérale. SGLT-2 est responsable de la majorité de la réabsorption de glucose dans le tubule proximal. Il est donc cohérent de penser que la glycosurie présente chez les souris sous AM chronique est principalement due à une diminution de l'expression de SGLT-2. Or l'expression des ARNm codant pour SGLT2 est diminuée chez les souris sous AM chronique (avec un "log2 fold" assez faible) et son expression protéique est aussi diminuée particulièrement sur le long terme de la cinétique. Au contraire, nous observons chez les souris sous charge acide, une diminution de l'expression de la protéine (après 3, 90 et 120 jours de traitement) et de l'ARNm de SGLT-1 (particulièrement sur les temps longs de la cinétique) et une augmentation de la protéine GLUT1 (particulièrement à J14) et GLUT2 (après 90 et 120 jours de traitement). La diminution de l'expression de SGLT1 sur le court terme et des deux SGLT sur le long terme pourrait expliquer la glycosurie observée chez les souris sous AM chronique.

## 7. Dégradation des tubules proximaux due à l'acidose métabolique chronique sans infiltration de cellules immunitaires

L'analyse histologique des reins en microscopie optique a été réalisée après coloration des coupes. Nous avons réalisé différentes colorations histologiques (Hematoxylin-eosine (HE), Periodic acid schiff (PAS) trichrome de Masson (TM) et Rouge Sirius (RS) sur les reins fixés et inclus en paraffine. Après 17 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , les souris sous AM chronique ne présentent pas de différence structurelle rénale comparée aux reins contrôles (Figure 36 A). La visualisation des coupes de rein colorées au HE et RS révèle des anomalies au niveau des tubules proximaux à partir de 30 jours de charge acide, et plus particulièrement la présence de vacuoles intra-cytoplasmiques. La présence de ces vésicules est cependant restreinte à un petit nombre de tubules proximaux et n'est donc pas statistiquement significative.

En quantifiant le nombre de vacuoles présent dans le cortex, nous avons déterminé que le nombre de ces dernières est significativement plus élevé après 3 mois de traitement comparé aux souris contrôles. Ces vacuoles intra-cytoplasmiques sont présentes dans de très nombreux tubules proximaux après 90 jours ( $1.269 \pm 0.050$  vs  $1 \pm 0.047$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.00173$  ; Figure 36 B), mais aussi après 120 jours ( $1.375 \pm 0.119$  vs  $1 \pm 0.020$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.00557$  ; Figure 36 B), 195 jours ( $1.270 \pm 0.050$  vs  $1 \pm 0.060$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.00634$  ; Figure 36 B), 225 jours ( $1.341 \pm 0.092$  vs  $1 \pm 0.081$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.0191$  ; Figure 36 B) et 300 jours de traitement ( $1.565 \pm 0.080$  vs  $1 \pm 0.081$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.000816$  ; Figure 36 B). L'apparition de ces vacuoles est couplée à une détérioration de la structure des tubules. De plus, une hypertrophie des reins (i.e., augmentation de l'aire de la surface totale des reins) associée à la formation de vacuoles intra-cytoplasmique est également observable (ANOVA à 2 facteurs, P

< 0.0001 ; Figure 36 C). Cette hypertrophie, probablement tubulaire, est particulièrement visible après 195 jours ( $1.429 \pm 0.057 \text{ mm}^2$  vs  $1 \pm 0.046 \text{ mm}^2$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.000158$ ; Figure 36 C), mais aussi après 225 jours ( $1.533 \pm 0.073 \text{ mm}^2$  vs  $1 \pm 0.041 \text{ mm}^2$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.000211$ ; Figure 36 C) et 300 jours de traitement ( $1.253 \pm 0.055 \text{ mm}^2$  vs  $1 \pm 0.064 \text{ mm}^2$  pour les contrôles ; Multiple unpaired t-test,  $P = 0.0173$ ; Figure 36 C).

L'examen des coupes colorées au rouge Sirius (marquant le collagène de types I et III) ou au trichrome de Masson indique que la surface de fibrose n'est pas supérieure chez les souris sous AM chronique, et la quantification du Rouge Sirius par macro (réalisé avec le logiciel ImageJ) confirme ceci (Figure 36 D).

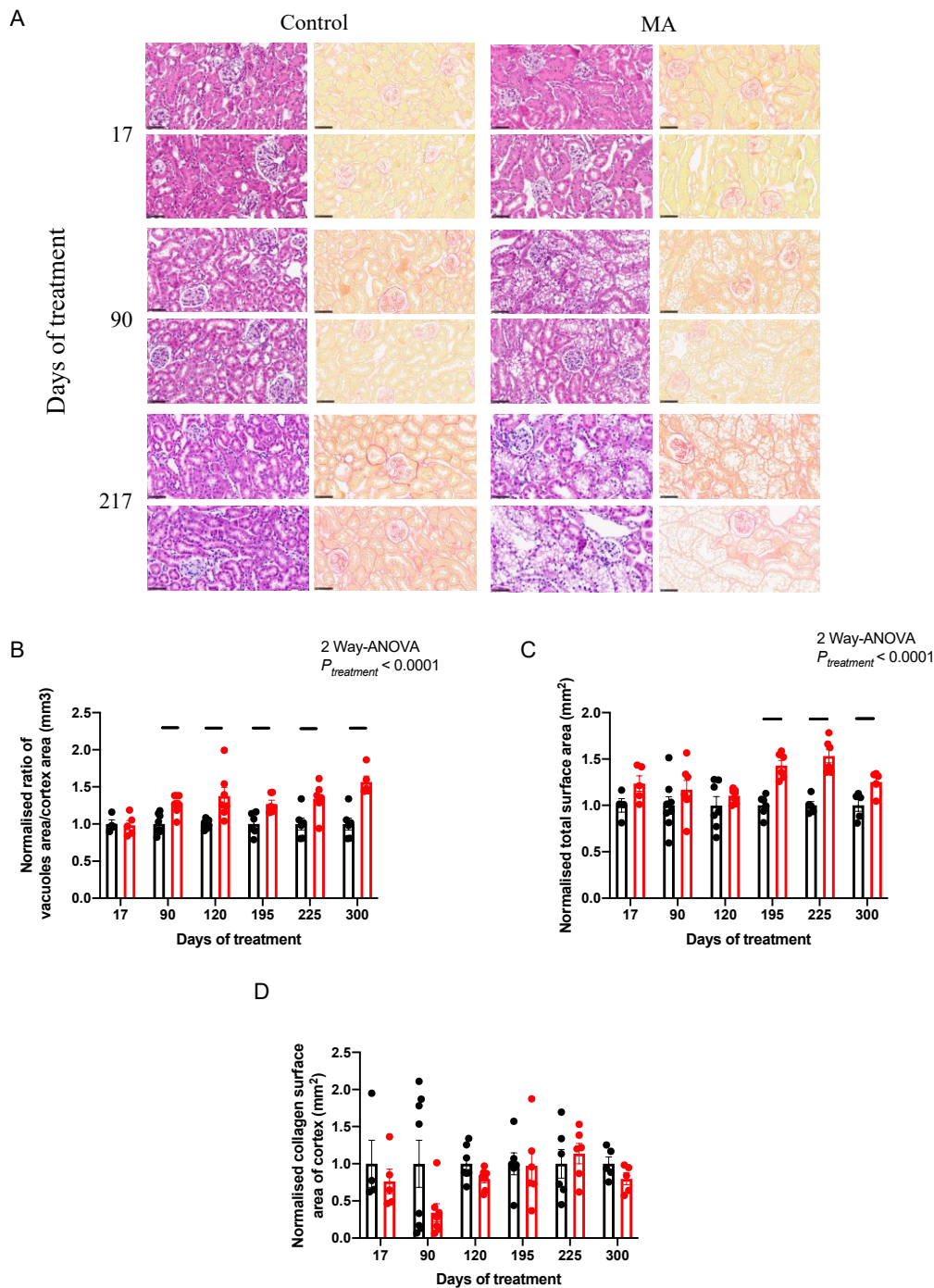


Figure 36. Histologie des reins des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 17 jours, 3 mois et 7.5 mois de traitement

Les reins ont été perfusé au PBS puis a la PFA 4% à un débit de perfusion de 2ml/min puis récolté et inclus en paraffine. Les coupes de 4 $\mu$ m ont été déparaffinées puis colorées : Hematoxylin & Eosine (H&E) en violet et de Rouge Sirius (RS) en jaune/rouge. Les lames colorées ont ensuite été scannées *via* un scanner de lames Hamamatsu. La quantification a été réalisée par macro sur ImageJ. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher's LSD): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs les souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous la forme : Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 4$  par groupe.

L'augmentation significative de 1.5 fois de l'abondance des protéines urinaires chez les souris sous AM chronique comparée aux contrôles après 6 mois de traitement (Figure 537 A-B) est associée aux altérations morphologiques des tubules proximaux reflétant une dégradation rénale provoquée par l'AM chronique. Malgré ces effets de l'AM sur la structure du rein, la concentration plasmatique de créatinine chez les souris traitées ne diffère pas de celle des souris contrôles, et cela sur toute la durée de la cinétique (données non présentées).

Toutefois, comme décrit dans la figure 15 A, une diminution significative du poids des souris sous AM chronique comparée aux contrôles est observée, particulièrement après 4.5 mois de traitement. Cet effet est aussi visible sur la masse maigre des souris sous AM chronique, sur la durée des 6 mois de traitement. Ceci est un facteur important car la créatinine plasmatique est un moyen de mesure communément utilisé pour l'estimation de la fonction rénale. La créatinine provient de la dégradation de la créatine musculaire et donc, une diminution de la masse maigre entraînerait une diminution de la production de créatinine ce qui expliquerait potentiellement pourquoi nous n'observons pas de différence de concentration entre les 2 groupes.



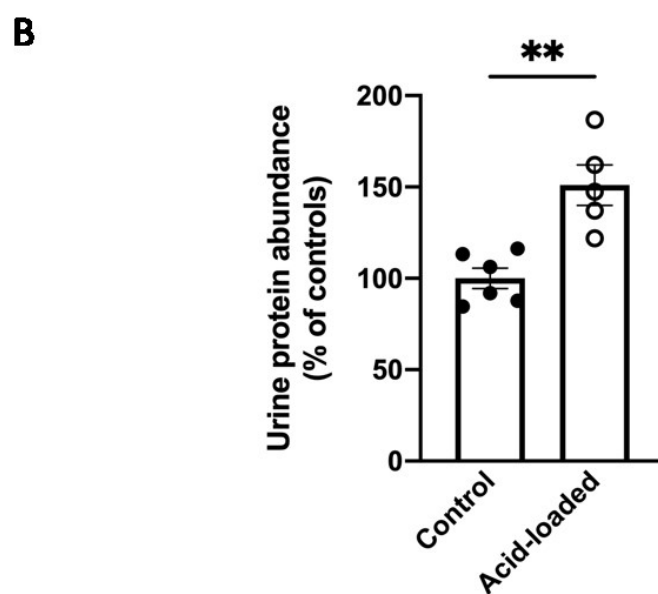
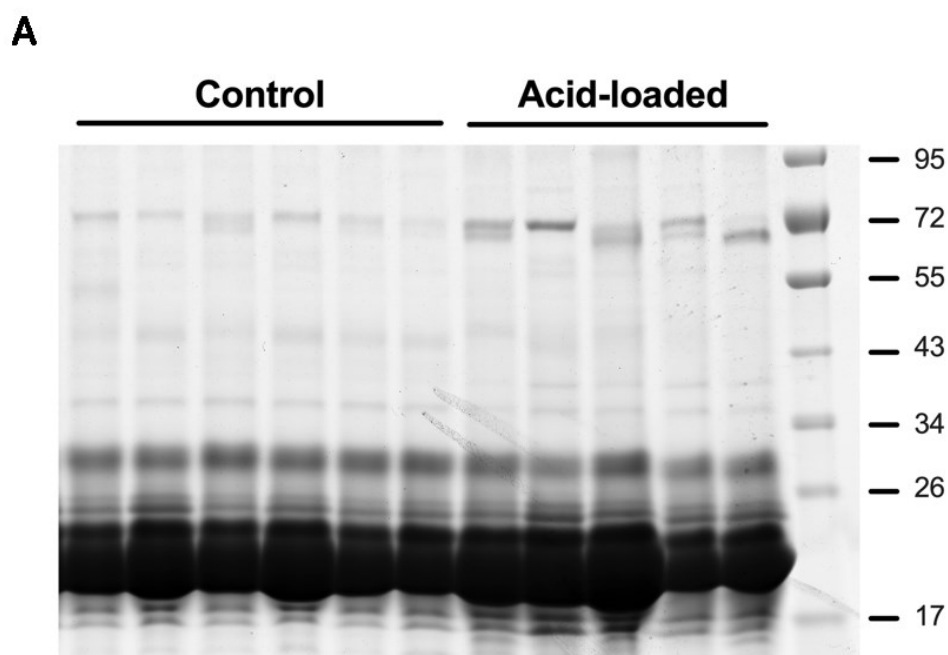


Figure 37. Quantification de protéines contenues dans l'urine des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 6 mois de traitement

**A.** Électrophorèse en gel de polyacrylamide (4-20%) des urines de souris suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Le volume d'urine déposé par puits est normalisé à la concentration de créatinine des urines. **B.** Quantification des bandes protéiques du gel présenté en A, réalisé par ImageJ. L'analyse statistique des données a été réalisée par un t-test non-apparié :  $**P < 0.01$  vs les souris contrôles. Les valeurs sont représentées sous la forme : Moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 5$  pour les contrôles et 4 pour les sous AM chronique.

Pour évaluer l'infiltration des reins par des cellules inflammatoires en réponse à l'AM chronique, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux (Fluorescent activated cell sorting ; FACS). Nous avons préparé des suspensions de cellules isolées par digestion enzymatique des reins de souris pour ensuite les trier et les compter sur la base de l'expression de marqueurs spécifiques (CD45+ pour la population immunitaire générale ; CD45+F4/80+ pour la population macrophagique ; CD45+F4/80- pour la population non-macrophagique; F4/80-CD3+ pour la population leucocytaire T, F4/80-CD19+ pour la population leucocytaire B; CD19+/CD22.2+ pour les lymphocytes B matures et CD19+/CD22.2- pour les lymphocytes B immatures. Un total de 700 000 cellules/souris a été compté et trié. Le pourcentage de cellules uniques était de l'ordre de 35% quel que soit le groupe de souris et la durée du traitement. Les cellules positives pour CD45 représentent environ 4% des cellules uniques.

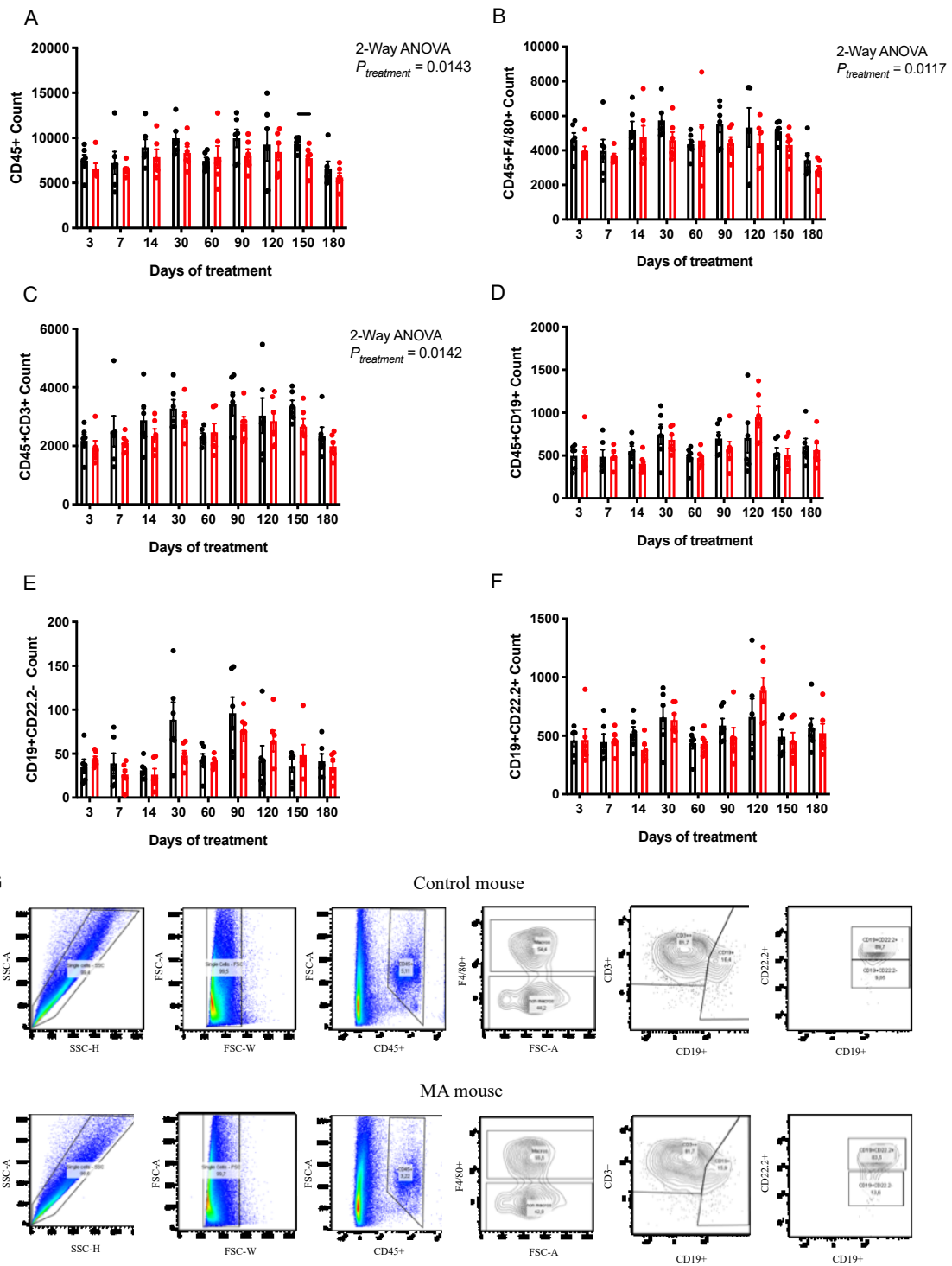
Pour un nombre de 700 000 événements par rein comptabilisé, nous observons une diminution de la population totale de cellules immunitaire (CD45+) chez les souris sous acidose sur la durée des 6 mois de cinétique (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0143$  ; Figure 38 A) avec une diminution significative de cette population après 150 jours de traitement ( $7755.667 \pm 588.034$  cellules vs  $9342.667 \pm 322.184$  cellules pour les contrôles,  $P = 0.039$  ; Figure 38 A).

De cette population mère, nous avons ensuite quantifié les cellules des populations macrophagiques et lymphocytaires. Une diminution des cellules F4/80+ est observée chez les souris sous traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0117$  ; Figure 38 B), mais aucune différence significative n'est observée en comparant la population macrophagique chez les souris sous AM chronique à leur contrôle respectif à chaque temps de la cinétique.

De la population lymphocytaire, nous avons ensuite séparé la population CD3+ (lymphocytes T) de la population CD19+ (lymphocytes B) pour l'analyse des sous-

populations immunitaires. Une nouvelle fois, une diminution des lymphocytes T est observée chez les souris sous traitement en charge acide (ANOVA à 2 voies,  $P = 0.0142$  ; Figure 38 C) mais aucune différence significative est visible en nombre de lymphocytes B totaux entre les deux groupes (Figure 38 D).

