

Effets diabétogènes des diurétiques thiazidiques et du solvant N - monométhylamide de l'acide acétique chez le rat* **

R. GUIDOUX

Institut de Pharmacologie de l'Université de Lausanne

Reçu le 26 février 1968

Diabetogenic Effects of Thiazide Diuretics and of the Solvent N-monomethyl-acetamide in Rats

Summary. Large doses of hydrochlorothiazide (50–200 mg/kg/day p.o.) given for 5 to 6 weeks did not induce any increase in the fasting blood-sugar concentration, nor any decrease of glucose tolerance in normal rats and in rats "sensitized" toward diabetogenic agents by a subtotal pancreatectomy or by a sub-diabetogenic dose of alloxan. No increase in blood sugar was found in the 8 h following a single oral dose of 50 mg/kg of hydrochlorothiazide. — Large doses (> 3.5 ml/kg) of the solvent N-monomethyl-acetamide (NMMAA), used at one time in the preparation of one brand of hydrochlorothiazide for injection, on the other hand, exerted marked diabetogenic effects in the rat. Lethal doses of NMMAA always induced a diabetic syndrome, i.e. progressive hyperglycaemia with ketonaemia and metabolic acidosis resembling the diabetic syndrome induced by large doses of anti-insulin serum. Fractions of lethal doses given repeatedly on successive days had additive diabetogenic and lethal effects: the drug or its toxic metabolites appeared to persist for a long time in the organism. — Sublethal doses of NMMAA induced a reversible hyperglycaemia of some days' duration. Thus the diabetes induced by NMMAA was either transitory or lethal. Chronic treatment with doses < 0.8 ml/kg/day did not induce any signs of toxicity within 6–8 months. In the rats intoxicated with lethal doses of NMMAA, the serum concentration of immunoreactive insulin (IRI) increased simultaneously with the glycaemia, and attained the same levels as in normal rats with similar blood glucose concentrations established by oral or i.v. loads with glucose. — The insulin secreted during NMMAA hyperglycaemia, thus, did not lower the blood sugar. During NMMAA hyperglycaemia, in contrast to glucose-induced hyperglycaemia in normal rats, the fraction of the insulin-like-activity of the serum suppressed by anti-insulin serum (SILA) did not rise to detectable levels: i.e. the IRI of the intoxicated animals did not appear to exert an insulin-like effect on normal isolated adipose tissue. — The blood-sugar-lowering effect of exogenous porcine insulin was depressed in rats intoxicated with NMMAA in comparison with normal animals or animals with alloxan-induced diabetes. — The findings lead to the conclusion that rats intoxicated with NMMAA inactivate exogenous as well as endogenous insulin. Although losing its metabolic activity, the inactivated endogenous insulin remains immunologically competent.

Résumé. Aucun effet diabétogène ni hyperglycémiant aigu de l'hydrochlorothiazide (HCT) n'a été décelé par des déterminations de la glycémie à jeun (avant et 2–8 h après l'administration d'HCT) et de la tolérance au glucose effectuées chez des rats normaux et des rats sensibilisés à un effet diabétogène par une pancréatectomie

subtotale ou par l'injection d'une dose subdiabétogène d'alloxane, au cours d'un traitement de 6 semaines par des doses de 50–200 mg/kg · jour d'HCT p. o. — De fortes doses (plus de 3 ml/kg) de N-monométhylamide de l'acide acétique (NMMAA), solvant qui fut utilisé dans la préparation d'une solution injectable commerciale d'hydrochlorothiazide, ont par contre exercé des effets diabétogènes très marqués chez le rat. Toute dose létale de NMMAA a induit chez cet animal un syndrome diabétique, c'est-à-dire une hyperglycémie progressive avec acido-cétose métabolique, ressemblant au syndrome diabétique aigu induit par l'injection d'une forte dose de sérum anti-insulinique. — Des fractions de doses léthales administrées quotidiennement pendant plusieurs jours ont exercé des effets diabétogènes et léthaux cumulatifs: la substance ou l'un de ses métabolites toxiques apparaît persister longtemps dans l'organisme du rat. — Des doses subléthales de NMMAA ont induit une hyperglycémie réversible d'une durée de quelques jours. Nous avons donc constaté que le diabète produit par le NMMAA était soit transitoire soit léthal. Aucun signe de toxicité ne s'est manifesté au cours d'un traitement de 6–8 mois par des doses inférieures à 0,5 ml/kg · jour. — Chez les rats intoxiqués par une dose létale de NMMAA, une corrélation positive très significative a été notée entre les valeurs sériques d'insuline immuno-réactive (IRI) et les valeurs de glycémie. Bien qu'ils aient été, à glycémie comparable, supérieurs à ceux constatés dans le sérum de rats normaux après surcharge de glucose, les taux d'IRI se trouvant dans le sérum des rats intoxiqués n'ont pas été en mesure de s'opposer à l'élévation régulière de la glycémie jusqu'à la mort. — L'effet hypoglycémiant d'insuline cristalline porcine est apparu inhibé chez les rats intoxiqués par le NMMAA, comparé à l'effet observé chez des rats normaux ou en diabète alloxanique. — Utilisant l'augmentation de l'oxydation du premier atome de carbone du glucose-1-C¹⁴ par le tissu adipeux épiddymaire du rat, in vitro, comme index métabolique de l'activité insulinoïde du sérum (ILA), nous n'avons pas constaté, dans le sérum des rats intoxiqués et en état de forte hyperglycémie, des taux d'ILA significativement supérieurs à ceux présents dans le sérum de rats témoins à jeun. Alors que, chez des rats normaux, la fraction de l'ILA sérique supprimable par sérum anti-insulinique (SILA) s'élevait fortement, comme l'IRI, au cours de l'hyperglycémie induite par une surcharge de glucose, cette fraction SILA n'est pas apparue en quantités décelables dans le sérum des animaux intoxiqués. L'IRI sérique de ces animaux n'a donc semble-t-il pas exercé d'effet «insulin-like» sur le tissu adipeux isolé de rat normal. — Les faits observés amènent à la conclusion que les rats intoxiqués par le NMMAA inactivent et l'insuline endogène et l'insuline exogène. Bien qu'ayant perdu son activité métabolique, l'insuline endogène inactivée reste immunologiquement compétente.

Diabetogene Effekte der Thiazid-Diuretika und des Lösungsmittels N-Monomethylacetamid bei Ratten

Zusammenfassung. Große Dosen von Hydrochlorothiazid (50–200 mg/kg/Tag, oral) über einen Zeit-

* Ce travail a bénéficié du soutien financier du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (Crédit No 4189).

** Communications préliminaires: GUIDOUX et PETERS, 1965; PETERS et coll., 1966.

raum von 5–6 Wochen riefen weder eine Steigerung der Nüchternblutzuckerspiegel, noch eine Herabsetzung der Glucosetoleranz bei normalen Ratten oder Ratten hervor, deren Empfindlichkeit gegenüber diabétogenen Substanzen durch eine subtotale Pankreatektomie oder durch subdiabétogene Dosen von Alloxan erhöht worden war. 8 Std. nach einer Einzeldosis von 50 mg/kg Hydrochlorothiazid fand sich keine Blutzuckererhöhung. Dagegen hatten große Dosen (über 3.5 ml/kg) des Lösungsmittels N-Monomethylacetamid (NMMAA), das vorübergehend zur Herstellung eines injizierbaren Hydrochlorothiazidpräparates gedient hat, deutliche diabétogene Effekte bei Ratten. Letale Dosen von NMMAA führten immer zu einem diabétischen Syndrom, d. h. fortschreitende Hyperglykämie mit Ketonämie und metabolischer Acidose, das mit dem diabétischen Syndrom nach Verabreichung großer Mengen von Anti-Insulin Serum große Ähnlichkeit aufwies. Bruchteile der letalen Dosis, die wiederholt an aufeinanderfolgenden Tagen gegeben wurden, summieren sich in ihrer diabétogenen und letalen Wirkung: NMMAA oder seine wirksamen Abbauprodukte scheinen längere Zeit im Organismus zu persistieren. Subletale Dosen von NMMAA lösten eine reversible Blutzuckererhöhung für einige Tage aus. Der durch NMMAA hervorgerufene Diabetes war also entweder reversibel oder tödlich. Die Langzeitbehandlung mit Dosen unter 0.8 ml/kg führte auch nach 6–8 Monaten zu keiner-

lei toxischen Anzeichen. Bei Ratten, die mit letalen Dosen von NMMAA vergiftet wurden, stiegen die Insulin- und Glucose-Spiegel im Blut gleichsinnig an, wobei das Insulin ähnliche Konzentrationen wie bei normalen Ratten erreichte, bei denen orale oder i. v. Glucosezufuhr zu einer entsprechenden Blutzuckersteigerung geführt hatte. — Das während der NMMAA Hyperglykämie sezernierte Insulin bewirkte also keine Blutzuckersenkung. Im Gegensatz zu der glucoseinduzierten Hyperglykämie bei der normalen Ratte stieg die mit Antiinsulin hemmbare insulinähnliche Aktivität während der NMMAA-Hyperglykämie nicht auf meßbare Werte an, d. h. das IRI der vergifteten Tiere schien auf normales, isoliertes Fettgewebe keinen insulinähnlichen Effekt auszuüben. — Die blutzuckersenkende Wirkung von exogenem Schweine-Insulin war bei mit NMMAA vergifteten Ratten niedriger als bei Normaltieren oder Ratten mit Alloxandiabetes. — Diese Befunde veranlassen zu der Schlußfolgerung, daß mit NMMAA vergiftete Ratten exogenes und endogenes Insulin inaktivieren, wobei das inaktivierte endogene Insulin trotz des Verlustes seiner Stoffwechselwirkung immunologisch aktiv bleibt.

