Université Fédérale

Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

**En vue de l'obtention du**

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**
**Estelle Grasset**

**le** vendredi 16 décembre 2016

**Titre :**

Mécanismes moléculaires régulant l'action du Glucagon-Like Peptide One dans la physiopathologie du diabète de type 2.

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**
ED BSB : Maladie métaboliques et cardiovasculaires

**Unité de recherche :**
UMR 1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, INSERM

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Rémy Burcelin, Directeur de Recherche
François Tercé, Chargé de Recherche

**Jury :**
Sophie Layé, Directrice de Recherche (Rapporteur)
Corinne Leloup, Professeur (Rapporteur)
Michel Neunlist, Directeur de Recherche (Rapporteur)
Pierre Gourdy, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier (Examinateur)

*« Toutes les fleurs de demain sont dans les semences d'aujourd'hui »*
*Proverbe chinois*
*A mes proches*

*« C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre. »*
*« La nature de notre esprit nous porte à chercher l'essence ou le pourquoi des choses. »*
*Introduction à l'étude de la médecine expérimentale (1865)*
*Claude Bernard*

I. Remerciements ..... 6
II. Abréviations ..... 9
III. Avant-Propos ..... 11
IV. Chapitre 1 : Du métabolisme cellulaire au développement des maladies métaboliques : une évolution complexe ..... 12
*A. La cellule et son métabolisme ..... 12*
1. Une unité de vie, la cellule ..... 12
2. La découverte du métabolisme cellulaire ..... 14
3. Fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire ..... 15
*B. De la cellule aux mammifères, évolution et optimisation de la gestion énergétique et métabolique ..... 17*
1. Les eucaryotes unicellulaires ou protozoaires : compartimentation et organisation d'un « tube digestif intracellulaire » ..... 18
2. Les métazoaires : agencements des cellules en tissus organisés ..... 18
3. L'apparition des cellules digestives, des cellules nerveuses et des premières communications intercellulaires ..... 18
4. Les cœlomates – acquisition d'un système circulatoire et respiratoire, développement d'appareils locomoteurs facilitant la conquête du milieu terrestre ..... 20
5. Les chordés - acquisition d'un système circulatoire fermé et d'un système nerveux central vrai, localisé au niveau dorsal. ..... 21
6. Conclusion ..... 22
*C. Des organismes programmés de manière ancestrale pour répondre aux cycles famine / abondance nutritionnelle ..... 22*
1. « Thrifty genotype concept » ou concept du génotype « vigoureux » ..... 22
2. « Thrifty phenotype concept » ou le concept du phénotype « vigoureux » ..... 24
*D. Le diabète, maladie du sucre ..... 25*
1. Découverte des diabètes ..... 25
2. Définition du diabète ..... 26
3. Quelques données actuelles et chiffrées sur le diabète ..... 27
V. Chapitre 2 : La régulation du métabolisme glucidique ..... 29
*A. AMPK, protéine ancestrale, senseur du statut énergétique intracellulaire ..... 29*
*B. Le Pancréas – organe clé dans la régulation hormonale de la glycémie ..... 31*
1. Introduction ..... 31
2. L'insuline, hormone pancréatique hypoglycémiante ..... 33
3. Le glucagon, hormone pancréatique hyperglycémiante ..... 42
*C. Le Foie – production et stockage de glucose ..... 47*
1. Introduction ..... 47
2. L'entrée et la sortie du glucose ..... 48
3. Gestion de la réserve hépatique en glucose, le glycogène : la glycogénèse et la glycogénolyse ..... 49
4. En période de jeûne prolongé : la néoglucogenèse ..... 49
5. La production d'énergie par les hépatocytes : la glycolyse en période postprandiale et la lipolyse en période de jeûne ..... 51
6. Anabolisme et catabolisme hépatique de lipides sous l'influence du sucre ..... 52

*D. Les muscles et le tissu adipeux – organes de stockage du glucose, fournisseurs de substrats néoglucogéniques et glandes endocrines régulant le métabolisme glucidique 53*
*E. Le système nerveux central et autonome – régulation nerveuse de la glycémie .....55*
1. Détection du glucose par le SNA au niveau de l'intestin et de la veine porte entéro-hépatique .....57
2. Les innervations autonomes motrices des tissus métaboliques .....58
3. L'activation directe des neurones centraux des noyaux hypothalamiques par les hormones et les nutriments. .....59
*F. Le tube digestif et le rein – épithéliums impliqués dans l'absorption et la production de glucose .....64*
1. L'intestin : l'absorption de glucose exogène en période postprandiale et la production de glucose en période de jeûne .....64
2. Le rein : recapture du glucose sanguin et néoglucogenèse .....67
*G. Conclusion .....69*
*H. Dérégulation multi-tissulaire du diabète de type 2 .....70*
1. La dérégulation de la balance hormonale insuline / glucagon : implication de la lipotoxicité, la glucotoxicité et l'inflammation à bas bruit .....71
2. Altération du système nerveux : problème de détection du glucose et neuropathie diabétique .....80
3. Tube digestif et rein : augmentation de l'absorption et de la production du glucose .....84
4. Conclusion .....85

**VI. Chapitre 3 : L'intestin et les incrétines .....87**
*A. L'intestin, glande neuroendocrine .....87*
1. Introduction .....87
2. Le système épithélial et entéro-endocrinien .....89
3. Le système nerveux entérique .....96
4. Détection intestinale du glucose .....108
5. Conclusion .....111
*B. Les incrétines et le GLP-1 .....112*
1. Introduction – La découverte des incrétines .....112
2. L'expression intestinale du préproglucagon .....114
3. La maturation post-traductionnelle intestinale du proglucagon .....115
4. La sécrétion du GLP-1 .....116
5. La dégradation sanguine du GLP-1 .....118
6. L'homéostasie des cellules L .....119
7. Le GLP-1 au cours du DT2 .....120
*C. Actions nerveuses et endocrines du GLP-1 .....121*
1. Introduction .....121
2. Le GLP-1r, ses voies de signalisation, son action endocrine. .....121
3. Les actions nerveuses du GLP-1 .....128
4. BILAN .....130
*D. L'intestin - site de symbiose – relation hôte/microbiote .....132*
1. Introduction .....132
2. Influence du microbiote sur le métabolisme, la détection des nutriments et les maladies métaboliques .....139

3. Microbiote et maladie métabolique ..... 142
4. CONCLUSION ..... 145
*E. Les traitements du DT2 ..... 146*

VII. PROBLEMATIQUE ..... 154

VIII. CHAPITRE 4 : ARTICLE - La dysbiose associée au diabète de type 2 induit une perte de la réponse au GLP-1 par des mécanismes dépendants du NO et de l'axe intestin-cerveau 156
*A. Résumé ..... 156*
*B. Manuscrit de l'article ..... 157*

IX. Chapitre 5 : Le liraglutide, agoniste du GLP-1r, améliore l'activité vagale impliquée dans l'axe intestin-cerveau-cellule β ..... 203
*A. Introduction ..... 203*
*B. Résultats ..... 204*
*C. Discussion ..... 207*

X. Chapitre 6 : Influence du cycle circadien sur l'action du GLP-1 et ses altérations possibles au cours du diabète de type 2. ..... 209
*A. Introduction ..... 209*
*B. Résultats ..... 213*
1. Oscillations nycthémérales des sécrétions hormonales, des gènes et des bactéries de l'ileon chez des souris contrôles ..... 213
2. L'action du GLP-1 est différente entre le jour et la nuit ..... 216
3. Les souris résistantes au GLP-1 montrent des altérations de l'expression des protéines « clock » au niveau iléal ..... 217
*C. Discussion et conclusion ..... 218*

XI. Chapitre 7 : Conclusion et perspectives ..... 221
*A. Comment le microbiote modifie-t-il l'action nerveuse du GLP-1 ? ..... 222*
*B. Quelle est la voie de signalisation intracellulaire impliquée ? ..... 225*
*C. Le nerf vague ..... 226*
*D. Augmentation de la sécrétion de GLP-1 ? ..... 228*
*E. Conclusion générale ..... 229*

XII. Références ..... 230

# I. Remerciements

*Le travail effectué au cours de ma thèse n'aurait pu se faire sans l'aide de nombreuses personnes qui m'ont soutenu et épaulé, conseillé et appris, formé, encadré, donné toute leur confiance. Ces personnes sont les suivantes :*

*Je remercie tout d'abord l'unité mixte de recherche 1048, autrement nommée institut de maladies métaboliques et cardiovasculaires, et son directeur Angelo Parini pour m'avoir permis d'effectuer mon apprentissage et mes travaux au sein de ses locaux. Je remercie également l'ensemble des plateformes techniques (imagerie, génomique, animalerie, histologie) qui m'ont permis d'obtenir les résultats cités dans ce manuscrit.*

*Je remercie l'université Paul Sabatier et l'école doctorale de Toulouse « Biologie, Santé, Biotechnologies », particulièrement Philippe Valet, pour leur disponibilité, leur organisation, leurs conseils et leur gentillesse.*

*Je remercie Michel Neunlist, Corinne Leloup, Sophie Layé et Pierre Gourdy pour avoir accepté d'être les membres du jury de ma thèse.*

*Je remercie Rémy Burcelin, mon directeur de thèse, également directeur de l'équipe 2 « Facteurs de risque intestinaux, diabètes, dyslipidémies », pour m'avoir financé, pour m'avoir fait confiance et offert de nombreuses opportunités (congrès nationaux et internationaux), pour m'avoir appris à penser, à critiquer et à réfléchir, pour m'avoir donné une liberté d'agir, d'interpréter et d'orienter les expériences, pour les discussions et les échanges scientifiques. Bien que ce ne fut pas toujours facile, je pense que je n'aurais pas acquis une telle expérience ailleurs.*

*Je remercie François Tercé, mon co-directeur de thèse, pour son soutien humain et psychologique dans les moments de doutes et de remises en question, pour les fous rires, pour les conseils bien avisés sur les protocoles expérimentaux, l'écriture d'articles, de projets et de ce manuscrit, pour sa confiance et sa reconnaissance, pour sa douceur et sa sagesse. Sans lui, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail et devenir celle que je suis devenue.*

*Je remercie l'ensemble de l'équipe 2. Bien que j'aie effectuée des stages dans d'autres laboratoires auparavant, je suis arrivée dans cette équipe naïve et inexpérimentée dans le domaine de la recherche. De nombreuses personnes m'ont permis d'acquérir très rapidement et de façon experte les différentes techniques du laboratoire. Je cite notamment Aurélie Waget, Céline Garret et Pascale Klopp. Puis, la structure du laboratoire se modifiant et évoluant au fil du temps, j'ai rencontré et travaillé avec d'autres personnes, Julie Charpentier, Anthony Puel, Pascale Loubière, Vincent Azalbert, Léa Lasvaux et Anaïs Giry. Certaines d'entre elles sont devenue des personnes très importantes dans ma vie professionnelle comme personnelle, avec qui j'ai lié une amitié très forte et sans elles, beaucoup de ce travail n'aurait pu être réalisé. Je pense notamment à Anthony Puel, Pascale Loubières, Léa Lasvaux et Anaïs Giry. J'aimerais aussi remercier particulièrement Céline Pomié, Vincent Blasco-Baques, Matteo Serino, Xavier Collet et Solange Tang avec qui j'ai partagé de très bons moments, de jolies discussions plus ou moins scientifiques.*

*Je remercie également certaines personnes extérieures au laboratoire comme Ana Granado pour ces conseils, son grain de folie, sa douceur ; Carla Cirillo pour son aide, son expérience, sa disponibilité, sa gentillesse ; Vassilia Théodoroux et Eric Sérée, membres de mon comité de thèse, pour leur humanité, leurs conseils et leur disponibilité. Je remercie toutes ces personnes rencontrées en congrès ou autres événements scientifiques et qui*

*m'ont donné envie de réaliser une carrière dans la recherche : Pierre Gourdy, Bernard Thorens, Fredrik Bäckhed, Christophe Magnan, Barbara Suzini, Yanis Saint Marie, Xavier Prieur, Cédric Lemay, et d'autres.*

*Je remercie tous mes stagiaires : Sara Mikolasek, Paul Alayrac, Djamaa Atamena, Tom Baillon et Lorraine Smith et également les autres stagiaires qui ont travaillé dans ce laboratoire : Hanna Ilchmann, Céline Schott, Elodie Montigneaux, ... J'ai vécu des moments inoubliables, uniques, des expériences réalisées dans la détente et les rires. J'ai beaucoup appris et échangé.*

*Enfin et ce n'est pas les moindres, mes derniers remerciements vont à mes proches. Premièrement, à mon compagnon, Nicolas Ribet, qui a vécu les week-end interrompus par les expériences ou l'écriture de la thèse, qui a affronté et supporté mes moments de doutes et de remises en question mais qui a également partagé mes moments de joies et de réussite, qui s'est porté volontaire pour corriger une partie de ce manuscrit alors que ce n'est pas son domaine. Ensuite, mes meilleures amies Tiffany et Emily qui, malgré la distance et ces années sans se revoir, reste toujours disponible. Je souhaite remercier Aude pour son aide dans la correction de ce manuscrit, son soutien et la façon dont elle a de faire oublier les soucis. Je souhaite remercier ma sœur, Natacha Grasset, pour sa douceur et sa sagesse. Je remercie également ma famille : mon père Gérard, ma marraine Anita, mon filleul Geoffroy, … ; et ma belle-famille : Daniel, Emmanuelle, Pierre, Edouard, Emilie, Florian, … qui, malgré la distance qui nous sépare, ont toujours été près de moi. Enfin, je remercie les personnes qui ne sont plus là aujourd'hui, ma mère Gisèle et ma grand-mère Michèle, mais qui m'ont donné la force de continuer et d'aboutir ce travail.*

# II. Abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptaminou sérotonine
ABC : ATP binding cassette
AC : adénylate cyclase
ACC : acétyl-CoA carboxylase
Acétyl CoA : acétyl coenzyme A
ACh : acétylcholine
ACTH : adrenocorticotrophic hormone
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AGCC : acide gras à chaine courte
AgRP : agouti related peptide
AKT : protéine kinase B
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : adenosine monophosphate dependant kinase.
AMPc : AMP cyclique
APJ : apelin receptor
ARC : arcuate nucleus
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
αMSH : α-melanocyte-stimulating hormone
ATP : adénosine triphosphate
BDNF : brain-derived neurotrophic factor
BHE : barrière hémato-encéphalique
Bmal1 : brain–muscle-Arnt-like 1
CamKKβ : calmoduline kinase kinase β
CaSR : calcium sensing receptor
CCK : cholécystokinine
CD36 : cluster of differentiation 36
CEE : cellule entéro-endocrine
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ChAT : choline acetyltransferase
ChREBP : carbohydrate-responsive element-binding protein
ClpB : caseinolytic protease B
CMH 1/2 : complexe majeur d'histocompatibilité 1/2
CoA : coenzyme A
CRE : cAMP responsive element
CREB : cAMP response element-binding protein
Cry1 et 2 : cryptochrome 1 et 2
DAG : diacylglycérol
DHA : dorsal hypothalamic area
DMNx : dorsal motor nucleus of the vagus nerve
DMH : dorsomedial hypothalamic nucleus
DPP4 : dipeptidylpeptidase 4
DT2 : diabète de type 2
EGFR : epidermal growth factor receptor
Elov : elongation of very long-chain fatty acids
EPAC : exchange protein directly activated by cAMP
ERK 1/2 : extracellular signal-regulated kinases 1/2
ERO : espèce réactive de l'oxygène
FABP : fatty-acid-binding protein
FACS : fluorescence-activated cell sorting
FADH : flavine adénine dinucléotide
FAS : fatty acid synthase
FATP : fatty acid transport protein
FBP2 / PFK2 : fructose bisphosphatase 2 ou phosphofructokinase 2
FFAR : free fatty acid receptor
FGF : fibroblast growth factor
FIAF : fasting-induced adipocyte factor
FOS : fructoligosaccharides
FOXO : Forkhead box 1: farnesoid X receptor
FXR
G6P : glucose 6 phosphatase
GABA : γ-aminobutyric acid
GDNF : glial cell-derived neurotrophic factor
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GFP : green fluorescent protein
GIP : glucose-dependent insulinotropic peptide ou gastric-inhibitory peptide
GK : glucokinase
GKRP : glucokinase regulatory peptide
GLP-1/2 : glucagon-like peptide ½
GLP-1r : récepteur au GLP-1
GLUT : glucose transporter
γMSH : γ-melanocyte-stimulating hormone
GNSO : S-nitroglutathione
GOS : glucoligosaccharides
GP : glycogène phosphorylase
GPR : G-protein coupled receptor
GRK : G-protein coupled receptor kinase
GRP : gastrin releasing peptide
GS : glycogène synthase
GSK3β : glycogène synthase kinase 3β
Hb1Ac : hémoglobine glyquée
HC-HFD : high-carbohydrate high-fat diet
HDAC : histone désacétylase
HDL : high density lipoproteine
HFD : high-fat diet
HIF-1 : hypoxia-inducible factors 1
HNF-4 : hepatocyte nuclear factor 4
HSP-27 : heat shock proteins 27
ICV : injection intracérébroventriculaire
IGF : insulin growth factor
IFAN : intestinofugal afferent neurone
IFNγ : interféron γ
IKK : IκB kinase
IκB : inhibitor of NF-κB
IL 6, 1β, 10 : interleukines 6, 1β, 10
IMC : indice de masse corporelle
$IP_3$ : insositol-3-phosphate
IPAN : intrinsic primary afferent neurones
IRS : insulin receptor substrates
JNK : c-Jun N-terminal kinases
$K_{ATP}$ : canaux $K^+$ sensible à l'ATP
KO : knock out
LHA : lateral hypothalamic area
LHS : lipase hormono-sensible
LKB1 : liver kinase B1
LPL : lipoprotéine lipase
LPS : lipopolysaccharides
LRH-1 : liver receptor homolog-1
MCT : monocarboxylate transporter
MC4R : melanocortin 4 receptor
MEF-2c : myocyte-specific enhancer factor 2c
MRVL : medulla rostral ventrolateral
mTOR : mammalian target of rapamycin
mTORC 1, 2 : mammalian target of rapamycin complex 1 et 2

| | |
|---|---|
| NAD | : nicotinamide adénine |
| NADH | : nicotinamide adénine dinucléotide |
| MAMP | : microbial associated molecular patterns |
| MAPK | : mitogen-activated protein kinase |
| NFκB | : nuclear factor-κ B |
| NGF | : neuronal growth factor |
| NK | : natural killer |
| NLR | : NOD-like receptor |
| nNOS | : neuronal nitric oxyde synthase |
| NO | : oxyde nitrique |
| NOD | : nucleotide oligomerization domain receptor |
| NPC1/L1 | : Niemann–Pick C1-like 1 |
| Nr1d1 | : nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 ou REV-ERBα |
| NTS | : noyau du tractus solitaire |
| OMS | : organisation mondiale de la santé |
| p70S6K1 | : ribosomal |
| PACAP | : pituitary adenylate cyclase activating |
| PARP | : poly (ADP-ribose) polymérase |
| PAX 4, 6 | : paired box protein 4, 6 |
| PC | : pyruvate carboxylase |
| PC 1,2 ou 3 | : proconvertase |
| PDH | : pyruvate déshydrogénase |
| PDK1/2 | : phosphoinositide-dependent kinase 1/2 |
| PDK | : pyruvate déshydrogénase kinase |
| PDX1 | : insulin promoter factor 1 ou pancreatic and duodenal homeobox 1 |
| PDX | : polydextrose |
| PEPCK | : phosphoénolpyruvate carboxykinase |
| Per1, 2 et 3 | : period 1, 2 et 3 |
| PFK2 / FBP2 | : phosphofructokinase 2 ou fructose bisphosphatase 2 |
| PGC-1α | : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α |
| PI3K | : phosphoinositide-3-kinase |
| $PIP_3$ | : phosphatidylinositol-3-phosphate |
| PK | : pyruvate kinase |
| PKA | : protéine kinase A |
| PKB | : protéine kinase B, AKT |
| PKC | : protéine kinase C |
| PKR | : protéines kinases R |
| PLC | : phospholipase C |
| POMC | : pro opio melanocortin |
| PP1 | : protéine phosphatase 1 |
| PPG | : propréproglucagon |
| PRR | : pattern recognition receptors |
| PVH | : paraventricular hypothalamus |
| PYY | : peptide dityrosine |
| RLR | : RIG-I like receptors |
| RE | : réticulum endoplasmique |
| REV-ERBα | : reverse erythroblastosis virus α ou Nr1d1 |
| Prph | : périphérine |
| RORα | : RAR-related orphan receptor α |
| RIP2 | : receptor-interacting protein 2 |
| RT-qPCR | : real-time reverse and quantitative transcription |
| S100 β | : S100 calcium binding protein β |
| SCD | : stearoyl-CoA desaturase |
| SCN | : suprachiasmatic nucleus |
| SGLT 1, 2 | : sodium glucose linked transporter |
| SMCT | : sodium monocarboxylate transporter |
| SNA | : système nerveux autonome |
| SNC | : système nerveux central |
| SNE | : système nerveux entérique |
| SNP | : système nerveux parasympathique |
| SNS | : système nerveux sympathique |
| SREBP1c | : sterol regulatory element-binding proteins 1c |
| SSTR | : somatostatine receptor |
| STAT5 | : signal transducer and activator of transcription 5 |
| TGF β1 | : transforming growth factor β1 |
| TGR5 ou Gpbar1 | : G-protein-coupled bile acid receptor |
| TLR | : Toll-like receptor |
| TNFα | : tumor necrotic factor α |
| TRIF | : TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β |
| UCP | : uncoupling protein |
| VIP | : vasoactive intestinal peptide |
| VMH | : ventromedian hypothalamus |

# III. Avant-Propos

Depuis l'avènement de l'ère industrielle, il y a un siècle et demi, jusqu'aux révolutions scientifiques des trente dernières années avec l'arrivée de l'ère numérique, les progrès technologiques ont impacté de façon brutale et inexorable les modes de vie des populations à l'échelle du monde. L'évolution biologique n'étant pas préparée à s'adapter dans les mêmes échelles de temps, il en résulte une inadéquation de nos métabolismes avec notre environnement et nos nouveaux standards de vie : sédentarité, alimentation plus grasse et riche en sucres, pollutions nombreuses, agents chimiques présents à tous les niveaux de la chaîne alimentaire (pesticides et herbicides, conservateurs, colorants et autres agents de sapidité), abus de traitements pharmacologiques (antibiotiques). Nos organismes ont ainsi développé de nouvelles pathologies liées à cette inadaptation de notre métabolisme et qui sont dans une évolution pandémique inquiétante. Regroupées sous le terme de maladies métaboliques, on y retrouve principalement le diabète de type 2, l'obésité et les maladies cardiovasculaires. Plus grave, ces pathologies, considérées comme des maladies de pays riches il y a encore quelques années, se développent encore de façon exponentielle dans les pays pauvres et entraînent une aggravation des inégalités sociales, un mal-être des populations impactées et un coût important pour l'ensemble de la société.

La thèse présentée dans ce manuscrit s'inscrit dans le contexte physiopathologique du diabète de type 2 que l'équipe de Rémy Burcelin étudie depuis de nombreuses années. Dans une première partie bibliographique, il m'a semblé intéressant de remonter à l'origine de ce qu'est le métabolisme cellulaire et comment l'évolution de la cellule aux mammifères a permis à ce métabolisme de s'intégrer dans des organismes de plus en plus complexes et qui ont abouti, par exemple à ce que des neurones, des cellules absorptives ou sécrétoires intestinales et des bactéries se retrouvent associées pour réguler de façon optimale nos besoins énergétiques. La présentation détaillée du métabolisme glucidique et du rôle essentiel des incrétines, sécrétées par l'intestin en réponse à notre alimentation, est développée pour permettre à chaque étape de faire le lien avec le diabète de type 2. Dans la partie résultats, présentée en partie sous forme d'articles soumis, j'apporte quelques éléments de plus dans la compréhension des mécanismes moléculaires liés au développement du diabète et à la résistance de certains patients aux traitements pharmacologiques basés sur l'hormone intestinale, Glucagon-like-peptide-1 ou GLP-1. Au travers de l'utilisation de plusieurs modèles murins, j'établi un lien entre la mise en place du diabète et le développement d'une neuropathie du système nerveux entérique et avec la modification du microbiote intestinal. Dans une dernière partie, j'ai regardé l'influence du cycle nycthéméral sur l'action du GLP-1 et si une dérégulation du mécanisme circadien est présente dans le cas du diabète de type 2.

L'ensemble de ces travaux me permet d'envisager quelques pistes à tester pour appréhender des traitements potentiels qui permettraient de mieux contrôler le diabète (par exemple à base de pré-probiotiques), mais aussi pour aider à comprendre les mécanismes qui se dérégulent dans cette maladie multifactorielle et multi-tissulaire complexe permettant d'envisager des actions préventives.

# IV. Chapitre 1 : Du métabolisme cellulaire au développement des maladies métaboliques : une évolution complexe

De la cellule, élément vivant le plus simple, à l'organisme le plus évolué biologiquement, le métabolisme, et en particulier le métabolisme énergétique, montre une grande homogénéité. Pour comprendre le développement chez l'homme de maladies liées à une dérégulation profonde de son métabolisme, il m'a semblé important de commencer par l'élément de base qu'est la cellule et son métabolisme, pour ensuite regarder au cours de l'évolution ce qui a permis d'intégrer progressivement cette unité de base à des systèmes de plus en plus complexes.

## A. La cellule et son métabolisme

### *1. Une unité de vie, la cellule*

Dès l'Antiquité, Aristote a suggéré l'idée que les organismes vivants, végétaux ou animaux, étaient constitués d'éléments simples, de sous-unités qui se répètent. Ceci n'a pu être confirmé qu'avec la création du microscope au début du 17ème siècle par Galilée et Janssen. Vers la fin du 17ème et le début du 18ème siècle, Antoni Van Leeuwenhoek et Robert Hooke furent les deux premiers scientifiques à l'utiliser à des fins biologiques. En 1667, Robert Hooke, savant anglais, observa dans un morceau de liège de petites structures se répétant qu'il définit comme les éléments les plus petits constituant un organisme. Il fut le premier scientifique à utiliser le mot cellule pour parler de ces structures. Il décrit ses observations dans son œuvre, *Micrographia*. Antoni Van Leeuwenhoek, chercheur amateur hollandais, contribua fortement à l'amélioration du microscope – pouvant, à cette époque, pour les meilleures agrandir de 300 fois – ce qui lui permit d'observer les premiers micro-organismes dans les eaux saumâtres et stagnantes. Il observa également les premiers spermatozoïdes qu'il appela « animalcules » et les compara à des micro-organismes capables de générer l'organisme entier en se développant dans la matrice utérine maternelle, ne suggérant jamais l'importance des gamètes femelles dans la reproduction. Il a également observé les globules rouges dans les vaisseaux sanguins de nombreux organismes [1].

Ainsi, au cours du 17ème siècle, Robert Hooke et Antoni Van Leeuwenhoek furent des précurseurs et les initiateurs des fondements de notre biologie cellulaire actuelle. Ils sont à l'origine de la théorie cellulaire notamment du 1er axiome « tout organisme vivant est composé d'une ou plusieurs cellules ». Suite aux travaux, entre autres, de Theodor Schwann, Henri Dutrochet et Rudolph Virchow, le 2ème axiome « la cellule est l'élément, l'unité fonctionnelle de la vie » et le 3ème axiome « toute cellule provient d'une autre cellule par biogénèse » seront établit. A cette époque, l'existence de petits organismes unicellulaires, vivants, invisibles à l'œil nu, capables de se reproduire n'est pas très bien accueillie dans la communauté scientifique et religieuse soutenant alors la théorie de la

génération spontanée. Cette dernière, datant d'Aristote, suggère l'apparition d'organismes vivants, de manière spontanée, indépendamment de la matière, sans ascendance. Il fallut un siècle pour admettre ces différentes théories. Henri Dutrochet, médecin français, décrit, qu'après un bain d'acide nitrique de quelques tissus végétaux, on obtient des petits sacs qu'il a pu également observer dans des tissus frais d'animaux. Ainsi, animaux et végétaux possèdent tous deux la même unité de structure. Il décrit ensuite l'existence de plusieurs types de cellules : les cellules circulantes dans les fluides qu'il qualifie de vagabondes et les cellules fixées. Il donne aussi la définition au mot « tissu » : il s'agit d'une structure composée de ces unités élémentaires liées entre elles. Il montre aussi l'existence de différentes structures cellulaires suivant le type de tissus [2]. Les travaux de Henri Dutrochet furent publiés en 1824, 15 ans avant ceux de Theodor Schwann, physiologiste allemand. Outre sa découverte de l'enzyme digestive, la pepsine, de la fermentation du sucre et de l'amidon chez la levure, Theodor Schwann soutint la thèse de ses prédécesseurs, Robert Hooke, Antoni Van Leeuwenhoek et Henri Dutrochet : les cellules sont des unités vivantes et les organismes végétaux et animaux sont composés de ces unités. Il étudia la contraction musculaire et la morphologie nerveuse. Il remarque que des cellules composent les nerfs et que ces cellules nerveuses possèdent à leur surface une sorte de gaine composée de cellules de soutien. Ces cellules seront appelées plus tard les cellules de Schwann. Enfin, il fût l'un des précurseurs dans la notion de métabolisme en observant des modifications chimiques dans les tissus vivants. Il fût également précurseur dans les études de développement embryonnaire en précisant que chaque organisme vivant se développe à partir d'une cellule-œuf [3]. Les études de Rudolph Virchow, médecin allemand et contemporain de Henri Dutrochet et Theodor Schwann, sont aussi à l'origine de la théorie cellulaire et notamment du 3ème axiome. Il réfutait de manière virulente la théorie de la génération spontanée. Dans une de ses œuvres « Cellularpathologie » il mentionne que toute cellule est obtenue d'une précédente. Dans chacune d'elles est contenu tous les caractères de la vie. Etudiant la pathologie des cellules, il sera à l'origine de la définition de la tumeur, amas de cellules devenues malades qui se multiplient à partir de cellules malades. Il sera, avec ses contemporains Claude Bernard et Louis Pasteur, à l'origine des fondements de la médecine moderne, bien qu'il réfute entièrement la théorie de Louis Pasteur mentionnant que la maladie d'origine infectieuse est due à l'entrée de micro-organismes pathogènes dans l'organisme.