A partir de la population totale de lymphocytes B, nous avons finalement séparé les lymphocytes B matures (CD19+CD22.2+) des lymphocytes B non matures (CD19+CD22.2-) et aucune différence significative est observée dans ces 2 populations et entre les deux groupes (Figures 38 E-F). La méthode de « gating » est représentée avec les dots plots des populations immunitaires pour les souris contrôles (Figure 38 G) et sous AM chronique (Figure 38 H).



**Figure 38. Infiltration de cellules immunitaires analysée par FACS dans des suspensions de cellules préparées à partir des reins de souris contrôles et sous acidose métabolique chronique entre 3 jours et 6 mois de traitement**

Quantification de **A.** CD45+, **B.** F4/80+, **C.** CD3+, **D.** CD19+, **E.** CD19+CD22.2- et **F.** CD19+CD22.2+. Dot plots des populations détectées par FACS chez les souris **G.** contrôles et **H.** sous AM chronique. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples,  $*P < 0,05$ , vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : Moyenne  $\pm$  SEM (n=6 par groupe).

Nous avons ensuite dosé l'interleukine-6 (IL-6) dans les lysats de reins de souris contrôles et sous AM chronique. Nous observons chez les souris traitées, une diminution de la concentration d'IL-6 dans les reins de souris sous NH<sub>4</sub>Cl entre 3 et 60 jours de traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0055$ ; Figure 39). Cette diminution est particulièrement flagrante après 3 jours ( $3.118 \pm 0.044$  pg/mg protéines vs  $4.086 \pm 0.369$  pg/mg protéines pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.040$ ) et 30 jours de traitement ( $2.073 \pm 0.111$  mg/mg protéines vs  $3.110 \pm 0.37$  pg/mg protéines pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.036$  ; Figure 39).

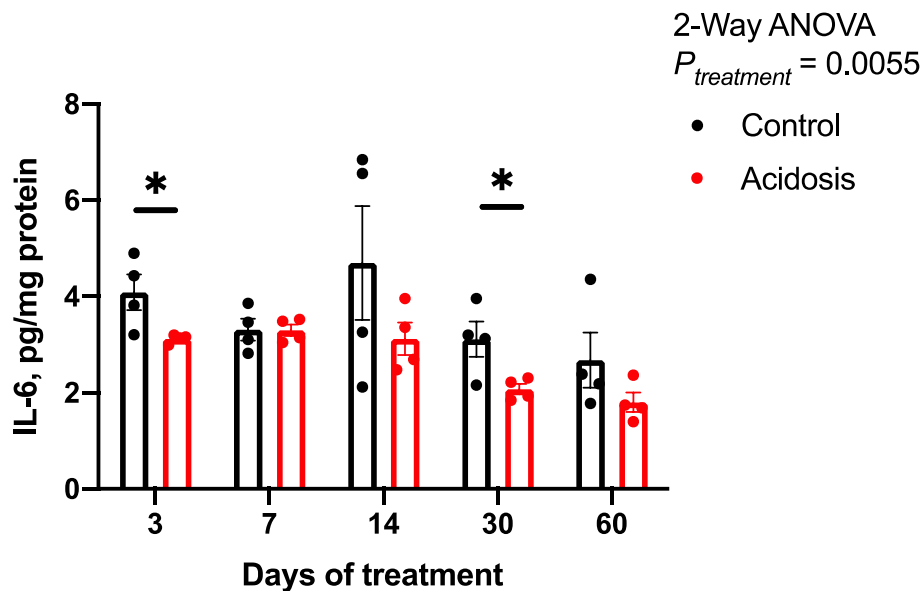


Figure 39. Production rénale d'interleukine-6 chez les souris témoins (noir) et sous acidose métabolique chronique (rouge)

L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA suivie d'un test de comparaisons multiples,  $*P < 0.05$  vs les souris contrôles. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM,  $n = 4$  souris par groupe.

## 7.1. Conclusion

Nous avons observé que l'AM chronique entraîne une détérioration des tubules proximaux principalement, en causant des vacuoles intracellulaires dans les tubules. Ces altérations structurales entraîneraient une protéinurie significative après 6 mois de traitement chez la souris sans toutefois entraîner une augmentation significative de la concentration plasmatique de créatinine. Cependant, malgré l'absence d'effet significatif du traitement sur la concentration plasmatique de créatinine, nous observons une forte diminution de la masse corporelle totale des souris sous charge acide, ainsi qu'une forte baisse de la masse maigre de ces dernières. Cette observation peut être corrélée à l'augmentation de la protéolyse musculaire qui est un symptôme connu de l'AM, due à une augmentation de l'activité des ubiquitines 1, 2 et 3.

Nous n'observons pas d'infiltration rénale par des cellules immunitaires et aucune augmentation de la sécrétion de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Au contraire, nous observons par FACS, une diminution globale des différentes populations de cellules immunitaires CD45+ chez nos souris sous charge acide, ainsi qu'une diminution des populations de cellules F4/80+ et CD3+ (macrophages et lymphocytes T).

Cette détérioration des tubules proximaux chez les souris sous charge acide n'est donc pas dû à une augmentation de l'infiltration de cellules immunitaires dans le rein, ni à une augmentation d'IL-6, au moins jusqu'à 2 mois.

## 8. La capture de glucose est augmentée en acidose métabolique chronique

Nous avons évalué la capture de glucose chez nos souris en utilisant du  $^{18}\text{F}$ Fluorodeoxyglucose et en traçant ce dernier avec la tomographie par émission de positons (TEP). Après quantification de la capture du glucose marqué, nous n'observons pas de différence significative entre les deux groupes après 17 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Malgré une tendance à la baisse de la capture de glucose cérébrale générale chez les souris sous AM chronique, cette dernière n'est pas significative ( $0.000950 \pm 0.000165$  SUV vs  $0.001329 \pm 0.000147$  SUV pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.1092$  ; Figure 40 A), le même effet est observé dans le muscle squelettique ( $0.000816 \pm 0.000060$  vs  $0.0008723 \pm 0.00004509$  pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.4620$  ; Figure 40 B). La capture de glucose marqué dans les tissus adipeux blancs périgonadique ( $0.00008357 \pm 0.00001$  SUV vs  $0.00008271 \pm 0.00002$  SUV pour les souris contrôles, Unpaired t-test,  $P = 0.973$  ; Figure 40 C) et inguinal ( $0.000287 \pm 0.00005$  SUV vs  $0.000257 \pm 0.00004$  pour les souris contrôles, Unpaired t-test,  $P = 0.633$  ; Figure 40 D) ne diffère pas entre les deux groupes. Une augmentation non significative est observée entre la capture de glucose des souris contrôles et sous AM chronique dans les reins et la vessie ( $0.00045 \pm 0.0001056$  SUV vs  $0.000265 \pm 0.0000375$  SUV pour les contrôles ; Welch's t-test,  $P = 0.140$  ;  $0.01356 \pm 0.002187$  SUV vs  $0.00945 \pm 0.001728$  SUV pour les contrôles, Unpaired t-test,  $P = 0.159$ , respectivement, Figures 40 E-F, H-I). Ceci est aussi le cas sur la capture globale de  $^{18}\text{F}$ FDG des souris ( $0.000832 \pm 0.0000263$  SUV vs  $0.000783 \pm 0.0000265$  SUV ; Unpaired t-test,  $P = 0.2115$ , Figure 40 G).

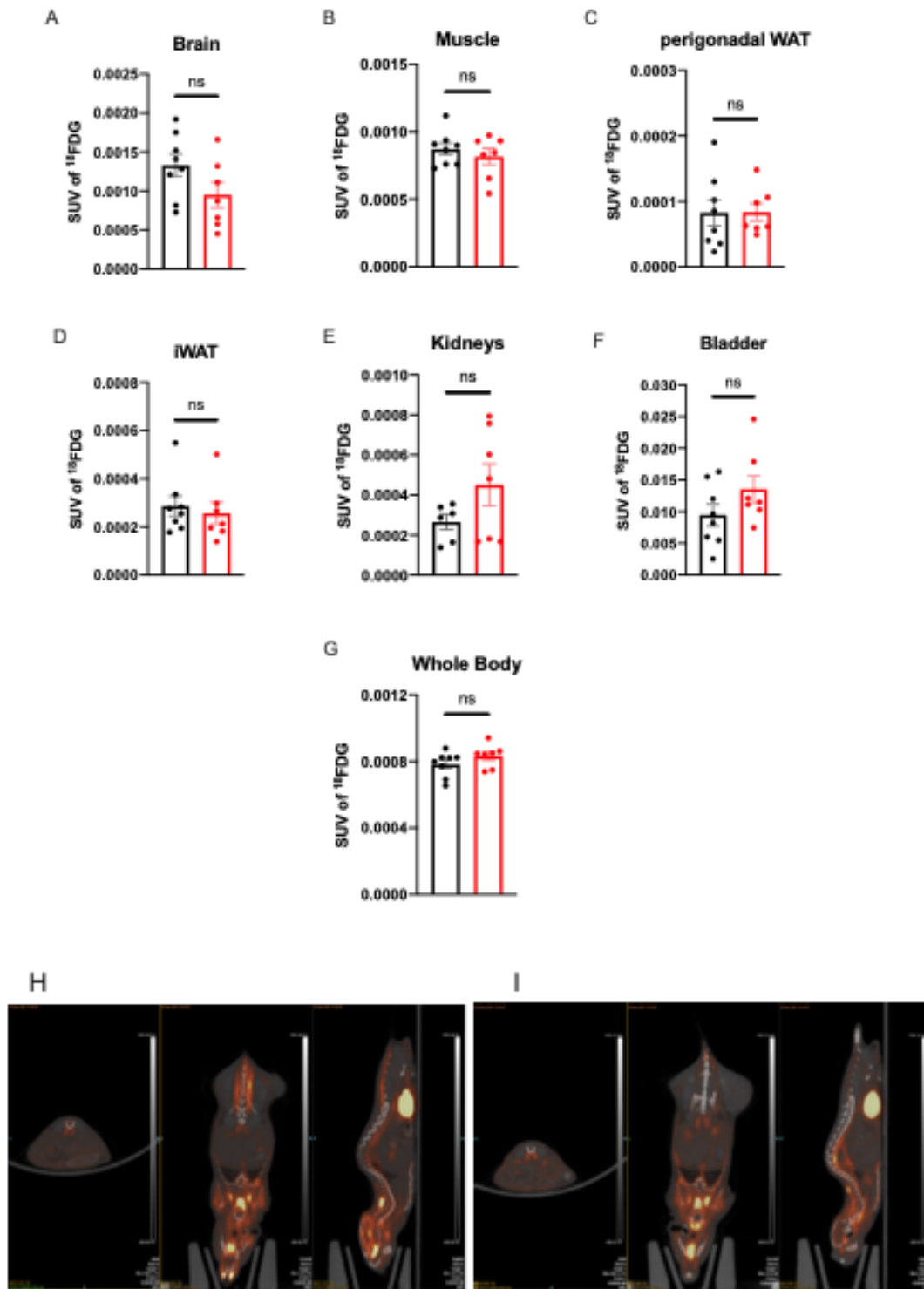


Figure 40. Quantification de standard uptake values de 2-Deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 17 jours de traitement

Une injection intrapéritonéale de  $^{18}\text{F}$ FDG de 0.5MBq/g de souris est réalisée. Après 45 minutes, les acquisitions en Tomographie par Émission de Positons (TEP) sont réalisées puis les acquisitions en tomodensitométrie (TDM). L'analyse a été faite sur **A.** le cerveau, **B.** le muscle, **C.** le tissu adipeux blanc périgonadique, **D.** le tissu adipeux blanc inguinal, **E.** les reins, **F.** la vessie et **G.** le corps entier de la souris. Superposition d'une acquisition de TEP et TDM d'une souris **H.** contrôlé et **I.** acidotique. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié : *ns* vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n= 8 pour les contrôles et 7 pour les sous AM chronique).



Après 195 jours de traitement, la capture de glucose cérébrale totale ( $0.001344 \pm 0.0001$  SUV vs  $0.001433 \pm 0.0001$  SUV pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.610$  ; Figure 41 A) et musculaire ( $0.001044 \pm 0.0001$  vs  $0.001023 \pm 0.0001$  pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.8943$  ; Figure 41 B) est identique chez les souris contrôles et sous charge acide. Le tissu adipeux blanc périgonadique chez les souris sous acidose ne montre pas de différence sur les SUV ( $0.0000852 \pm 0.000005$  SUV vs  $0.000112 \pm 0.00002$  SUV ; Welch's t-test,  $P = 0.194$ , Figure 41 C). Ceci est aussi le cas dans le tissu adipeux blanc inguinal ( $0.0002055 \pm 0.0000589$  SUV vs  $0.000268 \pm 0.0000327$  pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.3835$ , Figure 41 D). Une augmentation de la capture de  $^{18}\text{F}$ FDG est observée chez les souris sous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  dans les reins ( $0.000863 \pm 0.00009$  SUV vs  $0.000589 \pm 0.00005$  SUV pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0265$  ; Figure 41 E, H-I) et la vessie ( $0.0440 \pm 0.005$  SUV vs  $0.0245 \pm 0.004$  SUV pour les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0167$  ; Figure 41 F, H-I) après 195 jours de traitement, corrélant avec la glycosurie et la diminution de l'expression protéique des co-transporteurs de glucose dans le tubule proximal observée chez nos souris traitées (Figures 34 et 35). De plus, la capture de glucose marqué globale des souris sous AM chronique est similaire à celle des souris contrôles ( $0.00113 \pm 0.00005$  SUV vs  $0.00115 \pm 0.00007$  SUV pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.832$  ; Figure 41 G).

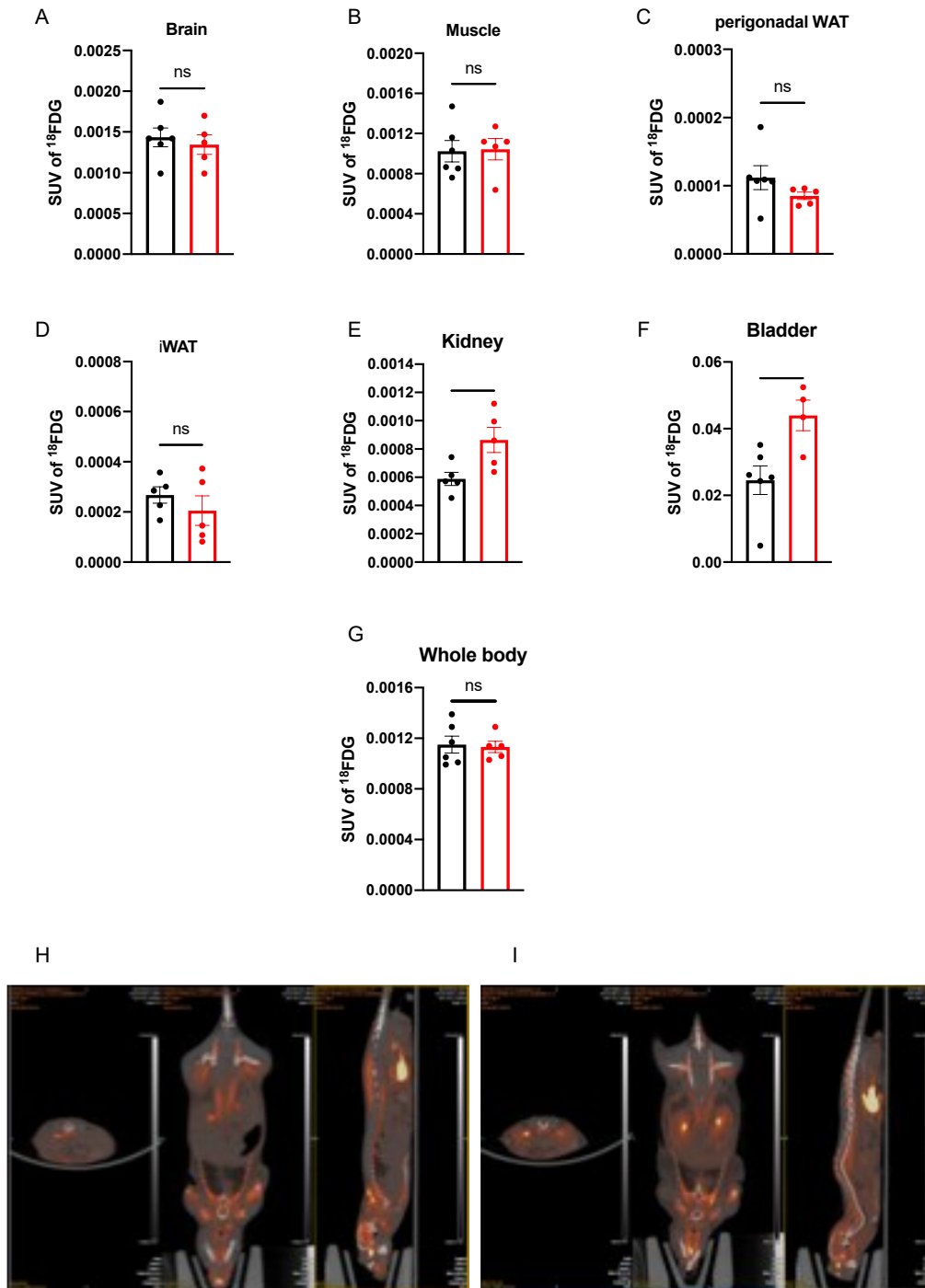


Figure 41. Quantification de standard uptake value de 2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous acidose métabolique chronique après 6.5 mois de traitement

Une injection intrapéritonéale de <sup>18</sup>F-FDG de 0.5MBq/g de souris est réalisée. Après 45 minutes, les acquisitions en Tomographie par Émission de Positons (TEP) sont réalisées puis les acquisitions en tomодensitométrie (TDM). L'analyse a été faite sur **A.** le cerveau, **B.** le muscle, **C.** le tissu adipeux blanc périgonadique, **D.** le tissu adipeux blanc inguinal, **E.** les reins, **F.** la vessie et **G.** le corps entier de la souris. Superposition d'une acquisition de TEP et TDM d'une souris **H.** contrôlé et **I.** acidotique. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié : \*P < 0.05 vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne ± SEM (n = 6 pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique).