Key-words: Rat, experimental diabetes, hydrochlorothiazide, N-monomethyl-acetamide, discrepancy between serum immunoreactive insulin and suppressible insulin-like activity.

1. Introduction

Les diurétiques thiazidiques engendrent rapidement des altérations de la glycémie chez des sujets diabétiques ou prédiabétiques: un traitement de 1 à 4 semaines par le chlorothiazide, l'hydrochlorothiazide, ou le trichlorméthiazide produit chez ces sujets une péjoration de la tolérance au glucose et une élévation de la glycémie à jeun (FINNERTY, 1959; SHAPIRO et coll., 1961; SAMAN et coll., 1963^a; CARLINER et coll., 1965; CHAZAN et BOSHELL 1965). Au cours de traitements prolongés de sujets hypertendus ou en insuffisance cardiaque, non prédiabétiques, il a aussi été observé une diminution de la tolérance au glucose (SAMAN et coll., 1963^a; CARLINER et coll., 1965; WELLER et BORONDY 1965) ainsi qu'une élévation faible mais significative de la glycémie à jeun (WOLFF et coll., 1963). Ces altérations sont généralement réversibles; quelques observations font cependant douter qu'il en soit toujours ainsi (WOLFF et coll., 1963; SAMAN et coll. 1963^a).

Afin de l'étudier et de trouver des moyens de le prévenir, plusieurs expérimentateurs ont cherché à reproduire chez le rat l'effet dit «diabétogène» des diurétiques thiazidiques. Quelques résultats contradictoires ont été obtenus. WATSON et coll. (1964) n'ont décelé aucune modification de la glycémie lors de traitements prolongés par des doses très fortes de chlorothiazide et d'hydrochlorothiazide. MENG et KRONEBERG (1965) ont observé après 12 jours de traitement par 50 mg/kg . jour d'hydrochlorothiazide par voie orale une élévation faible et transitoire de la glycémie à jeun sans changement de la tolérance au glucose. LOSERT et coll. (1965) ont par contre constaté une élévation considérable de la glycémie à jeun après 1 se-

maine de traitement par la même dose d'hydrochlorothiazide.

Dans ces expériences, seuls LOSERT et coll. ont utilisé des ampoules commerciales d'hydrochlorothiazide (SENFIT, communication personnelle) qui, à leur insu, contenaient alors 60% du solvant N-monométhylamide de l'acide acétique (NMMAA). Ce solvant possède lui-même un effet diabétogène marqué (GUIDOUX et PETERS, 1965; PETERS et coll., 1966; SITT et coll., 1966).

Les expériences à décrire ont eu pour but de: 1. vérifier si l'hydrochlorothiazide exerçait lui-même un effet diabétogène chez le rat, si un tel effet pouvait être mis en évidence chez des animaux «sensibilisés» par une pancréatectomie subtotale ou par l'injection d'une dose subdiabétogène d'alloxane; 2. caractériser les effets toxiques et diabétogènes du NMMAA; 3. éclaircir le mécanisme de l'action diabétogène du NMMAA.

2. Méthodes

2.1. Les animaux utilisés ont été des rats blancs de type Wistar. Le terme «à jeun» désigne des animaux privés de nourriture depuis 14 à 17 h, ayant eu libre accès à l'eau.

2.2. Les médicaments administrés ont été l'hydrochlorothiazide (Esidrex® Ciba en substance¹), le N-monométhylamide de l'acide acétique (N-méthylacétamide purum Fluka), l'insuline porcine cristallisée (Actrapid® Novo²), l'alloxane (hydrate d'alloxane anhydre Fluka), le glucose (monohydrate de glucose ou glucose anhydre Fluka).

¹ Nous remercions la maison Ciba S. A. Bâle de nous avoir fait cadeau de cette substance.

² Nous remercions la maison Novo Industri, Copenhague, de nous avoir aimablement offert de l'insuline porcine cristallisée ainsi que des échantillons d'insuline commerciale.

Les substances administrées par voie intra-veineuse (veine de la queue) ont été diluées dans une solution de NaCl à 0.9% (2 ml/kg poids), les substances administrées par voie orale (sonde gastrique rigide) dans l'eau, sauf l'hydrochlorothiazide qui a été dissous dans une solution de NaOH 0.05 ou 0.1 N (10 ml/kg poids). Les cristaux de N-monométhylamide de l'acide acétique ont été préalablement liquéfiés à 28°C. Toutes les solutions ont été préparées dans l'heure précédant leur utilisation; elles ont été administrées à des animaux non anesthésiés.

2.3. Les procédés utilisés pour sensibiliser les rats à un éventuel effet diabétogène de l'hydrochlorothiazide ont été la pancréatectomie subtotale, effectuée sous anesthésie à l'éther (INGLE et GRIFFITH, 1949) (les animaux témoins ont subi une laparotomie) et l'alloxanisation partielle par injection intra-veineuse de 35 mg/kg d'alloxane après 48 h de jeûne; les rares animaux devenus diabétiques (glucosurie ou glycémie à jeun supérieure à 100 mg/100 ml) à la suite de l'injection n'ont pas été utilisés.

2.4. L'effet diabétogène de l'hydrochlorothiazide (HCT) a été recherché chez les rats «sensibilisés» et non «sensibilisés»: les doses administrées ont été de 40, 100, ou 200 mg/kg·jour d'HCT pendant 6 semaines (traitement oral biquotidien). Les rats témoins de chaque groupe ont reçu la même quantité de solvant que les rats traités. L'effet diabétogène du N-monométhylamide de l'acide acétique (NMMAA) a été recherché chez des animaux non prétraités. Le NMMAA a été administré à 3 régimes de doses: a) administration de doses uniques de 3–10 ml/kg p.o.³; b) administration quotidienne de fortes doses (1.0–3.2 ml/kg·jour p.o. ou s.c.) (effet subaigu); c) administration quotidienne de faibles doses (0.2–1.0 ml/kg·jour p.o. ou s.c.) pendant plusieurs semaines (effet chronique). Pour certaines expériences, les animaux témoins ont été «pair-fed» avec les animaux traités, c'est-à-dire qu'ils ont reçu par tête de rat la même quantité de nourriture que la quantité moyenne ingérée le jour précédent par rat traité. Pour d'autres expériences, des rats témoins en état d'hyperglycémie ont été obtenus par l'injection d'une dose diabétogène d'alloxane (40 mg/kg i.v., après 48 h de jeûne) ou par l'administration de glucose (3 g/kg p.o. ou 1 g/kg i.v.).

2.5. Les échantillons de sang ont été généralement prélevés de veines de la queue des rats (placés dans des cages à contention); pour la mesure de l'activité insulinoïde, ils ont été prélevés de l'aorte des rats anesthésiés à l'éther. Le sérum a été obtenu par centrifugation moins de 60 min après le prélèvement du sang; il a été congelé à -20°C jusqu'au jour de la détermination.

2.6. Mesures. La concentration de glucose du sérum ou du sang (glycémie) a été déterminée par une microméthode colorimétrique utilisant les enzymes glucose-oxydase et peroxydase (réactifs Schweizerhall). Chaque détermination a été faite en double. L'osmolalité du sérum a été obtenue par mesure de l'abaissement cryoscopique. Acide acétylacétique et acétone ont été détectés dans le sérum à l'aide du réactif de ROTHERA (nitroprussiate de Na + NH₄OH + (NH₄)₂SO₄) (WEST et coll., 1966). Le pH sanguin a été mesuré dans des conditions anaérobies à l'aide d'une électrode en verre et d'un pH-mètre (Beckman Research); le CO₂ sanguin à l'aide de l'appareil manométrique de VAN SLYKE; les bicarbonates ont été calculés sur la base de l'équation de HENDERSON-HASSELBALCH. Les détails de la méthode ont été décrits par GUIGNARD (1966). Les taux sériques d'insuline immuno-réactive (IRI) ont été dosés par la méthode de HALES et RANDLE (1963); ils ont été exprimés en μ U d'insuline humaine par ml. de sérum (insuline humaine cristallisée de Novo Industri, Copenhague; insuline I 125 et «insulin binding reagent» de Radiochemical Center, Amersham, Royaume Uni).