Louis Pasteur, scientifique français, a permis aussi de grandes avancées dans la biologie cellulaire grâce à ses études en microbiologie, domaine dont il est considéré comme le fondateur. Grâce à ses études et sa compréhension de la vie micro-organique, il a montré que la fermentation alcoolique était réalisée par les levures en observant des objets sphériques dans la bière et le vin. Il a établi que la contamination microbienne se faisait par l'air ou au contact des matériaux. Il a permis l'augmentation de la durée de vie de liquides alimentaires, tel que le lait, par la pasteurisation et également mis en place certains principes fondamentaux de la chirurgie tels que la décontamination des instruments

médicaux par autoclavage et le lavage des mains des médecins. D'autre part, il fut l'inventeur du vaccin et un précurseur en immunologie. Il montra qu'en injectant les micro-organismes pathogènes morts chez les patients, ces derniers pouvaient résister à l'exposition au pathogène. Enfin, il fut le scientifique qui mit fin à la fin de la théorie de génération spontanée : en mettant du sang ou des urines en présence d'un air stérilisé, il démontra que la vie n'apparaît pas dans le liquide [4].

Ainsi, de nombreux travaux scientifiques et de nombreux débats furent nécessaires pour découvrir et définir la cellule : tout organisme vivant est composé d 'une ou plusieurs unités chimiquement fonctionnelles, les cellules, qui se multiplient à partir d'unité préexistantes et qui s'organisent en structures, tissus et organes, remplissant une fonction précise. Ces siècles ont été également nécessaires à la mise en place des premiers fondements de la médecine moderne, de la microbiologie et de la biologie cellulaire.

### *2. La découverte du métabolisme cellulaire*

Comment fonctionne cette unité de vie appelée cellule ? La notion de métabolisme est apparue dès le 13ème siècle c'est à dire dès les premières explorations organiques, les vivisections : Ibn al-Nafis, savant arabe contemporain de Galien, bien connu pour ses études sur la circulation sanguine, a déclaré que les pièces d'un organisme sont dans une condition continue oscillant entre dissolution, consommation et alimentation, approvisionnement. Au cours de ce siècle, beaucoup de savants ont étudié l'importance de l'alimentation dans la vie des organismes. A la fin du 16ème et au début du 17ème siècle, Santorio Sanctorius s'est pesé avant et après différentes activités : l'alimentation, le sommeil, l'activité physique, le jeûne, l'hydratation et l'élimination. Il a conclu que la nourriture entrante était détruite et nomma ce phénomène la transpiration insensible. Mais ceci concernait le métabolisme de l'organisme entier. En réalité, c'est Louis Pasteur, au cours du 19ème siècle, qui initia la notion de métabolisme cellulaire. En effet, grâce à la fermentation alcoolique, il mit en évidence que des ferments, c'est-à-dire les levures, pouvaient transformer le sucre en alcool. Ainsi, une cellule peut modifier une molécule en une autre. Mais cette observation s'oppose à la théorie du « vitalisme » qui déclare, à cette époque, que la vie est la matière animée d'une force motrice : la force vitale, une force un peu spirituelle qui n'obéit pas aux lois physicochimiques. C'est Friedrich Wöhler qui, par l'expérience, réfuta ce principe : il synthétisa l'urée de manière chimique alors qu'on attribuait à cette molécule une production du vivant, uniquement organique. La découverte de Wöhler suggéra que les produits organiques sont issus des voies de synthèse chimiques dites métaboliques. Les études biochimiques plus évoluées du 20ème siècle, et notamment celles de Eduard Buchner, ont défini les catalyseurs de la vie : les enzymes. En effet, il reproduit la fermentation alcoolique en laboratoire avec des extraits de levure. S'en est suivie la découverte des grandes voies métaboliques notamment par le scientifique allemand et premier biochimiste Hans Adolph Krebs avec le cycle de l'acide citrique ou le cycle de Krebs, le cycle de l'ornithine ou encore le cycle des glycosylates. La mise en place de

nouveaux outils technologiques et biochimiques (spectrométrie, chromatographie, cristallographie, …) permit par la suite d'asseoir les derniers fondements de notre biochimie moderne et donc du métabolisme cellulaire.

Ainsi, grâce à de nombreux scientifiques et travaux, il a été découvert que les cellules, unités de vie, sont capables de synthèse et de dégradation d'éléments présents dans leurs milieux et ces réactions sont définies comme des voies métaboliques.

### *3. Fonctionnement du métabolisme énergétique cellulaire*

Chez tous les organismes vivants, le métabolisme énergétique constitue l'ensemble des réactions biochimiques lui permettant de se maintenir en vie et de se reproduire. Le métabolisme peut être divisé en deux types de réactions : l'anabolisme qui regroupe l'ensemble des réactions de synthèse et le catabolisme qui regroupe l'ensemble des réactions de dégradation. L'anabolisme permet à l'organisme de créer et de former les éléments dont il a besoin pour se structurer, communiquer et stocker l'énergie sous forme de molécules complexes (protéines, lipides, glucides) tandis que le catabolisme permet de produire et libérer de l'énergie stockée ou réguler l'homéostasie générale en dégradant et éliminant ces molécules complexes en unités simples. Ainsi ces réactions biochimiques constituent des mouvements permanents de synthèse-dégradation ou des flux de stockage et de déstockage de l'énergie constituant un équilibre.

La molécule caractérisant cette énergie est l'adénosine triphosphate (ATP). Elle a été isolée pour la première fois à partir de muscle et de foie, en 1929, par Karl Lohmann, biochimiste allemand et contemporain de Hans Adolph Krebs. L'existence de l'ATP avait été suggérée et imaginée 80 ans auparavant par son homologue Justus Von Liebig. En effet, il détermina que la chaleur du corps était obtenue par combustion des graisses et des hydrates de carbone. L'énergie, que l'ATP porte, est obtenue grâce à la rupture de la liaison ester phosphorique en gamma par hydrolyse exergonique capable de libérer 30,6 kJ/mol. La rupture des deux liaisons ester phosphorique en beta-gamma permet la libération de 45,6kJ/mol. Très labile, son stockage direct est limité. Ainsi, l'ATP sert de catalyseur chimique aux réactions d'anabolisme permettant son stockage indirect puis lors des réactions cataboliques, cette molécule énergétique peut être régénérée.

Au sein de l'ensemble des organismes, l'ATP est obtenu grâce à la glycolyse qui constitue une réaction hautement conservée (**Figure 1**). Le substrat de la glycolyse est le glucose. Une fois dégradé, le glucose libère deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP (à partir d'adénosine diphosphate ou ADP), deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) provenant de nicotinamide adénine dinucléotide oxydé $NAD^+$. Le NADH est un cofacteur permettant le transport d'ions $H^+$ sous forme de NADH. En conditions anaérobiques, le pyruvate est réduit en lactate (recyclant le NADH en $NAD^+$) par la fermentation lactique. Chez les organismes supérieurs, le lactate est métabolisé par le foie pour redonner du glucose *via* la néoglucogenèse. Chez certains micro-organismes possédant les enzymes nécessaires comme l'alcool déshydrogénase, le pyruvate peut être

utilisé pour la fermentation alcoolique et produire de l'alcool. Cette réaction permet également le recyclage du NADH en $NAD^+$. En conditions aérobies et grâce à la mitochondrie, le pyruvate peut également fournir d'autres molécules d'ATP en étant dégradé par le cycle de Krebs. Dans un premier temps, il est transformé, à partir de coenzyme A (CoA), en acétyl coenzyme A (acétyl CoA). Il rejoint ensuite le cycle de Krebs. Ce cycle produit de l'ATP, du NADH ou un autre cofacteur transporteur d'ions $H^+$, la flavine adénine dinucléotide réduit (FADH) et libère du $CO_2$. Ces cofacteurs sont recyclés par des réactions d'oxydoréduction réalisées dans la membrane interne de la matrice mitochondriale grâce aux enzymes de la chaine respiratoire mitochondriale. Leur oxydation permet la libération d'ions $H^+$ dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. L'$O_2$ sert d'accepteur d'électrons libérés lors de l'oxydation des cofacteurs. Le transport d'ions $H^+$, par gradient de concentration, de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale, permet le fonctionnement de la pompe à protons (ou ATP synthase) et donc la production d'ATP. Les acides gras peuvent être également oxydés dans la mitochondrie pour produire de l'énergie. Pour cela, les acyl CoA, ester entre un CoA et un acide gras, entrent dans l'hélice de Lynen pour subir la β-oxydation, réaction catabolique mitochondriale. Cette chaine catabolique permet la production d'acétyl CoA à partir d'acide gras, mais aussi de NADH et FADH. L'acétyl CoA est ensuite utilisé par le cycle de Krebs.

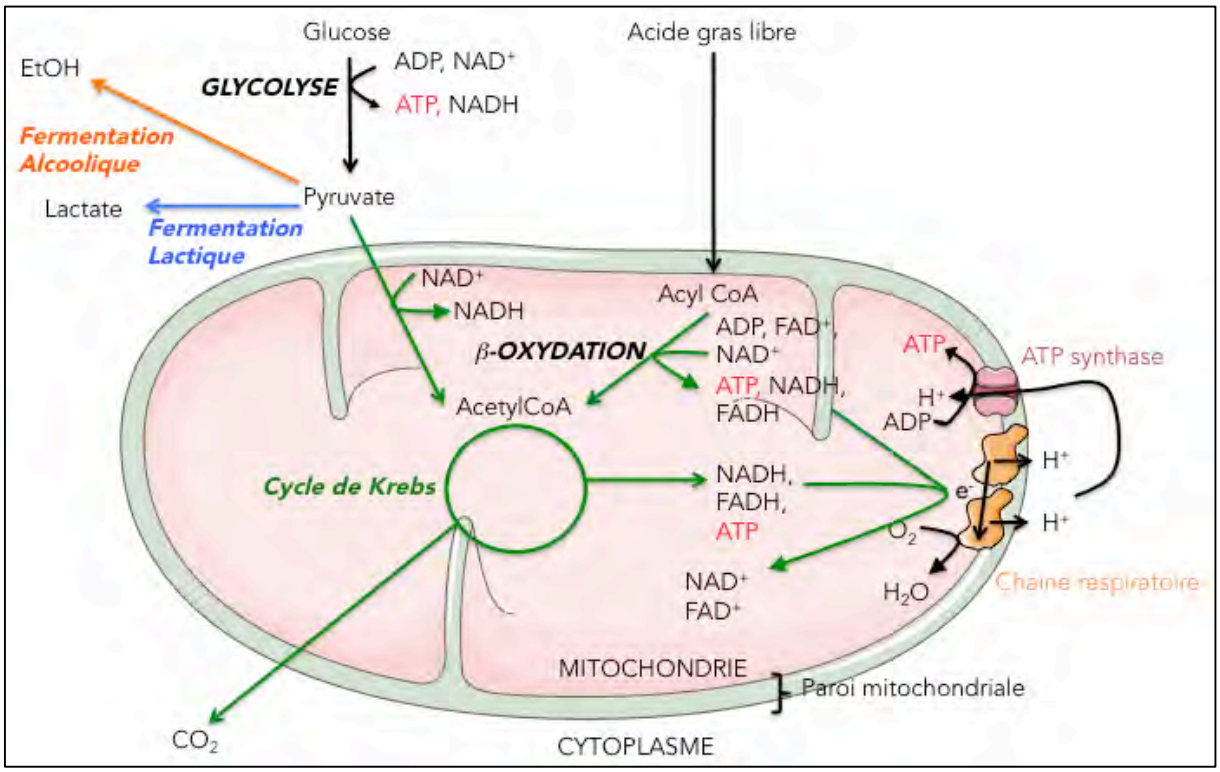



Figure 1 : La production d'ATP par les cellules. Les voies signalées en bleu concernent le devenir du pyruvate en condition anaérobie, en orange concernent le devenir du pyruvate lorsque la cellule possède l'alcool déshydrogénase, et en vert concernent les voies pouvant être réalisées lorsque la cellule possède des mitochondries.

Le glucose est donc un des nutriments essentiels de la vie et peut être comparé à l'essence pour le fonctionnement du moteur. La production de molécules carbonées telles que le glucose est permise principalement grâce aux végétaux et à la photosynthèse. Chez les animaux pluricellulaires, le glucose est apporté par la digestion et l'assimilation de la matière carbonée contenue dans les aliments d'origine végétale et animale. Ce glucose ingéré est consommé mais peut être aussi conservé, stocké, par certains tissus, sous forme de polymère : le glycogène par un processus que l'on appelle la glycogénogénèse. Le glycogène peut redonner des molécules de glucose *via* la glycogénolyse durant les périodes de jeûne et de carence. Enfin, le glucose peut être aussi obtenu à partir d'acides aminés, du lactate ou du glycérol contenu dans les lipides par la néoglucogenèse.

Pour la structure cellulaire et la division cellulaire qui nécessitent beaucoup d'énergie, d'autres nutriments sont nécessaires à la cellule comme d'autres sucres simples (fructose, ribose, …), les acides aminés et les lipides. Ainsi, le métabolisme est étroitement dépendant de la présence des nutriments dans l'environnement proche. Il a fallu des millions d'années d'évolution pour optimiser l'approvisionnement en nutriments des organismes pluricellulaires terrestres ou aquatiques.

## B. De la cellule aux mammifères, évolution et optimisation de la gestion énergétique et métabolique

Au cours de l'évolution, l'optimisation de la production d'énergie nécessaire pour le maintien de la vie et la reproduction cellulaire s'est faite par compartimentation cellulaire, tissulaire et organique des voies métaboliques, par la mise en place d'organes de stockage, de systèmes d'irrigation des organes assurant leur approvisionnement en nutriments ou en oxygène, de systèmes fins de régulation du métabolisme mais aussi par l'acquisition d'organes spécialisés dans le déplacement, la protection, la sensorialité … afin de pallier les carences possibles dans notre environnement proche, à l'échelle cellulaire, tissulaire, puis globale.

Contrairement aux procaryotes, les eucaryotes, contrairement aux procaryotes, se caractérisent par une compartimentation cellulaire qui se traduit par la présence d'organites, assimilables à des organes cellulaires : le noyau pour compartimenter et protéger l'information génétique, le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de golgi pour la synthèse et la maturation protéique et la compartimentation du calcium ($Ca^{2+}$) cytotoxique, les lysosomes pour l'élimination des déchets ou les mitochondries pour optimiser la production d'énergie à partir du pyruvate. Cette première compartimentation intracellulaire a permis entre autres d'optimiser la production d'énergie à partir des nutriments mais également la gestion des déchets métaboliques parfois cytotoxiques.

### *1. Les eucaryotes unicellulaires ou protozoaires : compartimentation et organisation d'un « tube digestif intracellulaire »*

Ce sont des systèmes dits totipotents puisque la cellule assure toutes les fonctions de l'organisme. Ils possèdent un système de nutrition intracellulaire organisée. Par phagocytose, ils ingèrent les aliments présents dans leur environnement. La zone d'ingestion, possédant une localisation précise, est nommée cytopharynx. Les nutriments ingérés vont suivre un parcours à travers des organites – vacuoles digestives de type lysosomes – afin que le protozoaire en extrait les nutriments essentiels. Ils assurent l'osmorégulation et éliminent les déchets, c'est à dire les molécules non assimilables ou cytotoxiques, par le cytoprocte qui correspond à une vacuole digestive dont l'extraction se fait par exocytose. Cette structure est comparable à un anus cellulaire. Par diffusion passive à travers leur membrane, ils éliminent les déchets azotés cytotoxiques. Ces organismes disposent également d'organites pour se déplacer et donc chercher les nutriments Ces organites peuvent être de type flagelle, cils ou pseudopodes.

### *2. Les métazoaires : agencements des cellules en tissus organisés*

Ce sont les premiers organismes pluricellulaires possédant une organisation tissulaire plus ou moins précise. Les organismes pluricellulaires les plus primitifs sont les placozoaires. Il s'agit d'un amas de cellules possédant une coordination limitée et chacune des cellules reste totipotente, s'approvisionne et excrète. L'organisation tissulaire vraie (un tissu=une fonction) est apparue avec les métazoaires. Elle s'est accompagnée par une perte de totipotence et un gain de spécificité cellulaire : une cellule = une fonction.

### *3. L'apparition des cellules digestives, des cellules nerveuses et des premières communications intercellulaires*

#### *a) Les diploblastiques – spécialisation cellulaire pour la nutrition*

Au cours de la gastrulation, les cellules s'organisent en feuillets embryonnaires. Au sein des métazoaires, on distingue deux grands groupes établis suivant la présence de deux ou trois feuillets embryonnaires. Les diploblastiques possèdent uniquement les feuillets endoderme et ectoderme. Comme leur nom l'indique, l'ectoderme est le feuillet embryonnaire donnant les tissus servant de paroi externe, protectrice tandis que l'endoderme donne tous les tissus internes constituant le tube digestif primitif. Cependant, une gelée assimilable à une matrice de collagène, la mésoglée, est sécrétée par les deux feuillets et se met en place entre l'endoderme et l'ectoderme où quelques cellules peuvent migrer. Chez ces organismes, la zone d'entrée des nutriments, assimilables à une bouche est également la zone de sortie des déchets excrétés, assimilable à l'anus.

Au sein des diploblastiques, on distingue deux grandes familles : les cnidaires et les spongiaires. Les spongiaires ou éponges sont les plus primitifs et sont composés de cellules spécialisées, unipotentes comme les cellules épithéliales, les cellules mésenchymateuses,

les cellules contractiles, les cellules inhalatrices et les cellules digestives. Pour le maintien structurel de l'organisme, les cellules peuvent produire des structures intracellulaires calcifiées ou siliciées enrichissant la mésoglée. Les spongiaires ne se déplacent pas, vivent toujours en milieu liquide et se nourrissent par filtration des nutriments dans l'eau. Ainsi à défaut d'acquérir des organes pour se déplacer et trouver la nourriture, ces organismes possèdent des cellules facilitant le mouvement de l'eau qui les entoure telles que des cellules contractiles ou ciliées. De plus, ils disposent de cellules spécialisées dans la digestion, exprimant des enzymes digestives, facilitant la dégradation des macromolécules en nutriments.

Au sein des diploblastiques, nous avons aussi les cnidaires (méduses et polypes). L'organisation tissulaire est de plus en plus coordonnée et organisée. Chez ces animaux, apparaissent les premiers phénomènes de communications intercellulaires. Les cellules se diversifient fonctionnellement un peu plus. Les cnidaires développent des organes, comme les tentacules, pour piéger leurs proies et se nourrir. On distingue les premières cellules nerveuses en étroite relation avec des cellules chimio- et photosensibles, des cellules pseudo-musculaires capables de se contracter et des cellules glandulaires sécrétant des enzymes facilitant la digestion. Leur milieu de vie est obligatoirement aquatique.

Ainsi, chez les diploblastiques, accompagnée de la perte de totipotence, sont apparues des cellules spécialisées dans : 1) la digestion, possédant des enzymes facilitant la libération de nutriments à partir de molécules complexes ; 2) la formation de structures facilitant le déplacement soit de l'organisme soit de l'environnement qui l'entoure ; et 3) la formation de structures facilitant l'immobilisation de proies dans l'unique but d'apporter la source en nutriments nécessaires à la vie et à la reproduction.

#### *b) Les triploblastiques – acquisition du tube digestif, première colonisation microbienne et céphalisation*

Chez les triploblastiques, se développe un troisième feuillet embryonnaire présent entre l'endoderme et l'ectoderme : le mésoderme. Au cours de l'évolution, des cellules ont migré vers la mésoglée et ont développé ce troisième feuillet. Il peut délimiter une cavité, le cœlome. Ce feuillet est accolé d'une part à l'ectoderme et d'autre part à l'endoderme formant l'archantéron qui constitue le tube digestif primitif.

Dès lors, les triploblastiques se divisent en trois grandes familles : 1) les acœlomates (ou vers plats), organismes sans cavité interne possédant un mésoderme « plein », 2) les pseudocœlomates (ou vers ronds) dont le mésoderme tapisse l'ectoderme uniquement, 3) les cœlomates dont le mésoderme délimite tout le cœlome, cavité au sein de laquelle se forme le tube digestif. Le groupe des triploblastiques est le premier à être caractérisé par une symétrie bilatérale, contrairement au diploblastique, définie par une absence de symétrie ou une symétrie radiale. Cette symétrie est définie par trois axes : l'axe antéro-postérieur, l'axe dorso-ventral et l'axe médio-latéral. Elle a son importance dans le développement des différents appareils et organes.

Les vers plats sont les triploblastiques les plus primitifs, mais contrairement aux diploblastiques, ils sont caractérisés par des organes et tissus différenciés notamment avec l'existence d'un tube digestif complet. Des neurones se développent à proximité de l'intestin mais le système nerveux reste encore diffus. Ce groupe ne possède aucun appareil circulatoire, respiratoire ou locomoteur.

Chez les vers ronds, comme le *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), la mise en place d'organes spécialisés s'affine. Le système digestif complet se place au niveau de la partie ventrale et on peut observer les premiers processus de céphalisation. En effet, les organes sensoriels comme des cellules photo-réceptrices orientant le déplacement et des groupes de neurones se concentrent dans la partie antérieure constituant alors une ébauche de cerveau. Ces neurones dont la fonction est essentiellement sensorielle émettent des prolongements sous forme de nerfs et de groupes neuronaux à proximité de l'intestin permettant un lien étroit entre l'alimentation, la communication nerveuse et le contrôle du déplacement.

Chez les triploblastiques, on distingue une véritable évolution en termes de tube digestif et de nutrition : le tube digestif est complet avec une entrée buccale et, pour la plupart, une sortie anale. L'œsophage sert à l'aspiration des aliments, la progression des aliments s'effectue par péristaltisme grâce à un système contractile mis en place autour de l'intestin. Enfin, la digestion se fait de manière extracellulaire par libération d'enzymes dans le lumen, ce qui les différencie des diploblastiques dont la nutrition s'effectue par phagocytose ou diffusion transpariétale. La mise en place de ce tube digestif s'est accompagnée de sa colonisation bactérienne : en effet, le tube digestif constitue un lieu privilégié pour un apport en nutriments régulier et une protection vis à vis d'un monde extérieur hostile. Le *C. elegans*, triploblastique primitif, se nourrit de bactéries qui à terme ont colonisé l'intestin. Pour ces raisons, ce vers rond constitue un modèle animal de laboratoire réductionniste dans les études moléculaires du tube digestif et du microbiote.

### *4. Les cœlomates – acquisition d'un système circulatoire et respiratoire, développement d'appareils locomoteurs facilitant la conquête du milieu terrestre*

Chez les cœlomates, le mésoderme délimite une cavité dans laquelle se développe le tube digestif. Il est à l'origine de tissus conjonctifs permettant au corps de se segmenter en différentes parties spécialisées : les métamères. Les cœlomates possèdent une extrémité supérieure contenant les organes sensoriels, la bouche et le cerveau et une extrémité postérieure contenant l'anus. Ces deux extrémités ne sont pas considérées comme des métamères car elles ne contiennent pas de vésicules coelomiques. A proximité du tube digestif se mettent en place des ganglions nerveux et des nerfs, des organes excréteurs et un système circulatoire. Ainsi, tous les organes se développent à proximité du tube digestif afin d'assurer l'approvisionnement en nutriments de tous les tissus. Entre la partie antérieure

et la partie postérieure, se mettent en place des organes permettant et facilitant le déplacement tels que les ailes, les pattes, …

Les cœlomates sont subdivisés en deux groupes suivant le développement de l'orifice embryonnaire, le blastopore, en bouche ou en anus : chez les protostomiens, cet orifice donne la bouche et chez les deutérostomiens, il donne l'anus. Chez les protostomiens, on distingue les individus à corps mou avec coquilles (les mollusques) ou sans coquille (les annélides) et les individus à corps dur notamment grâce à la présence d'un exosquelette (squelette externe), cuticule les protégeant de la déshydratation (arthropodes : insectes, crustacés, etc.). Avec les protostomiens, nous avons les premiers organismes allant à la conquête du milieu terrestre, nouvelle source de nutriments. L'apparition d'une cuticule solide et externe implique que les échanges gazeux soient limités particulièrement si les animaux sont de grande taille. Ainsi, on observe la mise en place d'organes respiratoires (branchie, système trachéen, poumon) afin d'éliminer le $CO_2$ et d'apporter l'$O_2$ et ainsi permettre la respiration cellulaire. On observe aussi la mise en place d'un appareil circulatoire, plus ou moins fermé, contenant un liquide dont le but est de transporter des gaz et de nutriments dans tout l'organisme : l'hémolymphe. Chez les mollusques (bivalves, gastéropodes), l'appareil digestif se complexifie par la mise en place d'un estomac permettant le broyage et de glandes digestives exocrines facilitant la digestion.

### *5. Les chordés - acquisition d'un système circulatoire fermé et d'un système nerveux central vrai, localisé au niveau dorsal.*

Au sein des deutérostomiens, on distingue les épineuriens qui possèdent leur système nerveux en position dorsale, à l'opposé des hyponeuriens qui possèdent leur système nerveux en position ventrale et des épithélioneuriens qui possèdent un système nerveux diffus proche de l'épithélium. Au sein des épineuriens, les chordés regroupent l'ensemble des animaux qui développent un axe interne mécanique et élastique, servant de maintien : la corde. Elle est considérée comme un squelette interne axial. Elle se situe en position dorsale et est opposée à la position ventrale de l'intestin.

Les vertébrés constituent le groupe le plus riche et le plus diversifié des chordés. Chez eux, la corde disparaît très précocement, durant le développement embryonnaire, pour donner place au squelette. Ce squelette interne est constitué de la colonne vertébrale se formant autour de la moelle épinière, de la boite crânienne se formant autour du cerveau et des os permettant la structure des membres et facilitant le déplacement. Les structures osseuses internes assurent la protection du système nerveux et permettent le déplacement. Les vertébrés regroupent les vertébrés aquatiques, les poissons et les vertébrés terrestres, les reptiles, les batraciens, les oiseaux et les mammifères.

Tous les vertébrés sont caractérisés par un système circulatoire fermé contenant comme liquide biologique, le sang. Cet appareil possède deux types de circulation : la petite circulation assurant les échanges gazeux et la circulation générale assurant la distribution des nutriments et de l'$O_2$. La circulation du sang est assurée par le cœur dont le

nombre de cavité varie entre les différents vertébrés. La fermeture du système circulatoire optimise la distribution de l'$O_2$ et des nutriments et l'élimination du $CO_2$ et des déchets. Les organismes peuvent métaboliser plus rapidement et donc se déplacer plus efficacement.

### 6. *Conclusion*

De la cellule aux vertébrés, l'évolution a donc permis de mettre en place des systèmes favorisant la nutrition et le stockage de l'énergie nécessaire au maintien de la vie et à la reproduction. En effet, au cours de l'évolution, nous avons acquis des caractères spécifiques permettant de se nourrir, d'optimiser l'arrivée des nutriments à chaque cellule et de favoriser leur stockage pour pallier à des famines éventuelles. Cela s'est traduit par l'apparition d'organes spécialisés : 1) le tube digestif permettant la digestion et l'assimilation de macromolécules, 2) un appareil locomoteur pour se déplacer, 3) des systèmes endocriniens et nerveux pour la communication intercellulaire optimisant la gestion des nutriments, 4) un système respiratoire pour faciliter l'apport en $O_2$ nécessaire à la production d'énergie et 5) d'un système circulatoire permettant la distribution des nutriments et de l'$O_2$ à chaque cellule. Ces éléments se sont perfectionnés au cours du temps, à l'échelle génétique, cellulaire, tissulaire et organique, pour optimiser chacune des fonctions.

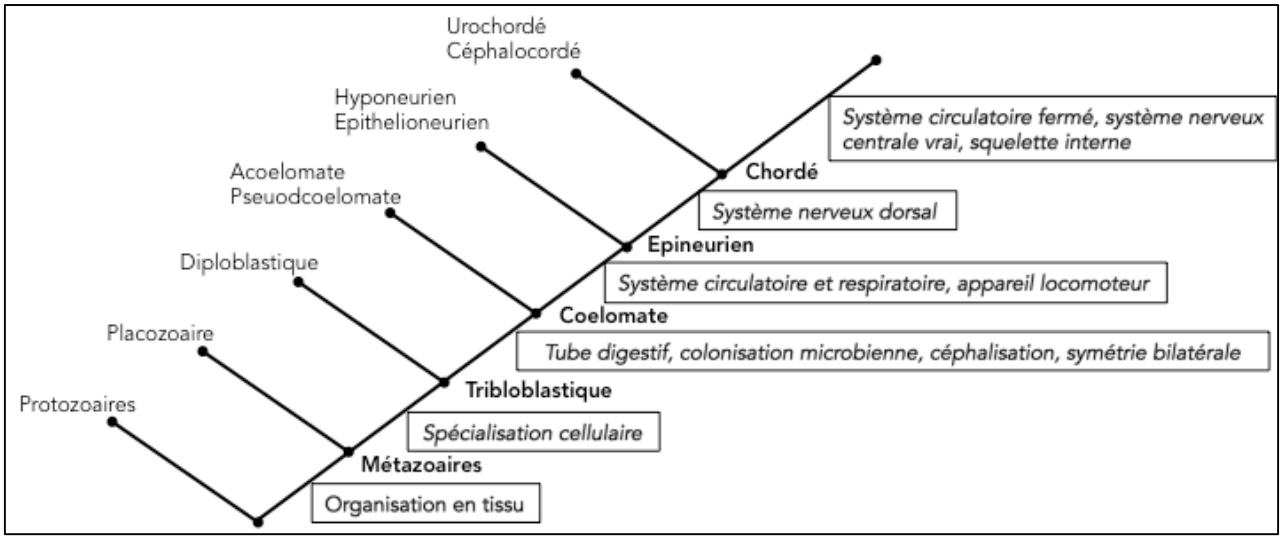



Figure 2 : Développement des organismes animaux au cours de l'évolution pour l'optimisation de l'apport en énergie à l'organisme et à chaque cellule.