Au niveau du cerveau, aucune différence significative n'est observée dans l'hippocampe, que ce soit la région gauche ( $0.993 \pm 0.026$  SUV vs  $0.967 \pm 0.025$  SUV chez les souris contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.484$  ; Figure 42 A, D-E) ou droite ( $1.015 \pm 0.032$  SUV vs  $0.979 \pm 0.032$  SUV pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.456$  ; Figure B, D-E). La zone du cortex somato-sensoriel gauche chez les souris sous AM chronique après 6.5 mois de traitement montre une augmentation significative de capture de  $^{18}\text{F}$ FDG ( $1.073 \pm 0.012$  SUV vs  $1.044 \pm 0.00572$  SUV pour les contrôles ; Unpaired t-test,  $P = 0.0482$ , Figure 42 C,

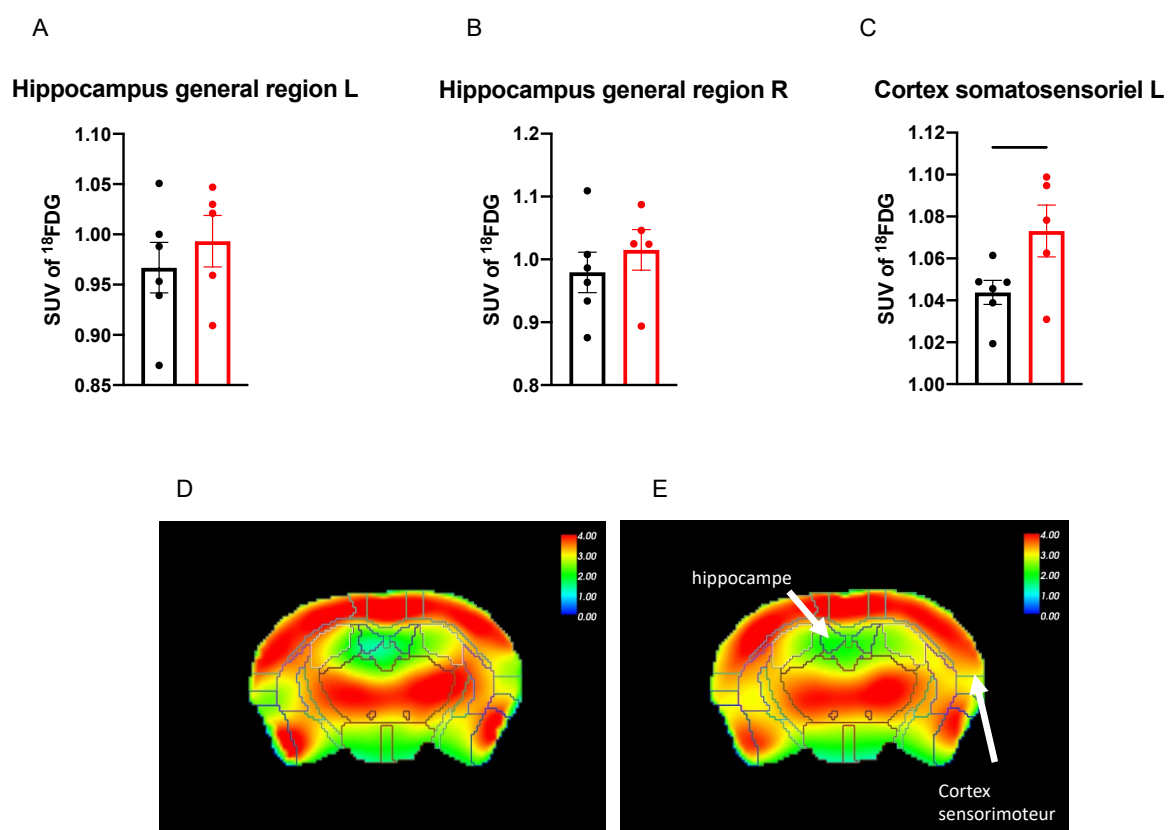


Figure 42. Quantification de standard uptake value de 2-Deoxy-2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroglucose dans certains organes et dans le corps des souris contrôles et sous AM chronique après 6.5 mois de traitement

D, E).

Une injection intrapéritonéale de  $^{18}\text{F}$ FDG de 0.5MBq/g de souris est réalisée. Après 45, les acquisitions en Tomographie par Émission de Positons (TEP) sont réalisées puis les acquisitions en tomodensitométrie (TDM). L'analyse a été faite sur A. La région gauche de l'hippocampe, B. La région droite de l'hippocampe et C. le cortex somatosensoriel gauche. Image moyenne de TEP des souris D. contrôles et E. sous AM chronique. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié : \* $P < 0.05$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n= 6 pour les contrôles et 5 pour les sous AM chronique).

## 8.1. Conclusion

Après 17 jours de traitement en  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , les souris sous AM chronique ne présentent aucune différence de capture de glucose dans les organes périphériques et/ou au niveau du corps entier. Nous observons une tendance à la hausse mais non significative dans les reins et la vessie, corrélant avec la glycosurie (Figure 34) chez les souris sous AM chronique comparé aux contrôles après 14 jours de traitement. Nous pouvons donc en conclure que l'amélioration de la tolérance au glucose observée durant nos ipGTT après 7 et 14 jours de traitement n'est pas due à une augmentation de la capture de glucose. La présence de glucose marqué dans les reins et la vessie des souris sous AM chronique est augmentée significativement après 6.5 mois de traitement, ce qui corrèle parfaitement avec les observations histologiques des reins chez nos souris traitées ainsi que la réduction protéique des co-transporteurs de glucose, SGLT1 et SGLT2.

De plus, au niveau cérébral, nous n'observons pas de différence significative entre les deux groupes mais nous avons trouvé une augmentation de la capture de  $^{18}\text{F}$ FDG dans la zone du cortex somato-sensorielle gauche chez nos souris sous  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Cette zone permet la réception des informations provenant de la surface du corps par l'intermédiaire des neurones relais et sensitifs.

## 9. L'acidose métabolique chronique augmente la régulation des procédés métaboliques et de la phosphorylation oxydative dans les cellules rénales

Nous avons ensuite procédé à un séquençage d'ARN (RNAseq) sur le rein total de souris contrôles et sous AM chronique, entre 3 et 60 jours de la cinétique. Chez les souris sous AM chronique, les gènes dont le niveau d'expression est augmenté sont majoritairement enrichis dans les voies de signalisations associées à la fonction mitochondriale. En effet, lors de l'analyse des données du séquençage, nous avons mis en évidence un enrichissement significatif des gènes associés au cycle tricarboxylique (TCA), mais aussi à l'organisation mitochondriale, à l'élongation traductionnelle de la mitochondrie, à la biogenèse mitochondriale, à son transport et à la phosphorylation oxydative sur plusieurs temps de la cinétique (Figure 43).

Dès 3 jours de traitement, nous avons observé chez les souris sous AM chronique, une augmentation du niveau d'expression et de l'enrichissement des gènes impliqués dans la traduction ( $\log_{10}(p) = 89.205$  ; Figure 43 A) mais aussi dans le cycle TCA et le transport d'électrons respiratoire ( $\log_{10}(p) = 73.314$  ; Figure 43 A), l'organisation mitochondriale ( $\log_{10}(p) = 44.339$  ; Figure 43 A), l'élongation traductionnelle de la mitochondrie ( $\log_{10}(p) = 39.255$  ; Figure 43 A), les procédés cataboliques et biosynthétiques des petites molécules ( $\log_{10}(p) = 20.292$  et  $10.995$ , respectivement = Figure 43 A), du métabolisme carbonique ( $\log_{10}(p) = 20.262$  ; Figure 43 A), de la biogenèse et du transport mitochondrial ( $\log_{10}(p) = 13.733$  et  $11.489$ , respectivement) et du métabolisme du pyruvate ( $\log_{10}(p) = 10.886$  ; Figure 43 A).

Après 3 jours de traitement, la majorité des gènes dont le niveau d'expression est diminué, participe à la régulation du génome. Nous observons qu'après 3 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , les souris sous AM chronique présentent une diminution de l'expression des gènes enrichis dans l'organisation de la chromatine ( $\log_{10}(p) = -14.111$  ; Figure 43 B) mais aussi

dans le cycle GTPase de la famille Rho ( $\log_{10}(p) = -11.161$  ; Figure 43 B) et la modification des histones ( $\log_{10}(p) = -9.558$  ; Figure 43 B). De plus, les souris sous AM chronique montrent clairement une diminution de l'expression des gènes enrichis impliqués dans la traduction des protéines. Nous observons notamment une diminution du niveau d'expression de la voie de signalisation de la transcription de la matrice d'ADN ( $\log_{10}(p) = -9.448$  ; Figure 43 B), de la modification des acides aminés peptidyl ( $\log_{10}(p) = -8.310$  ; Figure 43 B), de la régulation de la transduction contrôlée par les petites GTPase ( $\log_{10}(p) = -7.944$  ; Figure 43 B), de la régulation de l'activité des GTPase ( $\log_{10}(p) = -7.942$  ; Figure 43 B) de la régulation des procédés métaboliques de l'ARNm ( $\log_{10}(p) = -7.832$  et des procédés cataboliques des protéines ( $\log_{10}(p) = -7.755$  ; Figure 43 B). De plus, nous observons une diminution du niveau d'expression des gènes enrichis dans la régulation des procédés métaboliques lipidiques ( $\log_{10}(p) = -8.343$  ; Figure 43 B).

Après 7 jours de traitement, les reins des souris sous AM chronique montrent encore une augmentation du niveau d'expression des gènes enrichis dans la fonction mitochondriale, en particulier les gènes participant à la phosphorylation oxydative ( $\log_{10}(p) = 71.827$  ; Figure 43 C), mais aussi la biogenèse et l'élongation traductionnelle de la mitochondrie ( $\log_{10}(p) = 15.009$  et  $12.367$ , respectivement ; Figure 43 C). De plus, les gènes participant à la formation des protéines ribosomales cytoplasmiques montrent une augmentation de leur niveau d'expression dans les reins des souris traitées ( $\log_{10}(p) = 71.652$  ; Figure 43 C). Les gènes impliqués dans le métabolisme de la glutathionne présentent également une augmentation de leur niveau d'expression dans les reins des souris sous AM chronique après 7 jours de traitement ( $\log_{10}(p) = 12.821$  ; Figure 43 C).

De la même façon à J3, les gènes montrant une diminution de leur niveau d'expression sont enrichis dans les voies de signalisation impliquant la régulation du génome et de la transcription. La modification des histones et leur régulation ( $\log_{10}(p) = -14.575$  et -

9.180, respectivement ; Figure 43 D), l'organisation de la chromatine ( $\log_{10}(p) = -13.980$  ; Figure 43 D), les signalisations de GTPases de la famille des Rho ( $\log_{10}(p) = -10.077$  ; Figure 43 D) et la régulation de la transduction des signaux médiée par les petites GTPases ( $\log_{10}(p) = -8.538$  ; Figure 43 D) présentent une diminution de leur niveau d'expression dans les cellules rénales des souris sous AM chronique comparée aux contrôles. De plus, comme à J3, la transcription de la matrice d'ADN est également un processus qui semble présenter une activité plus faible ( $\log_{10}(p) = -8.423$  ; Figure 43 D).

Quatorze jours après le début de la cinétique, nous observons une augmentation du niveau d'expression des gènes enrichis dans la voie de signalisation des procédés cataboliques des acides carboxyliques ( $\log_{10}(p) = 11.301$  ; Figure 43 E), dans le transport des anions organiques ( $\log_{10}(p) = 7.114$  ; Figure 43 E), dans l'angiogenèse ( $\log_{10}(p) = 6.955$  ; Figure 43 E), dans le transport transmembranaire médié par les SLC (famille des transporteurs de solutés ;  $\log_{10}(p) = 5.484$  ; Figure 43 E), dans la biosynthèse des petites molécules ( $\log_{10}(p) = 5.345$  ; Figure 43 E) et dans le métabolisme des acides monocarboxyliques ( $\log_{10}(p) = 5.215$  ; Figure 43 E).

Les voies de signalisations présentant une plus faible activité après 14 jours de traitement sont les procédés cataboliques des petites molécules ( $\log_{10}(p) = -10.649$  ; Figure 43 F) mais aussi les procédés métaboliques des composants organiques hydroxy ( $\log_{10}(p) = -10.437$  ; Figure 43 F) et des acides aminés cellulaires modifiés ( $\log_{10}(p) = -7.964$  ; Figure 43 F). De plus, les gènes impliqués dans la biosynthèse des petites molécules présentent aussi une diminution de leur niveau d'expression dans les reins des souris sous AM chronique ( $\log_{10}(p) = -7.388$  ; Figure 43 F). Le métabolisme des vitamines est aussi altéré chez les souris sous AM chronique car le niveau d'expression des gènes impliqués dans son métabolisme est également aussi diminué ( $\log_{10}(p) = -7.018$  et  $-5.458$  ; Figures 43 F). Enfin, la

voie de signalisation de localisation des lipides et elle aussi diminuée par l'AM chronique, comparé aux contrôles ( $\log_{10}(p) = 6.157$  ; Figure 43 F).

A 30 jours de traitement, nous observons une augmentation du niveau d'expression des gènes enrichis dans le métabolisme et fonction mitochondriale car après analyse du séquençage, une augmentation du niveau d'expression des gènes du catabolisme des acides carboxyliques ( $\log_{10}(p) = 12.980$  ; Figure 43 G) mais aussi du métabolisme carbonique ( $\log_{10}(p) = 12.391$  ; Figure 43 G) et des acides monocarboxyliques ( $\log_{10}(p) = 11.404$  ; Figure 43 G) est visible. De plus, nous observons une augmentation du niveau d'expression des gènes enrichis dans le transport transmembranaire médié par les SLC ( $\log_{10}(p) = 9.754$  ; Figure 43 G) et le métabolisme du pyruvate ( $\log_{10}(p) = 9.017$  ; Figure 43 G), tous deux impliqués dans l'ammoniagenèse et la néoglucogenèse augmentée en cours d'AM. La fonction mitochondriale semble être activée dans le rein des souris sous AM chronique car le niveau d'expression des gènes associés au cycle TCA est augmentée comparé aux souris contrôles ( $\log_{10}(p) = 7.794$  ; Figure 43 G). De plus, les procédés métaboliques des triglycérides ( $\log_{10}(p) = 5.822$  ; Figure 43 G) et des lipides ( $\log_{10}(p) = 5.798$  ; Figure 43 G) comprenant leur biosynthèse, montrent aussi une augmentation de leur niveau d'expression dans le rein des souris traitées.

En dépit de ceci, le niveau d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés cellulaires est diminuée après 30 jours chez les souris sous AM chronique ( $\log_{10}(p) = -11.411$  ; Figure 43 H). Ce dernier est impliqué dans la formation de DRO car une diminution du métabolisme de la glutamine, de la proline et de l'arginine (3 voies de signalisations réduites en AM observé par le RNAseq) permet une surproduction de DRO d'origine mitochondriale (Kuo *et al.*, 2021).

Après 60 jours de traitement, nous observons un décalage métabolique car les gènes enrichis dans la modification des histones ( $\log_{10}(p) = 13.334$  ; Figure 43 I) ainsi que la



modification des acides aminés peptidyl et ( $\log_{10}(p) = 10.917$  ; Figure 43 I) et l'organisation des chromatines ( $\log_{10}(p) = 10.136$  ; Figure 43 I) présentent un niveau d'expression augmenté alors que précédemment, l'expression des gènes dans ces voies de signalisations étaient à la baisse.

De plus, les voies de signalisations précédemment augmentées sont, après 60 jours, diminuées chez les souris sous AM chronique. Le niveau d'expression des gènes enrichis dans la translation de l'ARN dans le rein des souris traitées est diminuée ( $\log_{10}(p) = -25.073$  ; Figure 43 J) ainsi que la dégradation ubiquitine-dépendante de la cycline D ( $\log_{10}(p) = -10.339$  ; Figure 43 J), la voie de signalisation NF- $\kappa$ b non-canoniale ( $\log_{10}(p) = -9.629$  ; Figure 43 J), la biosynthèse des petites molécules ( $\log_{10}(p) = -6.377$  ; Figure 43 J), assemblage des ribosome ( $\log_{10}(p) = -6.148$  ; Figure 43 J) et l'élongation de la translation mitochondriale ( $\log_{10}(p) = -5.663$  ; Figure 43 J).

Ces analyses ont donc montré que les gènes dont le niveau d'expression est augmenté dans les reins des souris sous AM chronique sont enrichis dans de nombreuses voies de signalisations associées à plusieurs procédés métaboliques tout au long de notre étude. Ces voies de signalisations sont résumées par les analyses d'enrichissement parentales Gene Ontology (Figure 43 K).

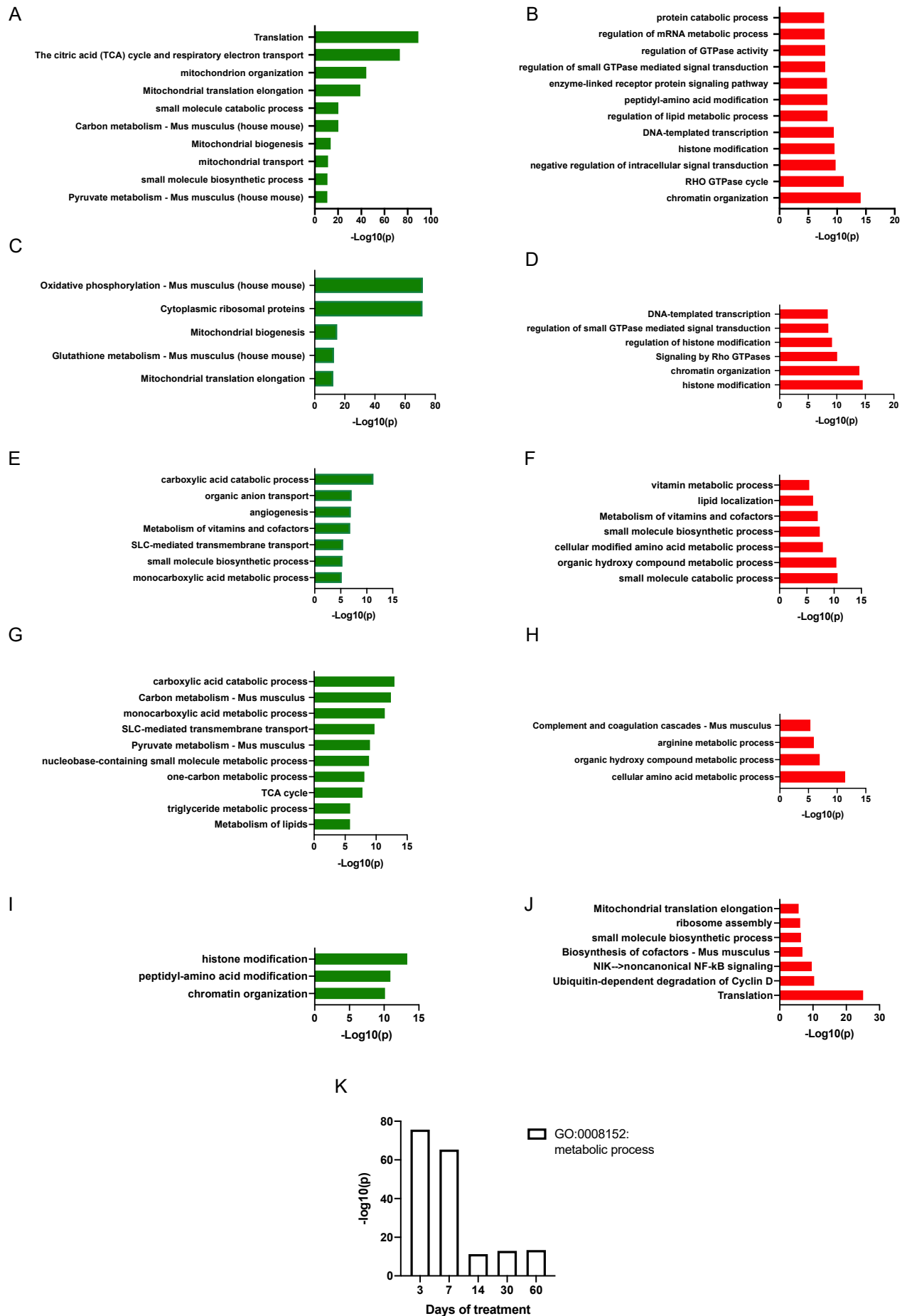


Figure 43. L'activité mitochondriale, le métabolisme oxydatif et les voies de signalisations cataboliques sont augmentées dans le rein des souris sous acidose métabolique chronique

Enrichissement fonctionnel des résultats du RNAseq après **(A-B)** 3 jours de traitement chez les souris **A.** contrôles et **B.** sous AM chronique. Enrichissement fonctionnel des résultats du RNAseq après **(C-D)** 7 jours de traitement chez les souris **C.** contrôles et **D.** sous AM chronique. Enrichissement fonctionnel des résultats du RNAseq après **(E-F)** 3 jours de traitement chez les souris **E.** contrôles et **F.** sous AM chronique. Enrichissement fonctionnel des résultats du RNAseq après **(G-H)** 30 jours de traitement chez les souris **G.** contrôles et **H.** sous AM chronique. Enrichissement fonctionnel des résultats du RNAseq après **(I-J)** 60 jours de traitement chez les souris **I.** contrôles et **J.** sous AM chronique. **K.** Analyses d'enrichissements parentales réalisées avec les données de Gene Ontology représentant les procédés métaboliques entre 3 et 60 jours de traitement. Les données ont été analysées par Metascape et les valeurs de  $\log_{10}(p)$  les plus élevées ont été présentées. Les données sont représentées sous la forme :  $\text{Log}_{10}(p)$ ,  $n=4$  par groupe

## 9.1. Conclusion

L'analyse du séquençage d'ARN montre une augmentation de l'activité mitochondriale, de la phosphorylation oxydative et des procédés cataboliques dans les reins des souris sous AM chronique entre 3 et 30 jours de traitement. Après 60 jours, une augmentation de la modification des histones et de l'organisation des chromatines est visible. De plus, nous observons une augmentation des procédés métaboliques entre 3 et 60 jours de traitement, avec une forte augmentation entre 3 et 7 jours.