L'activité insulinoïde (insulin-like-activity = ILA) a été mesurée in vitro sur du sérum dilué 1/5, en utilisant comme index métabolique l'oxydation de l'atome C₁₄ du glucose-1-C₁₄ par le tissu adipeux épидидymaire du rat (RENOULD et coll., 1960) (Glucose-1-C₁₄, New England Nuclear Corporation ou Radiochemical Center Amersham). Dans chaque sérum nous avons évalué par cette méthode l'ILA totale et la NSILA (activité insulinoïde non supprimable par sérum anti-insulinique) (FROESCH et coll., 1963; SAMAN et coll., 1963^b). Nous avons dans ce but ajouté au milieu d'incubation, 30 min. environ avant l'apport du tissu, du sérum de cobayes immunisés par l'insuline bovine⁴ en quantité 4 fois supérieure à celle suffisant à neutraliser l'activité de l'étalon d'insuline porcine le plus élevé (240 μ U/ml); à ce taux, le sérum anti-insulinique n'exerçait pas d'effet insulinoïde ni anti-insulinoïde propre.

Le tissu adipeux épидидymaire a été prélevé de 5 rats. Ces animaux, de 160–200 g, nourris ad libitum, ont reçu des concentrations croissantes de glucose de 5, 10, et 15% dans l'eau de boisson au cours des 5–8 jours précédant l'épreuve. Le tissu a été réparti dans 20 flacons d'incubation selon un mode semblable à celui utilisé par FROESCH et coll. (1963): chaque lambeau de tissu a été divisé en 12 fragments de taille semblable. Aussitôt prélevés, ces fragments ont été placés dans les flacons d'incubation selon un ordre tel que chaque flacon reçoive du tissu des 5 rats et, en proportions identiques, des fragments provenant de lambeaux gauches et droits, des fragments proximaux et distaux.

Selon le procédé adopté par le laboratoire de A.E. RENOLD, la base utilisée pour capter le CO₂ libéré par le tissu a été l'hydroxyde de hyamine-10-x (Packard) (solution 1 M, dans le méthanol), introduite en fin d'incubation (aussitôt après l'adjonction au milieu de 0.2 ml de H₂SO₄ 10 N) dans de petites cupules en plastique suspendues à l'intérieur des flacons (0.4 ml par cupule). Les flacons d'incubation ont ensuite été laissés 90 min à température ambiante, puis ont été débouchés, et les cupules et leur contenu ont été versés dans 15 ml de liquide à scintillation, soluté de 2,5-diphényloxazole (PPO) et de 1,4-bis-2-5-phényloxazolyl-benzène (POPOP) (PACKARD) dans du toluène. Les désintégrations ont été mesurées dans un compteur à scintillation liquide (NUCLEAR Chicago) et exprimées en coups par min (cpm). Une relation linéaire entre le logarithme de la concentration d'insuline (de 16 à 250 μ U/ml) et le logarithme des cpm/mg de tissu a été vérifiée. Nous avons exprimé les valeurs de l'ILA en μ U d'insuline porcine/ml de sérum non dilué. Les taux d'ILA supprimable par sérum anti-insulinique (SILA) ont été obtenus en soustrayant les valeurs d'ILA non supprimable (NSILA) des valeurs d'ILA totale. L'erreur de mensuration était faible: sur 90 déterminations doubles des valeurs soit d'ILA totale soit de NSILA, le rapport de la valeur obtenue lors de la seconde mesure à celle obtenue lors de la première mesure a été de 1.05 ± 0.044 .

2.7. Expression des résultats. Les données numériques ont été exprimées en moyennes \pm écarts moyens des moyennes ($\bar{x} \pm S.E.$). Les droites de régression, ainsi que les significations de différences entre moyennes et coefficients de régression ont été calculées selon les méthodes statistiques habituelles (SNEDECOR et COCHRAN, 1967).

3. Résultats

3.1. Effet diabétogène de l'hydrochlorothiazide: l'hydrochlorothiazide (HCT) administré pendant 5 à 6 semaines à raison de 40 ou 100–200 mg/kg·jour p.o.

³ La densité du N-monométhylamide de l'acide acétique liquéfié à 28°C est de 0.95.

⁴ Nous remercions le Dr. B.A. HURN, M.D. MC Path. des Wellcome Research Laboratories d'avoir préparé et mis à notre disposition le sérum anti-insulinique.

à des rats prétraités 3 jours avant le début du traitement à l'HCT par une dose subdiabétogène d'alloxane (35 mg/kg i. v.) ou 2 semaines avant le début du traitement à l'HCT par une pancréatectomie subtotale, ainsi qu'à des animaux normaux pseudo-opérés (témoins), n'a provoqué ni élévation de la glycémie à jeun, ni diminution de la tolérance au glucose (Tableau 1.)

Tableau 1. Effet de l'administration chronique d'HCT sur la glycémie à jeun et la tolérance au glucose des rats «sensibilisés» par une dose subdiabétogène d'alloxane (35 mg/kg i. v.) ou par une pancréatectomie subtotale et des rats normaux pseudo-opérés

Sont indiquées les valeurs de glycémie (mg/100 ml), à jeun et après surcharge de glucose (3 g/kg p. o.), notées au cours de la 6ème semaine de traitement par 100 mg/kg · jour d'HCT p. o. (200 mg/kg · jour pendant les 2 dernières semaines de traitement des rats alloxanisés)

	HCT	Solvant
<i>Rats alloxanisés</i>	<i>n = 9</i>	<i>n = 10</i>
jeun	65 ± 4	76 ± 3
90 min après glucose	119 ± 4	130 ± 7
240 min après glucose	84 ± 4	85 ± 5
<i>Rats pancréatectomisés</i>	<i>n = 4</i>	<i>n = 5</i>
jeun	69 ± 4	66 ± 3
90 min après glucose	108 ± 7	115 ± 7
240 min après glucose	82 ± 3	77 ± 3
<i>Rats pseudo-opérés</i>	<i>n = 3</i>	<i>n = 3</i>
jeun	81 ± 7	74 ± 5
90 min après glucose	114 ± 5	117 ± 4
240 min après glucose	90 ± 3	86 ± 2

Il n'a en outre été observé aucun effet hyperglycémiant aigu de l'HCT à la dose de 50 mg/kg p. o. (glycémie mesurée 2,5 et 8 h après l'administration). Cet effet a été recherché sur 6 rats pancréatectomisés et 5 rats témoins pseudo-opérés, avant et au cours du traitement de 100 mg/kg · jour d'HCT.

3.2. Effet léthal et diabétogène de l'administration subaiguë ou chronique de *N*-monométhylamide de l'acide acétique: la Fig. 1 montre les temps de survie moyens de groupes de rats traités une fois par jour par différentes doses de NMMAA, et indique que b doses quotidiennes de $\frac{a}{b}$ ml/kg avaient en général le même effet

léthal qu'une dose unique de a ml/kg, c'est-à-dire que la toxicité était cumulative. La courbe en trait continu indique les temps de survie attendus en admettant qu'une dose orale de 13 ml/kg de NMMAA soit mortelle au bout d'un jour et que la totalité du NMMAA administré à doses fractionnées reste dans l'organisme et contribue à part entière à l'effet léthal des doses suivantes. Cette représentation montre que les temps de survie ne dépassent ceux attendus en cas de cumulation intégrale qu'à des doses quotidiennes inférieures à 1 ml/kg · jour p. o.

Les animaux soumis à des administrations quotidiennes de 1 ml/kg de NMMAA p. o. (rats femelles d'environ 200 g) ont rapidement cessé de s'alimenter. La faim volontaire a été accompagnée par une perte de poids excessive (-53 ± 3 g en 6-7 jours), signifi-

cativement supérieure à la perte de poids constatée chez les animaux témoins «pair-fed» (-34 ± 3 g). 75% des animaux sont morts en 14 jours, 50% en 9 jours. Un effet semblable a été trouvé dans un groupe de 8 rats recevant la même dose de NMMAA par voie sous-cutanée. La mort de ces animaux a été précédée par une hyperglycémie: sur les 19 rats examinés au cours

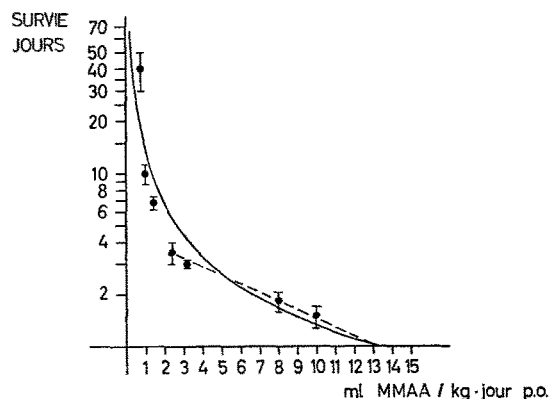


Fig. 1. Durée de survie de groupes de 8-20 rats traités par différentes doses quotidiennes de NMMAA par voie orale

Les points et barres désignent les moyennes ± erreurs moyennes des moyennes (S.E.). La ligne continue indique les temps de survie attendus en admettant qu'une dose unique de 13 ml/kg de NMMAA tue en 1 jour, et que des doses plus petites données à 1 jour d'intervalle s'accumulent totalement

d'un tel traitement par voie orale, la glycémie à jeun (mesurée 15 h après la précédente administration de la substance) était significativement plus élevée chez les 10 rats qui allaient succomber à l'intoxication dans les 3 jours à venir (117 ± 9 mg/100 ml) que chez les 9 rats qui devaient survivre plus longtemps (78 ± 5 mg/100 ml) ($p < 0.001$). La glycémie à jeun de ces derniers ne se distinguait pas de celle constatée chez 10 rats témoins «pair-fed» (68 ± 3 mg/100 ml), mais leur tolérance à une surcharge de glucose (3 g/kg p. o.) était nettement diminuée: la glycémie s'est élevée de $+75 \pm 10$ mg/100 ml chez ces animaux au cours des 90 min suivant l'administration de glucose, alors qu'elle ne s'est élevée que de $+45 \pm 3$ mg/100 ml pendant la même période chez les rats témoins «pair-fed» ($p < 0.001$).