## C. Des organismes programmés de manière ancestrale pour répondre aux cycles famine / abondance nutritionnelle

### 1. *« Thrifty genotype concept » ou concept du génotype « vigoureux »*

Le métabolisme est étroitement dépendant de la présence des nutriments dans l'environnement proche. En effet, les réactions d'anabolisme nécessitent l'apport d'éléments de base à la construction de molécules complexes : les glucides nécessitent

l'apport de glucose, les lipides, l'apport d'acides gras ou de stérols ou encore les protéines, l'apport d'acide aminés. Or, dans la nature, l'apport en nutriments est dépendant des saisons et au cours de l'évolution, a dû s'adapter aux périodes de grandes famines qui ont alors exercée une pression de sélection intense et modifié notre génome, qui s'est adapté à ces différents cycles abondance-famine et activité physique-repos. Ainsi, l'évolution a permis de sélectionner les êtres vivants capables d'optimiser cet apport en favorisant à la fois le stockage des nutriments mais également les comportements et la capacité à se déplacer pour aller à la recherche de ces nutriments. L'*Homo sapiens* préhistorique oscillait donc entre des périodes de famines, pauvres en nutriments ou sans exercice physique - dues par exemple à un échec durant la chasse ou une impossibilité de se déplacer à cause de maladies ou de manque d'énergie - et des périodes d'abondances nutritionnelles associée à la chasse et la cueillette, riches en activités physiques. Ces capacités évolutives sont imprimées dans notre génome depuis le Paléolithique, dans la période estimée à 50000-10000 avant Jésus-Christ [5, 6].

Notre organisme et son fonctionnement ont été optimisés génétiquement et phénotypiquement pour répondre à ces oscillations nutritionnelles et d'activités physiques : certains tissus ont pour rôle 1) le stockage de l'énergie (tissus adipeux, muscles, foie, …) et le déstockage (tissus adipeux, foie), 2) les régulations hormonales ou nerveuses de ces processus (pancréas, intestin, surrénales, thyroïdes, système nerveux …) avec une sensibilité variable des tissus périphériques à ces hormones, 3) l'approvisionnement en nutriments (l'intestin), 4) les déplacements (les muscles) et 5) les comportements (système nerveux central). Les gènes impliqués dans ces différents processus furent appelés les « thirty genes » ou « gènes vigoureux ». Cette théorie a été établit par les travaux de Neels, en 1962. Le scientifique a pensé que les gènes plus « vigoureux » avaient résisté à la pression de sélection plus fortement que les gènes moins « vigoureux » et il regroupait dans ce type de génome, les gènes les plus efficaces pour gérer le stockage, le déstockage et l'utilisation des nutriments. Des études génétiques ont estimés que ce génome n'avait subi quasiment aucune mutation depuis 10000 ans et était relativement stable [7].

Avec le début de l'ère industrielle, au 19ème siècle et surtout au cours du 20ème siècle, ces régulations acquises de manière ancestrale se sont trouvées trop rapidement inadaptées. Les nutriments sont devenus accessibles instantanément et en excès et sont de moins bonne qualité, associés à une sédentarisation déjà présente. En effet, les aliments sont de plus en plus riches en acides gras saturés et en sucres et de plus en plus pauvres en fibres et en vitamines [5]. La balance énergétique se trouve en déséquilibre avec plus d'apports que de consommation énergétique entrainant un stockage massif et inadapté des nutriments. L'adaptation aux cycles famine/abondance et repos/activité physique, ancrée dans notre génome depuis des milliers d'années, se trouve inadéquate. Ces dérèglements entrainent l'apparition de maladies chroniques de plus en plus présentes comme l'obésité, le diabète (DT2) ou les maladies cardiovasculaires [8]. Au cours d'études épidémiologiques, il a été évalué que l'absence d'utilisation d'énergie équivalente à 107kcal/jour (ce qui

équivaut par exemple à marcher plus de 20min/jours à une vitesse de 4,8km/h) augmente le risque de maladie chronique comme le DT2 [9, 10]. Il a été estimé que la prévalence du DT2 était de 1,1% dans des populations contemporaines de chasseurs-cueilleurs alors qu'actuellement dans le monde elle est d'environ 17,6% [11]. Nos gènes et le polymorphisme des gènes n'ont pas changé depuis 40 ans [11]. Ainsi, 100% de cette épidémie croissante est due à une altération de notre hygiène de vie, aux facteurs environnementaux et à l'inadaptation de notre génome à cet environnement, bien qu'il existe des mutations prédisposant à l'obésité et au diabète mais qui étaient aussi présentes avant l'ère industrielle.

Ainsi, notre modernisation et nos changements de mode de vie apparus trop vite n'ont pas permis à notre génome de s'adapter à cette abondance nutritionnelle et à l'augmentation de la sédentarité engendrant progressivement le développement des maladies métaboliques comme l'obésité et le DT2 [12, 13].

### *2. « Thrifty phenotype concept » ou le concept du phénotype « vigoureux »*

Ce concept date des années 90. Il associe à une nutrition pauvre et carencée durant la vie fœtale et néo-natale, une augmentation du risque de développer des dérèglements métaboliques tels que l'obésité et le diabète [14]. En effet, des études épidémiologiques sur des hommes de Hertfordshire ont montré que plus le poids de l'enfant à la naissance ou avant un an était faible, plus le risque de développer des dérèglements métaboliques était élevé [15, 16]. D'autres études ont également montré que les enfants nés pendant les périodes de grandes famines de la seconde guerre mondiale, aux Pays-Bas et à Leningrad, présentent une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline [17, 18]. Ainsi, un poids faible de l'enfant associé à une dénutrition fœtale ou à un état prématuré ou alors une période de dénutrition pendant la grossesse engendrent des dérèglements métaboliques importants pendant l'enfance et à l'âge adulte. Des données plus récentes ont montré que l'inverse était aussi vrai, une nutrition trop riche pendant la vie fœtale ou même le diabète gestationnel sont aussi des facteurs de risque de développer des maladies métaboliques [19-21]. Des études ont même montré que ces carences pouvaient impacter jusqu'à trois générations [22].

Les mécanismes peuvent être comparables à la théorie « thrifty genotype concept ». Le fœtus dénutri développant ses organes et notamment ses organes métaboliques (foie, tissu adipeux, muscle, pancréas) et sa sensibilité aux hormones de façon à s'adapter à une carence pauvre en nutriments (pancréas pauvre en cellule β, baisse du nombre de néphrons rénaux, changement de la structure de l'hippocampe, de l'axe hypothalamo-hypophysaire, …). Les études récentes sur l'animal ont montré que ces carences induisent des modifications épigénétiques importantes sur le génome du fœtus telles que la méthylation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) ou la modification des histones [23] responsables à terme du phénotype métabolique pathologique.

L'impact du dérèglement nutritionnel durant la gestation peut donc influencer génétiquement notre organisme sur la manière dont il gère le métabolisme et l'adapter pour pallier aux carences, au même titre que la programmation génétique optimale que l'on a acquise depuis des milliers d'années pour lutter contre la famine. Cependant, l'environnement nutritionnel post-natal n'est parfois pas adapté à la programmation épigénétique que le fœtus a acquise. On voit alors apparaître des dérèglements métaboliques importants au cours de l'enfance et au stade adulte.

## D. Le diabète, maladie du sucre

Les maladies métaboliques regroupent les altérations de gestion des nutriments (stockages, déstockages) au sein de notre organisme. Le diabète constitue une de ces altérations et est la conséquence d'une mauvaise gestion du glucose.

### *1. Découverte des diabètes*

Cette maladie est l'une des plus anciennement connues : les premiers ouvrages la mentionnant datent de 4000 ans avant Jésus-Christ dans des ouvrages chinois. Les premiers symptômes qu'on lui donne sont mentionnés sur des papyrus égyptiens antérieurs à 1500 ans avant Jésus-Christ et décrivent une soif permanente, une urine excessivement abondante et un amaigrissement. Au cours du premier siècle après Jésus-Christ, pendant l'antiquité, le terme « diabète », signifiant en grec « s'écouler à travers un siphon », lui fut attribuée par Arétée de Cappadoce qui avait été marqué par les urines abondantes et l'importante perte de poids. Il décrivait cette affection comme « une étrange maladie au cours de laquelle la chair et les os s'évacuent avec l'urine et dont la mort est très précoce ». Son contemporain Claude Galien décrit cette maladie où les reins et la vessie ne cessent d'émettre des urines. Il faudra attendre 1776 pour décrire l'importance du sucre dans la maladie ; Dolson montre la présence de sucres dans les urines grâce à une réaction avec la liqueur de Fehling et démontre que ce sucre est aussi très concentré dans le sang.

En 1850, Claude Bernard, à l'origine de la médecine expérimentale et des grands principes physiologiques, donne la vraie première définition au diabète : au cours de la vie, un être sain garde son taux de glucose plasmatique constant quelle que soit l'alimentation et dont le foie et l'intestin jouent un rôle important en assurant l'apport, le stockage et le déstockage du glucose. Chez une personne diabétique, l'existence d'une hyperglycémie et la présence anormale de glucose dans les urines se traduisent par un trouble général de la nutrition et de la gestion du glucose. Au cours du 19ème et du 20ème siècle, la découverte du pancréas, puis de l'insuline et la compréhension du métabolisme glucidique permettent de définir un peu plus précisément le diabète. Il s'agit d'une maladie dont le métabolisme glucidique est dérégulé notamment par une altération de sécrétion et d'action de l'insuline [24].

En 1920, la communauté scientifique a défini pour la première fois le syndrome métabolique : il s'agit d'une maladie caractérisée par de multiples dérèglements

métaboliques. Une vingtaine d'années plus tard, les médecins et les scientifiques ont établi un lien étroit entre le poids corporel important, l'adiposité, le DT2 et les maladies cardiovasculaires. En 1988, le groupe de Gerald Reaven utilisa le terme de syndrome X pour regrouper un ensemble de symptômes comme la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinisme, l'augmentation des triglycérides circulants, la baisse des lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein ou HDL) et l'hypertension. La dernière définition du syndrome métabolique a été donnée plus récemment dans les années 2000. Ce syndrome regroupe une hypertension, une hypertriglycéridémie, une hypoHDLémie, une obésité abdominale (tour de taille) et une hyperglycémie à jeun [25]. Les personnes atteintes ont cinq fois plus de chance de développer une DT2 et deux fois plus de chance d'avoir des maladies cardiovasculaires. Bien que le DT2 soit étroitement corrélé avec l'obésité, la maladie touche aussi des personnes de poids plus faible et les personnes âgées.

### *2. Définition du diabète*

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le diabète est « une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou que l'insuline n'agit pas correctement ». L'insuline est la seule hormone de l'organisme dite hypoglycémiante, elle a pour but de favoriser la capture et la consommation périphérique du glucose. Lorsque son métabolisme est perturbé, le glucose s'accumule dans le sang engendrant un changement de contexte intra et extracellulaire, plasmatique, tissulaire et organique. L'accumulation de glucose dans le sang induit la formation d'hémoglobine glyquée (Hb1Ac) par la liaison non enzymatique du glucose et les résidus aminés de l'hémoglobine. Le taux de renouvellement de l'hémoglobine étant de 120 jours, la variation de sa concentration sanguine dépend de l'équilibre glycémique sur les 2-3 derniers mois. Chez une personne saine, son taux se situe aux alentours de 5-6% (de l'hémoglobine totale) et chez un patient diabétique, son taux peut attendre 12%. L'hématie contenant de l'hémoglobine glyquée change alors de forme, le sang devient alors plus visqueux et engendre des complications micro-vasculaires. L'ensemble de ces modifications est à l'origine d'importantes complications comme la neuropathie, la néphropathie, la rétinopathie et à terme la cécité, les accidents vasculaires cardiaques et cérébraux, auxquels s'additionnent les infections cutanées, les amputations et une importante détérioration des conditions de vie.

Actuellement, selon l'OMS, le diabète est diagnostiqué de la manière suivante : une glycémie à jeun supérieure à 7nmol/L ou 1,26g/L ou une glycémie, 2h après ingestion de 75g de glucose, supérieure à 11nmol/L ou 2g/L.

On distingue actuellement 3 formes principales de diabète : le diabète de type 1, dit insulino-dépendant ou juvénile, le diabète de type 2 dit non insulino-dépendant, et le diabète gestationnel. Il existe également des formes plus rares de diabètes tels que les diabètes monogéniques ou encore les diabètes qui surviennent de manière secondaire, en

conséquence d'autres maladies. Le diabète décrit dans l'antiquité, de par ses symptômes, concernait le diabète de type 1. Il concerne une faible quantité de personne soit 7-12% des personnes diabétiques, apparaît très précocement et se caractérise par une quantité d'insuline quasi-inexistante. Ceci est la conséquence d'une faible quantité de cellules β détruites précocement par une réaction auto-immune d'origine encore inconnue. Le diabète de type 2 est le plus répandu, soit 87-91% des personnes atteintes de diabète. Il touche les personnes adultes obèses et/ou âgées bien que de plus en plus d'enfants, d'adolescents et de jeunes adultes ou encore des personnes minces soient touchés. Il met souvent plusieurs années à s'installer. Il se traduit par un premier stade dit prédiabétique caractérisé par une intolérance au glucose qui se définit par le maintien d'une glycémie élevée plusieurs minutes après une charge orale en glucose et une hyperglycémie à jeun. L'intolérance au glucose ne mène pas forcément au diabète de type 2. Le diabète gestationnel comme son nom l'indique apparaît au cours de la grossesse et constitue un facteur de risque pour le fœtus notamment pour le développement d'un DT2 à l'âge adulte sans compter les complications durant la grossesse.

### *3. Quelques données actuelles et chiffrées sur le diabète*

Actuellement, la fédération internationale du diabète considère que 422 millions de personnes, âgées de 20 à 79 ans, souffrent de diabète autour du monde soit 1 personnes sur 11. Elle estime qu'en 2040, 1 personne sur 10 sera touchée par le diabète [26]. En 2030, il pourrait constituer la 7ème cause de décès dans le monde [26]. En 2015, on considère qu'une personne meure toutes les 6 secondes de cette pathologie soit plus que le sida, la tuberculose ou la malaria [26]. Le phénomène épidémique associé au diabète concerne surtout le DT2 notamment due à l'augmentation exponentielle de l'obésité.

Le diabète touche particulièrement les pays ou régions en voie de développement ou à revenu faible et modéré, notamment l'Afrique et l'Asie du sud-ouest (Inde, Pakistan) [26]. Plus des deux tiers des personnes ne sont pas diagnostiquées dans ces régions. Ces populations, plus que toutes les autres, se trouvent au contact d'aliments très riches en sucres et en acides gras saturés et leur accès aux traitements est beaucoup plus difficile. De la même manière, la prévalence du diabète est multipliée par 2 dans les zones urbaines en comparaison des zones rurales et en 2040, il sera multiplié par 4 [26]. Ceci reflète l'impact de l'accès continu à la nourriture et de la sédentarité.

En plus de réduire l'espérance de vie et d'entrainer le décès de millions de personnes, cette maladie coûte très cher aux différents états à travers le monde et on estime que 5% à 20% des dépenses sanitaires, suivant les pays, sont attribués aux personnes atteintes de diabètes représentant un coût de 700 milliards de dollars en 2015 avec une augmentation prévue de 19% pour 2040 [26].

Après l'Afrique, L'Europe est la seconde région du monde ayant le plus faible taux de personnes atteintes de diabète et investit fortement pour la recherche et les soins de manière importante, soit 9% des dépenses sanitaires. La Chine, l'Inde et les Etats-Unis sont

les trois pays les plus touchés au niveau mondial. Alors que la prévalence en Europe est d'environ 9% (20-79ans), la France est moins touchée (5-6%) en partie par la diversité et la qualités alimentaire mieux contrôlées [26].

# V. Chapitre 2 : La régulation du métabolisme glucidique

Le glucose est une molécule essentielle à tout organisme vivant pour le fonctionnement de ses cellules. Chez les animaux, le glucose est métabolisé par la glycolyse et en conditions aérobies par la respiration mitochondriale, il permet de libérer de l'énergie sous forme d'ATP. Chez les vertébrés, sa distribution aux différents tissus se fait par l'intermédiaire du sang contenu dans un appareil circulatoire fermé. Sa concentration sanguine, variable selon les organismes, est dépendante de son entrée et de sa sortie. Son entrée dans le sang peut se faire par l'intestin, au cours des prises alimentaires et par le foie et dans une moindre mesure par l'intestin ou le rein, au cours du jeûne. Sa sortie se fait par les cellules consommatrices de glucose c'est à dire toutes les cellules. Cependant, certaines ont des besoins plus importants comme celles des muscles, du cerveau et des hématies, ces deux dernières étant gluco-dépendantes. Lorsqu'il est en excès, le glucose est excrété par les reins, dans nos urines. Chez l'homme, le taux de glucose dans le sang, la glycémie, doit être maintenue entre 0,8 et 1,2g/L ou 4,4 et 6,6mM. Chez d'autres animaux vertébrés, cette valeur peut être légèrement différente mais oscille généralement entre 0,4 et 1,2g/L suivant l'espèce. Pour la maintenir à ces niveaux précis, la glycémie est régulée par des systèmes hormonaux très particuliers et très précis. La dérégulation de son homéostasie et une augmentation de sa concentration sanguine nuisent à l'ensemble des cellules de l'organisme et génèrent les maladies métaboliques comme le DT2, la maladie du sucre.

## A. AMPK, protéine ancestrale, senseur du statut énergétique intracellulaire

La kinase dépendante de l'adénosine monophosphate (AMP), ou AMPK (AMP dependant kinase), est une protéine exprimée de manière ancestrale dans la plupart des cellules eucaryotes. Des études sur les organismes eucaryotes primitifs ont mis en évidence son rôle dans les mécanismes de résistance à la famine et de survie. Chez les mammifères, la protéine est sensible au ratio AMP/ATP dans la cellule et activée suite à sa diminution, reflétant un manque de production d'ATP, donc un appauvrissement en énergie due à une baisse du catabolisme du glucose ou d'autres nutriments. Par cette fonction, on lui attribue le rôle de protéine senseur de l'énergie intracellulaire ou de protéine senseur du glucose intracellulaire. Ce manque de production d'ATP peut aussi être révélateur d'une hypoxie ou d'une très grande consommation d'ATP (comme au niveau musculaire). Une fois activée, par sa fonction kinase, elle régule de manière transcriptionnelle par phosphorylation de facteurs de transcription, et de manière post-traductionnelle des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique [27].

Chez les mammifères, l'AMPK est composée de sous unités $\alpha$ (2 isoformes), $\beta$ (2 isoformes) et $\gamma$ (3 isoformes). La fixation de l'AMP ou de l'ATP se fait au niveau de la sous-unité $\gamma$. L'association avec l'AMP en période de faible rendement énergétique a différents

effets : changer la conformation de la kinase pour mettre en évidence un site de phosphorylation activateur au niveau de la sous unité $\alpha$ ; inhiber de façon allostérique la déphosphorylation de ce site ; et induire l'activation allostérique de la kinase [27]. L'activation par phosphorylation de l'AMPK se fait au niveau de la thréonine 172 dans la sous-unité $\alpha$ [28]. Deux enzymes sont capables d'induire cette phosphorylation : la kinase hépatique B1 (liver kinase B1, LKB1) [29], et la kinase de la kinase dépendante de la calmoduline, la CamKK$\beta$ (calmoduline kinase kinase $\beta$), activée lorsque le $Ca^{2+}$ augmente au niveau intracellulaire [30]. La sous unité $\beta$ de l'AMPK peut s'associer au glycogène lui attribuant alors le rôle de senseur du glycogène [31].

Les cibles de l'AMPK sont multiples et dépendantes du tissu. Pour favoriser l'augmentation de l'ATP, elle stimule le catabolisme et inhibe les processus consommateurs d'ATP comme les mécanismes anaboliques. L'AMPK favorise la translocation des transporteurs au glucose, GLUT1 et GLUT4 (glucose transporters 1 et 4), à la membrane en phosphorylant et activant une protéine impliquée dans les mécanismes d'exocytose. Ceci permet l'entrée du glucose dans la cellule puis la production d'ATP [32]. Elle active les processus de glycolyse, productrice d'énergie, en phosphorylant une enzyme impliquée dans le processus, la phosphofructokinase 2, PFK2 [33] et inhibe l'enzyme anabolique, la glycogène synthase, GS [34]. Elle contrecarre et inhibe la voie de signalisation à l'insuline impliquée dans l'anabolisme et la survie en inactivant la kinase mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1), association protéique entre mammalian target of rapamycin, mTOR, et d'autres protéines [35]. Ceci concerne les régulations de courtes durées. Pour les effets à plus long terme, l'AMPK régule également la transcription en activant ou inhibant certains facteurs de transcription. Elle inhibe ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) qui supprime l'expression de la dernière enzyme de la glycolyse, la pyruvate kinase (PK) [36]. Elle inhibe également un co-activateur de CREB (cAMP response element-binding protein) qui favorise l'expression d'enzyme néoglucogénique : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose 6 phosphatase (G6P) [37]. L'AMPK favorise également l'expression musculaire de GLUT4 *via* le facteur de transcription MEF-2c (myocyte-specific enhancer factor 2c) [38]. Au niveau musculaire, elle favorise également la biogénèse mitochondriale *via* l'activation de PGC-1$\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) [39].

L'AMPK est activée avant tout par la privation en glucose. Au niveau cérébral et au niveau pancréatique, elle joue un rôle déterminant dans la détection de la glycémie [40, 41]. Elle est également activée ou inhibée par des hormones telles que la leptine ou l'adiponectine, sécrétées toutes deux par le tissu adipeux. La leptine favorise le catabolisme des acides gras libres au niveau musculaire *via* l'activation de l'AMPK, mais inhibe la prise alimentaire *via* l'inhibition de l'AMPK au niveau hypothalamique. L'adiponectine, quant à elle, active l'AMPK au niveau du foie [42].

## B. Le Pancréas – organe clé dans la régulation hormonale de la glycémie

### 1. *Introduction*

#### *a) La découverte du pancréas*

Le pancréas est situé dans la cavité abdominale. Sous l'estomac, il est accolé au foie et au duodénum, partie haute de l'intestin. Il est fortement innervé par le système nerveux autonome (SNA) sensitif et moteur. En termes d'irrigation sanguine, le sang pancréatique se déverse dans la veine porte et la veine splénique et le pancréas est irrigué par l'artère pancréatique qui possède quelques embranchements communs avec les artères duodénales. D'un point de vue embryonnaire, il se développe à partir des cellules de l'intestin primitif par bourgeonnement. Il est dit amphicrine, c'est à dire qu'il possède les deux fonctions de sécrétions : endocrine et exocrine.

La découverte de l'organe a été permise par le chirurgien grec Herophilus qui fût, en 336 avant Jésus-Christ, le premier à disséquer un corps humain. 400 ans plus tard, Ruphos lui donna le nom qu'on lui connaît signifiant en grec « toute chair ». C'est Galien qui au cours du 2ème siècle essaya de lui attribuer un rôle : par son côté spongieux, il protégeait les vaisseaux qu'il recouvrait. Son étude commença au 17ème siècle, par Wirsüng qui découvrit les canaux pancréatiques déversant les sécrétions exocrines. Ces canaux portent son nom aujourd'hui mais il mourut avant d'en connaître la fonction. Deux siècles plus tard, les cellules exocrines, regroupées en acini, et les cellules endocrines, regroupées en îlots, furent décrites. En 1869, Paul Langherans – qui donna son nom aux îlots – décrit histologiquement ces amas cellulaires. Au cours de la seconde moitié du 18ème siècle, la fonction exocrine de l'organe fut établie, notamment par Claude Bernard : le pancréas sécrète des enzymes capables de réduire les aliments en molécules plus petites, au sein de l'intestin [43]. A cette même époque, en 1889, le rôle du pancréas dans la régulation de la glycémie fut démontré par les expériences de pancréatectomie réalisées par Minkowsky. Il démontra que suite à la chirurgie, l'animal développait un diabète avec un enrichissement des urines en glucose [44].

Après la première guerre mondiale, le rôle endocrine du pancréas a été découvert et décrit par les expériences de résection du pancréas qui ont permis de mettre à jour l'existence de l'insuline. En 1924, au cours de ces expériences, Frederik Gant Banting ligatura le canal pancréatique engendrant une atrophie du pancréas. Cette atrophie se traduisit par une destruction de ces acini exocrine. Il récupéra ce pancréas et en extrait un « jus ». Il retira le pancréas sur un autre chien qui développa très rapidement une hyperglycémie. Lorsqu'il injecta en intraveineux le liquide issu du pancréas atrophié, l'hyperglycémie disparue. Par contre, cela ne fut pas observé lorsque le liquide était donné oralement. Ces expériences révélèrent le rôle important du pancréas dans la régulation de la glycémie : il possède globalement une action hormonale hypo-glycémiante induite par l'insuline. Frederick Sanger obtiendra le prix Nobel de Chimie en déterminant pour la

première fois la séquence protéique de l'insuline. L'autre hormone pancréatique, le glucagon, dont l'action est hyperglycémiante et contrecarre l'action de l'insuline, a été découverte bien plus tard [43]. Son existence fut pourtant suggérée au début du 20ème siècle par Charle Kimball et John Murlin mais il fallut attendre 1953 pour que Bromer et Behrens séquencent sa structure peptidique. Par la suite, sa voie de signalisation a été étudiée et a permis de découvrir pour la première fois l'AMP cyclique (AMPc) comme second messager ce qui a valu un prix Nobel à Earl W. Sutherland, Jr. en 1971. Finalement, c'est en 1970 qu'on établit le véritable rôle du glucagon dans la physiologie et la physiopathologie par mise en place d'un dosage spécifique chez des individus sains et diabétiques et l'utilisation de la somatostatine pour inhiber sa sécrétion [45].

### *b) Les différentes fonctions du pancréas*

La fonction exocrine est liée au processus de digestion. Les cellules impliquées concernent 95 à 99% des cellules pancréatiques. Par cette action, il sécrète dans la lumière de l'intestin des enzymes digestives et des électrolytes permettant la dégradation des sucres complexes (amylases), des protéines (trypsine et chymotrypsine) et des lipides (lipases) et l'ajustement du pH du bol alimentaire sortant très acide de l'estomac.

Par sa fonction endocrine, effectuée par les îlots de Langerhans (1-2% de la masse de l'organe), il constitue un organe essentiel dans la régulation du métabolisme glucidique. L'organe endocrine est composé d'environ 1000 à 3000 cellules et sécrète deux hormones clés : le glucagon et l'insuline. La vascularisation des îlots est 10 fois plus dense que celle des acini exocrines. Les capillaires sont de type fenestré pour favoriser l'apport en nutriments et la libération des hormones vers la circulation sanguine. Les hormones rejoignent ensuite la veine porte puis la circulation générale. L'insuline est sécrétée par les cellules $\beta$, et le glucagon par les cellules $\alpha$. Le ratio des deux types de cellules dans un îlot est respectivement 60-80% / 15-20%. Il existe deux autres populations de cellules endocrines très faiblement représentées : les cellules sécrétant le polypeptide pancréatique ou cellules PP, les cellules $\varepsilon$ sécrétant la ghréline et les cellules $\delta$ sécrétant la somatostatine. L'insuline est hypo-glycémiante, le glucagon est hyper-glycémiant, la somatostatine inhibe la sécrétion de glucagon et d'insuline et le polypeptide pancréatique régule la fonction exocrine et endocrine du pancréas [46].

Ainsi, l'insuline et le glucagon sont les hormones pancréatiques clés de la régulation de la glycémie. Elles sont elles-mêmes finement régulées par les nutriments, d'autres hormones, et les neurotransmetteurs du système nerveux autonome sympathique (SNS) et parasympathique (SNP) tels que l'adrénaline, la noradrénaline et l'acétylcholine (ACh), dans le but de maintenir la glycémie aux environs de 1g/L. D'un point de vue physiologique, en état de jeûne, la glycémie est faible entrainant une libération du glucagon par les cellules $\alpha$. Le glucagon contribue à augmenter la glycémie en agissant sur le foie ou le rein pour induire la production endogène de glucose. A l'inverse, au cours d'un repas, lorsque la glycémie est haute, l'insuline est libérée par les cellules $\beta$ et favorise la capture périphérique

de glucose pour diminuer sa concentration sanguine. Au cours du DT2, leurs sécrétions et leurs actions sont particulièrement altérées participant ainsi à l'aggravation de la pathologie [47].

### 2. *L'insuline, hormone pancréatique hypoglycémiante*

#### *a) Son expression, sa production et sa sécrétion*

Les granules d'insuline représentent 10% du volume des cellules β et 13000 granules par cellules environ. L'insuline, composée de 51 acides aminés, est d'abord synthétisée en préproinsuline, composée de 110 acides aminés. Dans le RE et l'appareil de Golgi de la cellule β, elle est clivée en pro-insuline et acquiert une structure 3D notamment par la mise en place de liaisons pont-disulfures. Elle rejoint alors des vésicules de sécrétion immatures où la molécule sera clivée en insuline et en peptide C alors inclus dans la même vésicule de sécrétion. La régulation de sa production se fait au niveau transcriptionnel et traductionnel, mais aussi au niveau de sa maturation protéique. Sa sécrétion est aussi finement contrôlée.

Le glucose est le premier régulateur de son expression. Lorsque l'on met à jeun un rat pendant 3 jours, la seule injection intraveineuse de glucose permet d'augmenter la quantité d'acide ribonucléique messager (ARNm) codant pour la pro-insuline [48]. D'autre part, au cours d'expériences *in vitro*, le nutriment permet la stabilité de l'ARNm *via* une voie impliquant l'AMPc [49]. La séquence promotrice du gène codant l'insuline contient de nombreux éléments de réponse très conservés dans l'évolution. On y trouve en particulier les séquences sensibles à l'AMPc, CRE (cAMP responsive element) capables d'activer la transcription [50] *via* le facteur de transcription CREB. Ces séquences fixent également des facteurs de transcription dont les plus connus sont PDX1 (insulin promoter factor 1 ou pancreatic and duodenal homeobox 1) et PAX6 (paired box protein 6) [51-53].

L'insuline est également régulée au niveau traductionnel par le glucose. Il permet d'augmenter la capacité de traduction *via* un ratio spécifique du facteur de traduction eIF2A à l'état phosphorylé *versus* l'état déphosphorylé. Lorsque le glucose est présent, il est déphosphorylé par la protéine phosphatase 1 (PP1) et cette voie augmente la traduction de l'ARNm codant l'insuline [54]. De la même manière, la phosphorylation de ce facteur de traduction eIF2A est tout aussi importante. Elle est réalisée, indépendamment du glucose, entre autres par la kinase PERK, qui lorsqu'elle est mutée induit un diabète post-natal associé à un défaut de synthèse de l'insuline, mais aussi un défaut de prolifération et différentiation des cellules β que l'on appelle le syndrome de Wolcott-Rallison [55].