## 10. Évaluation du phénotype des souris sous acidose métabolique chronique soumises à un régime riche en graisse

### 10.1. La tolérance au glucose est fortement améliorée chez les souris sous acidose métabolique chronique sous régime riche en graisse

Chez les souris sous AM chronique soumises à un régime riche en graisse (HF), nous observons la même tendance que chez les souris sous AM chronique soumises à un régime standard (CD). Comme le montre la figure 44 A, dès 7 jours de traitement, la glycémie basale des souris sous AM chronique est plus faible que celle des souris contrôles HF ( $111.25 \pm 7.348$  mg/dL vs  $138.25 \pm 5.123$  mg/dL pour les contrôles ; unpaired t-test,  $P = 0.00928$ ). Malgré cette différence de glycémie à jeun, les deux groupes répondent de manière similaire 15 minutes ( $438.37 \pm 13.296$  mg/dL vs  $430 \pm 29.699$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.8$  ; Figure 44 A) et 30 minutes après le bolus de glucose ( $517.75 \pm 12.653$  mg/dL vs  $542 \pm 21.368$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.345$  ; Figure 44 A). Les souris contrôles ont une glycémie qui continue d'augmenter après 45 minutes mais la glycémie des souris sous AM chronique reste stable ( $517.25 \pm 13.437$  mg/dL vs  $582.5 \pm 10.048$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00164$  ; Figure 44 A). Cet écart se creuse car les souris sous AM chronique métabolisent le glucose injecté plus rapidement que les souris contrôles et une différence significative de la glycémie est visible après 60 minutes ( $469.4 \pm 17.323$  mg/dL vs  $566.4 \pm 17.226$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00139$  ; Figure 44 A) mais aussi après 90 minutes ( $416.6 \pm 121.656$  mg/dL vs  $524.6 \pm 23.006$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00416$  ; Figure 44 A) et 120 minutes ( $365.1 \pm 18.406$  mg/dL vs  $474.5 \pm 27.849$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00551$  ; Figure 44 A). L'AUC reflète la différence significative de tolérance au glucose car chez les souris sous AM

chronique, cette dernière est significativement inférieure à celle des souris non traitées ( $51472 \pm 1314$  mg/dL x 120 min vs  $59954 \pm 1946$  mg/dL x 120 min ; unpaired t-test,  $P = 0.0028$  ; Figure 44 B). L'amélioration de la tolérance au glucose n'est pas due à une modification de l'insuline chez nos souris sous régime riche en graisse, car au contraire, une différence significative à la baisse de la concentration d'insuline est observée chez les souris à jeun ( $71.42 \pm 8.459$  pmol/L vs  $141.3 \pm 20.241$  pmol/L pour les souris contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.016$  ; Figure 44 C) sous AM (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0005$  ; Figure 44 C), comparée aux souris contrôles. Le pic insulinémique des souris contrôles est atteint 15 minutes après l'injection de glucose mais la glycémie des souris contrôles ne descend qu'après 45 minutes post injection de glucose ( $101.4 \pm 5.884$  pmol/L vs  $165.3 \pm 12.937$  pmol/L pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00288$  ; Figure 44 C). Au contraire, les souris sous AM chronique atteignent la même concentration plasmatique que les souris contrôles après 30 minutes post-injection de glucose et leur glycémie descend après leur pic insulinémique.

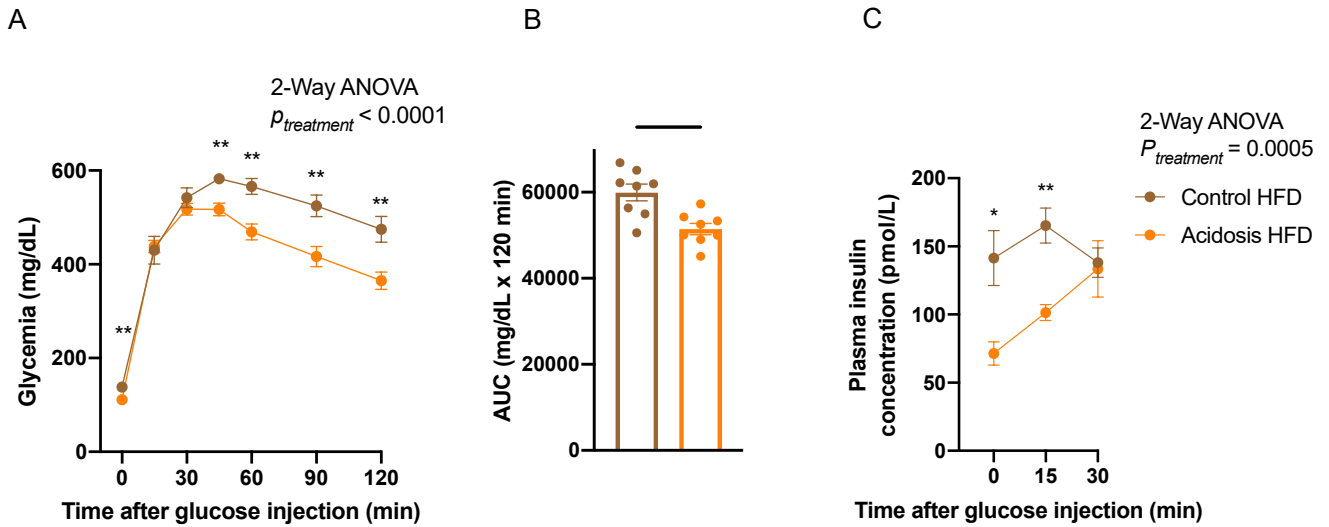


Figure 44. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement sous régime riche en graisse

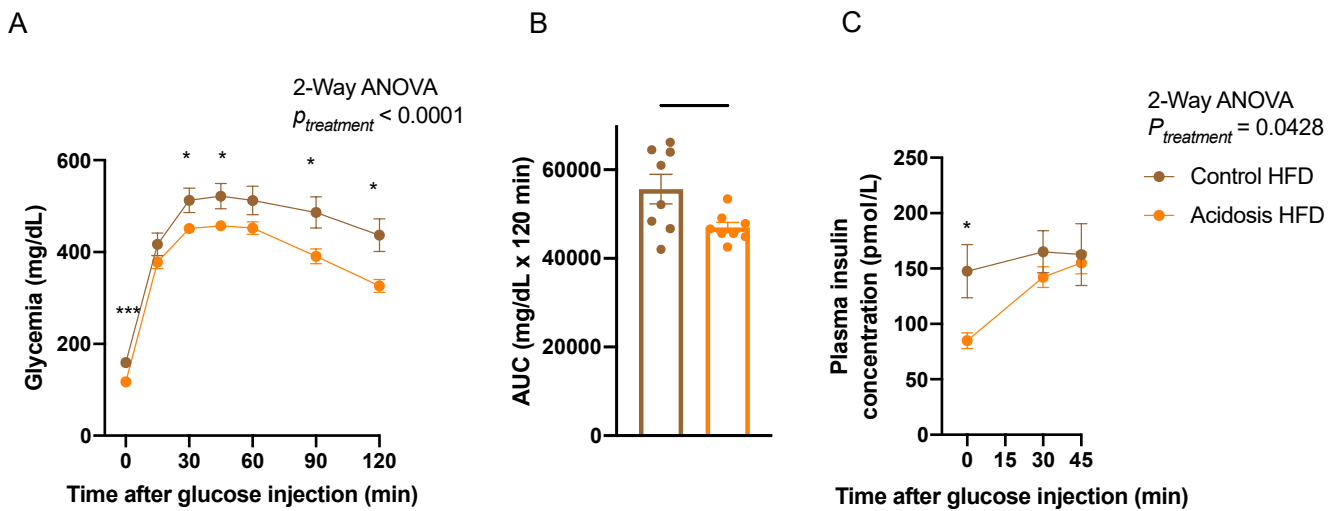
**A.** Glycémie des souris contrôles (rond marron) et sous AM chronique (rond orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) :  $**P < 0.01$  vs contrôles, (n = 8 souris par groupe). **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimée en mg/dLx120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié,  $**P < 0.01$ , (n = 8 souris par groupe). **C.** Concentration d'insuline plasmatique avant et 15 et 30 minutes après injection de glucose. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) :  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs contrôles. (n = 7 souris par groupe).

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM.

Après 30 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , ce phénotype perdure cette amélioration de la tolérance au glucose (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 45 A) est toujours visible. La glycémie à jeun des souris sous AM chronique est significativement plus faible que celle des souris contrôles ( $117.25 \pm 5.502$  mg/dL vs  $159 \pm 8.069$  mg/dL pour les contrôles, multiple t-test,  $P = 0.00077$  ; Figure 45 A). Après injection de glucose, les souris contrôles et sous AM chronique répondent de manière similaire ( $378.1 \pm 14.221$  mg/dL vs  $416.9 \pm 24.440$  mg/dL pour les souris contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.192$  ; Figure 45 A). Les souris sous AM

répondent plus rapidement au bolus de glucose, en effet, une clairance plus rapide comparé aux souris contrôles est visible (T30 ;  $451.2 \pm 9.319$  mg/dL vs  $512.7 \pm 26.262$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0445$  ; Figure 45 A). Cet écart est maintenu après 45 minutes ( $457.4 \pm 9.825$  mg/dL vs  $521.7 \pm 27.415$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0442$  ; Figure 45 A) et se creuse encore plus après 90 minutes ( $390.5 \pm 16.367$  mg/dL vs  $486.1 \pm 34.163$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0243$  ; Figure 45 A) et 120 minutes ( $326.4 \pm 14.244$  mg/dL vs  $436.5 \pm 35.997$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0130$  ; Figure 45 A). De plus, L'AUC des souris sous AM est significativement plus faible comparé à l'AUC des souris contrôles ( $46967 \pm 1149$  mg/dL x 120 min vs  $55615 \pm 3321$  mg/dL x 120 min pour les contrôles ; welch's t-test,  $P = 0.0371$  ; Figure 45 B), confirmant donc les effets du traitement sur la tolérance au glucose de souris. La sécrétion d'insuline des souris sous AM chronique est inférieure à celle des souris contrôles après 30 jours de traitement au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0428$  ; Figure 45 C) De plus, l'insulinémie à jeun est significativement plus faible chez les souris sous AM chronique, alors que la glycémie est elle aussi plus faible ( $84.9 \pm 7.106$  pmol/L vs  $147.6 \pm 23.908$  pmol/L pour les souris contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0308$  ; Figure 45 C).





**Figure 45. Évaluation de la tolérance au glucose chez les souris sous acidose métabolique chronique après 30 jours de traitement sous régime riche en graisse**

**A.** Glycémies des souris contrôles (rond marron) et sous AM chronique (rond orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glucose de 2g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) :  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  vs contrôles, (n = 8 souris par groupe). **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimée en mg/dLx120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié,  $*P < 0.05$ , (n = 8 souris par groupe). **C.** Concentration d'insuline plasmatique avant et 15 et 30 minutes après injection de glucose. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons multiples par paire (Fisher LSD) :  $*P < 0.05$ , vs contrôles. (n = 6 souris par groupe).

Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM.

## 10.2. L'acidose métabolique chronique n'altère pas la sensibilité à l'insuline chez les souris sous régime riche en graisse

Nous avons ensuite réalisé des tests de tolérance à l'insuline chez les souris contrôles et sous AM chronique nourries par un régime HF, pour analyser la réponse de nos souris traitées face à une charge insulinémique. Le phénotype que nous avons chez nos souris sous régime standard sous acidose est le même que celui des souris sous HF traitées en NH<sub>4</sub>Cl. Après 21 jours de traitement, les souris contrôles et sous AM chronique nourries par un régime HF ont la même réponse glycémique face à la charge d'insuline intrapéritonéale (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.4338$  ; Figure 46 A) ce qui était aussi observable avec les AUC ( $18192 \pm 1153$  mg/dL x 120 min vs  $18221 \pm 1034$  mg/dL x 120 min ; Unpaired t-test,  $P = 0.986$  ; Figure 46 B).

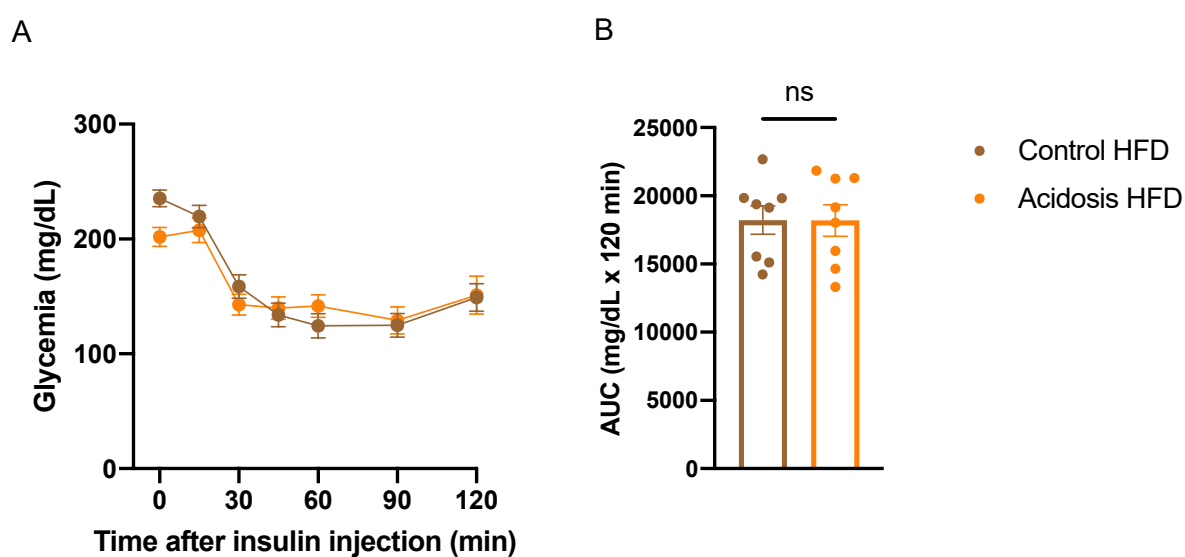


Figure 46. Évaluation de la tolérance à l'insuline des souris sous acidose métabolique chronique après 21 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'insuline de 0,75g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD). **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimée en mg/dL x 120 min. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié, *ns* vs les souris contrôles, ( $n = 8$  souris par groupe).

Après 40 jours de traitement, nous n’observons aucune différence significative de glycémie entre les deux groupes après injection d’insuline (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.435$  ; Figures 47).

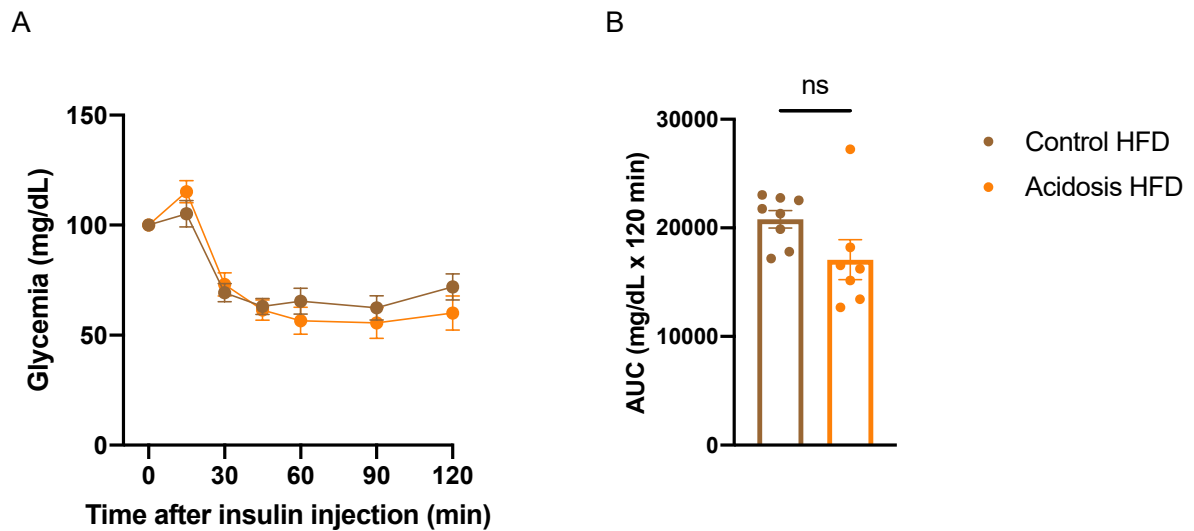


Figure 47. Évaluation de la tolérance à l’insuline des souris sous acidose métabolique chronique après 40 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d’insuline de 0,75g/kg, exprimées en mg/dL. L’analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d’un test de comparaisons par paire (Fisher LSD). **B.** L’aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimée en mg/dL x 120 min. L’analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié, *ns* vs les souris contrôles, (n = 8 souris par groupe).

### 10.3. La production endogène de glucose hépatique est diminuée chez les souris sous acidose métabolique chronique soumises à un régime riche en graisse

Le phénotype est préservé sous régime riche en graisse, car après 60 jours de traitement, nous observons une PEG hépatique plus faible chez les souris sous AM chronique (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 48 A). De plus, la glycémie après un jeûne chez les souris sous AM chronique est significativement plus faible que celle des souris contrôles ( $107.4 \pm 8$  mg/dL vs  $151.7 \pm 10.783$  mg/dL pour les contrôles, multiple t-test,  $P = 0.00521$  ; Figure 48 A) et cette différence significative est maintenue après 15 minutes ( $165.5 \pm 6.322$  mg/dL vs  $192.3 \pm 8.071$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.0206$  ; Figure 48 A), 30 minutes ( $162.6 \pm 5.081$  mg/dL vs  $197.3 \pm 8.178$  mg/dL pour les contrôles ; multiple t-test,  $P = 0.00292$  ; Figure 48 A), et 90 minutes post-injection ( $209.4 \pm 9.606$  mg/dL vs  $246.5 \pm 12.756$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.0356$  ; Figure 48 A). L'AUC de la tolérance à l'insuline des souris sous AM chronique est significativement plus faible comparée aux souris contrôles ( $21845 \pm 844.9$  mg/dL x 120 min vs  $25855 \pm 1122$  mg/dL x 120 min, unpaired t-test,  $P = 0.0127$  ; Figure 48 B).