Afin de préciser la relation entre l'effet hyperglycémiant et l'effet léthal du NMMAA, nous avons interrompu un traitement de 1 ml/kg · jour de NMMAA p. o. après 5-6 administrations quotidiennes et contrôlé la glycémie à jeun et après surcharge de glucose lors des 3 jours suivant l'arrêt du traitement; les résultats ont été groupés d'après la survie ultérieure des animaux (Tableau 2). Les animaux qui allaient périr 24-72 h plus tard présentaient une glycémie à jeun élevée et une tolérance au glucose diminuée. Dans le lot d'animaux moins gravement intoxiqués, qui tous allaient survivre plus de 3 semaines, la glycémie à jeun n'était pas élevée; la tolérance au glucose était par contre

significativement abaissée, phénomène transitoire qui n'a pas été retrouvé 6 jours après l'arrêt du traitement.

Au cours d'un traitement chronique par 0.5 ml/kg · jour de NMMAA p.o., des taux élevés de glucose n'ont été constatés que dans les échantillons de sang pré-

LECHAT et coll. (1960) (durée d'observation de 7 jours) et la DLM chez la souris est de 5.2 g/kg p.o. (= 5.5 ml/kg p.o.) selon SCHOLZ (1939). Dans nos expériences, la mort de la souris et du rat intoxiqués par le NMMAA a toujours été précédée d'une phase hyperglycémique. La Fig. 2 indique les droites de régression (et leurs

Tableau 2. Rapport entre glycémie (et tolérance au glucose) et survie après traitement par 1 ml/kg · jour de NMMAA p.o. pendant 5 à 6 jours

Parmi les valeurs obtenues 2-3 jours après l'arrêt du traitement, nous avons distingué celles notées chez les rats qui allaient mourir en quelques jours (5 rats: première colonne) de celles notées chez les rats qui devaient survivre ultérieurement (14 rats: deuxième colonne); ces derniers ont été examinés à nouveau 6 jours après l'arrêt du traitement (dernière colonne). Sont indiquées (en mg/100 ml) les valeurs de glycémie avant la surcharge de glucose (à jeun), et les élévations de glycémie résultant de cette surcharge (3 g/kg de glucose p.o.)

	2-3 jours après arrêt du traitement				6 j. après arrêt du traitement		
	24-72 h avant †	p	survie > 3 sem.	p	témoins	p	survie > 3 sem.
Glycémie à jeun	181 ± 41	<0.001	68 ± 3	N.S.	71 ± 2	N.S.	66 ± 5
Δ glycémie 90 min après glucose - jeun	+70 ± 21	N.S.	+63 ± 4	<0.001	+41 ± 2	N.S.	+47 ± 11
Δ glycémie 240 min après glucose - jeun	+48 ± 16	N.S.	+39 ± 9	<0.001	+13 ± 2	N.S.	+15 ± 5

levés moins de 5 jours avant la mort des animaux. L'administration quotidienne de 0.2 ml/kg de NMMAA par voie orale à 20 rats mâles pendant 10 mois n'a influencé ni la croissance, ni la mortalité, ni la glycémie à jeun, ni la tolérance au glucose, par comparaison aux valeurs notées sur un groupe de rats témoins tenus dans les mêmes cages.

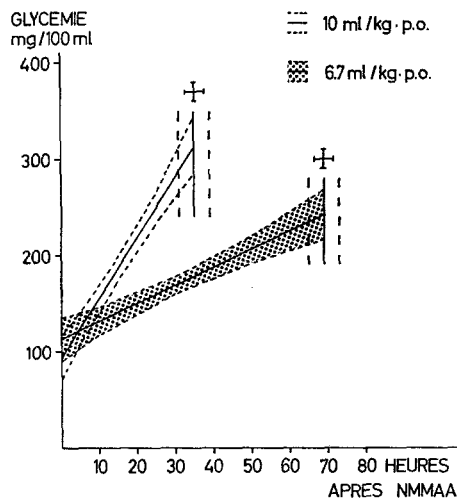


Fig. 2. Effet hyperglycémiant de doses léthales de NMMAA en fonction du temps écoulé depuis l'administration. Chacune des 2 doses de NMMAA a été administrée à 6 rats (mis à jeun après l'administration). La glycémie a été mesurée sur des échantillons de sang prélevés à des intervalles de 2 h. Les droites de régression sont indiquées avec leurs erreurs moyennes (voir légende tableau 4). La durée moyenne de vie (trait vertical) est indiquée avec son erreur moyenne de la moyenne (S.E.) (traits verticaux pointillés)

3.3. Effet léthal et hyperglycémiant aigu du N-monométhylamide de l'acide acétique: La DL₅₀ du NMMAA chez le rat est de 3.6 g/kg p.o. (= 3.8 ml/kg p.o.) selon

erreurs moyennes) des valeurs de glycémie en fonction du temps écoulé après l'administration de 2 différentes doses léthales (groupes de 6 rats; glycémie déterminée à intervalles de 2 h).

L'élévation de la glycémie a été généralement continue jusqu'à la mort; chez 2/12 animaux toutefois, après s'être élevée considérablement, la glycémie est retombée à des valeurs plus basses 6-12 h avant la mort.

Les valeurs de glycémie notées au cours des premières 30 min suivant l'administration des mêmes doses léthales de NMMAA ont été significativement plus élevées que celles constatées sur les mêmes rats avant l'administration de la substance (+25 ± 5 mg/100 ml). Nous n'avons pas constaté de phase hypoglycémique initiale.

La dose unique de 3 ml/kg p.o., inférieure à la DL₅₀, a provoqué chez tous les rats une élévation de la glycémie, à jeun et après surcharge de glucose; la tolérance au glucose était significativement plus abaissée chez les rats intoxiqués mortellement que chez les futurs survivants (Fig. 3). Le contrôle homéostatique de la glycémie de ces derniers s'est rétabli dans les 8 jours suivant l'administration de NMMAA.

3.4. Tableau du diabète provoqué par le N-monométhylamide de l'acide acétique: le comportement du rat après l'administration d'une dose léthale de NMMAA est devenu rapidement anormal. Déjà 5 h après l'administration de 8 ml/kg de NMMAA p.o., les animaux étaient somnolents, une parésie des membres postérieurs s'était installée; les animaux avaient cessé de prendre de la nourriture. La léthargie s'est accentuée au cours des heures (d'autant plus vite que la dose administrée avait été plus forte), les réactions du rat aux stimulations externes se sont affaiblies, la faiblesse musculaire a augmenté et finalement un coma profond a été constaté.

A la phase de léthargie, les rats étaient en acidose métabolique, avec cétonémie (nettement plus prononcée que chez les rats témoins à jeun), chute nette des bicarbonates plasmatiques, et même abaissement

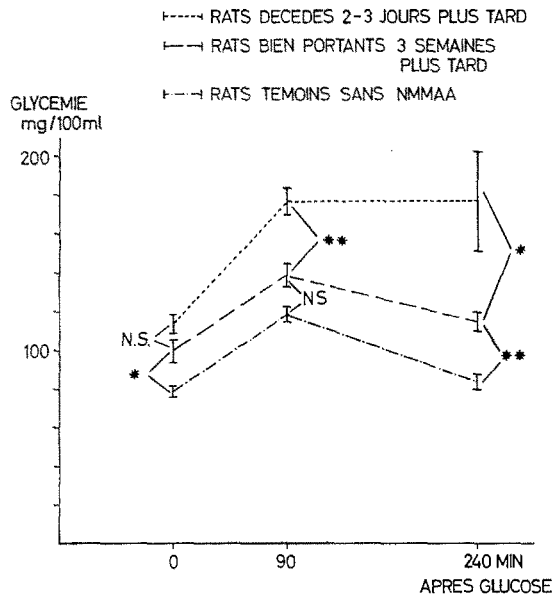


Fig. 3. Rapport entre glycémie (et tolérance au glucose) et survie après l'administration d'une dose unique de 3 ml/kg de NMMAA p.o.