Des études de dynamique cellulaire sur la transcription et la traduction du gène codant l'insuline ont montré que la modulation de la traduction se fait indépendamment de la modulation de la transcription. En effet, après 1h d'exposition à 25mM de glucose, la production d'insuline augmente indépendamment de la quantité d'ARNm [56]. De la même manière, une exposition à 25mM de glucose avec un bloqueur de la synthèse d'ARNm n'influence pas la production de proinsuline [57]. D'autre part, des études *in vivo* ont

montré qu'un rat mis à jeun pendant 3 jours, ne présentait plus que 15 à 20% des ARNm codant la proinsuline en comparaison à un rat normal [48] reflétant une régulation de plus long terme pour les ARNm. Ainsi, la régulation transcriptionnelle contribue à la synthèse du pool d'insuline basale alors que le contrôle post-transcriptionnel permet la synthèse immédiate d'insuline en réponse au glucose.

La sécrétion de l'insuline est tout d'abord régulée par les nutriments absorbés par l'intestin après la digestion tels que le glucose, les acides gras libres ou même certains acides aminés. Chez l'homme, le plus fort stimulateur est le glucose donné oralement comparativement à des lipides ou protéines donnés en même quantité. En effet, le glucose multiplie la quantité d'insuline plasmatique par 10 *versus* 2 pour les deux autres types de nutriments [58]. Le glucose entre dans la cellule β *via* GLUT2, protéine constitutivement exprimée. Ce transporteur est également exprimé au niveau des hépatocytes, des neurones, du rein, de l'intestin, organes contribuant à la régulation de la glycémie. Sa faible affinité pour le substrat et sa forte capacité permettent un influx important au sein de la cellule. Une fois dans le milieu intracellulaire, il est phosphorylé par la GK, ou hexokinase IV, également exprimée au niveau des neurones, des hématies, de l'intestin et du foie. Cette hexokinase ne possède aucune rétro-inhibition par le glucose-6-phosphate qu'elle génère contrairement aux autres hexokinases. Ainsi, son activité n'est pas inhibée par le glucose. Comme GLUT2, la GK a une faible affinité pour le glucose optimisant ainsi sa phosphorylation rapide. L'entrée massive de glucose et son métabolisme induit une augmentation de la concentration d'ATP fermant les canaux $K_{ATP}$ et donc la fuite d'ions positifs tel que le $K^+$ vers le milieu extracellulaire. La membrane de la cellule β se dépolarise, activant les canaux ioniques $Ca^{2+}$ voltage dépendant. La concentration calcique dans le milieu intracellulaire augmente et induit alors l'exocytose des granules d'insuline. Cependant, le cycle de Krebs se trouve rapidement saturé par l'arrivée massive de pyruvate, ainsi certains produits du cycle peuvent induire la sécrétion d'insuline : le coenzyme réduit NADPH, le malonyl-CoA et le glutamate. Enfin, le glucose-6-phosphate peut produire, par une autre voie de dégradation, du glycérol-3-phosphate qui, en augmentant la disponibilité de $NAD^+$, peut potentialiser l'activité de la mitochondrie. Ceci augmente le flux ATP qui influence directement l'activité des canaux $K_{ATP}$. Le glycérol-3-phosphate peut aussi être transformé en diacylglycérol (DAG) activateur de la protéine kinase C (PKC), kinase capable d'activer la sécrétion des granules d'insuline [58].

Les autres nutriments peuvent stimuler également la sécrétion d'insuline. Par exemple, la combinaison d'acides aminés, la glutamine et la leucine, stimule la sécrétion d'insuline induite par le glucose. La leucine active l'enzyme qui permet de dégrader la glutamine en α-cétoglutarate et donc d'activer le cycle de Krebs augmentant à terme la quantité d'ATP intracellulaire [59]. De la même manière, la glutamine, dégradée dans le cytosol en glutamate, peut activer le cycle de Krebs. Les lipides, *via* le catabolisme des acides gras libres plasmatiques, participent aussi à la production d'ATP et stimulent la sécrétion d'insuline. Ils peuvent aussi influencer cette sécrétion *via* le récepteur aux acides

gras libres, FFAR1 (free fatty acid receptor 1) [60]. Il a été montré que des îlots, maintenus dans un milieu dépourvu en acides gras libres, perdaient la capacité de sécrétion d'insuline induite par le glucose [61, 62]. Les acides gras, *via* les acyl CoA, ou même le DAG influencent cette sécrétion en acylant et activant des protéines impliquées comme la synaptogamine [63] ou la PKC [64].

De nombreuses hormones interviennent également dans le contrôle de la sécrétion d'insuline, et en particulier :

- *En régulation paracrine* : le glucagon *via* son récepteur spécifique et la somatostatine *via* les récepteurs à la somatostatine SSTR1 ou 5 (somatostatin receptor 1 ou 5),
- *En régulation endocrine* :
    - les adipokines (l'adiponectine activatrice de la sécrétion, la leptine inhibitrice de la sécrétion, …) ;
    - les myokines ;
    - les hormones sexuelles œstrogènes activatrices de la sécrétion ;
    - les hormones intestinales telles que les incrétines comprenant le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) et le glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) qui activent la sécrétion ;
    - les hormones du rythme circadien comme la mélatonine modulatrice de la sécrétion ;
    - l'hormone de croissance ;
    - l'adrénaline sécrétée par les surrénales et inhibitrice de la sécrétion ;
    - certaines hormones hypothalamiques telles que le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), VIP (vasoactive intestinal peptide), …) [58].

La sécrétion d'insuline est aussi régulée par des neurotransmetteurs. Le SNS, *via* la noradrénaline et les récepteurs $\alpha$ adrénergiques, inhibe la sécrétion d'insuline alors que le SNP, *via* l'ACh et le récepteur muscarinique de type M3, l'active. Enfin, nous avons les cytokines avec les plus connues : l'interleukine 6 (IL-6), le FGF-21 (fibroblast growth factor 21), l'IGF-1 (insulin growth factor 1), … [58] La fonction de toutes ces molécules sur la sécrétion d'insuline dépend des seconds messagers produits après activation de leurs récepteurs, comme les récepteurs couplés aux protéines G : 1) de type G$\alpha$s couplé à l'adénylate cyclase (AC) qui produit l'AMPc activateur (par exemple le récepteur GLP-1, GLP-1r), 2) de type G$\alpha$q couplé phospholipase C (PLC) qui à partir du phosphatidylinositol produit des DAG et de l'insositol-3-phosphate ($IP_3$), activateur (par exemple les récepteurs muscariniques de type M3) ou 3) de type G$\alpha$i/o/inhibition de l'AC et donc de la production AMPc (par exemple les récepteurs $\alpha$ adrénergiques). De par son unicité en termes d'hormone hypo-glycémiante, sa sécrétion ne peut être se faire que lors de la réception de certains signaux et est très finement régulée au niveau de la transcription, de la traduction et de la sécrétion que ce soit en état de jeûne ou en état postprandial.

Au cours d'un repas, la sécrétion d'insuline est caractérisée par deux phases. Chez l'homme (également chez le rat), lorsque le glucose plasmatique atteint 7nM (126mg/kg),

on observe une première phase rapide et intense (1,4nmol/min). Elle dure environ 5-10 minutes. On observe ensuite une deuxième phase lente et à débit plus faible (0,4nmol/min) et elle se prolonge sur plusieurs minutes. Cette double phase est moins présente chez les souris puisque l'insuline basale, à jeun est plus importante (8-9nmol/L chez la souris versus 4-5nmol/L chez l'homme) [58, 65]. Cette double phase s'explique par le fait qu'il existe deux formes de granules : les granules immédiatement secrétables très proches de la membrane plasmique de la cellule β (1% des granules) et les granules de réserve (99% des granules). Ils sont corrélés respectivement à la première phase et à la seconde phase [65]. La première phase apparaît de manière indépendante à une modification nutritionnelle au niveau du sang, est purement cognitive, activée par le système nerveux central (SNC) et appelée « phase céphalique » alors que la seconde phase est strictement dépendante des nutriments.

La sécrétion d'insuline est également dépendante de la quantité et de la qualité de cellules β. Chez l'homme adulte, le taux de renouvellement des cellules β est relativement faible. Dans certains cas, ce taux peut être augmenté (grossesse, dommages mécaniques et chimiques, …) montrant une certaine plasticité du tissu. La prolifération et la différenciation des cellules β dépendent d'une part des nutriments dont le glucose, mais aussi de certaines hormones (GLP-1, …) ou certains facteurs de croissance comme les hormones de type IGF et l'hormone de croissance [66, 67].

#### *b) Ses actions multiples*

L'insuline a deux actions globales : hypo-glycémiante et anabolique. Pour réduire la glycémie, elle favorise la capture périphérique de glucose, la synthèse de glycogène et inhibe la synthèse de novo du glucose. Sa fonction anabolisante se traduit par l'induction de la synthèse de lipide et de protéines, l'inhibition de leurs dégradations, l'induction de la prolifération, de la croissance et de la différenciation cellulaires et l'inhibition de l'apoptose. Les voies de signalisation de l'insuline sont complexes et multiples suivant le tissu. Ceci est notamment dû à l'expression tissu-spécifique des enzymes impliquées dans sa voie de signalisation. Elle peut réguler à la fois les activités cellulaires au niveau de la transcription mais aussi au niveau de l'activation ou de l'inhibition d'enzymes. Tous les tissus sont sensibles à l'insuline mais de nombreux organes sont clés pour médier l'influence de l'insuline sur le métabolisme : le foie, le tissu adipeux, le SNC et le muscle. L'action la plus globale sur les tissus périphériques est la capture de glucose [68] et la survie cellulaire, les autres actions seront plus spécifiques à certains tissus.

Le récepteur à l'insuline a donc un rôle dans le métabolisme mais aussi dans la croissance. Pour ces raisons, l'invalidation homozygote et globale du récepteur à l'insuline n'est pas viable [69]. Pour pallier à cela, il a été développé des invalidations du récepteur de manière tissu-spécifique permettant de mieux comprendre la fonction de l'insuline sur tous les tissus.

### *(1) Le récepteur et la voie de signalisation*

Son récepteur est globalement présent sur tous les tissus mais varie d'un facteur 20000 d'un érythrocyte à un adipocyte ou un hépatocyte, cellules des principaux tissus cibles de l'insuline et impliqués dans la gestion du glucose. Ce récepteur est hautement conservé au cours de l'évolution. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire composée de quatre sous-unités (deux sous-unités $\alpha$, deux sous-unités $\beta$) liées entre elles par des pont-disulfures. Le récepteur à l'insuline possède, *via* ses deux sous-unités $\beta$, une activité tyrosine kinase : il peut, à partir d'ATP, s'auto-phosphoryler ou phosphoryler des protéines cytoplasmiques sur des résidus tyrosine. En absence d'insuline, les sous-unités $\alpha$, par leur conformation, exercent une contrainte stérique inhibitrice des sous-unités $\beta$. L'insuline, en se fixant sur le récepteur par les domaines extracellulaires des sous-unités $\alpha$, induit un changement de conformation des sous-unités $\beta$ facilitant leur accès intracellulaire à l'ATP. Ainsi, elles fixent un ATP qui permet leur phosphorylation activatrice au niveau des tyrosines. Une fois activé, le récepteur s'auto-phosphoryle sur d'autres résidus tyrosine favorisant le recrutement de protéines cytoplasmiques comme les IRS (insulin receptor substrates). La phosphorylation de ces substrats au niveau des tyrosines incluses dans des motifs peptidiques particuliers accroît leur affinité pour d'autres protéines et favorise le recrutement de ces dernières au niveau du récepteur [70].

Les isoformes d'IRS sont multiples. IRS1 est impliqué d'une part dans la croissance et la différenciation et d'autre part dans le métabolisme glucidique. Le modèle de souris invalidées pour IRS1 a pour phénotype un retard de croissance et une importante résistance à l'insuline [71]. IRS2 est impliqué uniquement dans le métabolisme. Sa délétion induit une importante résistance à l'insuline et donc une forme de DT2 [72]. IRS3 et IRS4 ont des rôles plus modestes puisque leur invalidation n'induit pas de phénotypes marqués.

Un fois phosphorylés, les IRS restent à proximité du récepteur à l'insuline et recrutent d'autres protéines dans le but d'être phosphorylées par le récepteur (**Figure 3**). Une de ces enzymes est la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) dont l'action permet la synthèse de phosphatidylinositol-3-phosphate ($PIP_3$), phospholipide ancré à la membrane. La PI3K existe sous différentes isoformes dans tous les tissus. L'identification de l'isoforme impliquée dans la voie de signalisation de l'insuline reste à éclaircir bien que certaines publications suggèrent le rôle essentiel de la PI3KC2$\alpha$ pour la translocation de GLUT4 induite par l'insuline [73]. Par la suite, le $PIP_3$ membranaire recrute les kinases dépendantes des phosphinositides 1 et 2 (PDK1/2, phosphoinositide-dependent kinase 1/2) qui phosphorylent la sérine-thréonine kinase PKB ou autrement appelé AKT. Cette voie est la plus étudiée et est appelée voie « PI3K / AKT ». AKT existe sous différentes isoformes : AKT1, 2 et 3. Suivant l'expression tissu-spécifique de certaines isoformes d'AKT, l'insuline n'induit pas la même cascade de signalisation. Des souris invalidées pour AKT1 ne montrent pas d'altération métabolique liée à l'insuline mais un retard de croissance et un problème comportemental alors qu'à l'inverse, l'invalidation d'AKT2 induit une perte de réponse à l'insuline au niveau du foie mais aussi de façon moindre au niveau du muscle et du tissu

adipeux [74, 75]. Au cours du diabète, l'expression ou l'activation des PI3K ou des AKT peuvent varier suivant le type de tissu.

Une fois phosphorylées, les différentes AKT phosphorylent à leur tour de nombreuses protéines dont certaines sont impliquées dans la capture du glucose et l'exocytose de GLUT4, transporteur au glucose, dont l'exposition à la membrane est dépendante de l'insuline. Elles peuvent également migrer dans le noyau pour moduler l'activité de facteurs de transcription et donc l'expression de certaines protéines [76]. Par exemple, AKT2 phosphoryle des petites protéines G impliquées dans le trafic des granules de sécrétion comme AS160 [77]. AKT2 sert également à (**Figure 3**) :

- *L'activation de la synthèse de glycogène* par la phosphorylation inhibitrice de la glycogène synthase kinase GSK3β [78]. La GSK3β inhibe par phosphorylation la GS et donc la synthèse de glycogène. L'insuline active la PP1 qui déphosphoryle la GS et la glycogène phosphorylase (GP) de manière respectivement activatrice et inhibitrice [79-82] ;
- *l'inhibition de la néoglucogenèse* par phosphorylation inhibitrice du facteur de transcription FOXO1 (Forkhead box 1) et de PGC-1α [83-85]. Pour ces inhibitions, AKT transloque vers le noyau et phosphoryle les deux facteurs de transcription qui migrent alors vers le cytoplasme. Ces deux facteurs de transcription permettent l'expression de la PEPCK, et de la G6P ;
- *l'inhibition de la lipolyse et de la voie du glucagon* : par l'inhibition de la production de l'AMPc. Ceci inhibe la protéine kinase A (PKA) et le facteur de transcription CREB [86];
- *l'activation de la lipogenèse* par l'activation de la voie kinase mTORC1 qui active ensuite le facteur de transcription SREBP1c (sterol regulatory element-binding proteins 1c) dont les gènes cibles sont des protéines lipogéniques [87] ;
- *l'activation de la protéogenèse* par l'activation de la voie mTORC1 / protéine kinase p70S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase β-1) et facteur de traduction eIF4E [88];
- *l'inhibition de l'apoptose* par activation de la voie mTORC1 /Bcl2, cMyc et inhibition de Bad ;
- *l'activation de la glycolyse* par de nombreuses actions : inhibition du facteur de transcription FOXO et de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinases (PDK) qui inhibent par phosphorylation la pyruvate déshydrogénase (PDH) [89] ; activation des facteurs de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible factors 1) et HNF-4 (hepatocyte nuclear factor 4) et augmentation de l'expression de la glucokinase (GK) [90]; activation de la PFK2 / fructose-bisphosphatase (FBP2) par phosphorylation [91] (cette protéine possède également une activité phosphatase d'où le deuxième nom, PFB2)

La liste ci-dessus énumère les actions d'AKT2 induites par l'insuline. Cette liste n'est pas exhaustive et concerne les actions les plus décrites (**Figure 3**). En effet, très régulièrement de nouvelles voies sont découvertes. La délétion d'AKT2 n'inhibe pas

complétement l'effet de l'insuline suggérant qu'elle est importante mais pas unique dans l'induction de ces voies [77].

L'activation des PDK active aussi les protéines kinases C (PKC) atypiques δ et ζ. Il a été démontré que cette voie pouvait activer la translocation à la membrane de GLUT4. En effet, la surexpression des PKC améliore la capture du glucose induite par l'insuline [92, 93]. De la même manière, la délétion des PKC δ/ζ induit une forte résistance à l'insuline par diminution de la capture périphérique de glucose [94].

Une autre voie, dit PI3K indépendante, est induite par le récepteur à l'insuline : celle des MAPK (mitogen-activated protein kinase) plutôt régulatrice de l'expression des gènes et impliquée dans la croissance et la différenciation. Les voies PI3K dépendantes et PI3K indépendantes peuvent interagir entre elles et s'influencer *via* la protéine mTORC2, complexe protéique entre mTOR et d'autres protéines (**Figure 3**).

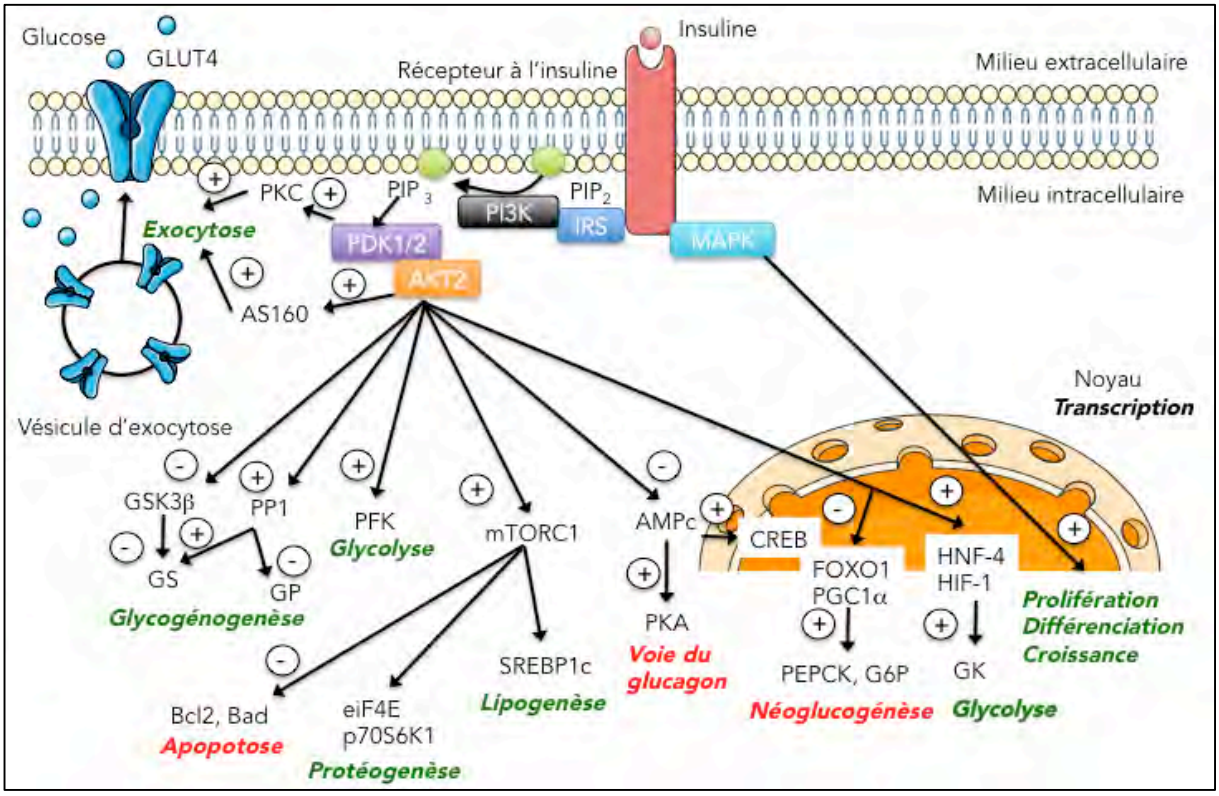



Figure 3 : Voie de signalisation du récepteur à l'insuline. Les actions notées en rouge sont inhibées et les actions notées en vert sont activées.

Les récepteurs à l'insuline possèdent une très forte affinité pour l'insuline mais également une affinité moindre pour les IGF1 et 2 (100 à 1000 fois inférieure pour l'IGF1). En effet, le récepteur à l'insuline partage 50% d'homologie avec le récepteur à l'IGF1 et de la même manière, l'insuline peut activer dans une moindre mesure le récepteur IGF1. Ceci a de l'importance surtout dans des cas pathologiques où l'insuline plasmatique augmente fortement comme observé au cours du DT2.

### *(2) Les organes cibles*

L'insuline cible tous les tissus exprimant son récepteur soit quasiment tous les tissus de notre organisme. Cependant, ses cibles privilégiées sont les organes clés du métabolisme glucidique, qui expriment en très grande quantité le récepteur avec comme finalité de diminuer la quantité de glucose dans le sang : au niveau du pancréas, elle inhibe la sécrétion du glucagon ; au niveau du foie, elle contrôle la néoglucogenèse, la glycogénolyse et la glycogénogénèse ; au niveau du muscle, elle favorise la capture, la consommation de glucose et la glycogénogénèse ; et enfin au niveau du tissu adipeux, elle stimule la capture de glucose et sa conversion en lipides.

Son action hypo-glycémiante peut se faire de manière indirecte *via* l'inhibition paracrine de la sécrétion de glucagon hyper-glycémiant. En effet, *via* la voie PI3K, elle module l'ouverture des canaux $K_{ATP}$ qui contribuent par la suite à l'activation de canaux GABA (γ-aminobutyric acid), inhibiteurs de la sécrétion de glucagon.

À l'exception du foie, du pancréas, du SNC, de l'intestin, du rein et des hématies qui expriment GLUT2, la fonction commune aux tissus sensibles à l'insuline est la capture de glucose *via* le transporteur de glucose GLUT4. En effet, l'insuline favorise la translocation de GLUT4 à la membrane. Par ce processus, l'insuline diminue le taux de glucose dans le sang. Une fois absorbé, le glucose est consommé et parfois stocké quand les cellules sont équipées des bonnes enzymes. GLUT4 est une des 14 isoformes de GLUT dont chacune est spécifique de tissus et sensible à certains mécanismes de régulation. Elles diffèrent également par leur affinité pour le glucose et leur efficacité. GLUT4 est de forte affinité pour le glucose et est très exprimé au niveau des muscles et du tissu adipeux. En période de jeûne, lorsque l'insulinémie est faible, seulement 5% des GLUT4 d'une cellule sont présents à la surface de cette dernière. Au niveau des muscles, l'insuline favorise l'export du transporteur à la membrane et augmente de 10 fois l'absorption de glucose. Le muscle joue un rôle essentiel sur le métabolisme du glucose. En effet, il est responsable à 75% de la capture du glucose *via* le transporteur insulino-régulé GLUT4. Pour ces raisons, on attribue un rôle déterminant aux muscles dans l'hyperglycémie induite par la résistance à l'insuline. L'exposition à la membrane de GLUT4 au niveau musculaire peut être régulée par l'insuline mais également par l'activation de l'AMPK.

D'autre part, l'insuline active *via* la voie AKT/GSK3 la synthèse du glycogène [78]. La voie AKT/mTORC activée par l'insuline a également une forte activité anabolisante et hypertrophique sur le muscle en favorisant la prolifération, la synthèse protéique, la capture des acides aminés plasmatiques et l'activation de facteurs de traduction *via* notamment la phosphorylation de la protéine p70S6K1 et l'activation de eIF4E [88].

Le foie est un organe clé, une plateforme tissulaire essentielle au maintien de la glycémie. Le foie possède une irrigation sanguine particulière. En effet, le sang en provenance de l'intestin se déverse directement au foie par la veine porte sans passer par le cœur et la périphérie. Ainsi le foie se trouve au contact des nutriments, dont le glucose, en grande quantité. De plus, le sang de la veine pancréatique se déverse directement dans la

veine porte avant de rejoindre la circulation systémique. Ceci implique que le foie est au contact de 3 fois plus d'insuline que les autres tissus. D'autre part, les capillaires composant le foie sont de type fenestrés favorisant l'accès des hépatocytes aux nutriments et aux hormones. L'insuline influence le métabolisme glucidique hépatique. En effet, la délétion spécifique du récepteur dans le foie mène à une augmentation de la production hépatique de glucose générant une hyperglycémie importante [95]. Au niveau de l'organe hépatique, l'insuline inhibe la néoglucogenèse, *via* l'inhibition de FOXO1 et de PGC1α [83-85] et active la glycogénogénèse *via* l'inhibition de GSK3β et de la GP [78-82]. La délétion d'AKT1, AKT2 ou FOXO1 dans le foie n'empêche pas l'insuline de diminuer la néoglucogenèse suggérant que l'insuline peut activer d'autres voies [96]. De plus, l'insuline favorise l'expression de la GK. Ceci permet le maintien du gradient transmembranaire de glucose ce qui optimise la capture du glucose [90]. Contrairement aux autres tissus, la capture du glucose par le foie est indépendante de l'insuline. En effet, elle se fait *via* le transporteur GLUT2 comme au niveau du pancréas. Les régulations par l'insuline de la glycogénolyse et de la glycogénogénèse se font de façon similaire au niveau du muscle.

Au niveau du tissu adipeux, l'insuline inhibe la lipolyse et active la lipogenèse. La lipogenèse dépend des substrats présents dans le plasma : les acides gras libres et le glucose. L'entrée du glucose au niveau de l'adipocyte se fait principalement par GLUT1 mais aussi par GLUT4 modulé par l'insuline. L'import intracellulaire de glucose *via* GLUT4 est assez minoritaire en comparaison du muscle (10%). La lipogenèse est activée par deux facteurs de transcription modulés par l'insuline : SREBP1c et ChREBP. L'activation par l'insuline de SREBP1c se fait par la voie PI3K/mTORC1 facilitant la maturation du facteur de transcription au niveau du RE et sa translocation dans le noyau [87]. L'activation par l'insuline de ChREBP est indirecte et dépend en réalité de la capture de glucose induite par l'insuline puisque l'activation de ChREBP se fait par le glucose. L'action de l'insuline au niveau du tissu adipeux, hormis sur son métabolisme, est importante que ce soit pour sa croissance, la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, son expansion ou la sécrétion des adipokines.

Nous venons de traiter l'action directe de l'insuline sur les différents tissus, mais l'insuline peut également les influencer de manière indirecte notamment par des communications inter-organes tel que l'axe cerveau-périphérie. L'insuline possède une influence non négligeable au niveau de l'hypothalamus, centre nerveux de la régulation du métabolisme énergétique, puisque son récepteur y est fortement exprimé [97]. Les délétions spécifiques du récepteur à l'insuline au niveau de l'hypothalamus ou des groupes neuronaux spécifiques présents dans l'hypothalamus ont permis de gagner en connaissance sur la fonction cérébrale de l'insuline. En effet, ces expériences ont montré que les délétions ne généraient aucun souci de développement cérébral ou de survie neuronale mais les animaux devenaient plus sensibles au régime gras pour le développement du diabète et de l'obésité. Cette sensibilité accrue au régime gras se traduit par une hyperphagie, une hypertriglycéridémie, une hyper-insulinémie, une augmentation de la masse grasse ou

encore une résistance à l'insuline. Ceci suggère que l'insuline, par son action cérébrale, a un impact en périphérie [98]. Il a été montré plus précisément que l'insuline cérébrale régulait la lipolyse et la lipogenèse du tissu adipeux, le métabolisme périphérique du glucose et également la production hépatique de glucose [99-101]. D'autre part, il a été montré que l'insuline cérébrale contrôle sa propre sécrétion et celle du glucagon [102, 103]. Les voies intracellulaires suggérées pour ces régulations par l'insuline impliquant l'axe cerveau-périphérie sont multiples : *via* l'activation des canaux $K_{ATP}$ [104, 105] induisant une augmentation du $Ca^{2+}$ intracellulaire et la sécrétion de neurotransmetteurs ou encore *via* l'activation des MAPK [106].

### 3. *Le glucagon, hormone pancréatique hyperglycémiante*

Le glucagon est une hormone dont les effets sur l'organisme et la glycémie s'opposent à ceux de l'insuline. Elle est plutôt catabolique et hyperglycémiante. Elle est qualifiée d'hormone du jeûne. Son action, que ce soit par ses effets directs ou par sa voie de signalisation, se rapproche de celle des catécholamines, hormones du stress. Elle est sécrétée par les cellules α présentes dans les îlots de Langerhans.