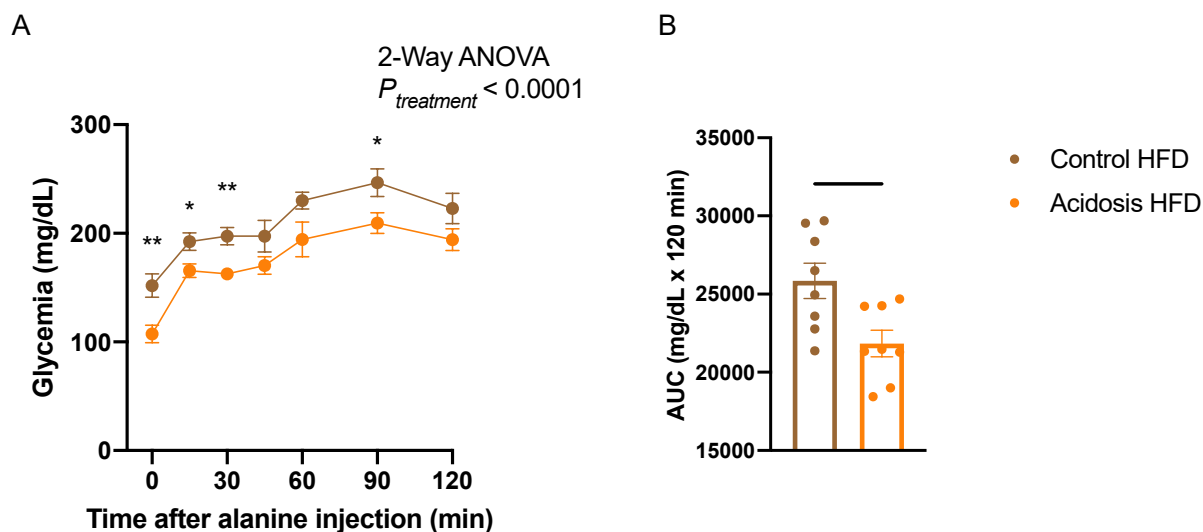


Figure 48. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 60 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'alanine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié :  $*P < 0,05$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par groupe).

La capacité réduite de PEG hépatique chez les souris en AM chronique est maintenue après 90 jours de traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 49 A). A jeun, la glycémie des souris sous AM chronique est toujours plus faible que celle des souris contrôles ( $104.1 \pm 3.082$  mg/dL vs  $166 \pm 10.299$  mg/dL ; multiple t-test,  $P = 0.000071$  ; Figure 49 A) et les souris traitées ont une glycémie maximale de  $207.7 \pm 12.003$  (comparée à  $259.3 \pm 32.253$  mg/dL pour les contrôles ; Multiple t-test,  $P = 0.139$ , Figure 49 A) après 120 minutes) alors que les souris contrôles ont un pic de concentration plasmatique de glucose atteint après 90 minutes post-injection d'alanine ( $267 \pm 13.540$  mg/dL comparé à  $202.9 \pm 21.732$  mg/dL pour les souris traitées ; multiple t-test,  $P = 0.0351$  ; Figure 49 A). Cette

réduction de la néoglucogenèse hépatique chez nos souris sous HF est aussi reflétée par l'AUC, qui est significativement plus faible chez les souris sous acidose ( $22167 \pm 1603$  mg/dL x 120 min vs  $28779 \pm 1015$  mg/dL x 120 min pour les contrôles, unpaired t-test,  $P = 0.0065$  ; Figure 49 B).

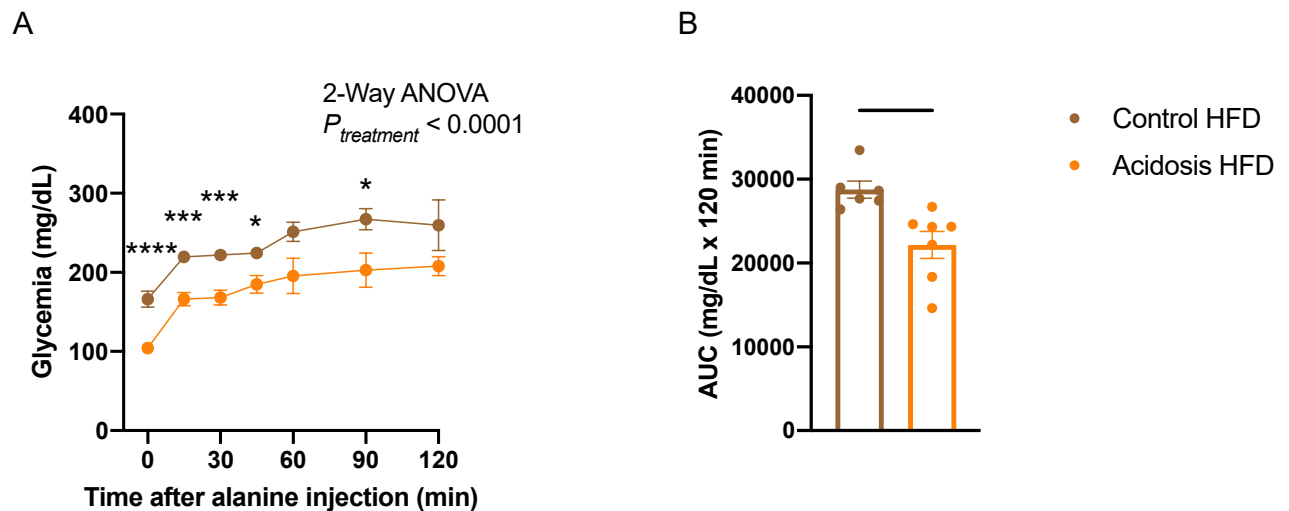


Figure 49. Évaluation de la tolérance à l'alanine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 90 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection d'alanine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$ ,  $***P < 0,001$ ,  $****P < 0,0001$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié :  $**P < 0,01$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n=6 pour les contrôles et 7 pour les sous AM chronique).

De plus, les souris sous AM chronique sous régime HF présentent une PEG extra-hépatique réduite après 7 jours de traitement (ANOVA à 2 facteurs,  $P = 0.0072$  ; Figure 50 A) avec une glycémie à jeun semblable ( $130 \pm 7.787$  mg/dL vs  $146.5 \pm 10.027$  mg/dL pour les

contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.493$  ; Figure 50 A). Malgré ceci, nous observons un écart significatif de la glycémie entre les deux groupes après 90 minutes post-injection car la PEG extra-hépatique des souris contrôles perdure entre T60 et T90 alors que chez les souris sous AM chronique, le glucose produit par l'injection de glutamine est utilisé à partir de T60 (T90 ;  $233.1 \pm 14.941$  m/dL vs  $291 \pm 27.986$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.0176$  ; Figure 50 A). Cette différence n'est pas reflétée par l'AUC ( $10073 \pm 780.3$  mg/dL x 120 min vs  $11598 \pm 1689$  mg/dL x 120 min ; unpaired t-test,  $P = 0.426$  ; Figure 50 B). Ce phénotype est aussi présent après 14 jours de traitement chez les souris sous AM chronique (données non présentées).

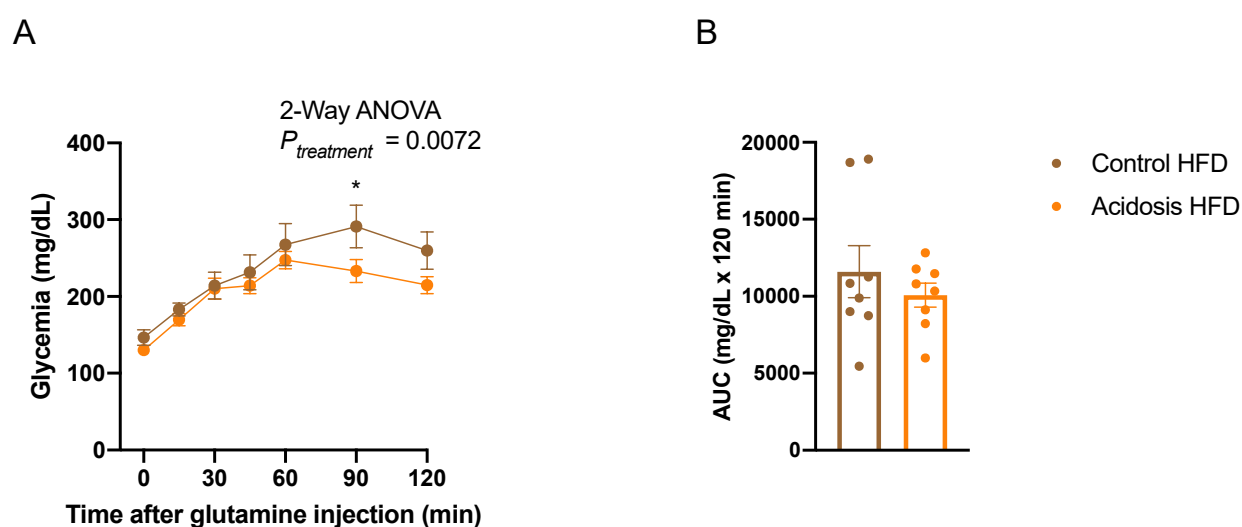


Figure 50. Évaluation de la tolérance à la glutamine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 7 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glutamine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié : *ns* vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n=8 par groupe).

Après 120 jours de traitement, les souris sous AM chronique nourries par un régime HF ont une PEG extra-hépatique significativement inférieure à celle des souris contrôles (ANOVA à 2 facteurs,  $P < 0.0001$  ; Figure 51 A). Suite à l'injection de glutamine, les souris sous AM chronique ont une glycémie qui augmente de 138.25 mg/dL entre la glycémie à jeun et le pic de glycémie alors que les souris contrôles présentent une glycémie qui augmente de 199 mg/dL. La diminution de la PEG extra-hépatique est plutôt flagrante en comparant les glycémies des 2 groupes temps par temps car dès 15 minutes post-injection, une différence significative est visible ( $185 \pm 7.517$  mg/dL vs  $251 \pm 16.801$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.0437$  ; Figure 51 A). Cette différence devient plus évidente après 30 minutes ( $206.4 \pm 12.660$  mg/dL vs  $289.6 \pm 23.5$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.0114$  ; Figure 51 A), mais aussi après 45 minutes ( $225 \pm 16.384$  mg/dL vs  $333.5 \pm 27.921$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.00112$  ; Figure 51 A) et 60 minutes ( $246.1 \pm 15.827$  mg/dL vs  $364.9 \pm 37.309$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.000388$  ; Figure 51 A). Après 90 minutes post-injection, les souris contrôles montrent une clairance de glucose alors que la glycémie des souris sous AM chronique augmente légèrement ( $261.8 \pm 23.168$  mg/dL vs  $332.9 \pm 38.355$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.0359$  ; Figure 51 A) pour enfin se stabiliser après 120 minutes chez les 2 groupes ( $246.6 \pm 21.799$  mg/dL vs  $329.3 \pm 39.489$  mg/dL pour les contrôles ; multiple unpaired t-test,  $P = 0.0151$  ; Figure 51 A). Cette forte diminution de la PEG extra-hépatique chez les souris sous AM chronique est aussi observable *via* l'AUC, car l'aire moyenne de la glycémie des souris traitées est plus faible que celle des souris contrôles ( $10969 \pm 1265$  mg/dL x 120 min vs  $17368 \pm 1270$  mg/dL x 120 min ; unpaired t-test,  $P = 0.0039$  ; Figure 51 B).



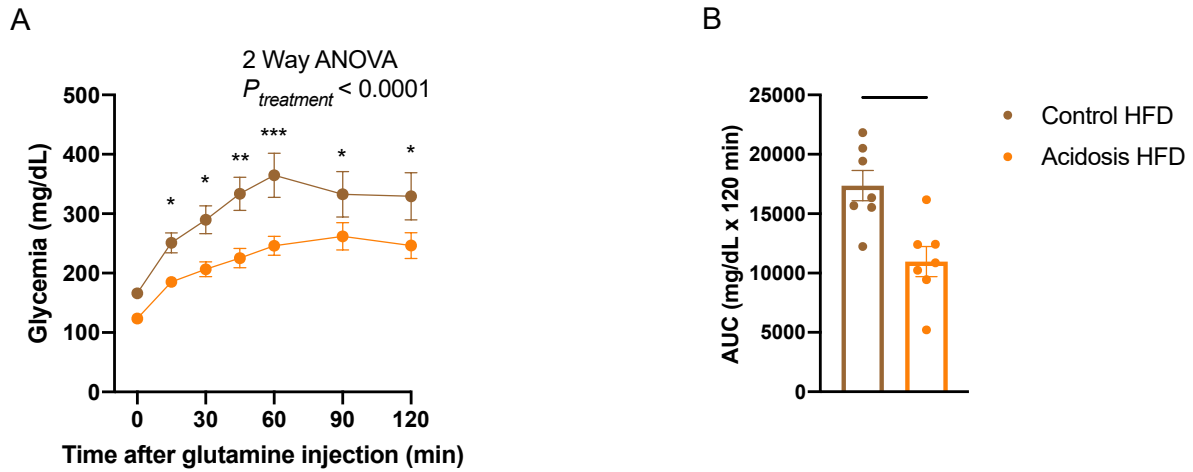


Figure 51. Évaluation de la tolérance à la glutamine chez les souris sous acidose métabolique chronique après 120 jours de traitement sous régime riche en graisse

**A.** Glycémie des souris contrôles (marron) et sous AM chronique (orange) à différents temps (0, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 min) après injection de glutamine de 1g/kg, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de comparaisons par paire (Fisher LSD):  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ ,  $***P < 0,001$  vs les souris contrôles. **B.** L'aire sous la courbe est calculée en soustrayant les glycémies basales à T0, exprimées en mg/dL. L'analyse statistique des données a été réalisée par un test t non apparié :  $**P < 0,01$  vs les souris contrôles. Les données sont représentées sous la forme : moyenne  $\pm$  SEM (n=8 par groupe).

## 10.4. Conclusion

Les souris en AM chronique nourries par un régime HF montrent une amélioration de la tolérance au glucose associée à une diminution de la sécrétion d'insuline et une diminution de la PEG hépatique et extra-hépatique. Ce phénotype observé chez les souris sous HF est assez semblable aux souris sous régime standard, à part la diminution de la sécrétion d'insuline qui constitue une différence majeure entre les deux régimes. La glycémie à jeun significativement plus faible chez les souris sous AM chronique est probablement partiellement due à la baisse de la PEG hépatique et extra-hépatique. De plus, la tolérance au glucose améliorée chez les souris sous AM chronique sous HF, et en particulier, la clairance de glucose plus rapide chez ses dernières, est possiblement due à une sensibilité plus élevée à l'insuline, malgré la baisse de sécrétion de l'hormone.

Chez les souris contrôles, le régime HF provoque classiquement une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie, due en grande partie, à la lipotoxicité et l'inflammation cellulaire induite par le régime riche en graisse. De façon étonnante, les souris en AM chronique sous régime HF ont une concentration à jeun d'insuline semblable aux souris sous régime standard et également un pic insulinémique semblable à ses dernières en cas d'hyperglycémie. Des études plus approfondies sur la sécrétion et la voie de signalisation de l'insuline mais aussi sur la capture de glucose sont nécessaires afin d'étudier comment l'AM chronique chez les souris sous régime HF conduit à une amélioration de la tolérance au glucose sans mise en place d'une résistance à l'insuline associée à une hyperinsulinémie.

## Conclusion et discussion

L'ensemble de nos résultats montre que l'AM chronique chez la souris induit une augmentation de la tolérance au glucose pouvant s'expliquer par une diminution de la néoglucogenèse hépatique, une augmentation globale de la dépense énergétique, une diminution de la réabsorption proximale de glucose via les SGLT et une augmentation de la demande énergétique des cellules rénales. Cet effet ne s'explique ni par une augmentation de la concentration plasmatique d'insuline ni par une augmentation de la sensibilité à l'insuline. (Figure 52).

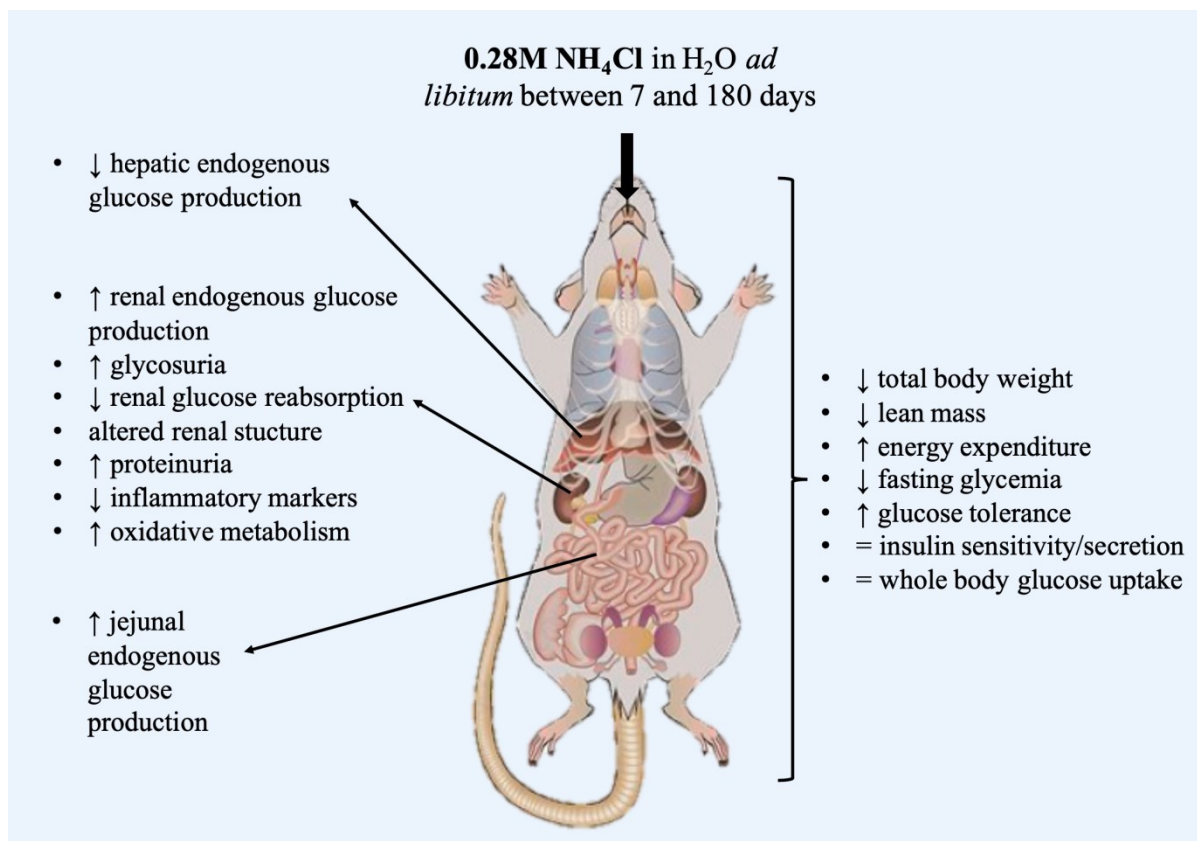


Figure 52. Effets de l'acidose métabolique chronique chez la souris

Cependant, notre étude pose un certain de nombre de questions.