Les valeurs de glycémie à jeun et après surcharge de glucose (3 g/kg p.o.) ont été notées au cours des 3 premiers jours suivant l'administration de la substance. La signification statistique de la différence entre moyennes est indiquée par:

* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

du pH (Tableau 3), modéré en raison de l'efficacité de la contre-régulation respiratoire par hyperventilation manifeste. Une diarrhée survenait parfois; au stade terminal, les rats étaient anuriques.

Tableau 3. Perturbations de l'équilibre acido-basique sanguin constatées chez les rats intoxiqués par une dose létale de NMMAA

*** : $p < 0.001$

	pH artériel	[HCO ₃] _{plasm.} mEq/l	pCO ₂ mm Hg
Témoins 18-40 h après 8-10 ml/kg NMMAA p.o.	7.40 ± 0.01 ***	22 ± 2 ***	29 ± 3
	7.30 ± 0.02	10 ± 1	21 ± 3

L'osmolalité du sérum s'est élevée de 307 ± 6 mOsm/kg H₂O avant l'administration à 382 ± 7 mOsm/kg H₂O 15-20 min après l'administration, puis s'est abaissée à 345 ± 7 mOsm/kg H₂O 40-60 min après l'administration. Elle s'est par la suite maintenue entre 360 et 390 mOsm/kg H₂O avant de s'élever à nouveau à 461 ± 15 mOsm/kg H₂O au cours des 5 h précédant la mort.

Le sérum des rats intoxiqués par le NMMAA n'était pas hémolysé. A l'autopsie, l'estomac était distendu, l'intestin était pâle, d'aspect vitreux. Pas d'autres particularités notables à l'examen externe des organes.

A l'examen histochimique du foie, le contenu cellulaire en glycogène est apparu fortement diminué 5 h après l'administration de la substance. A l'examen histologique du pancréas, un plus grand nombre de granulations a été trouvé dans les cellules β de rats 20 à 40 h après l'administration de la substance que dans les cellules β de rats témoins (MÖSLI, RIEDEL et GUIDOUX: observations non publiées).

3.5. Mécanisme de l'action diabétogène de l'*N*-monométhylamide de l'acide acétique:

3.5.1. Effet hypoglycémiant de l'insuline: différentes doses d'insuline (1,25-80 U/kg) ont été injectées par voie intra-veineuse à des rats qui avaient reçu une dose létale de NMMAA 5-36 h auparavant. L'effet hypoglycémiant de l'insuline chez ces animaux (dont la glycémie avant l'injection était de 193 ± 14 mg/100 ml) a été comparé à celui constaté chez des rats normaux non traités (glycémie avant l'injection: 85 ± 2 mg/100 ml) et chez des rats en diabète alloxanique (glycémie avant l'injection: 335 ± 23 mg/100 ml).

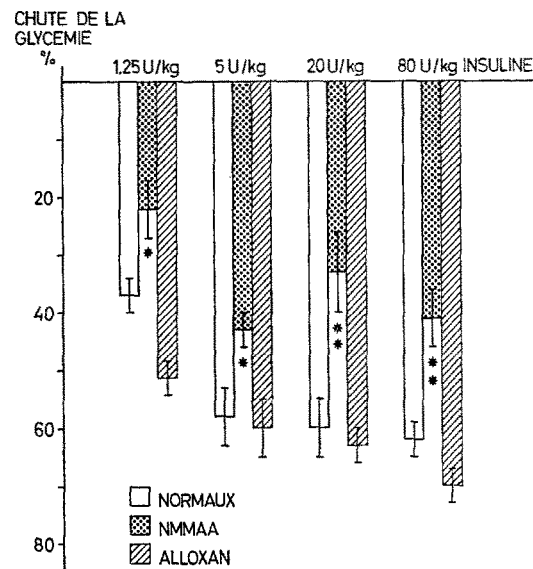


Fig. 4. Effet hypoglycémiant de l'insuline exprimé en fonction de la glycémie initiale

Sont représentées en pourcentages les moyennes (± S.E.) des chutes de glycémie produites en 60 min par l'injection intra-veineuse de différentes doses d'insuline porcine aux rats normaux, aux rats intoxiqués par 8 ml/kg de NMMAA p.o. 5-36 h auparavant, et aux rats en diabète alloxanique

Exprimée en fonction de la glycémie initiale, la chute de glycémie provoquée par une dose donnée d'insuline a été approximativement la même chez les rats normaux et les rats en diabète alloxanique (Fig. 4). Elle a par contre été significativement plus faible,

après chaque dose d'insuline, chez les rats intoxiqués par le NMMAA.

L'effet hypoglycémiant de l'insuline exogène est donc affaibli d'une façon marquée chez les rats intoxiqués par une dose létale de NMMAA. Cet affaiblissement pourrait rendre compte de l'hyperglycémie si la sensibilité à l'action hypoglycémiant de l'insuline endogène était semblablement diminuée.

3.5.2. Taux sériques d'insuline immuno-réactive: les concentrations d'insuline immuno-réactive (IRI) dans le sérum ont été déterminées parallèlement à la glycémie chez des rats intoxiqués par 8 ml/kg de NMMAA

tous ces animaux, la glycémie était supérieure à 350 mg/100 ml de sang.

3.5.3. Activité insulinoïde du sérum: les concentrations sériques d'ILA totale, d'ILA non supprimable par sérum anti-insulinique (NSILA) et supprimable par sérum anti-insulinique (SILA) ont été recherchées 5 h et 12–20 h après l'administration orale de 8 ml/kg de NMMAA p.o. à des rats à jeun depuis 15 h. Lors de chaque test était dosée également l'ILA de 1–2 échantillons sériques de contrôle. Les résultats, rapportés dans la table 8, indiquent que l'ILA s'est abaissée significativement au cours des premières 5 h

Tableau 4. Equations des droites de régression des concentrations sériques d'IRI par rapport aux valeurs de glycémie chez les rats intoxiqués par 8 ml/kg de NMMAA p.o., et chez les rats témoins après surcharge de glucose par voie orale (30–240 min après 3 g/kg de glucose) ou par voie intra-veineuse (3–60 min après 1 g/kg de glucose)

a = intersection de la droite de régression et de l'ordonnée;
 b = coefficient angulaire;
 S_b = erreur moyenne du coefficient angulaire (sample standard deviation of the regression coefficient);
 $S_{y \cdot x}$ = erreur moyenne de la moyenne des valeurs d'IRI par rapport à la droite de régression (sample standard error of Y estimated from X);
 validité = signification statistique de la déviation de la droite de régression de l'horizontale.

	IRI (μ U/ml)	a	b	S_b	$S_{y \cdot x}$	glycémie (mg/100 ml)	n	validité
NMMAA								
Témoins après		38	0.31	0.09	10.4	215 \pm 14	74	p < 0.001
glucose p.o. ou i.v.		20	0.31	0.03	2.2	139 \pm 7	135	p < 0.001

p.o., à divers intervalles de temps après l'intoxication; quelques animaux n'ont subi qu'un seul prélèvement, d'autres des prélèvements répétés, espacés de plus de 6 h. Les rats ont été mis à jeun après l'administration de NMMAA, parfois déjà 15 h avant l'administration. L'élévation de la glycémie induite par le NMMAA a été accompagnée par une élévation du taux sérique d'IRI: le coefficient angulaire de l'élévation du taux d'IRI en fonction de l'élévation de la glycémie a été identique à celui trouvé chez les rats normaux après surcharge orale ou intra-veineuse de glucose (Tableau 4), et la valeur de a élevée (intersection de la droite de régression et de l'ordonnée) indique une tendance à de fortes concentrations sériques d'IRI chez les rats intoxiqués.

Les taux élevés d'IRI sérique des rats intoxiqués par le NMMAA se sont cependant avérés incapables à empêcher l'élévation régulière de la glycémie jusqu'à la mort. Dans la Fig. 5, les valeurs de glycémie d'une part, d'IRI sérique d'autre part, sont montrées en fonction des intervalles de temps écoulés entre le moment du prélèvement et la mort. Il apparaît bien que l'élévation de la glycémie très marquée et uniforme jusqu'à la mort a été insensible à l'élévation également significative de l'IRI sérique. Les taux d'IRI ont fluctué très fortement à l'approche de la mort: c'est ainsi que sur 6 échantillons de sang prélevés 1–2 heures avant la mort des rats, 4 contenaient des taux considérables d'IRI sérique, compris entre 190 et 500 μ U/ml, alors que ces taux étaient retombés dans les 2 autres échantillons à moins de 100 μ U/ml. Chez

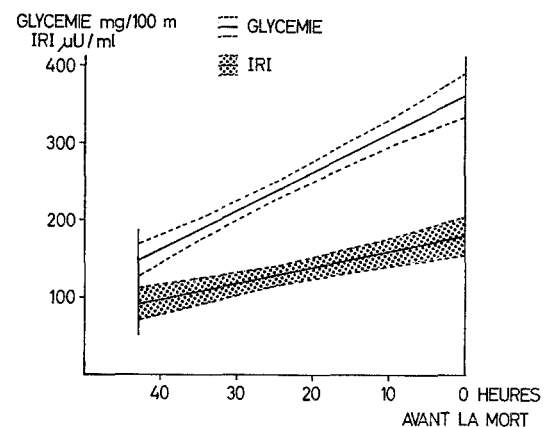


Fig. 5. Valeurs d'IRI sérique et de glycémie en fonction des intervalles de temps avant la mort, chez les rats intoxiqués par 8 ml/kg de NMMAA p.o.