#### *a) Sa synthèse et sa sécrétion*

Le glucagon est synthétisé à partir d'un gène codant un précurseur peptidique le propréproglucagon (PPG), commun à deux autres hormones intestinales et/ou cérébrales et impliquées dans la régulation de la glycémie : le GLP-1 et le GLP-2. L'expression de l'hormone en sa version finale est dépendante du tissu et de l'expression de certaines enzymes de clivage, les proconvertases (PC) (PC2 pour le glucagon et PC1/3 pour le GLP-1 et le GLP-2) [107]. La PC2, exprimée au niveau de la cellule α, libère d'autres peptides à partir du PPG : la glicentine, le « glicentin-related pancreatic peptide », le « intervening peptide 1 » et le « major proglucagon fragment ». D'ailleurs, les souris invalidée pour la PC2 ont un défaut de maturation du glucagon [108]. Les mécanismes de régulation de sa transcription et de sa traduction restent aujourd'hui à éclaircir. L'effet inhibiteur de l'insuline, comme celui de la somatostatine, sur le glucagon se fait dès le niveau transcriptionnel [109, 110]. L'effet du glucose sur l'expression du PPG, comme celui des lipides, est parfois contredit dans les publications : certaines études montrent que les nutriments semblent favoriser l'expression du PPG sur des cellules α isolées mais n'induisent rien sur des îlots isolés comprenant alors les cellules α et β. Ces effets différentiels peuvent s'expliquer par l'effet de l'insuline sur l'expression du glucagon [111, 112]. Des études ont montré que l'AMPc pouvait réguler la transcription du glucagon puisqu'une séquence sensible à l'AMPc, la séquence CRE fixant le facteur de transcription CREB, a été trouvée dans la région promotrice du gène à la fois au niveau pancréatique comme au niveau intestinal [113]. Ainsi, les stimulateurs de l'expression du PPG seront toutes les molécules pouvant, *via* leur récepteur, induire l'augmentation d'AMPc dans le milieu intracellulaire. Comme au niveau de la cellule β, le facteur de transcription PAX6 stimule l'expression du glucagon [114] et

également la prolifération des cellules α [115]. Certains auteurs expliquent que les cellules α sont des cellules β par défaut, devenues des cellules α par absence des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules β tels que PAX4, PDX1, … En effet, l'ajout de ces gènes sur des cellules α mène à la production d'insuline au détriment du glucagon et à l'inverse, leur inactivation au niveau de la cellule β mène à la production de glucagon [116-119]. Grâce à l'étude de l'extinction de PAX6 dans les cellules α, il a été démontré que PAX6 semble également induire l'expression de PC2 [120]. Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression et de la maturation protéique du précurseur PPG restent encore à éclaircir.

Sa sécrétion, comme l'insuline, est essentiellement régulée par le niveau sanguin de glucose. Comme la cellule β, la cellule α exprime un ensemble important de canaux ioniques voltage-dépendants permettant le transport de $Na^+$, $K^+$ ou $Ca^{2+}$ mais leurs activations se différencient entre les deux types de cellules. L'activation de ces canaux dépend du ratio intracellulaire ATP / ADP et de l'activité des canaux $K_{ATP}$. Lorsque le glucose est en faible concentration dans le sang, les canaux $K_{ATP}$ sont ouverts, engendrant une fuite des ions $K^+$ vers l'extérieur et donc une hyperpolarisation. Le potentiel de membrane très bas active des canaux $Ca^{2+}$ et $Na^+$ dépolarisants, permettant par dépolarisation puis par augmentation de la concentration intracellulaire de $Ca^{2+}$, l'exocytose des granules de glucagon. La repolarisation se fait par des canaux $K^+$. Lorsque le niveau de glucose est haut, les canaux $K_{ATP}$ se ferment, la membrane se dépolarise et l'hyperpolarisation activatrice est stoppée inhibant alors la sécrétion de glucagon [46]. L'effet du glucose sur la cellule α reste à éclaircir notamment sur une influence directe du nutriment ou sur une influence indirecte, *via* la sécrétion d'insuline. Les résultats divergents s'expliquent notamment par les différences de mécanismes d'action de l'insuline dans les modèles animaux utilisés. Le glucose semble avoir un effet direct chez la souris et l'homme mais pas chez le rat. Mais ces observations peuvent aussi s'expliquer par le fait que certaines expériences sont réalisées parfois à partir d'îlots et parfois à partir de cellules α isolées. L'effet paracrine de l'insuline est donc présent ou absent et des phénomènes compensatoires peuvent se mettre en place. Ainsi, l'insuline semble prédominante dans la régulation de la sécrétion de glucagon. D'ailleurs, chez les patients diabétiques de type I, on observe une importante hyper-glucagonémie [121].

Les autres nutriments, comme au niveau de la cellule β, peuvent influencer la sécrétion du glucagon. L'exposition courte des cellules α aux acides gras libres, suivant le type d'acides gras (longueur de la chaine carbonée, insaturations) induit une augmentation de la sécrétion du glucagon *via* l'augmentation intracellulaire de $Ca^{2+}$ [122, 123]. L'exposition chronique aux acides gras libres augmente la sécrétion de glucagon, l'accumulation de lipides intracellulaires et inhibe la prolifération cellulaire [124]. L'alanine, l'arginine et la glutamine stimulent la sécrétion du glucagon à des niveaux physiologiques mais lorsque leur concentration plasmatique augmente, reflet d'une dégradation importante des muscles induite par un jeûne prolongé, ces acides aminés exercent alors un effet

inhibiteur. Quant à elle, l'isoleucine inhibe la sécrétion [125]. Le rôle des acides aminés comme des acides gras sur la sécrétion du glucagon reste à éclaircir.

Il existe d'autres mécanismes régulateurs de la sécrétion du glucagon (autocrine, paracrine et endocrine). Comme mentionné précédemment, l'insuline permet d'inhiber la sécrétion de glucagon. *Via* l'activation de la PI3K, elle modifie l'activité des canaux $K_{ATP}$ qui restent fermés et favorise la translocation des canaux GABA favorisant l'hyperpolarisation inhibitrice [126]. De la même manière, la somatostatine, *via* le récepteur SSTR2, inhibe la sécrétion de glucagon *via* une hyperpolarisation induite par la sortie cellulaire de $K^+$ mais également l'inhibition de l'adressage des granules de glucagon en granules d'exocytose [127]. Enfin, le glucagon stimule sa propre sécrétion par une régulation autocrine et une augmentation du taux intracellulaire d'AMPc [128]. Certaines hormones intestinales sont aussi capables de réguler la sécrétion de glucagon, comme le GLP-1. En effet, le GLP-1 peut inhiber la sécrétion de l'hormone, *in vivo*, chez l'homme [129]. Cependant, ceci n'est pas observé *in vitro* sur des cellules $\alpha$ isolées de rats où, au contraire, le GLP-1 semble stimuler cette sécrétion [128, 130]. Les effets différentiels du GLP-1, *in vivo* et *in vitro*, peuvent s'expliquer par les influences diverses et multiples du GLP-1 sur les autres hormones pancréatiques et la résultante de toutes les stimulations induites comme la sécrétion d'insuline. En effet, les souris invalidées pour PDX-1 dans les cellules $\beta$, facteur de transcription stimulé par le GLP-1 et permettant d'augmenter le nombre de cellules $\beta$ et la sécrétion d'insuline, ne possèdent pas d'action inhibitrice du GLP-1 sur la sécrétion de glucagon [131]. D'autres messagers extracellulaires co-sécrétés avec l'insuline ou le glucagon (GABA, l'amyline, le glutamate, l'ATP, …) peuvent aussi influencer la sécrétion de glucagon.

Le pancréas, étant fortement innervé, la sécrétion de glucagon comme celle de l'insuline est sous le contrôle du SNP et du SNS. Tous les deux sont activateurs de la sécrétion. L'influence du SNP se fait *via* l'Ach et les récepteurs muscariniques [132, 133] et celle du SNS *via* la noradrénaline [133]. Les deux neurotransmetteurs mènent à terme à l'augmentation intracellulaire de $Ca^{2+}$. D'autres neurotransmetteurs parasympathiques - comme la galanine, le neuropeptide Y, ou orthosympathiques comme le « gastrin releasing peptide » (GRP) stimulent la sécrétion de l'hormone. Ces phénomènes nerveux régulateurs peuvent être dépendants de la détection du glucose au niveau hypothalamique [134] mais également sous le contrôle d'un axe nerveux, l'axe intestin-cerveau-périphérie.

Les mécanismes de régulation du glucagon par la transcription, la modification post-traductionnelle et la sécrétion sont aujourd'hui partiellement décrits et nécessitent de gagner en connaissance. En effet, les maladies métaboliques comme le DT2 ou l'obésité sont aujourd'hui caractérisées par un défaut important de la sécrétion de l'insuline mais également du glucagon.

*b) La voie de signalisation du récepteur au glucagon et son action*

Son récepteur est couplé aux protéines G de type Gαs [135]. Ce type de récepteur est également celui de son homologue peptidique, le GLP-1. L'activation de ce récepteur mène à l'augmentation de l'AMPc, sa fixation à la protéine EPAC1 (exchange protein directly activated by cAMP 1) ou au facteur de transcription CREB et à l'activation de la PKA (**Figure 4**). L'activation de la PKA peut aussi activer CREB par phosphorylation et induire sa localisation nucléaire. D'autre part, le récepteur au glucagon, à très faible dose, peut activer, *via* la protéine Gαq, la PLC permettant la production d'$IP_3$ et de DAG ce qui mène à terme à la libération de $Ca^{2+}$ du RE vers le milieu intracellulaire (**Figure 4**). L'expression du récepteur au glucagon est sous le contrôle positif du glucose et négatif du glucagon et des hormones induisant une augmentation de l'AMPc intracellulaire telles que le GLP-1, ou les catécholamines [136].

Le récepteur au glucagon est sensible principalement au glucagon mais aussi aux GLP1/2 [137]. Le récepteur au glucagon est exprimé principalement au niveau du foie, du rein, du pancréas, du tissu adipeux mais aussi du cœur, du cerveau ou de l'intestin. Sa principale action est surtout l'augmentation de la glycémie. En effet, il permet l'augmentation du glucose en condition hypoglycémique comme au cours du jeûne et ainsi la protection des cellules dépendantes du glucose. La connaissance de la fonction du glucagon a été acquise principalement en étudiant des animaux invalidés pour le récepteur, les souris Gcgr -/-. Ces souris montrent une hyperplasie des cellules α, une hypoglycémie sévère à jeun et une meilleure tolérance au glucose notamment par augmentation de la sécrétion et de la sensibilité à l'insuline, malgré le niveau très haut de la glucagonémie. Ces souris sont également résistantes au diabète induit par un régime gras et sucré, ou induit par un traitement pharmacologique à la streptozotocine [138-140].

L'action hyperglycémiante du glucagon se fait essentiellement sur le foie puisqu'il est le seul organe à pouvoir produire et libérer du glucose pour la périphérie [46]. La glucagonémie augmente en conditions hypoglycémiques. Au niveau du foie, il stimule alors la glycogénolyse, la néoglucogenèse et inhibe la glycogénogénèse et la glycolyse. Le récepteur au niveau du foie est très sensible au glucagon et de moindre manière aux GLP1/2. Au niveau de l'hépatocyte, le glucagon contribue en période de jeûne à l'augmentation de l'AMPc, par activation de l'AC dans le milieu intracellulaire de l'hépatocyte. L'AMPc active la protéine kinase PKA puis par phosphorylation, la PKA active la GP [141], la G6P [142] et la FBP/PFK [143] et inhibe la GS [144] et la PK [145] (**Figure 4**). Ces modulations participent à l'induction de la glycogénolyse, la néoglucogenèse et la libération du glucose puis à l'inhibition de la glycogénolyse et la glycolyse. Le glucagon active également la néoglucogenèse au niveau transcriptionnel. En effet, le glucagon active, par phosphorylation (PKA) le facteur de transcription CREB et stabilise par déphosphorylation son cofacteur CRCT2, deux molécules contrôlant l'expression d'enzymes clés de la régulation de la néoglucogenèse : FOXO1 et PGC1α [84, 85, 146-148] (**Figure**

**4**).. La combinaison des différents facteurs de transcription contribue ensuite à la stimulation de l'expression de la PEPCK et la G6P. Le glucagon peut également favoriser un flux calcique en provenance du RE vers le cytoplasme. Ce flux active la calmoduline kinase II, CamKII ayant pour but de favoriser la translocation de FOXO1 vers le noyau, mais aussi d'améliorer la stabilité de FOXO1 en favorisant sa desacétylation [149]. D'autre part, le glucagon active la capture d'acides aminés, substrats de la néoglucogenèse. En effet, les patients souffrant d'hyperglucagonémie montrent une baisse plasmatique de certains acides aminés, substrat de la néoglucogenèse, comme l'alanine, la glycine et la proline [150]. De la même manière, au niveau des hépatocytes, le glucagon stimule la β–oxydation des acides gras libres ce qui permet l'augmentation de la production d'énergie nécessaire à la néoglucogenèse. Cette β–oxydation accrue induit la production de corps cétoniques [151] tels que l'acétoacétate, le β-hydroxybutyrate et l'acétone. D'ailleurs, au cours du diabète, on observe une augmentation de la sécrétion de glucagon qui à terme est responsable d'une surproduction des corps cétoniques chez ces patients [152]. Chez les souris Gcgr -/-, après un jeûne prolongé, on observe une augmentation des acides gras libres plasmatiques due à une baisse de la β–oxydation induite par le glucagon à jeun comme à l'état nourri [153]. Au niveau du foie comme du tissu adipeux, le glucagon, *via* l'AMPc, inhibe la lipogenèse par inhibition de ChREBP [154, 155]. L'effet inhibiteur du glucagon produit en période de jeûne et donc en condition de faible glycémie s'additionne à la faible activation de ChREBP par le glucose. L'inhibition de ChREBP se traduit par la perte de l'expression la PK et donc une baisse de la glycolyse (**Figure 4**).

Au niveau du tissu adipeux, le glucagon joue un rôle déterminant sur la stimulation de la lipolyse. En effet, *via* la voie PKA, il active la lipase hormono-sensible (LHS) convertissant les triglycérides en acides gras libres et en glycérol [153, 156] (**Figure 4**). Les acides gras libres, libérés dans le sang, peuvent être alors utilisés par le foie pour produire de l'énergie nécessaire à la néoglucogenèse grâce à la β–oxydation et pour libérer des corps cétoniques utilisables par le muscle et le cerveau, le glycérol servant de substrat à la néoglucogenèse [153, 157].

Le glucagon possède également des effets sur d'autres tissus pour augmenter la glycémie. Chez les souris Gcgr -/-, on observe une augmentation de la concentration plasmatique du GLP-1 insulinotrope suggérant que le glucagon diminue la sécrétion de GLP-1 [140]. De plus, ces souris génétiquement modifiées montrent une diminution de la vidange gastrique et une baisse de la prise alimentaire ce qui signifie que le glucagon stimule la prise alimentaire et accélère la vidange gastrique contribuant ainsi à augmenter la glycémie [138]. Ces effets sont peut-être médiés par la diminution du GLP-1 ou peut-être par le glucagon lui-même. La régulation de la sécrétion du GLP-1 par le glucagon serait indépendante de la voie PKA ou de la voie PLC/$IP_3$ [158]. Comme pour d'autres processus discutés précédemment, l'effet du GLP-1 sur la sécrétion du glucagon pourrait passer par l'insuline inhibitrice.

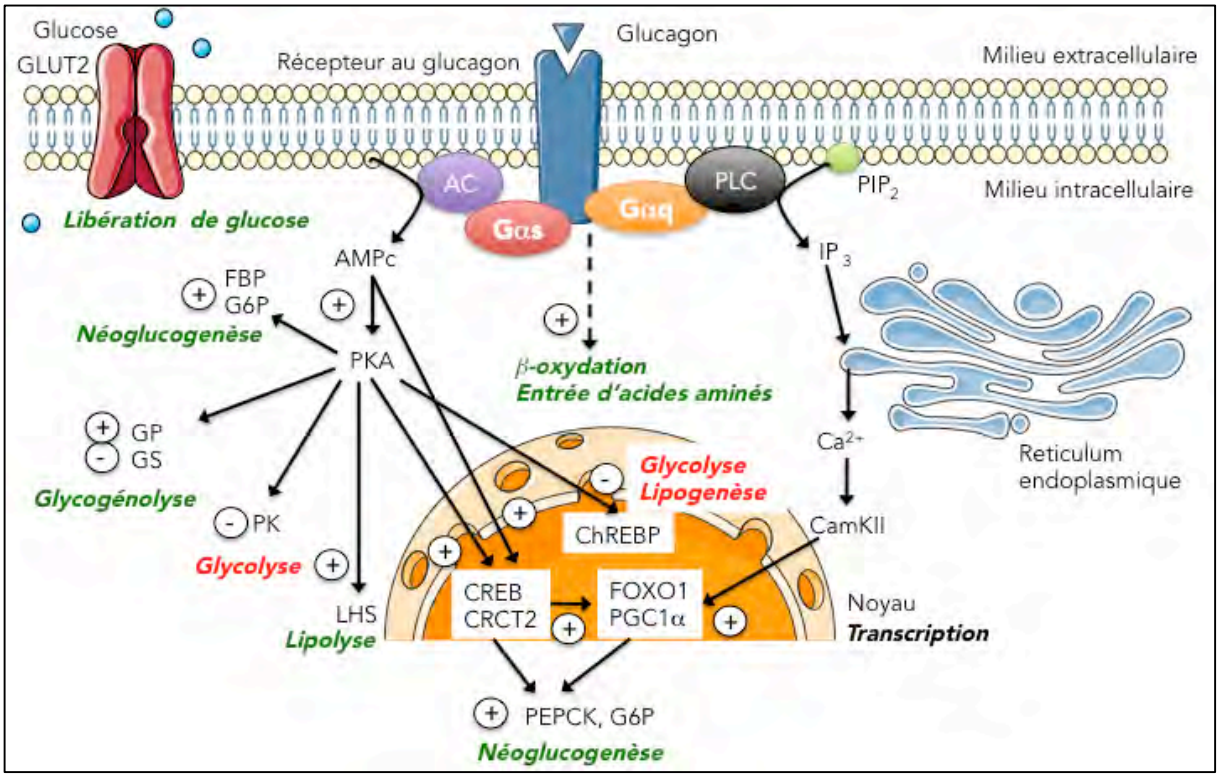



Figure 4 : Voie de signalisation du récepteur au glucagon. Les actions notées en rouge sont inhibées et les actions notées en vert sont activées.

## C. Le Foie – production et stockage de glucose

### 1. *Introduction*

Chez les vertébrés, le foie constitue un des organes internes les plus massifs. Morphologiquement, il est constitué de nombreux lobes – dont le nombre diffère selon le type d'animal. Il possède de nombreuses fonctions comme la synthèse, le stockage et l'épuration. Il peut être comparé à une véritable industrie chimique dans la ville que constitue le corps humain. Son approvisionnement sanguin est double : en provenance du cœur, *via* l'artère hépatique, et en provenance de l'intestin, *via* la veine porte entéro-hépatique. Ainsi, il reçoit tous les nutriments apportés par l'intestin lors de la digestion mais également les hormones pancréatiques qui se déversent dans la veine porte.

Il a fallu beaucoup de temps pour attribuer des fonctions précises à cet organe. Dans l'antiquité romaine, il était reconnu qu'il réalisait de grandes choses et qu'il était un organe essentiel mais la conclusion s'arrêtait là. En effet, Claude Galien, adepte de la vivisection, et ses contemporains attribuaient au foie une fonction nutritive et de digestion secondaire : il synthétisait le sang à partir d'aliments préalablement digérés et extraits par l'estomac et l'intestin. Le foie contribuait ainsi à élaborer, par une seconde digestion, le sang parfait qui était véhiculé au reste de l'organisme par les contractions du cœur. Ce dogme dura environ 13 siècles. Il fut ébranlé au 16ème et 17ème siècles lorsque la circulation lymphatique fut

découverte. En effet, on observa et décrit les vaisseaux chylifères, vaisseaux chargés d'aliments digérés qui ne traversaient par le foie. Au cours du 19ème siècle, Claude Bernard et ses contemporains viennent éclaircir ces théories en définissant les vraies fonctions du foie. Claude Bernard établit pour la première fois la fonction glucogénique du foie soit à partir de glycogène qu'il polymérise à partir de glucose soit à partir d'autres substrats tels que les acides aminés et le glycérol. Pour démontrer cela, il nourrit un chien avec uniquement de la viande pendant plusieurs jours. 7h après la dernière prise alimentaire, il euthanasia le chien et récupéra son foie. Il rinça l'organe prélevé à grande eau pour éliminer tout le sang. Il stocka ensuite le foie à température ambiante pendant 24h dans un bocal contenant de l'eau. Il montra ensuite que cette eau était riche en glucose. Il démontra ainsi que le foie pouvait produire du glucose. Ses contemporains établissent la fonction lipogénique de l'organe bien qu'elle fût indirectement connue depuis l'époque romaine. En effet, nous savions alors que gaver une oie avec du maïs et donc de l'amidon permettait de générer un foie gras. Enfin, on attribua à cette époque la fonction détoxifiante du foie [159].

### *2. L'entrée et la sortie du glucose*

À l'état nourri, l'entrée du glucose dans les hépatocytes dépend du récepteur GLUT2, de faible affinité pour le glucose et de forte capacité et de l'activité de la GK. Au niveau du foie, la GK permet : 1) la production de glucose-6-phosphate, précurseur de la voie de la glycogénogénèse, de la glycolyse ou même de la lipogenèse et 2) le maintien du gradient de glucose de part et d'autre de la membrane plasmique. Le glucose-6-phosphate est aussi un précurseur de la voie des pentoses phosphates permettant la production de NADPH, cofacteur nécessaire à la biosynthèse de lipides. En période de jeûne, le glucose peut être libéré de nouveau par GLUT2. Pour cela, le glucose-6-phosphate, libéré par glycogénolyse ou produit par la néoglucogenèse, peut être déphosphorylé par la G6P, enzyme uniquement exprimée dans le foie, le rein ou l'intestin, rendant ces organes néoglucogéniques. Une maladie génétique, autosomale et récessive, rare se traduit par une délétion de la G6P. Les personnes touchées présentent une hépatomégalie par accumulation de glycogène et de triglycérides dans le foie, une faible résistance au jeûne, un retard de croissance. Dès l'âge de 3-4 mois, on observe des hypoglycémies sévères révélant l'importance de l'enzyme pour la résistance au jeûne [160].

Comme vu précédemment, l'expression de la G6P est finement régulée notamment par l'insuline (**Figure 3**) et le glucagon (**Figure 4**) *via* les facteurs de transcription FOXO1 et PGC1$\alpha$. De manière globale, la néoglucogenèse sera induite par tous les récepteurs stimulant la production intracellulaire d'AMPc comme le glucagon ou les catécholamines [161]. La régulation de la G6P peut être plus rapide par des mécanismes de phosphorylation et des modifications allostériques, notamment sous l'induction du glucagon et de l'activité PKA [142] (**Figure 4**).

L'expression de la GK est dépendante du glucose et de certains dérivés, le mécanisme impliqué étant l'augmentation de la stabilité de l'ARN de la protéine [162, 163].

L'expression de la GK est également régulée par l'insuline *via* les facteurs de transcription HIF1 et HNF4 (**Figure 3**). Comme la G6P, la régulation de la GK peut se faire plus rapidement. Elle peut se fixer à un partenaire protéique, la protéine régulatrice de la GK (GKRP, glucokinase regulatory peptide) et être séquestrée dans le noyau ce qui la rend inactive. Ce phénomène est induit par de grandes concentrations de fructose-6-phosphate, reflétant l'activité de néoglucogenèse. Après un repas, lorsque le glucose augmente dans le sang, la protéine GKRP libère la GK [164]. Cette régulation est particulièrement altérée au cours du DT2 [165, 166]. La GK est inhibée de façon allostérique par le produit qu'elle génère, le glucose-6-phosphate.

La régulation de ces enzymes se fait à plusieurs niveaux (transcriptionnel, modifications allostériques) et par de nombreux facteurs hormonaux, nutritionnels ou nerveux. Cette liste n'est donc pas exhaustive et concerne les voies les plus décrites.

### *3. Gestion de la réserve hépatique en glucose, le glycogène : la glycogénèse et la glycogénolyse*

En période postprandiale, le glucose absorbé par l'intestin, rejoint la veine porte. Celle-ci irrigue directement le foie qui se trouve alors au contact d'une très grande quantité de glucose. Le glucose entre dans l'hépatocyte par le transporteur GLUT2. Il est alors transformé en glucose-6-phosphate puis polymérisé en glycogène par la GS. Le glucose-6-phosphate inhibe la GP, enzyme clé de la glycogénolyse. La glycogénolyse est un processus qui apparaît sur une période de jeûne de courte durée (entre deux repas, au cours d'un exercice) ou en période de stress.

La GS et la GP sont deux enzymes régulées par des modifications post-traductionnelles, notamment par phosphorylation et déphosphorylation. Ces modifications protéiques sont des processus sous le contrôle de nombreux facteurs : l'insuline et le glucagon (**Figure 3 et 4**), les catécholamines produites par les surrénales en période de stress et les efférences autonomes en période de stress ou de jeûne, les facteurs FGF15/19 produits par l'intestin en période de jeûne. La glycogénogénèse *via* la GS est sous le contrôle de l'insuline qui inhibe la GSK3β inactivant de la GS et active la PP1 activatrice de GS (**Figure 3**). De la même manière, la PKA activée par le glucagon ou l'AMPK activée par une baisse énergétique inhibe par phosphorylation de la GS et donc la synthèse de glycogène (**Figure 4**). D'autre part, la glycogénolyse *via* la GP est inhibée par l'insuline et l'activité phosphorylase de PP1 et activée par le glucagon *via* la phosphorylation activatrice par la PKA de la glycogène phosphorylase kinase puis de la glycogène phosphorylase (**Figure 3 et 4**).

### *4. En période de jeûne prolongé : la néoglucogenèse*

Ce processus concerne plutôt les jeûnes prolongés, lorsque tout le stock hépatique en glycogène est utilisé. Les substrats utilisés pour cette synthèse *de novo* sont nombreux : le pyruvate, le lactate, le glycérol et les acides aminés. Ils sont obtenus à partir de l'activité

catabolique des hépatocytes ou obtenus pa l'activité catabolique des muscles (pyruvate, lactate), du tissu adipeux (glycérol) et à moindre mesure des autres tissus (par exemple : les hématies produisent du lactate). Ils sont ensuite transportés jusqu'au foie par le sang. Le lactate, le pyruvate ou les acides aminés – convertis en intermédiaires du cycle de Krebs – sont modifiés en oxalo-acétate dans la mitochondrie puis exportés dans le cytoplasme par la pyruvate carboxylase (PC). L'oxalo-acétate est alors transformé en phospho-énol-pyruvate par l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la PEPCK. Une délétion totale de cette enzyme n'est pas viable après la naissance [167]. Chez la souris, une délétion spécifique dans les hépatocytes n'impacte pas la production de glucose à partir du glycérol. Cependant, les souris développent une stéatose hépatique en période de jeûne due à l'accumulation des produits du cycle de Krebs [168]. Ceci révèle que la voie de production de glucose à partir du glycérol ne nécessite pas la PEPCK. Le phospho-énol-pyruvate est ensuite converti en fructose-1,6-bisphosphate, puis ce dernier est déphosphorylé en fructose-6-phosphate par la FBP/PFK2. Le fructose-6-phosphate est transformé en glucose-6-phosphate. Le glycérol, quant à lui, entre dans l'hépatocyte par l'aquaporine 9 et est phosphorylé par la glycérol kinase en glycérol-3-phosphate puis par différentes étapes enzymatiques en glycéraldéhyde-3-phosphate et enfin en fructose-1,6-bisphosphate, intermédiaire de la néoglucogenèse.

En période de jeûne, les muscles consomment pour leur besoin en énergie leur propre glycogène *via* la glycogénolyse et produisent alors du pyruvate par glycolyse. Le pyruvate peut alors soit être catabolisé par le cycle de Krebs, soit dégradé en lactate (particulièrement en situation d'anaérobie comme au cours d'un exercice physique intense). D'autre part, le tissu adipeux libère du glycérol et des acides gras par la lipolyse. Le lactate, le glycérol et les acides gras rejoignent ensuite la circulation sanguine. Au niveau du foie, le glycérol et le lactate servent comme substrats et les acides gras de source d'énergie, *via* la production d'ATP par la β-oxydation, pour la néoglucogenèse. Le foie produit alors du glucose et des corps cétoniques qui servent au métabolisme énergétique des muscles, des neurones ou même des hématies lorsque le glucose fait défaut. L'échange lactate/glucose entre les muscles et le foie est appelé cycle de Cori. De la même manière, au cours d'un jeûne prolongé, le muscle peut fournir des acides aminés au foie en échange de glucose notamment par le cycle alanine / glucose.

La régulation du processus néoglucogénique se fait à plusieurs niveaux : l'expression des enzymes limitantes (entre autres la PEPCK, la G6P, la PC ou encore la FBP/PFK2) ou leurs modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylation ou ubiquitination). Ces phénomènes sont sous la dépendance de la disponibilité des substrats, des régulations hormonales (insuline et glucagon) et des produits que les enzymes génèrent qui inhibent ou activent leur activité ou celle d'autres enzymes. Par exemple, le glucose induit l'acétylation de la PEPCK puis son ubiquitination favorisant ainsi sa dégradation. Les expressions des enzymes PEPCK et G6P sont sous le contrôle de l'insuline et du glucagon *via* les facteurs de transcription CREB, FOXO1 et PGC1α (**Figure 3 et 4**). Lorsque l'on perturbe l'expression de

CREB ou que l'on surexprime un de ses inhibiteurs dans le foie, on observe une baisse de l'expression des deux enzymes menant à une baisse de la production de glucose au cours du jeûne [147]. La délétion de FOXO1 diminue la néoglucogenèse *via* l'absence de transcription de la G6P et de la PEPCK tandis que son activation constitutive induit une augmentation de la glycémie à jeun associée à une augmentation de l'expression des deux enzymes néoglucogéniques [84, 148]. L'activation constitutive de PGC1α dans des hépatocytes en culture augmente l'expression de la G6P et de la PEPCK [85]. De plus, le glucagon en phosphorylant la FBP/PFK active son activité phosphatase afin d'inhiber la glycolyse et d'activer la néoglucogenèse [143]. Le glucagon stimule également la néoglucogenèse, de manière indirecte, en favorisant la β-oxydation des acides gras et la lipolyse du tissu adipeux [153, 156]. Un autre facteur de transcription semble important pour le bon fonctionnement de la néoglucogenèse, le C/EBPαβ qui favorise l'expression d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs optimisant ainsi le fonctionnement du cycle [169]. D'autre part, l'AMPK, senseur énergétique intracellulaire, régule également cette fonction néoglucogénique en inhibant un co-activateur de CREB [37].