**1) Pourquoi la souris en AM chronique présente-t-elle un profil métabolique et une homéostasie glucidique améliorés alors que la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose sont fortement diminuées en AM aiguë ?**

Pourquoi la souris en AM chronique présente-t-elle un profil métabolique et une homéostasie glucidique améliorés alors que la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose sont fortement diminuées en AM aiguë ? Nous avons montré dans cette étude que l'AM chronique conduit à un profil métabolique « amélioré » opposé au phénotype décrit chez la souris en AM aiguë. Afin de valider notre étude et de comparer notre modèle aux données de la littérature, nous avons dans un premier temps évalué la tolérance au glucose chez les souris en AM aiguë. Nos résultats corroborent les conclusions de la littérature. En effet, nous avons bien observé une diminution de la tolérance au glucose suite à une AM aiguë sévère. Six heures après un gavage oral de 1.5 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , nous avons observé une nette diminution de la tolérance au glucose chez nos souris traitées, mais 15 heures après le même gavage, les souris sous AM chronique présentent le même phénotype que les souris contrôles. Après 3 jours de traitement de 0.28 M, les souris en AM chronique démontrent déjà une amélioration de la tolérance au glucose, suggérant un système compensatoire s'installant très rapidement chez la souris. Ceci peut paraître extrêmement rapide, mais il est bien établi que la souris à un métabolisme accéléré et que 9 jours chez la souris est équivalent à 1 an chez l'Homme en se basant sur la vie complète des deux espèces (Dutta and Sengupta, 2016). Cependant, durant la phase adulte de la souris (à partir de 70 jours de vie) 1 an chez l'Homme est équivalent à 2,6 jours chez la souris (Dutta and Sengupta, 2016). Cela suggère que 6 heures de traitement avec 1.5 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (concentration assez élevée) chez la souris adulte est équivalent à environ 35 jours chez l'Homme. Il est aussi important de noter que la majorité des autres études ont

été faites sur d'autres modèles précliniques, tels que le chien ou le rat, et que les études sur l'Homme ont été établies sur de très courte durée. Un article de Mannon et al. (2021) a montré que chez les rats Zuckers, un traitement de 7 jours au  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.1 M) n'altère ni la sécrétion, ni la sensibilité à l'insuline, corroborant nos résultats. En parallèle, l'équipe de Mannon et al., a aussi évalué la tolérance au glucose chez les rats contrôles et traités au  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Une tendance à une baisse de la glycémie est observée chez les souris sous acidose à T30. Lors d'une AM aiguë, le rein met en place un système adaptatif pour éliminer la charge acide par augmentation de l'ammoniogenèse et production d'endothéline-1, d'angiotensine II et d'aldostérone (Wesson et al., 2020). Ceci conduit à une augmentation du niveau d'expression de transporteurs de protons et de bicarbonate et donc, de la réabsorption de tampons, permettant un système compensatoire afin de maintenir la balance acido-basique. Ceci conduit à une augmentation de l'excrétion d'ammonium globale, mais aussi à une augmentation d'excrétion d'acide par le néphron (Wesson et al., 2020). Ceci est corroboré par d'une part, l'augmentation du niveau d'expression protéique des deux transporteurs NHE-3 et NBCe1-a, observé à J3, qui ensuite diminue après 7 jours, et d'autre part, par une nette augmentation des voies impliquées dans la traduction des protéines dans le rein. Dès lors que la réduction du nombre de néphrons fonctionnels dépasse les capacités d'adaptations du rein, un système « maladaptatif » s'installe et une perte des néphrons viable est visible. Dès J7, nous avons observé une glycosurie associée à une diminution du niveau d'expression protéique de SGLT1 dans les tubules proximaux. Cette diminution est post-traductionnelle, car l'expression d'ARNm de *Slc5a1*, codant la protéine SGLT1, est significativement augmentée après 3 et 7 jours de traitement chez les souris traitées. La diminution de l'expression de SGLT1 et SGLT2 et l'augmentation de GLUT1 et GLUT2 pourraient aussi constituer un système protecteur des tubules proximaux afin de réduire la concentration intracellulaire de glucose et ainsi protéger les cellules tubulaires lors de l'AM chronique,

situation dans laquelle la néoglucogenèse est augmentée. La traduction et translocation de SGLT-2 est principalement contrôlée par HNF-1a (hepatic nuclear factor-1a), qui par son activation due à sa liaison avec l'importin- $\alpha$ 1 favorise l'expression de SGLT-2 (Pontoglio et al., 2000 ; Umino et al., 2018). Il semblerait donc être intéressant d'analyser l'expression de HNF-1a chez nos souris sous AM chronique. L'activité mitochondriale est également très augmentée dans le rein total après 3 jours, ce qui suggère non seulement une augmentation de l'ammoniogenèse et de la néoglucogenèse (associée à l'activation du métabolisme de la glutamine et du pyruvate) mais aussi à une dépense d'énergie rénale plus élevée et donc, potentiellement de glucose. De plus, nous avons observé une diminution de la PEG hépatique, associée à une diminution du niveau d'expression protéique de PEPCK dans le foie, après 7 jours qui perdure sur la durée de la cinétique. Ceci est en accord avec ce qui est aussi décrit par Iles et al. (1977) et Beech et al. (1993). Nos résultats des ipPTTs n'ont pas montré de résultats significatifs, sauf entre J60 et J120, ce qui nous laisse penser que la hausse de la PEG rénale est compensée par la baisse de la PEG hépatique et intestinale. Or, l'abondance de la PEPCK après 90 jours est supérieure chez les souris sous AM chronique. Ceci étant, plusieurs publications ont décrit que l'importance de la PCK1 dans la production endogène de glucose intestinale était moins cruciale que la G6PC (Mithieux et al., 2004). De plus, une étude par Mutel et al., (2011) montre que dans le rein, l'altération de la néoglucogenèse était principalement due à la PCK1 et non la G6PC, contrairement à l'intestin. Une inhibition de la réabsorption rénale de glucose pourrait compenser l'augmentation de la PEG rénale. Le glucose produit par le tubule proximal au cours de l'AM passe via les transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT2 dans les capillaires péri-tubulaires et retourne dans la circulation sanguine générale où est capturé via GLUT1 par les segments tubulaires médullaires pour satisfaire leur besoin énergétique. Dans ce dernier cas, l'augmentation de la néoglucogenèse dans le tubule proximal devrait avoir peu d'effet sur la glycémie. Ceci pourrait donc

contribuer à la différence significative de glycémie à jeun dès J7, mais aussi l'amélioration de la tolérance au glucose sans modification de sécrétion d'insuline ni de sensibilité. De plus, l'amélioration de la tolérance au glucose est aussi observée chez nos souris traitées par un régime HF comparée aux contrôles et la diminution de la PEG hépatique est aussi diminuée chez les souris traitées sous HF. Les données sur la régulation de l'homéostasie glucidique obtenues sous régime HF corroborent les données sous régime standard.

## **2) l'AM chronique altère-t-elle la sensibilité à l'insuline d'une manière différentielle en fonction des tissus ?**

Selon les tests de tolérance à l'insuline, aucune modification de la sensibilité à l'insuline a été observée chez nos souris sous AM chronique. De plus, nous n'avons pas non plus observé de différences de sécrétion d'insuline entre les deux groupes sous régime standard. Les effets tissus dépendants de l'AM chronique sur la néoglucogenèse pourraient suggérer un mécanisme, lui aussi tissu-dépendant, sur la voie de signalisation de l'insuline. Cette hypothèse est étayée par des expériences préliminaires montrant que l'abondance protéique de pAKT/AKT dans le rein et dans le jéjunum de nos souris sous AM chronique suite à un pulse à insuline ne diffèrent pas de celle de nos souris contrôles. Par contre, dans le foie, le rapport pAKT/AKT est significativement diminué comparé aux souris contrôles (données non présentées). La diminution de la PEG hépatique serait donc potentiellement due, au moins en partie, à une augmentation de la sensibilité à l'insuline dans ce tissu. En effet, il est bien établi que l'insuline inhibe l'expression des enzymes clés de la néoglucogenèse (Honka et al., 2018) et augmente la biosynthèse des acides gras et des triglycérides (Maude, Sanchez-Cabanillas and Cebola, 2021). Ceci est d'autant plus intéressant que nous avons observé chez les souris sous AM chronique, une augmentation de la masse grasse sur la longueur de la cinétique ainsi qu'une augmentation de gènes impliqués dans les voies de

signalisations de la biosynthèse des petites molécules et du catabolisme/métabolisme des petites molécules (incluant les acides gras et les lipides) dès J3, mais aussi à J7, J14 et J30. Une augmentation du métabolisme des TG dans le rein des souris sous AM chronique après 30 jours de traitement est aussi observée. Ces résultats obtenus dans le rein pourraient être extrapolés au niveau du foie, bien qu'aucune augmentation de la capture de  $^{18}\text{F}$ FDG dans les tissus périphériques n'ait été observable.

De plus, nos résultats chez les souris nourries par un régime HF montrent que bien que les souris sous AM chronique secrètent moins d'insuline que les souris contrôles, elles présentent une amélioration de la tolérance au glucose. Mannon et al. (2021) ont réalisé chez les rats Zucker obèses, une néphrectomie des 5/6ème et ont également observé une amélioration de la sensibilité à l'insuline associée à une diminution de sa sécrétion. Il serait donc intéressant d'analyser plus en détail la sensibilité à l'insuline dans plusieurs tissus périphérique des souris, en incluant le muscle squelettique et les différents tissus adipeux blanc, pour évaluer si effectivement, l'AM chronique entraîne une altération de la voie de signalisation de l'insuline de façon différente en fonction des tissus.

### **3) L'augmentation globale des voies contrôlant le métabolisme oxydatif dans le rein reflète-t-elle un mécanisme plus général présent dans les autres organes périphériques ?**

Nous avons observé, après analyse transcriptomique, une reprogrammation du métabolisme cellulaire rénal. Durant l'AM, l'ammoniogenèse (localisée dans la mitochondrie) est fortement activée dans les tubules rénaux via une augmentation du transport intracellulaire et intra-mitochondrial de glutamine. Ensuite, le cycle TCA est activé, suivi d'une augmentation de synthèse d'ATP, probablement pour subvenir aux besoins énergétiques des pompes sur les membranes apicales et basolatérales des tubules (Bhargava et al., 2017),



pompes qui elles-mêmes sont suractivées durant l'AM (Gumz et al., 2009 ; Kaufman et al., 2022).

En effet, durant le cycle TCA, la conversion de succinate en fumarate par le succinate déshydrogénase conduit à une augmentation du transport d'électrons par le complexe II mitochondrial dans la chaîne de transport d'électrons (CTE), menant à une augmentation de la phosphorylation oxydative (Kaufman et al., 2022). Un pH acide induit aussi une augmentation de l'activité de la CTE via une augmentation de transport d'électrons, notamment car le complexe I, mais aussi grâce aux complexes III, IV et V (Martínez-Reyes et al., 2020). Il est tentant de poser l'hypothèse que le rein, qui en temps normal, est un organe à besoin énergétique élevé (i.e. organe qui consomme le plus d'énergie par gramme de tissu dans le corps (Bhargava et al., 2017) a un besoin énergétique encore plus élevé durant une AM due à l'activation des procédés cataboliques. Ceci provoquerait, en retour, une utilisation de glucose supérieure à la normale pour répondre à l'hyperactivation des divers processus métaboliques. L'AM chronique pourrait donc induire la reprogrammation du métabolisme des cellules rénales (Sas et al., 2016). Une étude de Lamonte et al. (2013) a montré dans de nombreux types cellulaires cancéreux que l'acidose induit une reprogrammation du métabolisme cellulaire dans le but d'atténuer le stress oxydatif, corrélant avec nos résultats. Cette étude montre aussi que les cellules dans un milieu acide augmentent la conversion de glucose marqué en glutamate, pour que ce dernier entre dans le cycle de Krebs, ce qui corrèle avec nos données d'analyse transcriptomique. Cela suggérerait que le glucose sera le substrat énergétique préférentiel lors d'une AM, validant notre hypothèse.

De plus, nous avons observé après 60 jours de traitement, une augmentation du niveau d'expression des gènes impliqués dans la modification des histones et l'acétylation des protéines. De façon intéressante, ces modifications sont visibles via SIRT3 lors d'une restriction calorique ou d'une « starvation » (Herbert et al., 2013 ; Hirschev et al., 2010 ;

Someya et al., 2010). Or, les souris sous AM chronique ont une consommation de nourriture supérieure aux souris contrôles, mais une dépense énergétique significativement supérieure.

De plus, une étude par Corbet et al. (2016) montre que l'augmentation de l'acétylation des protéines (principalement mitochondriales) est due à l'oxydation des acides gras, et non aux acides aminés ou aux sucres. Grâce aux cages métaboliques, nous avons montré qu'après 7 jours de traitement, les souris sous AM chronique utilisent essentiellement les sucres comme substrat de la respiration oxydative (RER  $\sim 1$  sur la phase nocturne) comparé aux souris contrôles, mais qu'après 120 jours de traitement, les RER des souris sous AM chronique sont inférieurs aux souris contrôles, suggérant une utilisation globale plus importante des acides gras qui pourrait corrélérer avec l'hyperacétylation des histones, l'augmentation des protéines mitochondriales et l'activation de la lipogenèse (Corbet et al., 2016) via l'augmentation significative de la masse grasse chez les souris sous AM chronique. Nous pourrions donc supposer que cette reprogrammation métabolique observée dans le rein ait lieu dans d'autres organes durant l'AM chronique (Lamonte et al., 2013 ; Corbet et al., 2016 ; Forni et al., 2005), ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la dépense énergétique, mais aussi l'activité oxydative et la tolérance au glucose. Une analyse transcriptomique plus large sur les organes périphériques tels que le foie, le muscle et les tissus adipeux serait intéressante pour évaluer si effectivement, la reprogrammation du métabolisme énergétique et la modulation de la fonction mitochondriale sont des mécanismes présents dans d'autres organes périphériques.

Malgré cette reprogrammation du métabolisme cellulaire pour atténuer le stress des tubules, une formation de vacuoles intracellulaires, localisée spécifiquement dans les tubules proximaux des 90 jours de traitement est visible. Cette dégradation tubulaire est associée à une protéinurie chez les souris sous AM chronique, sans formation de fibrose rénale, ni d'augmentation de marqueurs inflammatoires ou d'infiltration de cellules immunitaires, ni

d'augmentation de créatinine plasmatique. Au contraire, une diminution d'IL-6 associée à une diminution de la population immunitaire totale ainsi que des populations macrophagiques et lymphocytaires T. Comme indiqué précédemment (chapitre 2.5), un pH acide accélérerait la dégradation protéique en altérant la signalisation post-insuline récepteur due à une diminution de l'activité PI3K associée à IRS-1 et de p-Akt (Franch et al., 2004). Non seulement l'AM entraînerait une augmentation du catabolisme protéique, mais pourrait aussi inhiber la synthèse de protéines. Une étude de Caso et al. (2004) montre une inhibition de la synthèse des muscles squelettiques chez la souris après traitement de NH<sub>4</sub>Cl sur 24h. Cette augmentation de la dégradation protéique entraînerait une diminution de la concentration de créatinine plasmatique et donc pourrait expliquer cette similarité de concentration chez nos deux groupes, visible sur la totalité de la cinétique. La concentration de créatinine plasmatique est un marqueur biologique fréquemment utilisé pour estimer la masse maigre et la fonction rénale des patients en maladie rénale chronique. Plusieurs études, notamment celle de Patel et al. (2013), montrent une corrélation positive de  $R^2 = 0.99$  entre la concentration de créatinine plasmatique et de la masse maigre des patients en maladie rénale chronique. De plus, les données obtenues par FACS corroborent les résultats que nous avons obtenus sur les dosages de marqueurs inflammatoires, ayant observé une diminution de l'IL-6 dans les lysats de reins chez nos souris sous AM chronique ainsi qu'un manque de formation de fibrose rénale due au traitement. IL-6 est un marqueur pro-inflammatoire sécrété dû à une réponse inflammatoire aiguë par des macrophages et monocytes (Gabay, 2006). De plus, cette interleukine est sécrétée par les cellules rénales résidentes telles que les podocytes, les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les cellules épithéliales tubulaires (Magno et al., 2019). Une augmentation d'IL-6 entraîne non seulement une réponse immunitaire cellulaire et humorale (différentiation des lymphocytes B, activation des lymphocytes T et sécrétion d'immunoglobulines), mais conduit aussi à une inflammation chronique grâce à sa capacité de

recrutement de monocytes via IL-8 et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1-). La diminution de l'IL-6 est à corrélérer avec la diminution de macrophages et lymphocytes T chez nos souris sous AM chronique.

#### **4) Quelles sont les répercussions physiologiques de l'augmentation de la capture de glucose dans certaines zones du cerveau sur le phénotype observé chez les souris sous AM chronique ?**

Nous avons observé une augmentation significative de la capture de  $^{18}\text{FDG}$  dans le cortex controlatéral (gauche) somato-sensoriel chez nos souris sous AM chronique. Cette augmentation de la capture de  $^{18}\text{FDG}$  est principalement localisée dans la zone latérale du cortex qui contrôle principalement chez l'Homme, les sensations somato-sensorielles du visage et des bras (Raju and Tadi, 2022). L'étude de Mamet et Voillet (2002) a montré qu'une acidification extracellulaire captée par les « acid sensing ion channels » (ASIC) augmenterait le potentiel d'action neuronal *via* une entrée de sodium qui augmenterait donc les signaux traités par le cortex somato-sensoriel. Cela suggère que l'AM chronique augmenterait l'activité neuronale et, par conséquent, le besoin énergétique du cortex serait plus élevé. Ce besoin énergétique élevé pourrait donc expliquer l'augmentation de la capture de glucose comme ce dernier est le substrat énergétique préférentiel du cerveau (Chuquet *et al.*, 2010).

Le transport de glucose intracérébral est dû essentiellement à deux types de GLUT. GLUT1, qui existe sous forme de deux isoformes, est présent dans les cellules épithéliales et au niveau des pieds astrocytaires entourant le lit vasculaire et GLUT3, qui est le transporteur de glucose majoritaire dans les neurones. Un autre transporteur de glucose intracérébral est GLUT4, qui lui, contrairement aux deux autres, est insulino-dépendant, est localisé dans plusieurs sous-types neuronaux.

En parallèle, nous avons observé, chez les souris traitées, une augmentation de la dépense énergétique et du redressement sur le plan Z des cages. Lundgaard *et al.* (2005) ont montré qu'une stimulation de l'activité fonctionnelle augmente la capture de glucose marqué dans le cortex controlatéral (gauche) somato-sensoriel chez la souris, plus particulièrement dans les cellules neuronales, ce que nous observons chez nos souris traitées. Comme le glucose est le substrat énergétique préférentiel du cerveau (Chuquet *et al.*, 2010), cette augmentation de capture de glucose dans le cortex *via* les GLUT présents dans cette zone pourrait être possiblement dû à un besoin énergétique plus important pour traiter ces signaux de mouvement plus fréquents.

Des expérimentations plus approfondies telles que des tests de stimulation des souris, injectées au glucose marqué, seraient donc importantes pour évaluer si, effectivement, l'AM chronique induit une augmentation de la capture de glucose dans le cortex somato-sensoriel et stimule donc l'activité fonctionnelle.

## Références

- Abdul-Wahed A, Gautier-Stein A, Casteras S, Soty M, Roussel D, Romestaing C, Guillou H, Tourette JA, Pleche N, Zitoun C, Gri B, Sardella A, Rajas F, Mithieux G. A link between hepatic glucose production and peripheral energy metabolism *via* hepatokines. *Mol Metab.* 2014 May 28;3(5):531-43. doi: 10.1016/j.molmet.2014.05.005. PMID: 25061558; PMCID: PMC4099510.
- Ahmad M, Abramovich I, Agranovich B, Nemirovski A, Gottlieb E, Hinden L, Tam J. Kidney Proximal Tubule GLUT2—More than Meets the Eye. *Cells.* 2023; 12(1):94. <https://doi.org/10.3390/cells12010094>
- Aktas D, Utine EG, Mrasek K, Weise A, von Eggeling F, Yalaz K, Posorski N, Akarsu N, Alikasifoglu M, Liehr T, Tuncbilek E. Derivative chromosome 1 and GLUT1 deficiency syndrome in a sibling pair. *Mol Cytogenet.* 2010 May 28;3(1):10. doi: 10.1186/1755-8166-3-10. PMID: 20509907; PMCID: PMC2887874.
- Al-Hagggar M, Sakamoto O, Shaltout A, El-Hawary A, Wahba Y, Abdel-Hadi D. Fanconi Bickel Syndrome: Novel Mutations in GLUT 2 Gene Causing a Distinguished Form of Renal Tubular Acidosis in Two Unrelated Egyptian Families. *Case Rep Nephrol.* 2011;2011:754369. doi: 10.1155/2011/754369. Epub 2011 Jul 28. PMID: 24533196; PMCID: PMC3914128.
- Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2013 Aug 15;4(4):114-23. doi: 10.4239/wjd.v4.i4.114. PMID: 23961321; PMCID: PMC3746083.
- Arunagiri A, Haataja L, Cunningham CN, Shrestha N, Tsai B, Qi L, Liu M, Arvan P. Misfolded proinsulin in the endoplasmic reticulum during development of beta cell failure in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2018 Apr;1418(1):5-19. doi: 10.1111/nyas.13531. Epub 2018 Jan 28. PMID: 29377149; PMCID: PMC5934315.
- Augustin R, Mayoux E. Mammalian sugar transporters. In: Szablewski L, editor. *Glucose homeostasis.* 2014. pp. 3–36.
- Bailey CJ, Day C. Avandamet: combined metformin-rosiglitazone treatment for insulin resistance in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract.* 2004 Sep;58(9):867-76. doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00318.x. PMID: 15529521.
- Bailey, J., Zheng, B., Hu, Z., Price, S. and Mitch, W., 2006. Chronic Kidney Disease Causes Defects in Signaling through the Insulin Receptor

Substrate/Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway: Implications for Muscle Atrophy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(5), pp.1388-1394.