Les droites de régression, représentées avec leurs erreurs moyennes (voir légende Tableau 4), ont été calculées sur 52 valeurs d'IRI et de glycémie, notées sur 15 rats à divers intervalles de temps de la mort. Leur validité (probabilité statistique qu'elles se distinguent de l'horizontale) était de $p < 0.001$ pour la glycémie, de $p < 0.02$ pour l'IRI

qui ont suivi l'administration du NMMAA, aux dépens de la NSILA. Après 12–20 h d'intoxication, bien qu'un taux normal de NSILA se soit rétabli, le taux sérique d'ILA totale était significativement inférieur à la valeur de contrôle, c'est-à-dire au taux d'ILA présent dans le sérum de rats témoins après surcharge intra-veineuse de glucose et en état d'hyperglycémie compa-

nable à celui des rats intoxiqués (Tableau 5): la SILA n'est apparue en quantités appréciables que dans 2/19 sérums de rats intoxiqués, alors qu'elle se trouvait à des taux très élevés dans le sérum des rats témoins.

Les concentrations de NMMAA circulant dans le sang des rats intoxiqués n'interfèrent donc pas avec le procédé radioimmunologique de dosage de l'insuline.

Tableau 5. *Activité insulinoïde (ILA) du sérum de rats intoxiqués par une dose létale de NMMAA*

Les valeurs de glycémie sont exprimées en mg/100 ml de sérum, les taux sériques d'ILA en μ U d'insuline porcine/ml de sérum non dilué (c'est-à-dire que les concentrations d'ILA trouvées dans le sérum dilué 1/5 ont été multipliées par 5). Les rats avaient été mis à jeun 15 h avant l'administration du NMMAA ou l'injection de glucose
 — NSILA: Activité insulinoïde persistante en présence d'un excès d'anticorps à l'insuline.
 — SILA: Activité insulinoïde supprimée par les anticorps à l'insuline.

	Témoins à jeun		NMMAA 8 ml/kg p. o.				Témoins après glucose i. v.
	<i>n</i>	<i>p</i>	5h après -	<i>p</i>	12-20h après -	<i>p</i>	
	15		12		19		15
ILA totale	210 \pm 17	<0.005	129 \pm 14		236 \pm 54	<0.02	438 \pm 71
NSILA	210 \pm 22	<0.001	111 \pm 9	<0.005	182 \pm 15		190 \pm 13
SILA	0.3 \pm 13		18 \pm 10		54 \pm 48	<0.05	248 \pm 71
Glycémie	96 \pm 11		148 \pm 11		310 \pm 21		313 \pm 23

L'élévation de la glycémie induite par une dose létale de NMMAA n'est donc pas accompagnée par une élévation significative de l'ILA sérique supprimable par l'anticorps spécifique.

3.5.4. *Influence du NMMAA sur les systèmes d'évaluation de l'ILA et de l'IRI*: la réponse du tissu adipeux in vitro à l'ILA pourrait être directement altérée par la concentration de NMMAA se trouvant dans le sérum des rats intoxiqués par 8 ml/kg de NMMAA p.o. A défaut d'une méthode de dosage chimique, on peut estimer très approximativement cette concentration par la mesure de l'osmolalité du sérum: elle s'est élevée de 307 ± 7 mOsm/kg. H_2O avant l'administration à 383 ± 7 mOsm/kg. H_2O 15-20 minutes après l'administration de NMMAA, substance dont la concentration dans le sérum des rats intoxiqués peut ainsi être estimée à 75 mM/L. Selon le procédé utilisé pour évaluer l'ILA, les échantillons de sérum sont dilués 5 fois, de sorte que la concentration de NMMAA dans le milieu d'incubation doit être d'environ 15 mM/L ou 0.1 vol. %. Il fallait donc vérifier si l'ILA exercée sur le tissu adipeux par du sérum de rats normaux, et mesurée en présence de 0.1 vol. % de NMMAA dans le milieu, était plus faible que l'ILA exercée par le même sérum en l'absence de NMMAA dans le milieu. La vitesse d'oxydation du premier atome de carbone du glucose par le tissu n'a pas été modifiée significativement par l'adjonction au milieu d'une telle concentration de NMMAA, ni même par l'adjonction d'une concentration 5 fois plus élevée: l'ILA de 6 échantillons sériques de rats normaux (de 355 μ U/ml. en moyenne) a été élevée de $+35 \pm 45$ μ U/ml. par l'adjonction de 0.5 vol. % de NMMAA au milieu d'incubation. Ni la SILA ni la NSILA n'ont été abaissées.

Sur 6 échantillons de sérums dosés en l'absence et en présence de 0.5 vol. % de NMMAA, il n'a pas été constaté non plus de modification des taux d'IRI: de 55 ± 6 μ U/ml en l'absence de NMMAA, ils ont été élevés de $+1 \pm 3$ μ U/ml par l'adjonction de NMMAA.

4. Discussion

4.1. Effet diabétogène de l'hydrochlorothiazide

Les valeurs de glycémie à jeun et après surcharge de glucose notées au cours d'un traitement de 6 semaines par des doses de 50-200 mg/kg · jour d'HCT p.o. n'ont révélé aucun effet diabétogène de la substance chez le rat normal, ni chez le rat «sensibilisé» à un effet diabétogène par une pancréatectomie subtotale ou par l'injection d'une dose subdiabétogène d'alloxane.

Pour le rat normal non sensibilisé, l'absence d'effet diabétogène de l'HCT concorde avec les conclusions de SCHULTZ et coll. (1966) et de WATSON et coll. (1964). Les doses massives d'HCT (1000-8000 mg/kg · jour) administrées par ces derniers à différentes souches de rats pendant 6 semaines n'ont produit aucune élévation de la glycémie à jeun des animaux.

Bien qu'ils n'aient pas obtenu de «diabète thiazidique» du rat par un traitement prolongé à l'HCT, MENG et coll. (1965) ont observé une hyperglycémie faible et transitoire, non accompagnée par une diminution de la tolérance au glucose, au 12ème jour du traitement, et WOLFF et coll. (1964) ont noté un effet hyperglycémiant aigu de la dose d'HCT quotidiennement administrée. Nos observations, portant sur un grand nombre d'animaux, n'ont cependant pas confirmé l'existence de tels effets de l'hydrochlorothiazide, à dose semblable ou supérieure à celles utilisées par ces auteurs. TABACHNICK et coll. (1965) ont également démenti tout effet hyperglycémiant de l'HCT à la dose unique élevée de 160 mg/kg, mais ont constaté une hyperglycémie très marquée 60 min après l'administration par voie intra-péritonéale de la dose unique considérable de 320 mg/kg. Le procédé expérimental utilisé par ces auteurs se distinguait par la voie d'administration utilisée, et aussi par le mode de prélèvement du sang, obtenu par ponction de l'aorte abdominale du rat sous narcose à l'éther, condition dans laquelle les rats témoins présentaient déjà une hyperglycémie notable.

Lors de toutes ces études, l'HCT a été administré sous forme de solution alcaline ou de suspension. Son effet diabétogène surprenant initialement décrit par LOSERT et coll. (1965) nous a incité à étudier le solvant utilisé par ces auteurs, solvant qui contenait 12 vol. % de NMMAA (SENFT: communication personnelle).

4.2. Effet hyperglycémiant du *N*-monométhylamide de l'acide acétique

4.2.1. *Intensité et durée*: L'élévation de la glycémie à jeun ou la diminution de la tolérance au glucose notées après l'administration au rat de doses subléthales de NMMAA ont été transitoires. Ces perturbations du métabolisme des hydrates de carbone ont été moins prononcées, mais ont persisté plus longtemps que celles produites par d'autres agents hyperglycémiant, tels les hormones glycoéolytiques (adrénaline, glucagon), les agents inhibiteurs de la sécrétion d'insuline (adrénaline, mannoheptulose, diazoxide) ou le sérum anti-insulinique, inactivateur de l'insuline circulante. L'effet hyperglycémiant prolongé exercé par le NMMAA (plus de 3 jours) ainsi que son effet léthal cumulatif marqué semblent indiquer que la substance active, le NMMAA ou un de ses métabolites, persiste longtemps dans l'organisme.