Enfin, l'activité de ces enzymes est régulée par les variations de concentrations intracellulaires de certaines molécules. La PFK-1 est activée par le fructose-1,6-bisphosphate (produite par la PFK-2/FBP) et par l'AMP, reflétant une faible quantité d'énergie intracellulaire et inhibée par l'ATP et par le citrate, reflétant un bon fonctionnement du cycle de Krebs et donc un bon niveau d'énergie intracellulaire. La PC est activée par l'acétyl-coA, produit de dégradation des acides gras libres au cours du jeûne. Le cycle circadien influence également la néoglucogenèse à travers les clock genes Cry1/Cry2 qui contrecarrent la voie de signalisation du glucagon ou des glucocorticoïdes stimulateurs de la néoglucogenèse. Il existe d'autres influences de l'expression de la PEPCK, la G6P ou même de la PFK2 *via* les facteurs de transcription et leur stabilité. Les hormones de croissance stimulent la néoglucogenèse *via* le facteur de transcription STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) et l'enzyme de désacétylation des histones, HDAC (histone deacetylase). Les cytokines produites par les cellules de Kupfer et les cellules NK (natural killer), *via* la production d'IL6 ou d'IL13 et le facteur de transcription STAT5, inhibent la néoglucogenèse. Cependant, l'inflammation chronique a des effets promoteurs de la néoglucogenèse en altérant la voie de signalisation à l'insuline et en promouvant la voie de signalisation du glucagon. Les hormones intestinales, comme FGF15 et FGF19 inhibent CREB et donc la néoglucogenèse ou à l'inverse la 5-HT (5-hydroxytryptamine ou sérotonine), *via* son récepteur $5HT_2b$ qui active la néoglucogenèse [170].

### *5. La production d'énergie par les hépatocytes : la glycolyse en période postprandiale et la lipolyse en période de jeûne*

A l'inverse d'autres tissus, le foie a la capacité de changer son métabolisme suivant les substrats et les hormones qui l'entourent. L'importance de la glycolyse est qu'elle

produit à partir du glucose de nombreux substrats et de l'ATP, molécules nécessaires à la synthèse *de novo* de lipides ou d'acides aminés. Lorsque nous sommes à jeun, le tissu adipeux produit de nombreux acides gras libres par lipolyse et ainsi le foie change son métabolisme cellulaire et favorise la β-oxydation, notamment sous l'induction du glucagon [153]. Au cours du jeûne, la β-oxydation promeut également la production de corps cétoniques nécessaires aux organes dépendants du glucose et en particulier le cerveau.

La glycolyse hépatique est sous l'influence du niveau d'expression et de l'activation de 4 kinases : la GK, les PFK/FBP 1 et 2, la PK et la PDK. Les niveaux d'expression de ces protéines et les niveaux de protéines activées sont bas lorsque nous sommes à jeun et sont élevés lorsque nous avons mangé. Ils sont sous le contrôle de la voie de signalisation de l'insuline ou du glucagon (**Figure 3 et 4**), d'autres facteurs de transcription tel que LRH-1 (liver receptor homolog-1) qui stimule l'expression de la GK, des nutriments comme le glucose qui active ChREBP et stimule donc l'expression de la PK, ou même encore de manière allostérique par des molécules présentes dans la cellule : la PFK-1 est inhibée lorsque les niveaux d'ATP, de citrate sont haut et activée lorsque les niveaux de fructose-1,6-bisphosphate et d'AMP sont bas.

### *6. Anabolisme et catabolisme hépatique de lipides sous l'influence du sucre*

Le foie est une plateforme complexe à la fois de stockage mais aussi de synthèse *de novo*. Il synthétise des protéines, des lipides sécrétés sous forme de lipoprotéines type VLDL, ou des glucides. Lorsque l'apport en sucre est très important et que les stocks en glycogène sont remplis, le foie produit alors des acides gras à partir du glucose. En période postprandiale, à partir de ces acides gras libres produits *de novo* à partir du sucre ou capturés à partir des chylomicrons provenant de l'intestin, il génère, au niveau intracellulaire, des triglycérides ou du cholestérol estérifié qui composent le cœur hydrophobe des lipoprotéines de type VLDL. A jeun ou pendant un exercice, le foie consomme les acides gras libres issus de la lipolyse du tissu adipeux pour produire de l'énergie nécessaire à la néoglucogenèse et des corps cétoniques nécessaires au métabolisme des tissus périphériques. Ainsi, la fonction hépatique oscille entre la lipogenèse et la β-oxydation suivant l'état nutritionnel de l'organisme.

Pour la synthèse de lipides le foie possède tous les éléments nécessaires : des transporteurs à acides gras - FATP (fatty acid transport protein), CD36 (cluster of differentiation 36), FABP (fatty-acid-binding protein) -, des enzymes de synthèse - ACC (acetyl-CoA carboxylase), FAS (fatty acid synthase), SCD (stearoyl-CoA desaturase), Elov (elongation of very long-chain fatty acids) -, des protéines de transport (apolipoprotéine B, …), des coactivateurs des lipoprotéines lipases (apolipoprotéine A1, …).

Comme pour la gestion hépatique du glucose, les processus de lipogenèse sont régulés au niveau transcriptionnel et post-traductionnel par les nutriments, les hormones, la disponibilité des substrats lipogéniques, l'activité des facteurs de transcription (SREBP,

ChREBP, …), les modifications post-traductionnelles (phosphorylations /déphosphorylations et acétylations/déacétylations), les activateurs ou les inhibiteurs allostériques. La voie transcriptionnelle la plus évidente est la voie ChREBP activée par le glucose qui induit, en plus de l'expression de la PK, l'expression de nombreux gènes lipogéniques (ACC, FAS) [155, 171]. Ces facteurs de transcription sont sous le contrôle de nombreuses hormones. L'insuline, sécrétée en réponse au glucose, favorise la lipogenèse en état postprandial *via* l'activation de l'expression et de l'activité de SREBP-1c [87]. L'insuline inhibe également la lipolyse par l'inhibition de la production de l'AMPc et de la PKA [86] (**Figure 3**). Le glucagon, quant à lui, favorise la β-oxydation et la lipolyse du tissu adipeux au cours du jeûne [153, 156] et inhibe la lipogenèse par inhibition de ChREBP [154, 155] (**Figure 4**).

### D. Les muscles et le tissu adipeux – organes de stockage du glucose, fournisseurs de substrats néoglucogéniques et glandes endocrines régulant le métabolisme glucidique

Le muscle est un organe massif au sein de notre organisme et représente environ 50% de la masse corporelle. Sa fonction est déterminante pour les mouvements et la recherche de nourriture (comme mentionné au cours du Chapitre 1). Pour sa fonction, le muscle a besoin de nutriments pour produire de l'énergie en grande quantité et assurer l'exercice physique. Ces nutriments sont principalement le glucose et les acides gras. Le muscle est composé de différents types de fibres : les fibres de type I (faible capacité glycolytique et forte capacité oxydative, beaucoup de mitochondries, donc principalement d'activité aérobique), les fibres de type IIb (forte capacité glycolytique et faible capacité oxydative, peu de mitochondries, donc principalement d'activité anaérobique) et les fibres de type IIa (intermédiaires aux deux précédentes). Les fibres IIb consomment du glucose et les fibres I consomment plutôt des lipides. 3-6% de la source énergétique proviennent des acides aminés notamment de type branchés (leucine, isoleucine et valine).

Comme le foie, le muscle est capable de stocker le glucose sous forme de glycogène et de par sa représentativité au sein de l'organisme, il est le plus grand organe de stockage du glycogène. La gestion du glucose par le muscle est équivalente au foie : glycogénolyse, glycogénogenèse ; capture du glucose et glycolyse. Contrairement à ce dernier, il n'exprime par l'enzyme G6P ce qui l'empêche de fournir du glucose à la périphérie. De manière continue, le muscle capture du glucose et consomme le glucose par glycolyse et catabolisme oxydatif (suivant le type de fibre). En période postprandiale, il recharge ses stocks en glycogène tandis qu'en période de jeûne ou d'exercice, il utilise le glycogène et le glucose produit par le foie comme source énergétique et distribue au foie des substrats néoglucogéniques. En absence de catabolisme oxydatif (faible activité mitochondriale, ou absence d'approvisionnement en $O_2$ au cours d'une activité physique intense), le pyruvate donne du lactate qui peut être redistribué au foie comme substrat néoglucogénique (cycle de Cori). Lorsque l'activité mitochondriale est conséquente alors le pyruvate intègre la voie oxydative et permet de produire une grande quantité d'énergie.

Sans compter l'importance de l'apport en oxygène et de l'activité mitochondriale, la production de lactate par le muscle est tributaire de l'utilisation et de la métabolisation du pyruvate par le cycle de Krebs. Ceci est dépendant de la PDH transformant le pyruvate en oxaloacétate, dont l'inhibition dépend de la phosphorylation par les PDK, enzymes régulées entre autres par l'insuline. Les souris PDK4KO présentent une importante hypoglycémie à jeun [172]. En effet, en absence de PDK, le pyruvate rentre dans le cycle de Krebs et ne peut produire du lactate et donc le foie ne dispose plus de la molécule pour produire du glucose.

Comme au niveau du foie, ces processus sont régulés au niveau transcriptionnel et post-traductionnel par les nutriments, les hormones (insuline et glucagon), l'activité des facteurs de transcription, les modifications post-traductionnelles, les activateurs ou les inhibiteurs allostériques. Un des régulateurs du métabolisme glucidique du muscle est l'exercice. Il a été démontré que l'exercice augmentait la capture de glucose au niveau musculaire et que ceci se traduisait par une augmentation de la translocation de GLUT4 à la membrane [173, 174]. Cette augmentation de la translocation de GLUT4 induite par une contraction peut s'expliquer par une augmentation de la quantité de $Ca^{2+}$ libéré par le RE [175]. Cette augmentation de $Ca^{2}$ pourrait s'expliquer par une augmentation de l'activité AMPK [176]. Des expériences d'activation de l'AMPK utilisant l'AICAR ont montré que cela suffisait à augmenter la présence de GLUT4 à la membrane des muscles [177]. Des rongeurs invalidés pour l'AMPK (sous unité β régulatrice) dans le muscle sont caractérisés par une baisse de la translocation de GLUT4 à la membrane [178]. Au cours de l'exercice, chez l'homme, l'AMPK est activée par phosphorylation [179]. Le lien entre l'exercice et l'activation de l'AMPK peut s'expliquer par la consommation importante d'ATP mais d'autres mécanismes moléculaires restent à envisager.

Lors d'un exercice, la consommation de glycogène peut être régulée par l'activité plus ou moins importante de GP et GS. L'AMP et le $Ca^{2+}$, reflétant l'activité musculaire, augmentent l'activité de la GP et donc la disponibilité du glucose. Il a été également prouvé que le glycogène stimulait l'activité de la GP [180] et ainsi l'accumulation de glycogène au niveau basal est déterminante. Au cours de l'exercice, l'activité sympathique augmente. Le récepteur β2 adrénergique couplé à l'AC et à la PKA stimule alors l'activité de la GP par phosphorylation [181]. D'autre part, l'activité de la GS est réduite au cours de l'exercice mais les mécanismes de régulation restent à éclaircir bien que sa localisation dans le myocyte soit démontrée comme importante [182, 183].

Le tissu adipeux est capable de capturer le glucose sanguin *via* GLUT4, transporteur au glucose régulé par l'insuline. Le glucose permet de produire l'énergie nécessaire à l'activité basale de l'adipocyte mais sert également à son activité anabolique : la lipogenèse *de novo*. Ceci est permis par l'activation du facteur de transcription ChREBP [184, 185] qui permet l'expression d'enzymes impliquées dans la synthèse de lipides comme décrit au niveau du foie [155]. Ainsi, le glucose, particulièrement lorsqu'il est en excès, peut contribuer à l'augmentation de la masse grasse et l'expansion du tissu adipeux. Cependant,

au cours de maladies métaboliques, l'expression de ChREBP dans le tissu adipeux est diminuée. En effet, le tissu adipeux résistant à l'insuline capture de manière plus faible le glucose menant à terme à une moindre activation et expression du facteur de transcription [185]. Ainsi, il est envisagé que ChREBP serait plutôt protecteur au niveau du tissu adipeux en tamponnant l'excès de sucre et en favorisant son stockage sous forme de lipides. Au niveau du foie, GLUT2 permet l'entrée constitutive de glucose dans les cellules. Ainsi, au cours des maladies métaboliques, sous l'influence de l'hyperglycémie, ChREBP est activé de manière continue. Dans le foie, il serait alors plutôt délétère et mènerait à une accumulation de lipides : la stéatose hépatique. Le tissu adipeux est également une glande endocrine. Il est capable de sécréter une hormone insulino-sensibilisatrice, l'adiponectine [186], et une hormone inhibant la prise alimentaire, la leptine [187] contribuant à terme à la régulation de la glycémie.

### E. Le système nerveux central et autonome – régulation nerveuse de la glycémie

Le contrôle du métabolisme énergétique par le SNC se fait de plusieurs manières : soit par l'intégration de messages nerveux émanant de la périphérie *via* le SNA, ou de messages nerveux sensoriels (par exemple, la voie trigéminale), soit par une détection directe des nutriments ou des hormones présents dans le sang. Pour l'activation du SNC, le SNA agit en synergie avec le système neuro-endocrinien. Une fois le message réceptionné et intégré au niveau central, il est retransmis en périphérie soit de manière nerveuse par le SNA, soit de manière endocrinienne par les sécrétions neuro-hormonales du cerveau telles que l'ACTH (adrénocorticotrophic hormone).

Le SNA comprend le système nerveux entérique (SNE), le SNS et le SNP. Le SNA régule toutes les fonctions basales des organes contenus dans les cavités thoraciques, abdominales et pelviennes et de la peau. Les nerfs du SNS et du SNP sont mixtes c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois des axones sensitifs et des axones moteurs : le nerf vague parasympathique contient un axone moteur pour 3 axones sensitifs alors que les nerfs sympathiques sont composés d'un axone moteur pour un axone sensitif. Le SNP est composé principalement du nerf vague (innervant toute la sphère thoracique et abdominale sauf la vessie, les organes génitaux et le côlon), puis secondairement des nerfs faciaux et du nerf sacré (innervant la vessie, les organes génitaux et le côlon). Ainsi, le nerf vague, de par les organes qu'il innerve, semble être le nerf clé du SNP dans la régulation du métabolisme énergétique. Le SNS est composé de nombreux nerfs émanant de la chaine ganglionnaire proche de la colonne vertébrale, mais les innervations splanchniques sont celles innervant de façon importante la sphère digestive.

Le signaux parasympathiques vagaux sont réceptionnés dans un premier temps au niveau des ganglions nodaux du nerf vague puis au niveau du tronc cérébral, là où se situe le complexe vagal dorsal comprenant le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMNx, dorsal motor nucleus of the vagus nerve), alors que les signaux

sympathiques émanant de la sphère digestive sont réceptionnés au niveau des ganglions périphériques coeliaques et mésentériques puis au niveau de la moelle épinière lombaire et enfin au niveau du tronc cérébral notamment au niveau de la medulla rostral ventrolateral (MRVL) [188]. Dans un second temps, l'ensemble de ces signaux sympathiques et parasympathiques est transmis à l'hypothalamus.

L'hypothalamus est « la » zone centrale impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique (**Figure 5**). Il interagit de manière importante avec les autres aires cérébrales dont l'hypophyse, le tronc cérébral assurant la réception de signaux périphériques, le noyau suprachiasmatique (SCN, suprachiasmatic nucleus) impliqué dans le rythme circadien, le thalamus et différentes zones du cortex. L'hypothalamus s'organise en différents groupes de neurones appelés noyaux. Dans la régulation du métabolisme énergétique, on distingue le noyau hypothalamique ventromédian (VMH, ventromedian hypothalamus), le noyau paraventriculaire (PVH, paraventricular hypothalamus), le noyau arqué (ARC, arcuate nucleus), l'aire hypothalamique latérale (LHA, lateral hypothalamic area), le noyau hypothalamique dorsomédian (DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus) et l'aire hypothalamique dorsale (DHA, dorsal hypothalamic area) [189]. Une fois intégrés, les messages hypothalamiques sont transmis à la périphérie *via* le DMNx pour les signaux vagaux et *via* la moelle épinière pour les signaux sympathiques (**Figure 5**).

La régulation centrale du métabolisme glucidique a été imaginée pour la première fois par Claude Bernard en 1849. A l'aide d'une aiguille, il stimule le plancher du 4ème ventricule contenu dans le tronc cérébral (non loin du NTS et du DMVx) et observe une augmentation très importante de la glycémie en périphérie. Il appelle ce phénomène le « diabète piqure ». Il démontre ensuite que cette augmentation n'est pas liée au nerf vague puisqu'une fois coupé, le phénomène a toujours lieu. En réalité, le phénomène est aboli lorsqu'il coupe les branches splanchniques du SNS. Bien des années plus tard, il est démontré que c'est par l'intermédiaire de l'adrénaline que le phénomène a lieu.

Le SNA joue un rôle essentiel et majoritaire dans la détection des variations de la glycémie. Cette action se fait en détectant de manière directe le glucose ou indirecte *via* les hormones libérées en réponse aux variations de glycémie (insuline, glucagon, GLP, …). Cette détection se fait en périphérie au niveau de différentes parties de l'intestin grêle, de la veine porte, du pancréas, du tissu adipeux, … en période de jeûne ou en période postprandiale. Les messages sont ensuite perçus au niveau central où ils contribuent majoritairement à réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique. Mais ils sont aussi intégrés puis retransmis en périphérie dans le but de stabiliser la glycémie à un niveau physiologique d'environ 1g/L en contrôlant les sécrétions hormonales ou les fonctions métaboliques des organes périphériques. Le SNP agit en synergie avec les hormones sécrétées par ces différents organes (tissu adipeux, intestin, pancréas …) et peuvent stimuler eux aussi le SNC ou les organes périphériques. Ces axes nerveux sont appelés « axe périphérie-cerveau-périphérie » et contribuent à la régulation du métabolisme glucidique de nombreux organes : le pancréas, le foie, l'intestin, le système vasculaire, … Le

foie et le pancréas possèdent des innervations splanchniques et vagales tandis que le tissu adipeux est innervé principalement par des ramifications sympathiques. L'innervation parasympathique du tissu adipeux blanc reste controversée [190].

L'hypothalamus est aussi activé de manière nutritionnelle directement, *via* les nutriments ou indirectement, *via* les hormones présentes dans le sang (ghréline, leptine, insuline, glucagon …) [191]. Ceci est notamment permis grâce à la perméabilité sélective de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, le cerveau est isolé, de façon fine et protectrice, du sang périphérique par une structure de capillaires très imperméables. La région hypothalamique correspondant à l'éminence médiane présente, quant à elle, une structure capillaire de type fenestré comme présente au niveau du foie. Ces capillaires sont composés de cellules endothéliales autour desquelles se sont développés des prolongements astrogliaux dont les corps cellulaires sont localisés à proximité de neurones sensibles aux nutriments. Bien que ces complexes cellulaires fins jouant un rôle essentiel dans la détection des nutriments soient clairement décrits au niveau de l'éminence médiane, les mécanismes impliqués dans la détection des nutriments restent à éclaircir pour les noyaux hypothalamiques plus profonds [192].

#### *1. Détection du glucose par le SNA au niveau de l'intestin et de la veine porte entéro-hépatique*

En période postprandiale, le glucose absorbé au niveau duodénal induit de nombreux signaux intestin-cerveau *via* la sécrétion des hormones intestinales qu'il stimule ou par sa propre présence (**Figure 5**). Ces signaux perçus au niveau de l'intestin permettent de réguler, en périphérie, la consommation de glucose dans le but de maintenir la glycémie à des taux normaux de 1g/L. D'autre part, le glucose absorbé après un repas se concentre au niveau de la veine porte entéro-hépatique. De nombreux travaux ont démontré que l'infusion de glucose au niveau de cette veine contrôlait *via* une stimulation parasympathique ou sympathique, la prise alimentaire, la consommation musculaire et hépatique de glucose et les sécrétions pancréatiques [193-196]. Il a été démontré que GLUT2 exprimé au niveau de cette veine était essentiel pour ces mécanismes [197, 198]. D'autre part, la veine porte est riche en récepteurs d'hormones intestinales telles que le récepteur au GLP-1, le GLP-1r. Cette détection hormonale joue un rôle non négligeable dans la régulation du métabolisme du glucose et sera traitée dans un chapitre suivant [199, 200]. Enfin, après avoir mis en évidence l'existence de la néoglucogenèse intestinale au cours du jeûne par l'expression de la G6P au niveau des entérocytes, l'équipe de Gilles Mithieux a montré l'importance de la détection de ce glucose produit *de novo* par l'intestin, au niveau portal, par le SNS et pour la régulation du métabolisme en périphérie [201].

### 2. *Les innervations autonomes motrices des tissus métaboliques*

#### a) *Le foie*

Le foie est innervé à la fois par les ramifications nerveuses émanant du SNS et du SNP (**Figure 5**). La régulation sympathique effectrice se fait par la noradrénaline *via* les récepteurs α et β adrénergiques mais aussi par la galanine et le NPY et la régulation parasympathique *via* les récepteurs cholinergiques de type muscarinique [202]. Cependant, la régulation parasympathique semble faiblement impliquée dans le contrôle du métabolisme glucidique du foie [203]. De nombreux sites hypothalamiques sont impliqués dans l'envoie de signaux régulateurs de la fonction hépatique comme le LHA par le nerf vague ou le VMH par les innervations sympathiques. Le PVH, quant à lui, intègre des signaux émanant de l'ARC, du VMH et du SCN et envoie le message effecteur *via* le SNS et le SNP. L'activation électrique ou hormonale du LHA induit la synthèse de glycogène et diminue l'activité de l'enzyme néoglucogénique PEPCK. D'une autre façon, l'activation électrique du VMH augmente l'activité de la PEPCK néoglucogénique et diminue celle de la PK glycolytique [204]. La stimulation sympathique *via* les récepteurs α adrénergiques induit la phosphorylation de la GP se traduisant par une glycogénolyse accrue et une surproduction de glucose par le foie. Ceci mène rapidement à une hyperglycémie et une baisse des stocks de glycogène [205, 206]. Enfin, le SNP peut avoir des effets indirects sur le métabolisme glucidique du foie, en contrôlant la contraction des vaisseaux et le flux sanguin modulant ainsi leur accessibilité aux nutriments et aux hormones.

#### b) *Le pancréas*

Comme le foie, le pancréas est innervé par le SNS et le SNP (**Figure 5**). A l'aide de l'utilisation de traceur viral rétrograde, il a pu être mis en évidence que le SNC pouvait contrôler la fonction pancréatique *via* différents noyaux et neurones hypothalamiques (DMH, LHA, DHA) et du tronc cérébral (AP, NTS, DMNx pour le nerf vague et la MRVL pour le nerf sympathique) [207]. Le SNP régule les cellules α et β alors que le SNS régule les cellules α. Le SNP stimule la sécrétion d'insuline *via* les récepteurs muscariniques M3/M5 couplés à la protéine Gαs alors que le SNS inhibe cette sécrétion *via* les récepteurs α adrénergiques couplés à la protéine Gαi [208-210]. Ainsi, le contrôle autonome de la sécrétion d'insuline se fait par modulation de la production d'AMPc et de l'activité de la PKA. Outre l'Ach, de nombreux autres neurotransmetteurs parasympathiques peuvent stimuler la sécrétion d'insuline tels que le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) ou le VIP – aussi sécrétés par les neurones intestinaux et les îlots pancréatiques [209]. La stimulation vagale est responsable de la phase très précoce dite céphalique de la sécrétion d'insuline [211]. En plus de réguler la sécrétion, le SNP semble aussi important pour la prolifération des cellules β [212].

Pour la sécrétion de glucagon, il a été montré que lorsque la glycémie chute de façon modérée, l'hypoglycémie est détectée au niveau cérébral et engendre une

augmentation de l'activité vagale jusqu'au pancréas stimulant entre autre la sécrétion de glucagon [209, 213, 214]. En conditions d'hypoglycémie plus sévère, la sécrétion de glucagon est également induite mais cette fois-ci sous l'impulsion de l'activité du SNS *via* les récepteurs adrénergiques $\alpha$ et $\beta$ couplés à G$\alpha$s [213, 215].

Comme au niveau du foie, le SNP peut avoir des effets indirects sur la fonction sécrétrice des îlots en contrôlant la contraction des vaisseaux et le flux sanguin modulant ainsi leur accessibilité aux nutriments et aux hormones, mais également en influençant la sécrétion des autres hormones pancréatiques comme la somatostatine.

#### *c) Le tissu adipeux*

L'injection d'un traceur viral rétrograde dans le tissu adipeux blanc a permis d'identifier les zones cérébrales en lien avec ce tissu. Elles concernent les zones du tronc cérébral activées par le SNS et certains noyaux de l'hypothalamus (ARC, DMH, LHA et VMH) [216] (**Figure 5**). Le SNS, *via* la noradrénaline et les récepteurs $\alpha$ et $\beta$ adrénergiques, régule la lipolyse, l'adipogenèse et donc le nombre d'adipocytes et aussi la production d'adipokines [217]. Chez le rongeur, le récepteur $\beta$ adrénergique active la voie AMPc/PKA pour stimuler la lipolyse tandis que le récepteur $\alpha$ inhibe la PKA et donc la lipolyse. Ces mécanismes peuvent être différents entre l'animal et l'homme suivant les récepteurs exprimés et les voies de signalisation impliquées.

### *3. L'activation directe des neurones centraux des noyaux hypothalamiques par les hormones et les nutriments.*

#### *a) Les noyaux hypothalamiques impliqués*

Le noyau ARC est le noyau le plus étudié et est activé par les hormones et les nutriments. Il est particulièrement riche en neurones de type AgRP (agouti related peptide) et de type POMC (pro-opio-melanocortine) très impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et la prise alimentaire. Les neurones du noyau ARC interagissent avec les autres zones hypothalamiques comme le PVH, le VMH, le DMH et le LHA bien que ces zones soient aussi stimulables par les hormones et les nutriments. Le transfert des messages provenant du noyau ARC vers la périphérie, notamment sous l'induction de l'insuline ou des acides gras, se fait par le nerf vague puisque la vagotomie de la branche hépatique inhibe les effets observés [105, 218]. Les messages issus du VMH, quant à eux, semblent être retransmis *via* les nerfs sympathiques et la sécrétion de noradrénaline [219, 220].

Le bon fonctionnement du VMH semble essentiel pour la régulation du métabolisme énergétique en périphérie. Une altération physique du VMH induit un hyperinsulinisme. Cet effet est médié par le nerf vague puisqu'il est abolit après une vagotomie [221]. Au niveau du VMN, il existe aussi un groupe de neurones très important pour la régulation du métabolisme énergétique, les neurones SF1 [222]. Ces mêmes neurones lorsqu'ils sont

invalidés pour l'AMPK, induisent une hypoglycémie importante au cours du jeûne résultante d'une altération de l'action du glucagon sur l'expression de la PEPCK et de la G6Pase [41], tandis que l'inhibition des récepteurs GABA favorise l'action du glucagon et de l'adrénaline, hormones hyperglycémiantes [223]. Le PVH également jouent également un rôle fondamental sur la régulation du métabolisme glucidique. Ce noyau perçoit des informations en provenance du VMH, de l'ARC et du NSC mais également des innervations autonomes. Ce noyau, par son activité AMPK, peut réguler la prise alimentaire sous l'induction d'hormones (leptine, …) ou de neurotransmetteurs (mélanocortine, …) [224]. Le SCN est impliqué dans la régulation circadienne de la production de glucose *via* des circuits nerveux dépendant du glutamate et de GABA. Son action est médiée à la fois par le SNS et le SNP [225].

#### *b) Les hormones périphériques peuvent activer les neurones hypothalamiques*

Certains neurones hypothalamiques possèdent les récepteurs à l'insuline. Cette idée a émergé des travaux d'Obici et ses collègues qui ont montré que les noyaux ARC et VMH possédaient le récepteur à l'insuline et qu'ils étaient nécessaires pour la diminution de la production hépatique de glucose [103, 226, 227]. Cet effet semble médié par le récepteur à l'insuline exprimé au niveau des neurones AgRP. En effet, la diminution de l'expression du récepteur à l'insuline au niveau de ces neurones modifie le métabolisme glucidique en altérant la production hépatique et la capture musculaire de glucose [228]. De la même manière, l'insuline peut agir au niveau du VMH et inhiber la sécrétion de glucagon [103]. L'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau du VMH génère une importante intolérance au glucose par altération de la fonction endocrine du pancréas sans augmentation de poids [227].

La leptine, sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, connue pour son action anorexigène au niveau hypothalamique, en activant les neurones POMC, améliore la production hépatique de glucose de manière insulino-dépendante [229, 230] ou en activant les neurones AgRP, réduit la sécrétion de glucagon [231]. La leptine injectée au niveau hypothalamique est également capable d'améliorer le métabolisme glucidique des muscles par les voies AKT, AMPK et PGC1$\alpha$ [232]. Enfin, sous l'induction de la leptine, le VMH stimule la capture musculaire de glucose indépendamment de l'action de l'insuline et cet effet implique les récepteurs $\beta$ adrénergiques et donc le SNS [232, 233].

De la même manière, le GLP-1, le GLP-2 ou le glucagon agissent sur leur récepteur exprimé par les neurones hypothalamiques pour contrôler la sensibilité à l'insuline périphérique, la production hépatique de glucose, la prise alimentaire [234, 235], la capture musculaire de glucose ou encore l'apport cérébral en sucre par le sang [236]. Une délétion du récepteur au GLP-2 au niveau des neurones POMC induit une importante résistance à l'insuline au niveau hépatique [237]. Au laboratoire, notamment par les travaux de Claude Knauf, il a été montré que le GLP-1 injecté au niveau cérébral augmentait la sécrétion

d'insuline et induisait une résistance musculaire à l'insuline en faveur d'un stockage hépatique de glycogène [238]. Enfin, le groupe de Tony Lam a montré que le glucagon hypothalamique inhibait la production hépatique de glucose [239]. Cependant, le glucagon et les GLP1/2 sont également exprimés et sécrétés au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus. Dans ces différents mécanismes, il est difficile de conclure si ces actions sont médiées par la part cérébrale ou la part périphérique de ces hormones, notamment lors des expériences d'injections intracérébroventriculaires (ICV) [240]. En effet, le glucagon et le GLP 1/2 sont des peptides capables de traverser la BHE.