- Balakrishnan A, Stearns AT, Rhoads DB, Ashley SW, Tavakkolizadeh A. Defining the transcriptional regulation of the intestinal sodium-glucose cotransporter using RNA-interference mediated gene silencing. *Surgery* 2008; 144: 168-173.
- Beech, J., Iles, R. and Cohen, R., 1993. Bicarbonate in the treatment of metabolic acidosis: Effects on hepatic intracellular pH, gluconeogenesis, and lactate disposal in rats. *Metabolism*, 42(3), pp.341-346.
- Bellasi, A., Di Micco, L., Santoro, D., Marzocco, S., De Simone, E., Cozzolino, M., Di Lullo, L., Guastaferrò, P. and Di Iorio, B., 2016. Correction of metabolic acidosis improves insulin resistance in chronic kidney disease. *BMC Nephrology*, 17(1).
- Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Oct;13(10):629-646. doi: 10.1038/nrneph.2017.107. Epub 2017 Aug 14. PMID: 28804120; PMCID: PMC5965678.
- Bhutia YD, Ganapathy V. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1863(10):2531-9. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.017. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26724577; PMCID: PMC4919214.
- Blonde L, Stenlöf K, Fung A, Xie J, Canovatchel W, Meininger G. Effects of canagliflozin on body weight and body composition in patients with type 2 diabetes over 104 weeks. *Postgrad Med*. 2016 May;128(4):371-80. doi: 10.1080/00325481.2016.1169894. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27002421.
- Böhmer C, Bröer A, Munzinger M, Kowalczyk S, Rasko JE, Lang F, Bröer S. Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem J*. 2005 Aug 1;389(Pt 3):745-51. doi: 10.1042/BJ20050083. PMID: 15804236; PMCID: PMC1180725.
- Bolinder, J., Ljunggren, Ö., Johansson, L., Wilding, J., Langkilde, A.M., Sjöström, C.D., Sugg, J. and Parikh, S. (2014), Dapagliflozin maintains glycaemic control while reducing weight and body fat mass over 2 years in patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled on metformin. *Diabetes Obes Metab*, 16: 159-169. <https://doi.org/10.1111/dom.1218909>; PMCID: PMC6005223.
- Bosse, A., Stoykova, A., Nieselt-Struwe, K., Chowdhury, K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Gruss, P. (2000), Identification of a novel mouse Iroquois homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse

Iroquois gene family. *Dev. Dyn.*, 218: 160-174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(200005\)218:1<160::AID-DVDY14>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(200005)218:1<160::AID-DVDY14>3.0.CO;2-2)

- Brant SR, Bernstein M, Wasmuth JJ, Taylor EW, McPherson JD, Li X, Walker S, Pouyssegur J, Donowitz M, Tse CM, *et al.* Physical and genetic mapping of a human apical epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE3) isoform to chromosome 5p15.3. *Genomics*. 1993 Mar;15(3):668-72. doi: 10.1006/geno.1993.1122. PMID: 8096830.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM *et al.* Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 2005; 53: 1087–1097.
- C.A. Mandarim-de-Lacerda, L'îlot pancréatique : ce que nous savons 150 ans après Langerhans, *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, Volume 203, Issues 8–9, 2019, Pages 670-682, ISSN 0001-4079, <https://doi.org/10.1016/j.banm.2019.06.015>.
- Caso, G., Garlick, B., Casella, G., Sasvary, D. and Garlick, P., 2004. Acute metabolic acidosis inhibits muscle protein synthesis in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 287(1), pp.E90-E96.
- Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994;17:961–969
- Chatelain F, Pégorier JP, Minassian C, Bruni N, Tarpin S, Girard J, Mithieux G. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):882-9. doi: 10.2337/diabetes.47.6.882. PMID: 9604863.
- Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase-[[beta]] deficiency: etiology and therapy. *Nat Rev Endocrinol.* (2010) 6:676–88. 10.1038/nrendo.2010.189
- Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 1995;122:481–486
- Corbet C, Pinto A, Martherus R, Santiago de Jesus JP, Polet F, Feron O. Acidosis Drives the Reprogramming of Fatty Acid Metabolism in Cancer Cells through Changes in Mitochondrial and Histone Acetylation. *Cell Metab.* 2016 Aug 9;24(2):311-23. doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.003. PMID: 27508876.
- Curthoys NP, Gstraunthaler G. pH-responsive, gluconeogenic renal epithelial LLC-PK1-FBPase<sup>+</sup> cells: a versatile in vitro model to study renal proximal tubule metabolism and function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014 Jul 1;307(1):F1-F11. doi:



10.1152/ajprenal.00067.2014. Epub 2014 May 7. PMID: 24808535; PMCID: PMC4080158.

- D'Alessio D. The role of dysregulated glucagon secretion in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2011;13(Suppl 1):126–132.
- D'Apolito, M., Du, X., Zong, H., Catucci, A., Maiuri, L., Trivisano, T., Pettoello-Mantovani, M., Campanozzi, A., Raia, V., Pessin, J., Brownlee, M. and Giardino, I., 2010. Urea-induced ROS generation causes insulin resistance in mice with chronic renal failure. *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), pp.203-213.
- David-Silva A, Esteves JV, Morais MRPT, Freitas HS, Zorn TM, Correa-Giannella ML, Machado UF. Dual SGLT1/SGLT2 Inhibitor Phlorizin Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatic Glucose Production in Type 2 Diabetic Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020 Mar 17;13:739-751. doi: 10.2147/DMSO.S242282. PMID: 32231437; PMCID: PMC7085338.
- Davies KJ. Adaptive homeostasis. *Mol Aspects Med*. 2016 Jun;49:1-7. doi: 10.1016/j.mam.2016.04.007. Epub 2016 Apr 22. PMID: 27112802; PMCID: PMC4868097.
- Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT1: a glucose transporter in the Type2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab*. 2001;74:186–199. doi: 10.1006/mgme.2001.3212.
- de Brito-Ashurst, I., Varaganam, M., Raftery, M. and Yaqoob, M., 2009. Bicarbonate Supplementation Slows Progression of CKD and Improves Nutritional Status. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(9), pp.2075-2084.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis *via* Intestinal Gluconeogenesis. *Cell Metab*. 2016 Jul 12;24(1):151-7. doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.013. PMID: 27411015.
- DeFronzo, R. and Beckles, A., 1979. Glucose intolerance following chronic metabolic acidosis in man. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 236(4), p.E328.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P. *et al*. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510, 121–125 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13306>
- Disthabanchong, S., Niticharoenpong, K., Radinahamed, P., Stitchenrakul, W., Ongphiphadhanakul, B. and Hongeng, S., 2011. Metabolic acidosis lowers circulating

adiponectin through inhibition of adiponectin gene transcription. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(2), pp.592-598.

- Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci.* 2016 May 1;152:244-8. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025. Epub 2015 Oct 24. PMID: 26596563.
- Egea PF, Stroud RM, Walter P. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(2):213–20.
- Espino Guarch M, Font-Llitjós M, Murillo-Cuesta S, Errasti-Murugarren E, Celaya AM, Giroto G, Vuckovic D, Mezzavilla M, Vilches C, Bodoy S, Sahún I, González L, Prat E, Zorzano A, Dierssen M, Varela-Nieto I, Gasparini P, Palacín M, Nunes V. Mutations in L-type amino acid transporter-2 support SLC7A8 as a novel gene involved in age-related hearing loss. *Elife.* 2018 Jan 22;7:e31511. doi: 10.7554/eLife.31511. PMID: 29355479; PMCID: PMC5811215.
- Evans-Molina C, Garmey JC, Ketchum R, Brayman KL, Deng S, Mirmira RG. Glucose regulation of insulin gene transcription and pre-mRNA processing in human islets. *Diabetes.* 2007 Mar;56(3):827-35. doi: 10.2337/db06-1440. PMID: 17327454; PMCID: PMC3705758.
- Foreman JW. Fanconi Syndrome. *Pediatr Clin North Am.* 2019 Feb;66(1):159-167. doi: 10.1016/j.pcl.2018.09.002. PMID: 30454741.
- Forni LG, McKinnon W, Lord GA, Treacher DF, Peron JM, Hilton PJ. Circulating anions usually associated with the Krebs cycle in patients with metabolic acidosis. *Crit Care.* 2005 Oct 5;9(5):R591-5. doi: 10.1186/cc3806. Epub 2005 Sep 13. PMID: 16277723; PMCID: PMC1297631.
- Franch, H., Raissi, S., Wang, X., Zheng, B., Bailey, J. and Price, S., 2004. Acidosis impairs insulin receptor substrate-1-associated phosphoinositide 3-kinase signaling in muscle cells: consequences on proteolysis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 287(4), pp.F700-F706.
- Freeman AM, Pennings N. Insulin Resistance. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 10, 2021.
- Freychet L, Rizkalla SW, Desplanque N, Basdevant A, Zirinis P, Tchobroutsky G *et al.* Effect of intranasal glucagon on blood glucose levels in healthy subjects and hypoglycaemic patients with insulin-dependent diabetes. *Lancet*1988; 1: 1364–1366.
- Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013 Jan 1;9(1):25-53. PMID: 22974359; PMCID: PMC3934755.

- Gabay, C., 2006. *Arthritis Research and Therapy*, 8(Suppl 2), p.S3.
- Gene: Slc38a3 (2023) Summary - mus\_musculus - ensembl genome browser 109. Available at: [https://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000010064%3Br](https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?g=ENSMUSG00000010064%3Br) (Accessed: March 6, 2023).
- Gerber KM, Whitticar NB, Rochester DR, Corbin KL, Koch WJ, Nunemaker CS. The Capacity to Secrete Insulin Is Dose-Dependent to Extremely High Glucose Concentrations: A Key Role for Adenylyl Cyclase. *Metabolites*. 2021 Jun 19;11(6):401. doi: 10.3390/metabo11060401. PMID: 34205432; PMCID: PMC8235240.
- Giudici, L., Velic, A., Daryadel, A., Bettoni, C., Mohebbi, N., Suply, T., Seuwen, K., Ludwig, M. and Wagner, C., 2013. The Proton-Activated Receptor GPR4 Modulates Glucose Homeostasis by Increasing Insulin Sensitivity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 32(5), pp.1403-1416.
- Goldstein I, Hager GL. The Three Ds of Transcription Activation by Glucagon: Direct, Delayed, and Dynamic. *Endocrinology*. 2018 Jan 1;159(1):206-216. doi: 10.1210/en.2017-00521. PMID: 29077799; PMCID: PMC6283435.
- Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*(1989) 59:675–80. 10.1016/0092-8674(89)90013-5
- Goraya, N., Simoni, J., Jo, C. and Wesson, D., 2014. Treatment of metabolic acidosis in patients with stage 3 chronic kidney disease with fruits and vegetables or oral bicarbonate reduces urine angiotensinogen and preserves glomerular filtration rate. *Kidney International*, 86(5), pp.1031-1038.
- Guillemain G, Loizeau M, Pinçon-Raymond M, Girard J, Leturque A. The large intracytoplasmic loop of the glucose transporter GLUT2 is involved in glucose signaling in hepatic cells. *J Cell Sci*. 2000 Mar;113 ( Pt 5):841-7. doi: 10.1242/jcs.113.5.841. PMID: 10671373.
- Gumz ML, Lynch IJ, Greenlee MM, Cain BD, Wingo CS. The renal H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPases: physiology, regulation, and structure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jan;298(1):F12-21. doi: 10.1152/ajprenal.90723.2008. Epub 2009 Jul 29. PMID: 19640897; PMCID: PMC2806118.
- H. S. Freitas, G. F. Anê, K. F. S. Melo, M. M. Okamoto, M. Oliveira-Souza, S. Bordin, U. F. Machado, Na<sup>+</sup>-Glucose Transporter-2 Messenger Ribonucleic Acid

- Expression in Kidney of Diabetic Rats Correlates with Glycemic Levels: Involvement of Hepatocyte Nuclear Factor-1 $\alpha$  Expression and Activity, *Endocrinology*, Volume 149, Issue 2, 1 February 2008, Pages 717–724, <https://doi.org/10.1210/en.2007-1088>
- Haldane JBS, Wigglesworth VB, Woodrow CE. The Effect of Reaction Changes on Human Carbohydrate and Oxygen Metabolism *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 96: 15-28. DOI: 10.1098/Rspb.1924.0008
  - Hamm LL, Nakhoul N, Hering-Smith KS. Acid-Base Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Dec 7;10(12):2232-42. doi: 10.2215/CJN.07400715. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26597304; PMCID: PMC4670772.
  - Han, L., Qu, Q., Aydin, D. *et al.* Structure and mechanism of the SGLT family of glucose transporters. *Nature* 601, 274–279 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04211-w>
  - Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Jan;1411(1):21-35. doi: 10.1111/nyas.13435. Epub 2017 Sep 3. PMID: 28868790; PMCID: PMC5927596.
  - Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, Bailey DJ, Selen ES, Boersma MD, Carson JJ, Tonelli M, Balloon AJ, Higbee AJ, Westphall MS, Pagliarini DJ, Prolla TA, Assadi-Porter F, Roy S, Denu JM, Coon JJ. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome. *Mol Cell*. 2013 Jan 10;49(1):186-99. doi: 10.1016/j.molcel.2012.10.024. Epub 2012 Nov 29. PMID: 23201123; PMCID: PMC3704155.
  - Hiroaki Takesue, Takeshi Hirota, Mami Tachimura, Ayane Tokashiki and Ichiro Ieiri
  - Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV Jr, Alt FW, Kahn CR, Verdin E. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):121-5. doi: 10.1038/nature08778. PMID: 20203611; PMCID: PMC2841477.
  - Hjemdahl, P. and Fredholm, B., 1977. Direct Antilipolytic Effect of Acidosis in Isolated Rat Adipocytes. *Acta Physiologica Scandinavica*, 101(3), pp.294-301.
  - Honka MJ, Latva-Rasku A, Bucci M, Virtanen KA, Hannukainen JC, Kalliokoski KK, Nuutila P. Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: a positron emission tomography study. *Eur J Endocrinol*. 2018 May;178(5):523-

531. doi: 10.1530/EJE-17-0882. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29535167; PMCID: PMC5920018.

- Howell SL. The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia*. 1984;26(5):319–27.
- Huh, Y., Kim, Y.S. Predictors for successful weight reduction during treatment with Dapagliflozin among patients with type 2 diabetes mellitus in primary care. *BMC Prim. Care* 23, 134 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12875-022-01748-1>
- Hwang JH, *et al*. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95:783–787.
- IDF Diabetes Atlas 2022 Reports (2023) IDF Diabetes Atlas. Available at: <https://diabetesatlas.org/> (Accessed: March 20, 2023).
- Iles, R., Cohen, R., Rist, A. and Baron, P., 1977. The mechanism of inhibition by acidosis of gluconeogenesis from lactate in rat liver. *Biochemical Journal*, 164(1), pp.185-191.
- Jager, K., Kovesdy, C., Langham, R., Rosenberg, M., Jha, V. and Zoccali, C., 2019. A single number for advocacy and communication—worldwide more than 850 million individuals have kidney diseases. *Kidney International*, 96(5), pp.1048-1050.
- Jando J, Camargo SMR, Herzog B, Verrey F (2017) Expression and regulation of the neutral amino acid transporter B0AT1 in rat small intestine. *PLoS ONE* 12(9): e0184845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184845>
- Katsurada, K., Nandi, S., Sharma, N. and Patel, K., 2021. Enhanced Expression and Function of Renal SGLT2 (Sodium-Glucose Cotransporter 2) in Heart Failure: Role of Renal Nerves. *Circulation: Heart Failure*, 14(12).
- Katsuura G, Asakawa A, Inui A. Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides* 2002; 23: 323–329.
- Kaufman JS. Acute Kidney Injury in CKD: Role of Metabolic Acidosis. *Kidney Int Rep*. 2022 Oct 20;7(12):2555-2557. doi: 10.1016/j.ekir.2022.10.017. PMID: 36506223; PMCID: PMC9727512.
- King PA, Goldstein L, Newsholme EA. Glutamine synthetase activity of muscle in acidosis. *Biochem J*. 1983 Nov 15;216(2):523-5. doi: 10.1042/bj2160523. PMID: 6140920; PMCID: PMC1152536.
- Kleta R, Romeo E, Ristic Z, Ohura T, Stuart C, Arcos-Burgos M, Dave MH, Wagner CA, Camargo SR, Inoue S, Matsuura N, Helip-Wooley A, Bockenbauer D, Warth R, Bernardini I, Visser G, Eggermann T, Lee P, Chairoungdua A, Jutabha P, Babu E,

- Nilwarangkoon S, Anzai N, Kanai Y, Verrey F, Gahl WA, Koizumi A. Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):999-1002. doi: 10.1038/ng1405. Epub 2004 Aug 1. PMID: 15286787.
- Komatsu M, Takei M, Ishii H, Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: a newer perspective. *J Diabetes Investig* 2013; 4: 511–516.
  - Koppe, L., Nyam, E., Vivot, K., Manning Fox, J., Dai, X., Nguyen, B., Trudel, D., Attané, C., Moullé, V., MacDonald, P., Ghislain, J. and Poitout, V., 2016. Urea impairs  $\beta$  cell glycolysis and insulin secretion in chronic kidney disease. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), pp.3598-3612.
  - KRAHL ME. STIMULATION OF PEPTIDE SYNTHESIS IN ADIPOSE TISSUE BY INSULIN WITHOUT GLUCOSE. *Am J Physiol.* 1964 Mar;206:618-20. doi: 10.1152/ajplegacy.1964.206.3.618. PMID: 14160994.
  - Kraut, J. and Madias, N., 2016. Metabolic Acidosis of CKD: An Update. *American Journal of Kidney Diseases*, 67(2), pp.307-317.
  - Kumashiro N, Beddow SA, Vatner DF, Majumdar SK, Cantley JL, Guebreegziabher F, *et al.*. Targeting pyruvate carboxylase reduces gluconeogenesis and adiposity and improves insulin resistance. *Diabetes* (2013) 62:2183–94. 10.2337/db12-1311
  - Kuo MT, Chen HHW, Feun LG, Savaraj N. Targeting the Proline–Glutamine–Asparagine–Arginine Metabolic Axis in Amino Acid Starvation Cancer Therapy. *Pharmaceuticals.* 2021; 14(1):72. <https://doi.org/10.3390/ph14010072>
  - Lamonte G, Tang X, Chen JL, Wu J, Ding CK, Keenan MM, Sangokoya C, Kung HN, Ilkayeva O, Boros LG, Newgard CB, Chi JT. Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer Metab.* 2013 Dec 23;1(1):23. doi: 10.1186/2049-3002-1-23. PMID: 24359630; PMCID: PMC4178214.
  - Lee YJ, Lee YJ, Han HJ. Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells. *Kidney Int Suppl.* 2007 Aug;(106):S27-35. doi: 10.1038/sj.ki.5002383. PMID: 17653207.
  - Liman MNP, Jialal I. Physiology, Glycosuria. [Updated 2022 Mar 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557441/>
  - Liu M, Weiss MA, Arunagiri A, Yong J, Rege N, Sun J, Haataja L, Kaufman RJ, Arvan P. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes Metab.* 2018 Sep;20 Suppl 2(Suppl 2):28-50. doi: 10.1111/dom.13378. PMID: 30230185; PM

- Livadas S, Anagnostis P, Bosdou JK, Bantouna D, Papanicolaou DA, Papanicolaou DA, Papanicolaou DA, Papanicolaou DA, Papanicolaou DA, Papanicolaou DA. Polycystic ovary syndrome and type 2 diabetes mellitus: A state-of-the-art review. *World J Diabetes*. 2022 Jan 15;13(1):5-26. doi: 10.4239/wjd.v13.i1.5. PMID: 35070056; PMCID: PMC8771268.
- Lomedico PT, Chan SJ, Steiner DF, Saunders GF. Immunological and chemical characterization of bovine preproinsulin. *J Biol Chem*. 1977;252(22):7971–8.
- Long, W., & Cheeseman, C. I. (2015). Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. *Cell Health and Cytoskeleton*, 7, 167.
- Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, *et al*. Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2003;425:93–98.
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L. *et al*. Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat Commun* 6, 6807 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7807>
- Mackenzie, B., Erickson, J.D. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 447, 784–795 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1117-9>
- Mackler, B., Lichtenstein, H. and Guest, G., 1952. Effects of Ammonium Chloride Acidosis on Glucose Tolerance in Dogs. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 168(1), pp.126-130.
- Magno, A., Herat, L., Carnagarin, R., Schlaich, M. and Matthews, V., 2019. Current Knowledge of IL-6 Cytokine Family Members in Acute and Chronic Kidney Disease. *Biomedicines*, 7(1), p.19.
- Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study. *The Journal of clinical investigation*. 1992;90:1323–1327.
- Mahajan, A., Simoni, J., Sheather, S., Broglio, K., Rajab, M. and Wesson, D., 2010. Daily oral sodium bicarbonate preserves glomerular filtration rate by slowing its decline in early hypertensive nephropathy. *Kidney International*, 78(3), pp.303-309.
- Malin SK, Stephens BR, Sharoff CG, Hagobian TA, Chipkin SR, Braun B. Metformin's effect on exercise and postexercise substrate oxidation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010 Feb;20(1):63-71. doi: 10.1123/ijsnem.20.1.63. PMID: 20190353.
- Mamet, J. and Voilley, N., 2002. Les canaux sodiques activés par l'acidification extracellulaire et la douleur inflammatoire. *médecine/sciences*, 18(8-9), pp.889-895.