4.2.2. *Effet diabétogène et toxicité générale*: Qu'il ait été produit par une dose unique ou par cumulation de doses, l'effet léthal du NMMAA a toujours été précédé par un dérèglement de l'homéostasie du glucose sanguin. Effet hyperglycémiant et effet léthal se sont manifestés d'autant plus rapidement que la dose administrée a été plus forte. L'élévation continue de la glycémie jusqu'à la mort, produite par l'administration d'une dose élevée de NMMAA, a été aussi rapide que l'élévation aiguë de glycémie notée chez le rat brusquement privé d'insuline par une pancréatectomie totale (SCOW, 1956) ou par l'injection d'une dose forte de sérum anti-insulinique (WRIGHT, 1965). La mort du rat intoxiqué par une dose léthale de NMMAA pourrait être la conséquence du diabète grave induit par la substance, ou d'un autre effet toxique de la substance. Les arguments suivants paraissent établir une relation de dépendance entre le syndrome diabétique et la mort: a) l'effet toxique du NMMAA est réversible lorsque le métabolisme des hydrates de carbone n'est que faiblement perturbé, il est léthal lorsque celui-ci est fortement perturbé; b) le développement de l'acidose métabolique, la concentration de bicarbonates et la pCO_2 sanguine abaissées, la cétonémie, l'hyperventilation pulmonaire, la cessation rapide de toute prise de nourriture, les parésies musculaires après quelques heures, l'état léthargique s'accroissant progressivement, l'anurie et la mort en état de déshydratation, la distension de l'estomac et de la vessie à l'autopsie sont analogues aux observations de WRIGHT (1965) sur le rat en diabète aigu à la suite de l'injection d'une forte dose de sérum anti-insulinique.

Nous ne savons pas s'il existe un rapport entre l'effet diabétogène du NMMAA et son effet caryoclas-

que décrit par LECHAT et coll. (1960) et WALLON et coll. (1960). Les lésions cellulaires provoquées par l'administration au rat de 0.8 — 8 ml/kg de NMMAA ont été trouvées surtout dans la moelle osseuse et le testicule, également dans l'iléon et la rate, moins fréquemment dans le foie. Il a été en outre observé par THIERSCH et coll. (1962) que l'administration de NMMAA à une ratte gestante pouvait provoquer des nanismes fœtaux ou des morts in utero. Nos observations au sujet de l'innocuité relative de doses quotidiennes inférieures à 1 ml/kg de NMMAA chez le rat coïncident avec celles d'ANGLESIO et coll. (1958): un traitement de 5 jours par 0.5 g/kg · jour de NMMAA n'a pas engendré d'anémie ni de neutropénie; aucun signe de toxicité hépatique ni rénale n'a été décelé à l'examen histologique.

4.2.3. *Mécanisme de l'effet hyperglycémiant du N-méthylamide de l'acide acétique*: L'appauvrissement très marqué du contenu hépatique en glycogène constaté à l'examen histochimique de foies de rat prélevés 5 h après l'administration de 8 ml/kg de NMMAA p.o. indique que le débit hépatique de glucose est rapidement renforcé par l'administration de la substance, mais ce phénomène ne peut contribuer qu'à l'hyperglycémie des premières heures. L'élévation progressive de la glycémie pendant 2 jours ou davantage observée chez ces animaux implique qu'un tel mécanisme soit secondé par une inhibition de la captation de glucose par les tissus, comme dans le cas de perfusions d'adrénaline: ALTSZULER et coll. (1967) ont constaté, au cours de perfusions prolongées d'adrénaline à des chiens, que la production hépatique de glucose, initialement stimulée, retombait à son débit basal 60 min après le début de la perfusion; l'hyperglycémie persistait toutefois car la vitesse d'utilisation du glucose par les tissus n'était pas augmentée, conséquence de l'effet inhibiteur de la sécrétion d'insuline exercé par l'adrénaline. L'éventualité que l'effet hyperglycémiant du NMMAA soit, comme celui de l'uréthane, (REINERT, 1964) substance à structure chimique apparentée, secondaire à une libération d'adrénaline des surrénales est démentie par la constatation qu'un traitement de quelques jours par le NMMAA produit chez des rats surrénalectomisés une élévation de la glycémie semblable à celle observée chez le rat normal, ce qui exclut, en même temps, une éventuelle contribution des glucocorticoïdes à cet effet (SITT et coll., 1966).

Nous avons noté, parallèlement à l'élévation continue de la glycémie jusqu'à la mort induite par la dose léthale de 8 ml/kg de NMMAA p.o., une élévation significative des taux sériques d'IRI. Bien que plus élevés, à glycémie comparable, que ceux trouvés dans le sérum de rats normaux surchargés en glucose, les taux d'IRI présents dans le sérum des rats intoxiqués ne sont pas parvenus à enrayer l'élévation de la glycémie. SITT et coll. (1966) ont aussi observé des taux élevés d'IRI, disproportionnés à la glycémie, dans le sérum de rats en état d'hyperglycémie à la suite d'un traitement de quelques jours par des injections sous-cutanées de

NMMAA. Nous avons cependant constaté, secondairement à une élévation, un fléchissement du taux sérique d'IRI chez quelques rats sur le point de mourir.

Il apparaît donc que les cellules β des îlots de Langerhans parviennent jusqu'à un stade avancé de l'intoxication par le NMMAA à sécréter de l'insuline immunologiquement décelable en réponse à la glycémie sans cesse croissante. Il n'a d'ailleurs été constaté aucun signe d'«épuisement» des ces cellules β à l'examen histologique de pancréas prélevés 20 et 40 h après l'administration de la substance, mais au contraire une augmentation du nombre de granulations.

L'incapacité de l'insuline endogène à empêcher l'élévation de la glycémie chez les animaux intoxiqués par le NMMAA est corroborée par l'observation d'une résistance à l'effet hypoglycémiant de l'insuline exogène. Une résistance à l'effet hypoglycémiant d'insuline cristalline a également été observée par SITR et coll. (1966) chez des rats en état d'hyperglycémie à la suite d'un traitement de quelques jours par des injections sous-cutanées de NMMAA.

Contrairement aux taux d'IRI, les taux d'ILA constatés dans le sérum de rats intoxiqués (20 h après l'administration de NMMAA) se sont avérés significativement inférieurs, à glycémie comparable d'environ 300 mg/100 ml, à ceux trouvés dans le sérum de rats normaux surchargés en glucose; la différence portait essentiellement sur la fraction SILA, présente à des taux élevés dans le sérum des rats témoins surchargés en glucose, absente dans le sérum de la grande majorité des rats intoxiqués. Or la SILA, qui se comporte comme l'IRI lors de surcharge de glucose à des rats normaux et qui, comme l'IRI, se trouve à un taux abaissé dans le sérum de rat en état d'hyperglycémie à la suite d'une injection de mannoheptulose (FROESCH et coll., 1966) et dans le sérum d'animal en diabète alloxanique (FROESCH et coll. 1964; MORGAN et LAZAROFF, 1965) apparaît bien refléter l'activité biologique de l'insuline sécrétée par le pancréas. L'inactivation de la SILA sérique par injection à l'animal de sérum anti-insulinique induit un diabète aigu, avec réduction de la vitesse d'utilisation du glucose et également augmentation très précoce du débit hépatique de glucose (FRANCKSON et coll., 1964; ALTSZULER et coll., 1964).

Nous avons observé que l'adjonction, à un milieu d'incubation contenant du sérum de rat normal dilué 1/5, d'une concentration relativement forte de NMMAA (environ 5 fois supérieure à la concentration susceptible de se trouver dans le sérum des animaux intoxiqués) ne déprimait pas l'ILA exercée. Cette constatation indique que la sensibilité du tissu adipeux à l'action de l'insuline n'est pas inhibée par le NMMAA contenu dans le sérum des animaux intoxiqués.

La divergence frappante entre taux d'IRI et SILA contenus dans le sérum des rats intoxiqués par le NMMAA pourrait être due à la libération d'une insuline immunologiquement compétente mais biologiquement inactive du pancréas de ces animaux. Cette hypothèse n'expliquerait cependant pas la résistance des

rats intoxiqués à l'effet hypoglycémiant de l'insuline exogène porcine. L'inactivation de l'insuline endogène ainsi qu'exogène pourrait par contre se produire dans le courant sanguin ou dans des tissus circonscrits; elle pourrait être due à un processus déclenché par la présence de NMMAA ou d'un de ses métabolites, elle pourrait être due à l'activation ou à l'inactivation d'une réaction enzymatique physiologique.

L'abaissement significatif, transitoire, au cours de la phase initiale de l'élévation de la glycémie sous l'influence du NMMAA, de la fraction NSILA est difficile à interpréter; la NSILA se trouve à un taux stable dans le sérum de rats normaux (quelle que soit la glycémie), elle est présente dans le sérum d'animaux pancréatocytomisés (STEINKE et coll., 1962) et de sujets en état d'acido-cétose diabétique (FROESCH et coll., 1964) et ne semble donc pas contribuer directement au réglage du taux de la glycémie. Un abaissement de la NSILA a également été constaté par FROESCH et coll. (1964) dans le sérum de rats en diabète alloxanique.

Remerciements. Je remercie Madame LUCIENNE GUIDOUX-GRASSI et Mademoiselle JANINE MAERKI du laboratoire de Biochimie de la Clinique Médicale Universitaire de Lausanne (Prof. J.-P. FELBER) d'avoir bien voulu effectuer les déterminations d'insuline immuno-réactive.