Cette liste d'hormones est non exhaustive et de nombreuses autres hormones peuvent influencer le contrôle central du métabolisme : les hormones thyroïdiennes, les glucocorticoïdes, …

#### *c) Détection directe du glucose par le système nerveux central*

Les neurones hypothalamiques, en plus de répondre aux hormones périphériques et aux stimulations autonomes, sont également sensibles aux nutriments. Il existe des neurones sensibles au glucose, jouant le rôle de senseurs centraux au glucose. Dans ce cas, le glucose n'a pas seulement le rôle de fournisseur d'énergie mais de molécules de signalisation. Dans les années 90, des études ont montré qu'injecter du glucose dans l'artère carotide, artère irriguant le SNC, induit la production d'insuline *via* l'activation de l'ARC et du nerf vague [241, 242].

Les neurones sensibles au glucose se trouvent très concentrés au niveau de l'ARC. La stimulation de ces neurones est comparable aux mécanismes moléculaires identifiés au niveau de la cellules β : entrée du glucose par GLUT2, phosphorylation du nutriment par la GK, production d'ATP, fermeture des canaux $K_{ATP}$, dépolarisation membranaire, ouverture des canaux $Ca^{2+}$ voltage-dépendant puis exocytose. Comme au niveau de la cellule β, en possédant GLUT2 de faible affinité et de forte capacité et la GK, le catabolisme du glucose n'est pas inhibé et limité dans ces neurones (**Figure 5**). Le transporteur GLUT2 exprimé au niveau cérébral est essentiel pour la détection du glucose et la régulation périphérique. En effet, invalider GLUT2 au niveau hypothalamique et notamment au niveau de l'ARC bloque la sécrétion d'insuline en réponse à une hyperglycémie cérébrale [243].

Les neurones sensibilisés au glucose mais également aux acides gras libres peuvent réguler la production hépatique de glucose [105, 218, 244]. Les neurones AgRP et POMC de l'ARC semblent jouer un rôle primordial dans la détection des nutriments et la régulation périphérique de leur utilisation [245, 246]. La détection du glucose au niveau du VMH régule la sécrétion de glucagon en conditions d'hypoglycémie [247].

Dans les années 90, notamment par Corinne Leloup et Luc Pénicaud puis ensuite Bernard Thorens, il a été montré que GLUT2 était principalement exprimé au niveau des astrocytes plutôt que dans les neurones hypothalamiques [248]. La réexpression de GLUT2 spécifiquement au niveau des astrocytes dans des souris invalidées pour GLUT2 permet de restaurer la détection cérébrale du glucose sanguin et le contrôle de la sécrétion de

glucagon en conditions hypoglycémiques [249]. Une autre étude réalisée par le même groupe a montré que GLUT2 exprimé au niveau astrocytaire permettait le contrôle de la prise alimentaire [250]. Comme les neurones hypothalamiques, les astrocytes sont sensibles aux hormones émanant de la périphérie et peuvent jouer leur rôle dans la régulation du métabolisme énergétique [251]. Comment les cellules gliales peuvent-elles jouer un rôle sur le métabolisme énergétique ? Les cellules gliales, dont les astrocytes, sont les fournisseurs d'énergie des neurones en effectuant un échange de métabolites comparable au cycle de Cori entre le muscle et le foie. Les astrocytes produisent du lactate à partir du glucose et de la glycolyse et ce lactate est catabolisé par le cycle de Krebs dans les neurones. Pour cela, les cellules gliales possèdent des PDH de faible activité, des transporteurs aux monocarboxylates de type 1 et 4 (MCT1 et 4, monocarboxylate transporter 1 et 4) et des lactate déshydrogénases. Pour permettre l'entrée de lactate, les neurones expriment plutôt le transporteur MCT2 de forte affinité. Les neurones préfèrent cataboliser le lactate plutôt que le glucose. Il a été montré que restaurer GLUT1 au niveau des cellules gliales hypothalamiques, chez des souris diabétiques, normalisait la production hépatique de glucose [252]. Ainsi, le bon fonctionnement par les cellules gliales est nécessaire pour le contrôle du métabolisme glucidique. Les astrocytes peuvent jouer un rôle de senseur au glucose et transmettre leur message aux neurones afin de les activer. En effet, le lactate produit par les cellules gliales augmente le flux calcique au niveau des neurones *via* une augmentation de l'ATP et l'activation du canal $K_{ATP}$ [253]. Le lactate peut également être considéré comme une molécule de signalisation (**Figure 5**) car son injection dans le 3ème ventricule (ARC) et dans l'artère carotidienne contrôle la production hépatique de glucose et la sécrétion d'insuline *via* l'activation du nerf vague [218]. Il a été montré également qu'en conditions hyperglycémiques chroniques et pathologiques telles que le diabète, les MCT étaient surexprimés au niveau cérébral pouvant alors expliquer les dérégulations en périphérie [254, 255].

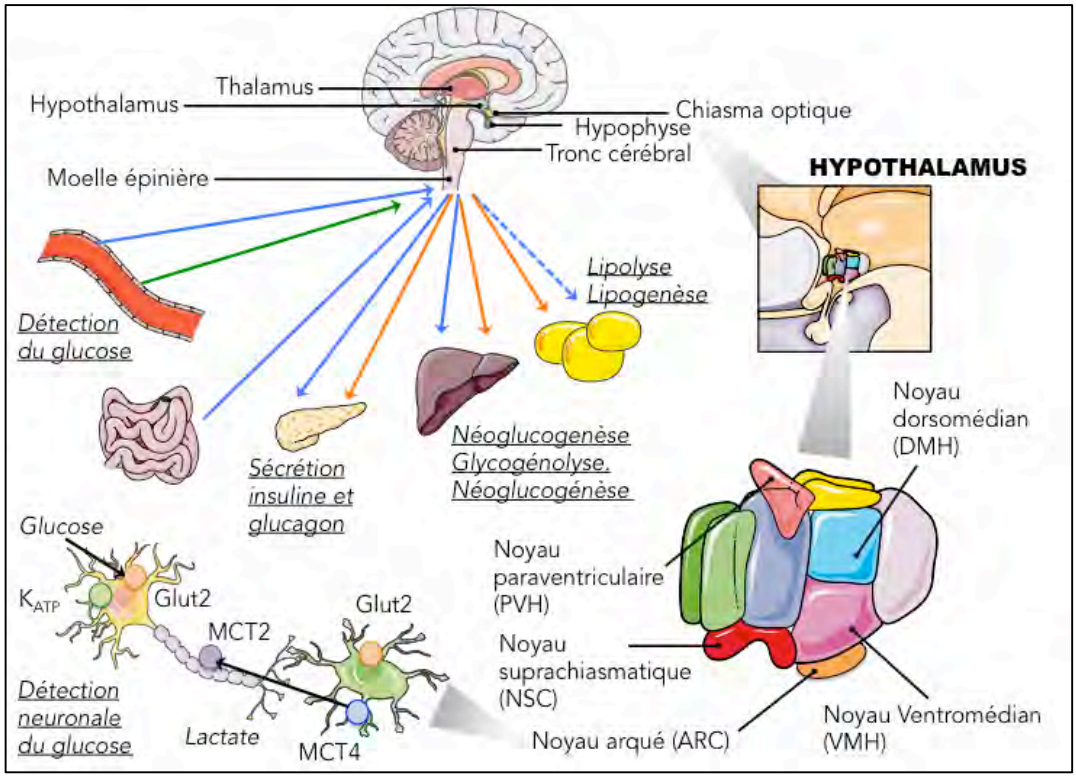



Figure 5 Le contrôle du métabolisme glucidique par le système nerveux central. Les flèches représentées en bleu correspondent aux innervations du SNP (nerfs vague), représentées en orange aux innervations du SNS et représentées en vert aux hormones. La détection du glucose au niveau de l'intestin et de la circulation sanguine, notamment la veine porte, est réalisée directement par le glucose ou indirectement *via* les hormones intestinales ou encore du tissu adipeux. L'intégration cérébrale des changements de glycémie se fait au niveau de l'hypothalamus où l'ARC, le VMH, le PVH et le DMH jouent un rôle important. La détection du glucose au niveau neuronal s'effectue directement par l'entrée du glucose dans le cytoplasme du corps neuronal ou indirectement *via* l'entrée de lactate produit par les cellules gliales (astrocytes).

Le tronc cérébral, comprenant le DMNx, le NTS et l'AP est aussi très important dans la régulation périphérique du métabolisme glucidique. En effet, il possède comme l'hypothalamus des neurones sensibles au glucose qui peuvent transmettre l'information en périphérie par le nerf vague. Le DMNx semble critique dans la régulation de les fonctions sécrétrices du pancréas car la stimulation chimique et électrique du complexe induit la stimulation des sécrétions endocrines et exocrines du tissu [256]. En réalité, ce complexe vagal est activé par des messages émanant de la périphérie soit par activation indirecte *via* les afférences vagale, soit par activation directe endocrine comme c'est le cas pour le GLP-1 [257].

## F. Le tube digestif et le rein – épithéliums impliqués dans l'absorption et la production de glucose

### *1. L'intestin : l'absorption de glucose exogène en période postprandiale et la production de glucose en période de jeûne*

Le tube digestif est la porte d'entrée des nutriments venant de l'extérieur. Il est donc la source unique de sucre exogène. Parmi les sucres simples, on distingue le glucose mais également le galactose et le fructose. Lorsque l'on ingère les aliments, les sucres peuvent être organisés en molécules plus ou moins complexes telles que le lactose, le saccharose, l'amidon, la cellulose ou le glycogène. De notre bouche jusque dans notre intestin, nous sommes capables de digérer notamment l'amidon et le glycogène mais pas la cellulose, grâce aux amylases sécrétées dans la salive et par le pancréas. Les petits fragments glucidiques restant sont ensuite catabolisés en monomère par les enzymes présentes au niveau de la surface apicale des entérocytes : lactase, maltase ou encore sucrase. Une fois les monomères individualisés (D-glucose, D-galactose, et D-fructose), ils pénètrent dans l'entérocyte par des transporteurs aujourd'hui très bien identifiés.

Dans les années 1960, après avoir démontré que le glucose était plus concentré dans le lumen de l'intestin que dans le reste du tissu et de l'organisme [258], il a été mis en évidence l'existence d'un co-transporteur de glucose/$Na^+$ : le transport du glucose à l'intérieur de l'entérocyte est facilité par le gradient $Na^+$ de part et d'autre de la membrane. Ce co-transport est réalisé par la protéine SGLT1 (sodium glucose-linked transporter 1) présente au niveau des microvillosités apicales de l'entérocyte. Au cours de ces études, il a été aussi démontré que la pompe $Na^+/K^+$ basolatérale était critique pour maintenir le gradient de $Na^+$ entre les milieux intracellulaires et extracellulaires et nécessitait de l'énergie – hydrolyse d'ATP – pour assurer ce transport actif [259, 260]. Lorsque l'expression de la pompe $Na^+/K^+$ basolatérale est dérégulée, cela engendre des maladies comme le diabète [261]. Le transport du glucose par SGLT1 a été remis d'ailleurs au goût du jour récemment [262] expliquant le rôle des sels biliaires dans la potentialisation, en tant que sel, de l'absorption du glucose. Une fois dans l'entérocyte, le glucose sort au niveau basal par les transporteurs GLUT2, cloné plus tardivement dans les années 90. En parallèle, a été mis en évidence le transport du fructose : il est assuré par GLUT5 au niveau apical et par GLUT2 au niveau basal.

SGLT1, permettant le transport du glucose mais aussi du galactose, est essentiellement retrouvé au niveau du pôle apical des entérocytes matures, en haut des villosités et en quantité beaucoup plus faible au niveau du rein et du cœur. Cependant, il a été démontré que ce transporteur était exprimé au niveau de l'endothélium de la BHE et jouerait un rôle sur le transport du glucose à travers cette barrière [263]. Pour transporter du glucose, il nécessite 2 ions $Na^+$, qui en se fixant sur la protéine induit son changement de conformation et la fixation du glucose. Cette fixation induit un changement de conformation permettant la libération de glucose dans la cellule, suivi de la libération de $Na^+$.

L'expression de SGLT1 est régulée par le sucre et peut être augmentée lorsque le régime est enrichi en sucre [264]. Ces effets passent par les récepteurs au goût T1R ou récepteur à la gustudicine [265]. L'expression de SGLT1 semble également régulée par d'autres facteurs comme le glucagon, les GLP1/2, l'insuline ou l'adrénaline, notamment *via* l'augmentation d'AMPc [266-269]. Dans les maladies telles que les diabètes, on observe une augmentation de l'expression de SGLT1 au niveau du duodénum de deux à trois fois [270]. Son activité est régulée par phosphorylation : la PKA augmente de 30% son activation et la PKC la diminue de 60%. La régulation de son activité se fait essentiellement par exocytose et endocytose. Il a été démontré qu'une protéine RS1 intracellulaire pouvait réguler la dynamique d'endocytose et exocytose du transporteur. D'ailleurs, les souris KO pour cette protéine développent une obésité, une hyperphagie et une augmentation du transport intestinal de glucose [271]. La malabsorption du glucose est une maladie rare autosomale récessive qui se traduit par des diarrhées violentes en période néonatale. Elles sont limitées si le glucose est retiré du régime. En réalité, ce défaut d'absorption est dû à une mauvaise exposition de SGLT1 à la membrane apicale et à une très forte concentration de glucose dans la lumière intestinale sur tout le long du tractus digestif [272]. Lorsque l'on réalise un test de tolérance oral au glucose chez ces patients, cela se traduit par une très faible augmentation de la glycémie. Ces patients peuvent vivre en absence de glucose mais nécessitent un enrichissement en fructose qui lui est bien absorbé [273]. Comme SGLT1, GLUT5 se trouve exprimé au niveau de la membrane apicale des entérocytes matures. Il assure le transport de fructose. GLUT5 est exprimé dans le rein et le cerveau, dans le tissu adipeux ou le muscle squelettique. L'expression de GLUT5 décroit le long du tractus digestif : la concentration de la protéine est très concentrée au niveau du duodénum et GLUT5 est quasi-absent dans l'iléon. L'ARNm de GLUT5 et l'absorption du fructose augmentent sous régime enrichi en fructose suggérant un lien essentiel entre le sucre et le transporteur [264]. D'ailleurs, il a été montré que l'augmentation d'AMPc dans le milieu intracellulaire pouvait augmenter la transcription et la traduction de GLUT5 par, entre autres, l'augmentation de l'activité du promoteur de GLUT5 (séquence CRE) et la stabilité de l'ARNm (PKA dépendante) [274, 275]. L'augmentation de l'AMPc stimule également l'activité du transporteur [276]. Les processus inflammatoires, que l'on peut observer dans les maladies inflammatoires intestinales ou même au cours des maladies métaboliques, diminuent l'expression de GLUT5, *via* le TNF$\alpha$, l'oxyde nitrique (NO) ou encore les prostaglandines. Le glucose et le fructose sont transportés au pôle basal par GLUT2 qui est un transporteur de faible affinité mais de forte capacité. La présence luminale de glucose augmente l'expression de GLUT2 et son activité [264].

Le modèle de transport intestinal du glucose « SGLT1/GLUT2 » est le plus connu et le plus décrit. Cependant, des études ont montré qu'il pouvait exister d'autres types de transport du glucose. En effet, au cours d'expériences réalisées sur des vésicules composées de fragments de la membrane du pôle apical de l'entérocyte et en faisant varier la concentration de glucose jusqu'à 100mM, on observe une linéarité du transport du

glucose. Pourtant, les protéines SGLT1 sont saturables à 50mmol/L. Ainsi, deux types de transports pourraient exister : de haute affinité de faible capacité (SGLT1) et de forte capacité de faible affinité [277, 278]. Il a été observé il y a quelques années, que chez des souris diabétiques, GLUT2 pouvait être exprimé au niveau de la bordure en brosse. On a donc associé ce phénomène à la pathologie. Cependant, quelques temps après, il a été démontré que SGLT1 pouvait favoriser la translocation de GLUT2 à la membrane apicale par l'intermédiaire des protéines PKC et MAPK [279]. La théorie qui a émergé de ces études est que lorsque le glucose est en concentration faible dans le lumen alors GLUT2 est faiblement exprimé au niveau apical et SGLT1 assure le transport du glucose. Lorsque l'on mange, alors la concentration des enzymes dégradant les polyoses et la protéine SGLT1 se trouvent surexprimées à la membrane mais sont rapidement saturées. L'entrée de glucose dans l'entérocyte s'accompagne d'une augmentation de la concentration calcique dans la cellule. Ceci active la PKCβ qui favorise alors la translocation de GLUT2 à la membrane [279]. L'activation de la PKCβ peut également se faire par une voie dépendante de la PI3K et de mTORC suggérant un possible rôle de l'insuline et même des acides aminés dans cette régulation [280]. Ainsi, les premières expériences sur les vésicules citées ci-dessus, décrivant un transport de haute affinité / faible capacité, pourraient concerner le transport SGLT1/GLUT2, tandis que le transport de faible affinité / haute capacité pourrait concerner le transport GLUT2/GLUT2. GLUT2 présent au niveau de la membrane apicale contribue également à l'absorption du fructose. Le GLP-2, produit au niveau de l'intestin, infusé dans le lumen ou dans les vaisseaux intestinaux, favorise l'absorption du fructose *via* l'augmentation de GLUT2 au niveau apical [281]. L'AMPK, senseur énergétique de l'organisme, est aussi capable de réguler la translocation de GLUT2 à la membrane [282]. La voie PI3K / AKT semble tout aussi importante dans la régulation du transport à la membrane apicale de GLUT2 et GLUT5 comme il l'est pour GLUT4 [283]. Un autre type de transport a été suggéré dans les années 1990. Au cours d'une perfusion en glucose dans différents segments d'intestin, il a été observé la dilatation importante des jonctions serrées et une augmentation de la perméabilité intestinale. Le flux traversant ces dilatations emporte avec lui le glucose, on parle de transport transépithélial ou paracellulaire. Ce phénomène est médié par l'activité de SGLT1 [284].

Le glucose, en plus d'être absorbé sert de molécule de signalisation et induit la sécrétion d'hormones intestinales et l'activation du SNA présent dans l'intestin mais ceci est traité dans le chapitre suivant.

Depuis quelques années, le groupe de Gilles Mithieux a étudié un rôle néoglucogénique de l'intestin. En effet, il a été découvert que la G6P était aussi exprimée au niveau des cellules épithéliales intestinales chez le rongeur, sous régime normal, au niveau du duodénum et du jéjunum et chez l'homme au niveau du duodénum, jéjunum et iléon. Chez des rats diabétiques, cette expression est augmentée de 6 à 8 fois et l'activité de 300 fois. D'ailleurs, il est estimé que 1/3 du glucose sanguin chez ces rats est issu de la néoglucogenèse intestinale. Le jeûne stimule également l'expression et l'activité de la G6P

[285]. L'intestin est responsable de 5-10% de la néoglucogenèse post-absorptive, soit un jeûne de courte durée, et 20-25% après 48h de jeûne [286, 287]. La création de souris invalidées pour la G6P dans l'intestin a permis d'acquérir plus de connaissances sur cette action intestinale. Dans un premier temps, les souris invalidées pour la G6P au niveau du foie ont montré une glycémie nourrie normale et une résistance au jeûne [288]. Suite à un jeûne de courte durée, elle possède une légère hypoglycémie car la glycogénolyse est absente mais se stabilise sur un jeûne plus prolongé. Ceci peut s'expliquer par un rôle non négligeable du rein et aussi de l'intestin sur la stabilité de la glycémie au cours d'un jeûne prolongé. Les souris doublement invalidées pour la G6P au niveau du foie et de l'intestin résistent beaucoup moins bien au jeûne suggérant un rôle important de l'intestin pour la production de glucose *via* la néoglucogenèse [289]. Les substrats préférentiels pour la néoglucogenèse intestinale sont différents de ceux du foie : il s'agit de la glutamine et du glycérol [290]. Les cellules épithéliales intestinales peuvent stocker du glycogène mais en faibles quantités. D'ailleurs, ce stock intestinal est accru chez des animaux diabétiques. Ainsi, l'état diabétique et le jeûne semblent induire de manière importante la néoglucogenèse intestinale notamment *via* l'induction de l'expression de la G6P. Mais ceci passe aussi par la modulation de l'expression de la PEPCK et de la PK. En effet, au niveau des cellules épithéliales intestinales, l'expression de la PEPCK était augmentée alors que celle de la PK était diminuée et ceci, au cours du jeûne et du diabète. D'autre part, la renutrition et l'injection d'insuline semblent normaliser la fonction néoglucogénique intestinale. D'autre part, sur ses derniers travaux, le groupe de Gilles Mithieux a montré que ce glucose intestinal, produit par néoglucogenèse pouvait, en plus de servir de source énergétique au reste de l'organisme, être une molécule de régulation essentielle dans le métabolisme périphérique [201, 291].

### *2. Le rein : recapture du glucose sanguin et néoglucogenèse*

L'implication du rein dans le métabolisme glucidique a été démontrée dans les années 1930 en réalisant des clamps euglycémiques sur deux groupes de lapins : des lapins hépatectomisés ou hépatectomisés et néphrectomisés. Dans le dernier groupe, le glucose injecté pour maintenir une glycémie normale est beaucoup plus élevé que pour le premier groupe suggérant un rôle essentiel du rein dans le maintien de la glycémie [292]. En réalité, le rôle du rein dans le métabolisme glucidique se fait de plusieurs manières : il produit du glucose par néoglucogenèse, consomme du glucose pour produire sa propre énergie et recapture le glucose filtré à partir du plasma au niveau du glomérule rénal. Par jour, il libère 180g de glucose par réabsorption, 15-55g de glucose par néoglucogenèse et enfin métabolise 25-35g de glucose [292]. Ainsi, son influence la plus importante sur le métabolisme glucidique reste la réabsorption du glucose présent dans le filtrat rénal. La modification de cette action rénale peut donc avoir de graves conséquences sur la glycémie. Au niveau rénal, on associe plutôt la consommation de glucose à la partie la plus profonde du néphron appelée médulla, alors que la réabsorption sera plutôt réalisée au

niveau du cortex. Cette répartition de fonction est la conséquence de l'expression différentielle des enzymes entre les différentes cellules épithéliales rénales. Ainsi, au niveau de la medulla, s'expriment les enzymes de phosphorylation du glucose et de la glycolyse (PK, PDH) et même des enzymes de synthèse du glycogène (GS), tandis qu'au niveau du cortex, les cellules expriment les enzymes de la néoglucogenèse (G6P). La consommation de glucose ne varie pas au cours de la journée, entre les périodes de jeûne et de prise alimentaire contrairement au foie, mais elle varie de façon spatiale, dans l'organe, suivant la zone du rein concernée.

Le rein joue un rôle essentiel dans la réabsorption d'électrolytes, des acides aminés ou du glucose, filtrés par le glomérule rénal. Comme au niveau de l'intestin, l'épithélium rénal est composé d'un pôle apical riche en microvillosités au contact du filtrat rénal et du milieu extérieur et un pôle basal côté interne, sanguin. Cet épithélium possède les deux transporteurs SGLT et GLUT [292]. SGLT joue le rôle de transporteur actif au niveau apical et GLUT, le rôle de transporteur passif au niveau basal. Cependant, au niveau du rein, on distingue plutôt l'isoforme SGLT2, de faible affinité / forte capacité afin de limiter la perte de sucre dans les urines. On estime qu'il assure la réabsorption de 90% du glucose. Cependant, le rein exprime également SGLT1. SGLT2 est très exprimé au début du tubule proximal du néphron tandis que SGLT1 est plutôt tardif dans le tubule proximal. Plus la glycémie est haute, plus la quantité de glucose filtré est importante. La quantité de glucose absorbé par le rein dépend de la capacité des transporteurs, s'ils saturent alors le glucose est éliminé par les urines ce qui est le cas lorsque la glycémie est à 10-12mM ou 180-200mg/dL [292]. Comme au niveau intestinal, l'absorption du glucose est réalisée grâce au maintien du gradient $Na^+/K^+$ réalisé par la pompe ATP. SGLT2 est couplé avec GLUT2 pour le transport transcellulaire, alors que SGLT1 est couplé plutôt à GLUT1. Au cours du diabète, la réabsorption du glucose au niveau du rein est plus efficace : les protéines SGLT2 et GLUT sont plus exprimées et plus actives au niveau du tube proximal proche contribuant ainsi de manière néfaste à l'hyperglycémie [293]. Un défaut autosomal récessif touchant SGLT2 induit une glucosurie bégnine avec une glycémie correcte et un état général normal [294]. Un défaut autosomal récessif touchant SGLT1 engendre une malabsorption de glucose/galactose au niveau intestinal mais présente une glucosurie mineure [272, 273]. Ceci confirme que contrairement à SGLT2, SGLT1 joue un rôle mineur sur la réabsorption du glucose par le rein et est important plutôt dans l'absorption intestinale. Chez les souris invalidées pour SGLT2, la réabsorption du glucose par le rein est estimée à 70% [295]. Ainsi, SGLT1 peut compenser partiellement l'absence de SGLT2. De plus, ces souris montrent une meilleure tolérance au glucose associée avec une augmentation de 30% de l'élimination du glucose dans les urines [296]. Cet aspect est à l'origine de la création de stratégies thérapeutiques antidiabétiques ciblant l'inhibition de SGLT2.

Chez le rat, le rein est capable de produire par néoglucogenèse après 24h de jeûne, l'équivalent de 50% du glucose présent dans le sang et 15%-20% en période post-absorptive (6h de jeûne). Chez l'homme, le rein produit 5%-20% du glucose présent dans le

sang en état post-absorptif et 25-50% au cours de périodes de jeûne plus longues. Au cours du diabète, ce phénomène est augmenté [292, 297]. A l'opposé du foie, le rein a de très faibles capacités de stockage de glucose sous forme de glycogène. Bien que certaines cellules rénales, localisées au niveau de la médulla, soient capables de stocker du glycogène pour leur propre consommation, elles ne peuvent pas le restituer à la périphérie car elles n'expriment pas la G6P. Comme le foie, le rein produit du glucose à partir des substrats glycogéniques : le glycérol, le lactate, ou les acides aminés [298]. Le foie et le rein ont comme substrat préférentiel le lactate mais contrairement au foie, le rein préfère la glutamine plutôt que l'alanine. Après un jeûne de 12h-16h, le rein se met à produire du glucose en grande quantité et sa capacité à produire augmente avec le temps de jeûne. Contrairement au foie, la néoglucogenèse rénale ne s'arrête par lorsque nous sommes en état nourri et semblerait jouer un rôle dans le remplissage des stocks de glycogène dans le foie et les muscles. La néoglucogenèse rénale est régulée par l'insuline ou encore les catécholamines mais pas par le glucagon [299].

## G. Conclusion

La cellule a besoin d'énergie de manière permanente pour fonctionner et se reproduire. Dans un organisme animal pluricellulaire, complexe et organisé, les systèmes intracellulaires et extracellulaires sont programmés et régulés de façon à apporter aux cellules toute l'énergie nécessaire à leur fonctionnement. La régulation du métabolisme glucidique est donc complexe et fine. Lorsque le glucose est en quantité faible, les organes et les tissus communiquent entre eux pour pallier ce défaut en glucose, entrainant l'activation de processus enzymatiques qui permettent de libérer et rendre disponible de l'énergie à l'ensemble des cellules : la glycogénolyse, la néoglucogenèse ou la lipolyse. Par contre, lorsque le glucose est en grande quantité, les organes et les tissus, sous l'induction de signaux nutritionnels puis hormonaux et nerveux, consomment ou stockent cet excès d'énergie par certains processus enzymatiques tels que la glycogénogénèse ou la lipogenèse voir même l'adipogenèse. L'induction de ces mécanismes dépend de la situation qui nous entoure (stress, jeûne, famine) et se fait à travers l'influence d'hormones et de signaux nerveux (pancréas, surrénale, SNC, SNA, …) mais également du tissu. Chaque organe est pourvu de transporteurs au glucose dans le but de se fournir en énergie. Cependant, dans certains tissus, ces transporteurs peuvent également jouer le rôle de senseur au glucose (cerveau, pancréas, intestin, …).

Au niveau cellulaire, la régulation du métabolisme glucidique se fait de manière aigue par des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, ubiquitinylation, …) ou des modulations allostériques de l'activité (présence de molécules activatrices et inhibitrices reflétant l'environnement intracellulaire immédiat : pauvre ou riche en énergie) des enzymes. La régulation des enzymes peut se faire de manière chronique et sur du long terme en modifiant leur expression génique par l'activation ou l'inhibition des facteurs de transcription. Ainsi, l'homéostasie glucidique est maintenue par des mécanismes

de sortie et de consommation de glucose et des mécanismes d'entrée et de production de glucose.

Lorsque l'apport en énergie est excédentaire et que la balance énergétique est déséquilibrée reflétant alors plus d'entrée que de sortie, dans un premier temps l'organisme compense en adaptant le fonctionnement des organes à cet apport massif. Mais lorsque cet apport excédentaire est maintenu de manière chronique alors le contexte devient délétère pour les cellules et mène aux maladies métaboliques telles que le DT2 et l'obésité.

### H. Dérégulation multi-tissulaire du diabète de type 2

Le DT2 est une maladie métabolique qui se caractérise par un défaut du métabolisme glucidique. Ce dernier se traduit par une hyperglycémie à jeun et une intolérance au glucose. Ce défaut est essentiellement dû à une modification de la sécrétion et de l'action de l'insuline. L'installation du DT2 se fait en différentes étapes. Au stade pré-diabétique, la résistance à l'insuline s'installe, la glycémie est maintenue par une augmentation de la sécrétion d'insuline pour pallier le défaut d'action de l'insuline. Ce stade peut se maintenir sur plusieurs années et peut être traité par des mesures hygiéno-diététiques. Lorsque la glycémie continue à augmenter, que la glucagonémie augmente et que la production d'insuline commence à diminuer par insuffisance pancréatique, alors le diabète est déclaré. On envisage alors des traitements antidiabétiques (monothérapie dans un premier temps et plurithérapie dans un second temps, en cas d'échec thérapeutique). A des stades très avancés, les patients possèdent de très faibles taux d'insuline et on traite alors par insulinothérapie. Ainsi, la résistance à l'insuline semble être le précurseur majeur de l'installation d'un diabète. S'en suit alors une hyperglycémie importante et chronique qui a de graves conséquences sur les vaisseaux, les neurones, les cellules des îlots pancréatiques puis toutes les autres cellules. Chaque acteur tissulaire, cellulaire et moléculaire impliqué dans la régulation de la glycémie se trouve impacté et toutes ces altérations tissulaires contribuent à l'aggravation du diabète.