- Mandel, E., Curhan, G., Hu, F. and Taylor, E., 2012. Plasma bicarbonate and risk of type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*, 184(13), pp.E719-E725.
- Manuel CR, Haeusler RA. Insulin-stimulated lipogenesis gets an epigenetic makeover. *J Clin Invest*. 2020 Jun 1;130(6):2809-2810. doi: 10.1172/JCI137050. PMID: 32364539; PMCID: PMC7260037.
- Martin MG, Wang J, Solorzano-Vargas RS, Lam JT, Turk E, Wright EM. Regulation of the human Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G591-G603.
- Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 2020 Jan 3;11(1):102. doi: 10.1038/s41467-019-13668-3. PMID: 31900386; PMCID: PMC6941980.
- Mate A, de la Hermosa MA, Barfull A, Planas JM, Vazquez CM. Characterization of d-fructose transport by rat kidney brush-border membrane vesicles: changes in hypertensive rats. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:1961–1967. doi: 10.1007/PL00000830.
- Matthews, V., Elliot, R., Rudnicka, C., Hricova, J., Herat, L. and Schlaich, M., 2017. Role of the sympathetic nervous system in regulation of the sodium glucose cotransporter 2. *Journal of Hypertension*, 35(10), pp.2059-2068.
- Maude H, Sanchez-Cabanillas C, Cebola I. Epigenetics of Hepatic Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 May 11;12:681356. doi: 10.3389/fendo.2021.681356. PMID: 34046015; PMCID: PMC8147868.
- Melkonian EA, Asuka E, Schury MP. Physiology, Gluconeogenesis. [Updated 2022 May 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541119/>
- Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Mar;286(3):E370-5. doi: 10.1152/ajpendo.00299.2003. Epub 2003 Oct 14. PMID: 14559723.
- Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab*. 2005 Nov;2(5):321-9. doi: 10.1016/j.cmet.2005.09.010. PMID: 16271532.
- Mithieux G. La néoglucogénèse intestinale : une fonction insulino-mimétique [Intestinal gluconeogenesis: an insulin-mimetic function]. *Biol Aujourd'hui*.



2022;216(1-2):37-39. French. doi: 10.1051/jbio/2022003. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35876519.

- Mithieux, Gilles (2001). New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 4(4), 267–271. doi:10.1097/00075197-200107000-00004
- Mogi C, Tomura H, Tobo M, *et al.* Sphingosylphosphorylcholine antagonizes proton-sensing ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1)-mediated inositol phosphate production and cAMP accumulation. *J Pharmacol Sci.* 2005;99:160–167.
- *Molecular Pharmacology* September 2018, 94 (3) 953-962; DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.118.111807>
- Mutel E, Gautier-Stein A, Abdul-Wahed A, Amigó-Correig M, Zitoun C, Stefanutti A, Houberton I, Tourette JA, Mithieux G, Rajas F. Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production during prolonged fasting in mice: induction of renal and intestinal gluconeogenesis by glucagon. *Diabetes.* 2011 Dec;60(12):3121-31. doi: 10.2337/db11-0571. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22013018; PMCID: PMC3219939.
- Nakakura, T., Mogi, C., Tobo, M., Tomura, H., Sato, K., Kobayashi, M., Ohnishi, H., Tanaka, S., Wayama, M., Sugiyama, T., Kitamura, T., Harada, A. and Okajima, F., 2012. Deficiency of Proton-Sensing Ovarian Cancer G Protein-Coupled Receptor 1 Attenuates Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Endocrinology*, 153(9), pp.4171-4180.
- Neeland IJ, McGuire DK, Chilton R, Crowe S, Lund SS, Woerle HJ, Broedl UC, Johansen OE. Empagliflozin reduces body weight and indices of adipose distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res.* 2016 Mar;13(2):119-26. doi: 10.1177/1479164115616901. PMID: 26873905; PMCID: PMC4768401.
- Olson AL. Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *ISRN Mol Biol.* 2012 Oct 17;2012:856987. doi: 10.5402/2012/856987. PMID: 27335671; PMCID: PMC4890881.
- Pancréas (2020) Unité hépatobiliaire et pancréatique de Strasbourg. Available at: <https://foie-pancreas-strasbourg.eu/pathologies/pancreas/> (Accessed: February 20, 2023).
- Parker MD. Mouse models of SLC4-linked disorders of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-transporter dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 May 1;314(5):C569-C588. doi:

10.1152/ajpcell.00301.2017. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29384695; PMCID: PMC6008066.

- Patel, S., Molnar, M., Tayek, J., Ix, J., Noori, N., Benner, D., Heymsfield, S., Kopple, J., Kovesdy, C. and Kalantar-Zadeh, K., 2013. Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 4(1), pp.19-29.
- Pham, H., Robinson-Cohen, C., Biggs, M., Ix, J., Mukamal, K., Fried, L., Kestenbaum, B., Siscovick, D. and de Boer, I., 2012. Chronic Kidney Disease, Insulin Resistance, and Incident Diabetes in Older Adults. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(4), pp.588-594.
- Pontoglio, M., Prié, D., Cheret, C., Doyen, A., Leroy, C., Froguel, P., Velho, G., Yaniv, M. and Friedlander, G., 2000. HNF1 $\alpha$  controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO reports*, 1(4), pp.359-365.
- Poudel RR. Renal glucose handling in diabetes and sodium glucose cotransporter 2 inhibition. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013 Jul;17(4):588-93. doi: 10.4103/2230-8210.113725. PMID: 23961473; PMCID: PMC3743357.
- Raju H, Tadi P. Neuroanatomy, Somatosensory Cortex. [Updated 2022 Nov 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555915/>
- Rhoads DB, Rosenbaum DH, Unsal H, Isselbacher KJ, Levitsky LL. Circadian periodicity of intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated. *J Biol Chem* 1998; 273: 9510-9516.
- Richards OC, Raines SM, Attie AD. The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action. *Endocr Rev*. 2010 Jun;31(3):343-63. doi: 10.1210/er.2009-0035. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20164242; PMCID: PMC3365844.
- Saleem F. Dapagliflozin: Cardiovascular Safety and Benefits in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cureus*. 2017 Oct 5;9(10):e1751. doi: 10.7759/cureus.1751. PMID: 29226041; PMCID: PMC5716679.
- Sas KM, Kayampilly P, Byun J, Nair V, Hinder LM, Hur J, Zhang H, Lin C, Qi NR, Michailidis G, Groop PH, Nelson RG, Darshi M, Sharma K, Schelling JR, Sedor JR, Pop-Busui R, Weinberg JM, Soleimanpour SA, Abcouwer SF, Gardner TW, Burant CF, Feldman EL, Kretzler M, Brosius FC 3rd, Pennathur S. Tissue-specific metabolic

- reprogramming drives nutrient flux in diabetic complications. *JCI Insight*. 2016 Sep 22;1(15):e86976. doi: 10.1172/jci.insight.86976. PMID: 27699244; PMCID: PMC5033761.
- Scapin, G., Dandey, V., Zhang, Z. *et al.* Structure of the insulin receptor–insulin complex by single-particle cryo-EM analysis. *Nature* 556, 122–125 (2018). <https://doi.org/10.1038/nature26153>
  - Schmidl S, Tamayo Rojas SA, Iancu CV, Choe JY, Oreb M. Functional Expression of the Human Glucose Transporters GLUT2 and GLUT3 in Yeast Offers Novel Screening Systems for GLUT-Targeting Drugs. *Front Mol Biosci*. 2021 Feb 18;7:598419. doi: 10.3389/fmolb.2020.598419. PMID: 33681287; PMCID: PMC7930720.
  - Schmidl, S., Ursu, O., Iancu, C.V. *et al.* Identification of new GLUT2-selective inhibitors through in silico ligand screening and validation in eukaryotic expression systems. *Sci Rep* 11, 13751 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93063-5>
  - Semenza G. L. (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 167–171
  - Seow HF, Bröer S, Bröer A, Bailey CG, Potter SJ, Cavanaugh JA, Rasko JE. Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet.* 2004 Sep;36(9):1003-7. doi: 10.1038/ng1406. Epub 2004 Aug 1. PMID: 15286788.
  - Seuwen K, Ludwig MG, Wolf RM. Receptors for protons or lipid messengers or both? *J Recept Signal Transduct Res.* 2006;26:599–610.
  - Sharma R, Tiwari S. Renal gluconeogenesis in insulin resistance: A culprit for hyperglycemia in diabetes. *World J Diabetes.* 2021 May 15;12(5):556-568. doi: 10.4239/wjdv12.i5.556. PMID: 33995844; PMCID: PMC8107972.
  - She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, Sherry AD, Magnuson MA. Mechanisms by which liver-specific PEPCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes.* 2003 Jul;52(7):1649-54. doi: 10.2337/diabetes.52.7.1649. PMID: 12829628.
  - *SLC2A1 solute carrier family 2* (2023) *National Center for Biotechnology Information*. U.S. National Library of Medicine. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20525> (Accessed: March 21, 2023).
  - *SLC2A2 solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 [mus musculus (house mouse)] - gene - NCBI*(2023) *National Center for Biotechnology*

- Information*. U.S. National Library of Medicine. Available at:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20526> (Accessed: March 21, 2023).
- *SLC5A1 solute carrier family 5* (no date) *National Center for Biotechnology Information*. U.S. National Library of Medicine. Available at:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20537> (Accessed: March 21, 2023).
  - Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, Prolla TA. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*. 2010 Nov 24;143(5):802-12. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.002. PMID: 21094524; PMCID: PMC3018849.CID: PMC6463291.
  - Soty M, Gautier-Stein A, Rajas F, Mithieux G. Gut-Brain Glucose Signaling in Energy Homeostasis. *Cell Metab*. 2017 Jun 6;25(6):1231-1242. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.032. PMID: 28591631.
  - Steiner DF. The proinsulin C-peptide--a multirole model. *Exp Diabetes Res*. 2004 Jan-Mar;5(1):7-14. doi: 10.1080/15438600490424389. PMID: 15198367; PMCID: PMC2478623.
  - Sugiyama S, Jinnouchi H, Kurinami N, Hieshima K, Yoshida A, Jinnouchi K, Nishimura H, Suzuki T, Miyamoto F, Kajiwara K, Jinnouchi T. Dapagliflozin Reduces Fat Mass without Affecting Muscle Mass in Type 2 Diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Jun 1;25(6):467-476. doi: 10.5551/jat.40873. Epub 2017 Dec 8. PMID: 292252
  - Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2018). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In L. Szablewski (Ed.), *Blood Glucose Levels*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.80402>
  - Taylor L, Curthoys NP. Glutamine metabolism: Role in acid-base balance\*. *Biochem Mol Biol Educ*. 2004 Sep;32(5):291-304. doi: 10.1002/bmb.2004.494032050388. PMID: 21706743.
  - Teta, D., Bevington, A., Brown, J., Pawluczyk, I., Harris, K. and Walls, J., 2003. Acidosis Downregulates Leptin Production from Cultured Adipocytes through a Glucose Transport-Dependent Post-transcriptional Mechanism. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(9), pp.2248-2254.

- Thorens B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am J Physiol.* 1996 Apr;270(4 Pt 1):G541-53. doi: 10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541. PMID: 8928783.
- Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia.* 2015 Feb;58(2):221-32. doi: 10.1007/s00125-014-3451-1. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25421524.
- Thrailkill KM, Bunn RC, Uppuganti S, Ray P, Garrett K, Popescu I, Pennings JS, Fowlkes JL, Nyman JS. Genetic ablation of SGLT2 function in mice impairs tissue mineral density but does not affect fracture resistance of bone. *Bone.* 2020 Apr;133:115254. doi: 10.1016/j.bone.2020.115254. Epub 2020 Jan 25. PMID: 31991250; PMCID: PMC7059549.
- Tiberti C, Giordano C, Locatelli M, *et al.* Identification of tyrosine phosphatase 2(256-760) construct as a new, sensitive marker for the detection of islet autoimmunity in type 2 diabetic patients: the non-insulin requiring autoimmune diabetes (NIRAD) study 2. *Diabetes* 2008;57:1276–1283
- Tillmar L, Carlsson C, Welsh N. Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):1099-106. doi: 10.1074/jbc.M108340200. Epub 2001 Nov 5. PMID: 11696543.
- Tomura H, Wang JQ, Komachi M, *et al.* Prostaglandin I(2) production and cAMP accumulation in response to acidic extracellular pH through OGR1 in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2005;280:34458–34464.
- Turk E, Klisak I, Bacallao R, Sparkes RS, Wright EM. Assignment of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter gene SGLT1 to chromosome 22q13.1. *Genomics.* 1993 Sep;17(3):752-4. doi: 10.1006/geno.1993.1399. PMID: 8244393.
- Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B (2002) GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett* 524:199–203
- Umino, H., Hasegawa, K., Minakuchi, H., Muraoka, H., Kawaguchi, T., Kanda, T., Tokuyama, H., Wakino, S. and Itoh, H., 2018. High Basolateral Glucose Increases Sodium-Glucose Cotransporter 2 and Reduces Sirtuin-1 in Renal Tubules through Glucose Transporter-2 Detection. *Scientific Reports*, 8(1).
- Vallet M, Metzger M, Haymann JP, *et al.* Urinary ammonia and long-term outcomes in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(1):137-145. doi:10.1038/ki.2015.52

- Vargas E, Joy NV, Carrillo Sepulveda MA. Biochemistry, Insulin Metabolic Effects. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525983/>
- Vayro S, Wood IS, Dyer J, Shirazi-Beechey SP. Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1 gene. Role of HNF-1 in glucose activation of promoter function. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5460-5470.
- Vidnes J, Søvik O. Gluconeogenesis in infancy and childhood III. Deficiency of the extramitochondrial Form of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in a case of persistent neonatal hypoglycaemia. *Acta Paediatr.*(2010) 65:307–12. 10.1111/j.1651-2227.1976.tb04890.x
- Wajngot A, *et al.* Quantitative contributions of gluconeogenesis to glucose production during fasting in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental.* 2001;50:47–52.
- Walker, B., Phear, D., Martin, F. and Baird, C., 1963. INHIBITION OF INSULIN BY ACIDOSIS. *The Lancet*, 282(7315), pp.964-965.
- Weidemann MJ, Hems R, Williams DL, Spray GH, Krebs HA. Gluconeogenesis from propionate in kidney and liver of the vitamin B12-deficient rat. *Biochem J.* 1970 Mar;117(1):177-81. doi: 10.1042/bj1170177. PMID: 5420952; PMCID: PMC1178844.
- Weiner ID, Verlander JW. Role of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Jan;300(1):F11-23. doi: 10.1152/ajprenal.00554.2010. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21048022; PMCID: PMC3023229.
- Weisinger, J., Swenson, R., Greene, W., Taylor, J. and Reaven, G., 1972. Comparison of the Effects of Metabolic Acidosis and Acute Uremia on Carbohydrate Tolerance. *Diabetes*, 21(11), pp.1109-1115.
- Wells RG, Mohandas TK, Hediger MA. Localization of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter gene SGLT2 to human chromosome 16 close to the centromere. *Genomics.* 1993 Sep;17(3):787-9. doi: 10.1006/geno.1993.1411. PMID: 8244402.
- Wesson DE, Buysse JM, Bushinsky DA. Mechanisms of Metabolic Acidosis-Induced Kidney Injury in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2020 Mar;31(3):469-482. doi: 10.1681/ASN.2019070677. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31988269; PMCID: PMC7062220.

- Whittaker, J., Cuthbert, C., Hammond, V. and Alberti, K., 1982. The effects of metabolic acidosis in vivo on insulin binding to isolated rat adipocytes. *Metabolism*, 31(6), pp.553-557.
- Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept* 2002; 107: 63–69.
- Winters SJ. Endocrine Dysfunction in Patients With Myotonic Dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Sep 27;106(10):2819-2827. doi: 10.1210/clinem/dgab430. PMID: 34125228.
- Wright, E.M. SGLT2 and cancer. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 472, 1407–1414 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02448-4>
- Xue J, Thomas L, Tahmasbi M, Valdez A, Dominguez Rieg JA, Fenton RA, Rieg T. An inducible intestinal epithelial cell-specific NHE3 knockout mouse model mimicking congenital sodium diarrhea. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Apr 30;134(8):941-953. doi: 10.1042/CS20200065. PMID: 32227118; PMCID: PMC8819665.
- Yeung, S., Gomes-Neto, A., Osté, M., van den Berg, E., Kootstra-Ros, J., Sanders, J., Berger, S., Carrero, J., De Borst, M., Navis, G. and Bakker, S., 2021. Net Endogenous Acid Excretion and Kidney Allograft Outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, p.CJN.00780121.
- Zhang X, Yang S, Chen J, Su Z. Unraveling the Regulation of Hepatic Gluconeogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jan 24;9:802. doi: 10.3389/fendo.2018.00802. PMID: 30733709; PMCID: PMC6353800