Je remercie Messieurs PIERRE MÖSLI, de l'Institut d'Anatomie Pathologique de l'Université de Lausanne (Prof. CHR. HEDINGER) et BODO RIEDEL, de l'Institut d'Histologie et d'Embryologie de l'Université de Lausanne (Prof. O. BUCHER) d'avoir bien voulu effectuer les examens histologiques.

Je remercie Mademoiselle JOSETTE LEUBA de l'Institut de Biochimie Clinique de l'Université de Genève (Prof. A.E. RENOLD) de nous avoir enseigné la méthode biologique de détermination de l'insuline

Je remercie Mesdemoiselles UTA PERTHEL, BERNDETTE FILLOUX et ANTOINETTE LE GRAND de leur précieuse collaboration technique.

Bibliographie

- ALTSZULER N., R. STEELE, I. RATHGEB, and R.C. DE BODO: Glucose metabolism and plasma insulin level during epinephrine infusion in the dog. *Amer. J. Physiol.*, **212**, 677—682 (1967).
- — J. TOBIN, I. RATHGEB, and R.C. DE BODO: Effect of anti-insulin serum on glucose production and uptake in dogs. Abstract No. 333, p. 168, 5th Congress International Diabetes Federation. *Excerpta Medica International Congress Series No. 74*, 1964.
- ANGLESIO, E., E. HIRSCHBERG, and A. GELLHORN: Effects of carcinostatic and other biologically active compounds in the normal rat: evaluation as a system for cancer chemotherapy screening. *Cancer* **18**, 113—116 (1958).
- CARLINER, N.H., J.-L. SCHELLING, R.P. RUSSELL, R. OKUN, and M. DAVIS: Thiazide and phtalimidine induced hyperglycemia in hypertensive patients. *J. amer. med. Ass.* **15**, 535—540 (1965).
- CHAZAN, J.A., and B.R. BOSHELL: Etiological factors in thiazide induced or aggravated diabetes mellitus. *Diabetes* **14**, 132—136 (1965).
- FINNERTY F.A.: Special problems in the therapy of hypertension. Discussion on hypertension: on the first Hahnemann Symposium on hypertensive disease, p. 635. J.H. MOYER, éd. Philadelphia: Saunders 1959.

- FRANKSON, J. R. M., Y. ARNOULD, W. MALAISSE, and V. CONARD: Glucose metabolism in the normal anesthetized dog injected successively with anti-insulin serum and insulin. *Diabetes* **13**, 532—541 (1964).
- FROESCH, E. R., H. BURGI, E. B. RAMSEIER, P. BALLY, and A. LABHART: Antibody suppressible and non suppressible insulin-like activities in human serum and their physiological significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. clin. Invest.* **42**, 1816—1834 (1963).
- — W. A. MÜLLER u. A. LABHART: Mit anti-insulin Serum hemmbare und nicht hemmbare Insulinaktivität im menschlichen Serum. *Schweiz. med. Wschr.* **94**, 309—313 (1964).
- A. JAKOB, G. R. ZAHND, and E. SIMON: Immunoreactive insulin, suppressible and non suppressible insulin-like activities in rats after administration of glucose and induction of hyperglycemia by mannoheptulose. *Diabetologia* **2**, 265—268 (1966).
- GUIDOUX, R., et G. PETERS: Effets diabétogènes de l'hydrochlorothiazide et du N-monométhylacétamide chez le rat. *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **23**, C 93—C 94 (1965).
- GUIGNARD, J.-P.: Mécanisme de la réabsorption rénale des bicarbonates chez le rat. *Helv. physiol., pharmacol. Acta* **24**, 193—218 (1966).
- HALES, C. N., and J. P. RANDLE: Immunoassay of insulin with antibody precipitate. *Lancet* **1963 I**, 200.
- INGLE, D. J., and J. Q. GRIFFITH: Surgery of the rat, in: *The rat in laboratory investigation*, p. 446. Ed.: E. J. FARRIS et J. Q. GRIFFITH, New York: Hafner publ. Co. 1949.
- LECHAT, P., J. BROWAES, et D. WALLON: Action caryoclasique du N-monométhylacétamide à doses élevées chez le rat. *C. R. Acad. Sci.* **251**, 1937—1939 (1960).
- LOSERT, W., G. SENFT und R. SITT: Hormonale Regulationsstörungen als Ursache der Benzothiadiazin bedingten Kaliumverluste. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **251**, 120—121 (1965).
- MENG, K., und K. KRONEBERG: Untersuchungen an der Ratte zur Frage der diabetogenen Wirkung von Saluretica. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **251**, 433—444 (1965).
- MORGAN, C. R., and A. LAZAROFF: Immunoassay of pancreatic and plasma insulin following alloxan injection of rats. *Diabetes* **14**, 669—671 (1965).
- PETERS, G., R. GUIDOUX und L. GRASSI: Die diabetogene Wirkung von N-monomethylacetamid. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **255**, 58—59 (1966).
- REINERT, H.: Urethane hyperglycaemia and hypothalamic activation. *Nature* **204**, 889—891 (1964).
- RENOLD, A. E., D. B. MARTIN, Y. M. DAGENAIS, J. STEINKE, R. J. NICKERSON, M. C. SHEP, and V. LAURIS: Measurement of small quantities of insulin-like-activity using rat adipose tissue. I. A proposed procedure. *J. clin. Invest.* **39**, 1487—1498 (1960).
- SAMAAN, N., C. T. DOLLERY, and R. FRASER: Diabetogenic action of benzothiadiazines. *Lancet* **1963 I**, 1244—1246.
- R. FRASER, and W. J. DEMPSTER: The "typical" and "atypical" forms of serum insulin. *Diabetes* **12**, 339—348 (1963).
- SCHOLZ, J.: Zur Toxikologie einiger für medizinische Zwecke gebräuchlicher organischer Lösungsmittel. *Arch. Pharm.* **227**, 161 (1939).
- SCHULTZ, G., W. LOSERT, G. SENFT und R. SITT: Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von Diazoxide, Hydrochlorothiazide und Furosemid auf den Kohlenhydratsstoffwechsel der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **255**, 74—76 (1966).
- SCOW, R. U.: Total pancreatectomy in the rat: operation, effects and postoperative care. *Endocrinology* **60**, 359—367 (1956).
- SHAPIRO, A. P., and T. G. BENEDEK, and J. L. SMALL: Effect of thiazides on carbohydrate metabolism in patients with hypertension. *New Engl. J. Med.* **265**, 1028—1033 (1961).
- SITT, R., G. SENFT, W. LOSERT und H. C. BARTELHEIMER: Wirkungsverlust des Insulins als Ursache der N-monomethylacetamid-hyperglykämie. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmacol.* **255**, 383—387 (1966).
- SNEDECOR, G. W., and W. G. COCHRAN: *Statistical methods*. Ames (Iowa): The Iowa State University Press 1967.
- STEINKE, J., A. SIREK, V. LAURIS, F. D. W. LUKENS, and A. E. RENOLD: Measurement of small quantities of insulin-like-activity with rat adipose tissue. III. Persistence of serum ILA after pancreatectomy. *J. clin. Invest.* **41**, 1699—1707 (1962).
- TABACHNICK, I. I. A., A. GULBENKIAN, and A. YANNEL: The hyperglycemic activity of benzothiadiazine and other diuretics. *Life Sciences* **4**, 1931—1936 (1965).
- THIERSCH, J. B.: Effects of acetamides and formamides on the rat litter *in utero*. *J. Reprod. Fertil.* **4**, 219—220 (1962).
- WALLON, D., J. BROWAES, et P. LECHAT: Action caryoclasique de différents N-alcylamides à doses élevées chez le rat. *Le Sang* **31**, 871—879 (1960).
- WATSON, L. S., S. M. van PELT, and Ch. A. WINTER: Effect of chlorothiazide on blood sugar of rats. *Fed. Proc.* **23**, 438 (1964).
- WELLER, J. M., and P. E. BORONDY: Effects of benzothiadiazine drugs on carbohydrate metabolism. *Metabolism* **14**, 708—714 (1965).
- WEST, E. S., W. R. TODD, H. S. MASON, and J. T. van BRUGGEN: *Textbook of Biochemistry*, p. 1457. New York, London: Macmillan 1966.
- WOLFF, F. W., W. W. PARMLEY, K. WHITE, and R. OKUN: Drug-induced diabetes. Observations concerning the diabetogenic activity of long-term benzothiadiazine administration. *J. amer. med. Assoc.* **185**, 568—574 (1963).
- — Further observations concerning the hyperglycemic activity of benzothiadiazines. *Diabetes* **13**, 115—121 (1964).
- WRIGHT, P. H.: Experimental diabetes induced by insulin antibodies. From: *On the nature and treatment of diabetes*, p. 354. LEIBEL, B. S., and G. A. WRENSHALL, Ed. Amsterdam: Excerpta medica Foundation 1965.

Dr. R. GUIDOUX
 Université de Lausanne
 Faculté de Médecine, Institut de
 Pharmacologie
 21, Rue du Bugnon, Lausanne