Le DT2 est souvent associé à une surcharge pondérale, localisée au niveau viscéral et à un syndrome métabolique. Or, aujourd'hui, on observe l'apparition d'une nouvelle population diabétique possédant un indice de masse corporel (IMC) normal, inférieur à 25 [300]. D'ailleurs, dans une étude clinique pakistanaise réalisée sur 300 patients ayant un diabète depuis environ 7 ans, 17% d'entre eux ne montrent pas de syndrome métabolique et de surcharge pondérale [301]. Ces patients sont souvent très jeunes (environ 30 ans) et de sexe masculin. Ils viennent de pays en voie de développement ou de minorités pauvres où la nutrition est souvent caractérisée par des aliments de mauvaises qualités nutritives (riche en sel, en sucre, en édulcorants, en acide gras saturés). Ces patients sont également caractérisés par une altération plus rapide de la fonctionnalité des cellules β. L'OMS a nommé ce type de maladie « diabète associé à la malnutrition » [302]. On considère deux types de diabètes non associés à l'obésité : diabète avec un IMC < 18 qui définit un état de maigreur importante (3,5% des patients DT2) ou diabète avec un IMC

entre 18 et 24,5 (13% des patients DT2). Le maintien de l'IMC sous 25 peut s'expliquer par le fait que ces patients sont décrits par une augmentation de la masse grasse au détriment de la masse musculaire maintenant le poids à un niveau normal. Les causes pouvant expliquer l'émergence d'un tel phénotype sont diverses et impliquent la génétique, l'immunité, et les facteurs environnementaux, les qualités nutritives des aliments pendant le développement fœtal.

### *1. La dérégulation de la balance hormonale insuline / glucagon : implication de la lipotoxicité, la glucotoxicité et l'inflammation à bas bruit*

L'altération de la sécrétion et de l'action de l'insuline et du glucagon s'effectue dans un contexte plasmatique particulier dont le rôle est déterminant : un contexte cytokinique particulier induit par une inflammation de bas bruit, une hyperglycémie et une hyperlipidémie.

#### *a) Les altérations de la sécrétion d'insuline : résister, lutter puis abdiquer*

Les altérations de sécrétions sont dues à un défaut de masse de cellules β et de leurs fonctions sécrétrices. Les défauts de sécrétion diffèrent suivant l'âge du diabète. En effet, au cours du stade prédiabétique s'installe la résistance périphérique à l'insuline, ce qui accroit la demande en insuline pour maintenir une glycémie stable. Pour lutter contre la résistance à l'insuline, le pancréas sécrète l'insuline en grande quantité et les cellules β prolifèrent, notamment sous l'impulsion du glucose plasmatique, dont la concentration est augmentée. Plus le diabète avance, plus la résistance à l'insuline augmente et les cellules β se fatiguent et deviennent incapables de répondre au besoin, menant à terme, à leur destruction et une insuffisance pancréatique. Ce stade se traduit donc par une insulinopénie, le DT2 est déclaré. Globalement, le diagnostic du DT2 est établit lorsque on observe une réduction de 50% du nombre de cellules β [303].

Au cours du stade prédiabétique, les cellules β prolifèrent et hyper-sécrètent l'insuline en réponse à l'hyperglycémie ambiante [304, 305]. Hormis l'effet du glucose, d'autres mécanismes sont responsables de cette hyper-sécrétion et de cette prolifération : l'augmentation de la concentration sanguine en acides gras libres, en l'insuline, en facteurs de croissance IGF1/2, ou encore en GLP-1 [304, 306, 307]. Les voies intracellulaires impliquées sont multiples. Les IGF, ou le GLP-1 agissent *via* la voie AMPc/CREB permettant l'expression de l'insuline. Elles activent d'autre part la PKA qui facilite la sécrétion d'insuline. Les deux hormones activent également l'AKT qui inhibe FOXO1 et permet ainsi l'expression de PDX1, facteur de transcription essentiel dans la production d'insuline mais également dans la prolifération et la survie des cellules β. AKT limite également l'apoptose par l'inhibition des protéines pro-apoptotiques [308]. De la même manière, les cellules β expriment de manière importante des récepteurs aux acides gras libres leur attribuant un effet proliératif [60, 309]. L'autre effet compensatoire est l'augmentation de la sécrétion

d'insuline. Elle peut se faire de différentes manières. Par exemple, l'augmentation du métabolisme intracellulaire du glucose et des acides gras libres [310, 311] permet l'augmentation intracellulaire de l'ATP qui active ensuite des canaux $K_{ATP}$ et donc la sécrétion de l'insuline. L'augmentation de la sécrétion d'insuline peut aussi s'expliquer par une plus forte activité parasympathique ou une baisse de l'activité sympathique [312, 313].

Une fois, la compensation β installée et stable, on peut alors observer une stabilité de la glycémie. Cependant, dans certains cas, les cellules β nouvellement formées et hyper-sécrétrices d'insuline sont plus sensibles au diabète. Après différenciation, elles développent une fonction altérée menant à leur destruction et une insuffisance pancréatique. Cette susceptibilité est d'origine diverse. Elle dépend de la génétique et des défauts acquis lors de la différenciation des nouvelles cellules β. Elle peut toucher les mécanismes de détoxification de la glucolipotoxicité, l'exocytose d'insuline, la fonction mitochondriale, la stabilité du RE, le métabolisme énergétique intracellulaire et impliquer aussi des modifications épigénétiques [314, 315]. Cette susceptibilité, associée aux contextes plasmatiques et intracellulaires particuliers (richesse en glucose et en lipides), à un stress inflammatoire, oxydatif ou du RE [315], induit à terme une perte de masse des cellules β par apoptose [316, 317].

La compréhension des mécanismes impliqués dans la mort des cellules β a été acquise grâce à l'étude sur différents modèles in vitro (cellules MIN6, INS1, …) et sur différents modèles de rongeurs. L'augmentation du métabolisme des nutriments et l'activité accrue de la chaine mitochondriale dans la cellule β mènent à une production d'ions superoxydes et d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Pour limiter la production d'ions superoxydes, la cellule β exprime la protéine découplante mitochondriale UCP2 (uncoupling protein 2) [318, 319]. En effet, cette protéine favorise le flux des protons à travers la membrane mitochondriale, limite leur accumulation dans la mitochondrie et donc leur disponibilité pour produire des ions superoxydes. Cependant, l'expression de cette protéine, en contrecarrant l'activité de la pompe ATP mitochondriale, empêche une production d'ATP suffisante. Cette perte de production d'ATP limite la sécrétion d'insuline et donc limite la réponse de la cellule β à l'hyperglycémie [318, 319]. Ainsi, la cellule β se protège contre le stress oxydant au détriment de la régulation de la glycémie. La cellule β possède d'autres moyens pour lutter contre les ions superoxydes, les enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathione péroxidase, ... Leur activité génère les ERO. D'ailleurs, il a été montré que la concentration des ERO est augmentée chez des rats diabétiques [320]. Ce stress oxydant intracellulaire active des voies apoptotiques détruisant les cellules β. En effet, les radicaux hydroxyles peuvent entrer dans le noyau et induire des mutations au niveau de l'ADN. Les ERO sont aussi capables de modifier des voies inflammatoires et pro-apoptotiques impliquant les kinases de stress c-Jun (JNK, c-Jun N-terminal kinases) et les facteurs de transcription c-Jun puis IKK (IκB kinase) / IκB (inhibitor of NF-κB et le facteur de transcription NF-κB (nuclear factor-κ B). Ces voies mènent à la baisse de l'expression de PDX-1 et à l'altération de la voie de

signalisation de l'insuline. Le promoteur du gène codant l'insuline est également sensible aux ERO [321]. D'autre part, on observe la création de protéines glyquées due à la réaction entre les résidus aminés des protéines et le sucre présent en excès. Ces produits sont connus pour être augmentés au cours du diabète. Ils peuvent activer des voies pro-inflammatoires et pro-apoptotiques impliquant le TNFα (tumor necrotic factor α), l'IL6, l'IL1β et aussi modifier l'activité du promoteur du gène codant l'insuline [321, 322]. Enfin, l'entrée continue de glucose dans la cellule β a aussi ses propres conséquences. Une exposition chronique au glucose mène à une perte de réponse au glucose. En effet, la cellule β devient insuffisante pour répondre au glucose notamment par la baisse de l'expression de l'insuline et de la production de granules de sécrétion par absence de renouvellement des granules de réserve [323].

Au cours du DT2, la résistance à l'insuline mène aussi à une dérégulation de la gestion des lipides dans l'organisme : on observe une augmentation de la lipolyse par le tissu adipeux et de la lipogenèse *de novo* par le foie. Ceci favorise l'augmentation des acides gras libres dans le sang. Les effets de l'hyperlipidémie ambiante sont multiples : formation des céramides cytotoxiques et augmentation du stress oxydatif induite par le catabolisme accru des acides gras, du stress inflammatoire ou du stress du RE [324]. De plus, certains acides gras libres circulants ont un effet négatif sur la production d'insuline induite par le glucose comme le palmitate, acide gras saturé [325, 326]. Les acides gras insaturés sont, quant à eux, protecteurs de l'hyperlipidémie et de l'hyperglycémie ambiante [326, 327]. Dans certains cas, on parle de glucolipotoxicité impliquant que l'hyperglycémie et l'hyperlipidémie aggravent leurs effets l'un l'autre. En effet, le catabolisme du glucose et la formation de malonyl-CoA inhibent l'activité CPT1 nécessaire à l'entrée des lipides dans la mitochondrie et à leur catabolisme. Ceci induit l'accumulation d'acides gras libres dans le cytoplasme. Pour se protéger, la cellule β peut stocker les acides gras libres sous forme de triglycérides ou alors modifier les acides gras saturés en acides gras insaturés afin de limiter la lipotoxicité de ces lipides [328, 329]. Ceci est permis par l'activation de l'AMPK qui active SREBP1c, facteur de transcription de la lipogenèse. Cependant, à terme, on observe une augmentation cytoplasmique de céramides et de DAG dans la cellule β. Ces deux molécules, produites à partir de triglycérides ou de palmitates (acides gras saturé) sont très cytotoxiques. De plus, les cellules β expriment beaucoup de récepteurs aux lipides comme le récepteur couplé aux protéines G, GPR40 (G-protein coupled receptor 40). Ce récepteur induit la baisse de l'activité de PDX-1, diminue l'expression d'insuline et active des voies pro-apoptotiques [324].

Enfin, le contexte cytokinique, associé à l'inflammation à bas bruit observée au cours des maladies métaboliques, se traduit par l'augmentation de l'IL6 et du TNFα circulants. Ces cytokines induisent des voies apoptotiques au niveau de la cellule β [324].

Le stress du RE est aussi un déterminant clé de la dysfonction de la cellule β. La forte demande de production en insuline due à l'exposition chronique aux nutriments et les

contextes lipidiques et cytokiniques mènent à un défaut du RE et la production de protéines mal conformées [324].

### *b) Les altérations de l'action de l'insuline : perturbations de la voie de signalisation*

#### *(1) Le tissu adipeux à l'origine de l'augmentation des acides gras libres plasmatiques et de l'inflammation systémique à bas bruit*

Lors d'une alimentation riche en graisse et en sucre, notre organisme, programmé génétiquement pour résister au jeûne et donc pour stocker, accumule ses nutriments en excès, à défaut de les cataboliser pour produire de l'énergie. Le tissu adipeux et le foie jouent un rôle primordial dans cette fonction. En effet, le glucose, par l'activation de ChREBP, ou le fructose, dont les voies d'induction restent à explorer, contribuent à la synthèse des lipides par le tissu adipeux et par le foie qui peut les libérer sous forme de VLDL [330]. Cette activation accrue de la lipogenèse dans le foie induit une accumulation de triglycérides dans les hépatocytes et donc à une stéatose hépatique. D'ailleurs, l'invalidation de ChREBP dans le foie serait protectrice de ce phénomène [155, 185]. Les VLDL ou alors les chylomicrons libérés par l'intestin en période postprandiale sont catabolisés par la lipoprotéine lipase (LPL) endothéliale qui permet la libération d'acides gras libres. Ces acides gras libres sont pris en charge par les adipocytes. Dans leur cytoplasme, les cellules du tissu adipeux possèdent un arsenal d'enzymes dont le but est de former à partir des acides gras libres, capturés du plasma, des gouttelettes de triglycérides. En période de jeûne, ces triglycérides peuvent être mobilisés et redistribués en périphérie pour fournir de l'énergie grâce à la lipase hormono-sensible activée par le glucagon [331]. Lorsque l'apport en nutriments est excessif, le tissu adipeux augmente en taille : on observe une augmentation de taille cellulaire ou hypertrophie et une augmentation du nombre de cellules ou hyperplasie notamment sous l'induction du facteur de transcription PPARγ [332]. Cette adaptation physiologique est un mécanisme de défense et de protection face à un excès de nutriments qui peut être délétère pour l'organisme. Cependant, au cours de l'obésité, on observe une baisse de l'expression de ChREBP ou de PPARγ dans le tissu adipeux altérant donc ses capacités de stockage sous forme de triglycérides [185, 333]. En absence de tissu adipeux, comme c'est le cas au cours des lipodystrophies, l'espérance de vie est limitée due aux dépôts ectopiques de lipides dans les tissus périphériques et de leur lipotoxicité [334].

Cette expansion du tissu adipeux peut être plus ou moins délétère suivant le tissu adipeux qu'il touche. Par exemple, l'expansion du tissu adipeux sous cutané riche en préadipocytes est moins délétère en comparaison à l'expansion du tissu adipeux viscéral proche des viscères impliqués dans la gestion du métabolisme énergétique [335]. L'expansion de ce dernier particulièrement mène à terme à des dysfonctions tissulaires se

traduisant par une baisse de la sensibilité à l'insuline, une augmentation de l'infiltrat immunitaire, de la fibrose, de l'hypoxie et une augmentation du flux d'acide gras libres intracellulaires et systémiques. La perte de sensibilité à l'insuline du tissu adipeux induit une perte de production de triglycérides dans l'adipocyte en période postprandiale et donc limite les capacités de stockage, pire on observe une activation accrue de la lipolyse [336]. De la même façon, on observe une augmentation de l'activité de la LPL participant à l'augmentation d'acides gras libres dans le milieu extracellulaire du tissu adipeux [337]. Cette mauvaise gestion est en partie à l'origine du contexte hyperlipidémique délétère. En effet, chaque cellule, pour se protéger, capture les acides gras libres et les conserve sous forme de triglycérides à défaut de les métaboliser. Elles deviennent alors un site de stockage des lipides, notamment les cellules musculaires, hépatiques, pancréatiques, cardiaques, comme observé au cours des lipodystrophies.

Dans un contexte physiologique, le tissu adipeux est infiltré principalement par des cellules immunitaires de type anti-inflammatoires : les lymphocytes T régulateurs et les macrophages de type M2 [338]. Ces cellules ont pour rôle de maintenir l'homéostasie du tissu en favorisant l'angiogenèse, le nettoyage des cellules apoptotiques et la régulation des sécrétions hormonales du tissu. Les cellules T régulatrices peuvent également améliorer la sensibilité du tissu à l'insuline en sécrétant de l'IL10 [339]. Lors d'une expansion trop importante du tissu adipeux, comme c'est le cas au cours de l'obésité, on observe une hypertrophie des adipocytes qui meurent ensuite par nécrose. Les cellules nécrotiques recrutent de nouvelles cellules immunitaires favorisant le nettoyage du tissu comme les macrophages de type M1, et des lymphocytes T cytotoxiques inflammatoires, et ceci au détriment des cellules immunitaires régulatrices [340]. De plus, les lymphocytes B recrutés sur le site inflammatoire sécrètent du TNF$\alpha$, activent les lymphocytes T cytotoxiques et produisent des immunoglobulines influençant la polarisation inflammatoire des macrophages. L'inflammation du tissu adipeux est amplifiée par l'activation de voies intracellulaires de stress sous l'induction des lipides et des cytokines. Cette inflammation chronique de bas bruit du tissu adipeux perdure tant qu'il augmente en taille et contribue à l'aggravation de la résistance à l'insuline au niveau du tissu. En effet, limiter cette inflammation contribue à améliorer la sensibilité à l'insuline [341].

#### *(2) L'altération de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline. Rôle de l'inflammation, de l'hyperlipidémie et de l'hyperglycémie*

Les acides gras libres libérés en excès et les cytokines produites par l'inflammation du tissu adipeux affectent l'activité des tissus périphériques et notamment ceux impliqués dans la gestion du glucose et des lipides. Ce contexte lipidique et cytokinique, les stress intracellulaires (RE, accumulation lipidique, stress oxydant, …) au niveau des cellules périphériques, notamment musculaires, hépatiques et adipeuses, modifient des voies inflammatoires pour répondre au stress ambiant. Ces voies sont multiples : on distingue par exemple, la voie pro-apoptotique JNK / facteur de transcription c-Jun, la voie de survie IKK

/ IκB / le facteur de transcription NF-κB ou encore la voie des protéines kinases R (PKR) [342, 343]. En effet, la délétion de JNK1, la délétion de IκB, inhibiteur de NF-κB ou encore la délétion de PKR dans des modèles de rongeurs diabétiques augmentent leur sensibilité à l'insuline et diminuent leur obésité et leur diabète [344-346]. Ces voies intracellulaires inactivent la voie de signalisation de l'insuline. En effet, JNK1 ou encore PKR phosphorylent les IRS sur des résidus sérine les rendant inactifs [345, 347]. De plus, l'activation des JNK et de IκB induit la production de TNFα et l'expression d'IL1β perturbant également la voie de signalisation du récepteur à l'insuline [348]. En effet, le TNFα, augmenté au niveau sanguin chez les personnes obèses et diabétiques, *via* son récepteur [348, 349], perturbe la voie de signalisation de l'insuline par la phosphorylation inhibitrice des sérines contenues dans les IRS [350]. Des rats obèses auxquels est injecté un anticorps anti-TNFα voient leur sécrétion d'insuline réduite et une meilleure capture périphérique de glucose montrant ainsi le rôle déterminant de la cytokine [351]. De la même façon, les souris invalidées pour le récepteur au TNFα ou pour le TNFα lui-même sont protégées des désordres métaboliques induits par un régime gras [352]. D'autre part, l'incubation d'adipocytes avec de l'IL1β réduit la capture de glucose induite par l'insuline et la translocation de GLUT4 par inhibition de IRS1 [353, 354]. Enfin, le rôle de l'IL6 pro-inflammatoire est controversé. L'IL6 est sécrétée par le tissu adipeux, le muscle et le foie et active la voie des MAPK. Au niveau du tissu adipeux, il diminue la capture de glucose par phosphorylation inhibitrice des IRS1 alors qu'au niveau du muscle, il semble favoriser l'oxydation des lipides et du glucose *via* la modulation de la voie AMPK [355, 356].

La lipotoxicité englobe différents phénomènes : l'activation par les acides gras libres circulants de voies intracellulaires pro-inflammatoires et cytotoxiques [343] ou alors leur catabolisme et la production de dérivés lipidiques néfastes pour la cellule tels que les ERO ou les céramides. Les acides gras libres circulants sont augmentés dans le cadre de l'obésité soit par enrichissement nutritionnel, soit par activation accrue de la LPL, soit par défaut de stockage du tissu adipeux. Lorsque les acides gras libres se trouvent au contact des cellules, notamment des cellules immunitaires, ils peuvent activer des voies pro-inflammatoires dépendantes de TLR4 [357]. D'ailleurs, les animaux invalidés pour TLR4 sont protégés de l'obésité et du diabète lorsqu'ils sont placés sous régime gras [343, 358]. L'activation du récepteur TLR4 mène à l'activation de IκB modifiant le profil transcriptionnel de la cellule. Ce profil transcriptionnel favorise la production de dérivés lipidiques tels que les céramides ou les DAG cytotoxiques et perturbateurs de la voie de signalisation à l'insuline [359, 360]. La voie de TLR4 activée par les lipides implique également la voie de stress JNK [361]. Les acides gras libres peuvent également activer l'inflammasome responsable de la production d'IL1β [362]. L'activation des voies de stress ou pro-inflammatoire est dépendante du type d'acide gras. En effet, les acides gras mono-insaturés semblent protecteurs. Des personnes atteintes de syndrome métabolique nourries avec une supplémentation en acides gras mono-insaturés voient leur sensibilité à l'insuline augmentée [362]. Le remplacement d'acides gras saturés par des acides gras mono-insaturés diminue la production d'IL1β et

diminue la résistance à l'insuline du tissu adipeux [362]. De plus, les acides gras poly-insaturés ont des effets anti-inflammatoires et insulino-sensibilisateurs comme par exemple l'acides docosahexaenoïque [363, 364]. L'effet des acides gras mono-insaturés peut également passer par des dépôts ectopiques différentiels des lipides. En effet, les acides gras saturés favorisent les dépôts au niveau du foie et du tissu adipeux alors que les acides gras mono-insaturés favorisent les dépôts dans les myocytes, sites cataboliques importants [365]. De plus, le niveau d'instauration des acides gras détermine la balance stockage / β-oxydation [366].

Les cellules périphériques, baignant dans cet environnement riche en lipides, peuvent 1) cataboliser à leur capacité maximum ces acides gras grâce à la β-oxydation ou alors 2) stocker sous forme de gouttelettes de triglycérides ces lipides lorsque le système de catabolisme est saturé. Le stockage des acides gras libres sous forme de gouttelettes est cytoprotecteur [367]. Ce phénomène est particulièrement observé au niveau des muscles, du pancréas, et même du foie qui dérivent vers une stéatose. Cependant, certains dérivés lipidiques, tels que le DAG ou les céramides, s'accumulent dans la cellule et influencent négativement la voie de signalisation à l'insuline. Lors de leur catabolisme, les triglycérides sont convertis en DAG qui activent la PKC phosphorylant des sérines de IRS1 [360]. Les céramides, quant à eux, sont particulièrement cytotoxiques et inhibiteurs d'AKT, kinase déterminante dans la voie de signalisation de l'insuline [368]. Enfin, le catabolisme excessif des acides gras libres, comme décrit précédemment, induit la production d'ERO, génère un stress mitochondrial et entraine l'activation de voies de stress et d'apoptose [369].

Ainsi, les acides gras libres sont toxiques de par la production de dérivés lipidiques cytotoxiques, de par la perturbation de la voie de signalisation à l'insuline mais aussi de par l'activation de voies pro-inflammatoires nuisant à la sensibilité à l'insuline et favorisant l'inflammation à bas bruit. Le niveau d'insaturation des lipides semble critique pour ces phénomènes. Aujourd'hui notre nutrition en lipides est détériorée au niveau quantitatif comme au niveau qualitatif avec une balance d'acide gras saturés / insaturés augmentée et néfaste. Ceci pourrait expliquer l'apparition des nouveaux DT2 non associés à l'obésité.

#### *c) Défaut de sécrétion et d'action du glucagon*

Depuis maintenant 40 ans, on associe au diabète une altération bi-hormonale se traduisant par une altération de la balance insuline / glucagon et un rôle important du glucagon dans le développement de la maladie [370]. Dans les modèles de rongeurs diabétiques et chez les patients, la concentration de glucagon, hormone du jeûne, est augmentée au niveau plasmatique, en période de jeûne comme en période postprandiale. Cette augmentation est associée aux dérégulations du métabolisme glucidique notamment au niveau du foie, du rein, du pancréas et du tissu adipeux, organes cibles du glucagon [371-374]. Au cours du diabète, la résistance à l'insuline empêche l'insuline de contrecarrer l'effet du glucagon et aggrave l'hyper-glucagonémie [375]. De la même manière, l'hyper-glucagonémie observée en période postprandiale montre que la cellules α

ne répond plus au glucose [376, 377]. Une ouverture constitutive du canal $K_{ATP}$ en serait à l'origine [377]. Le traitement à l'insuline suffit à restaurer cette réponse [378]. Certains patients développent une hyper-glucagonémie pathologique due à une tumeur touchant les cellules α pancréatiques et sont caractérisés par une hyperglycémie et un diabète [379]. L'importance du glucagon et de son action dans la physiopathologie du DT2 a été permise par l'étude des souris invalidées pour le récepteur au glucagon, mises sous régime gras ou alors traitées à la streptozotocine. Ces souris sont tolérantes au glucose, ne montrent pas de résistance à l'insuline et sont résistantes au développement du diabète [138, 375].

En plus de montrer une hyperglucagonémie, le DT2 se caractérise par des modulations d'expressions du récepteur au glucagon. Certaines études rapportent une augmentation de son expression sous l'induction de l'hyperglycémie [380] qui pourrait s'expliquer par le fait que le glucose régule la transcription du gène codant le glucagon [381, 382]. Cependant, d'autre études montrent qu'une exposition trop importante aux lipides ou même au glucagon induit une désensibilisation au glucagon par internalisation et protéolyse du récepteur [383, 384]. Ces effets différentiels restent encore à éclaircir. Il est possible que cette différence d'expression s'explique par la durée du diabète. En effet, la réduction du récepteur pourrait, dans un premier temps, protéger de l'hyper-glucagonémie ambiante et à long terme cette protection ne serait plus aussi efficace.

Ainsi, le diabète est plutôt caractérisé par un défaut de pancréas endocrine se traduisant par une altération de la balance insuline / glucagon et de l'action des deux hormones. Ceci engendre sur leurs organes cibles des défauts synergiques multipliant les défauts de gestion de leur métabolisme glucidique et lipidique.

#### *d) La résistance à l'insuline des organes périphériques tels que le foie, le muscle, le tissu adipeux, le pancréas et le système nerveux central mène à l'aggravation du diabète*

La résistance à l'insuline et l'hypersécrétion de glucagon influencent de façon délétère les organes impliqués dans la gestion de la glycémie comme le muscle, le foie, le tissu adipeux ou encore le SNC et le pancréas. Le gain de connaissance sur les dérégulations glycémiques associées au diabète a été permis par l'invalidation du récepteur à l'insuline de manière tissu spécifique, par l'invalidation des protéines impliquées dans sa cascade de signalisation chez la souris, ou par l'étude des modèles de rongeurs diabétiques (nutritionnels, génétiques ou pharmacologiques). Pour les études *in vitro*, les invalidations génétiques ou la mise en place d'un contexte nutritionnel enrichi en glucose et en lipides et parfois en cytokines ont permis également de mettre en évidence les mécanismes cellulaires impliqués.

Les souris invalidées de façon globale pour le récepteur à l'insuline décèdent d'acidose cétogénique 72h après leur naissance [69, 385]. Les souris invalidées de manière homozygote, pour IRS1, sont particulièrement intolérantes au glucose [71, 386] et, pour IRS2, développent un diabète dû à un défaut de développement des cellules β [72]. Les

souris doublement invalidées de manière hétérozygote pour le récepteur à l'insuline et IRS1 sont résistantes à l'insuline et 50% développent un diabète [387]. Bien que la délétion de AKT1 ait des effets modestes sur la glycémie [74], la délétion globale d'AKT2 induit une résistance à l'insuline [75]. Ainsi une altération globale de la voie de signalisation à l'insuline mène à une altération du métabolisme glucidique comparable au diabète. Mais quels sont les organes responsables ? Quels sont les dérèglements dans chacun d'eux ?

Pour le foie, l'étude du modèle LIRKO - souris ayant une invalidation inductible du récepteur à l'insuline dans le foie - montre une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline, un hyperinsulinisme se traduisant par une absence de baisse de la glycémie induite par l'insuline. Ceci est induit par une production incontrôlée de glucose par le foie qui se traduit par une augmentation de l'expression de la PEPCK, G6P et une baisse de la GK. On observe une forte atteinte hépatique : une stéatose, la présence de nodules cancéreux ou l'augmentation des transaminases [95]. Pour les muscles, le modèle MIRKO correspond à l'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau musculaire. Cependant, ce modèle n'est ni intolérant au glucose ni intolérant à l'insuline bien qu'il présente une hypertriglycéridémie et une augmentation du poids. En réalité, la capture de glucose est compensée au niveau du tissu adipeux, les souris deviennent obèses par lipogenèse et adipogenèse accrues et possèdent une altération du métabolisme lipidique [388]. D'autre part, les souris invalidées pour le récepteur à l'IGF1 au niveau musculaire deviennent diabétiques [389] ; ainsi, ce récepteur, dont l'activation peut être induite par l'insuline, pourrait compenser le défaut du récepteur à l'insuline au niveau musculaire chez les MIRKO. Bien que le récepteur à l'insuline au niveau musculaire ne soit pas primordial, la délétion de GLUT4 au niveau du muscle engendre une forte résistance à l'insuline et une intolérance au glucose [390] montrant l'importance de la capture de glucose par les muscles. Enfin, l'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau du tissu adipeux protège de la résistance à l'insuline, de l'intolérance au glucose et de l'obésité *via* une diminution de l'hypertrophie et une baisse de la lipogenèse [391]. Une altération de la voie de l'insuline uniquement au niveau du tissu adipeux serait donc plutôt protectrice. Ceci semble plutôt contradictoire avec ce que l'on observe au cours des maladies métaboliques. Dans ce cadre physiopathologique, l'ensemble des tissus métaboliques est résistant à l'insuline et pas uniquement le tissu adipeux. Ainsi, la résistance périphérique globale à l'insuline serait aggravante d'autant plus qu'elle est associée à un contexte plasmatique délétère (hyperglycémie, hyperlipidémie et inflammation). L'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau de la cellule β mène à une intolérance au glucose, une hyperglycémie due à un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose associée à une baisse du nombre de cellules β, une baisse de l'expression de GLUT2 et de la GK [392]. La diminution de l'expression du récepteur à l'insuline au niveau des neurones de type AgRP localisés dans le noyau ARC modifie le métabolisme glucidique en altérant la production hépatique de glucose et la capture musculaire [227, 228]. L'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau

du VMH génère une importante intolérance au glucose par altération de la fonction endocrine du pancréas sans augmentation de poids [227].

L'ensemble de ces études révèle que 1) la résistance à l'insuline du tissu adipeux n'est pas suffisante pour générer un diabète, il faut un contexte aggravant tel que l'inflammation, ou une augmentation de la concentration plasmatique en glucose et en lipides 2) perturber la voie de l'insuline au niveau du foie, du pancréas, du muscle et du SNC est suffisante pour générer un diabète. L'altération multi-tissulaire de la voie de signalisation de l'insuline modifie l'activité du foie, qui produit alors plus de glucose ; l'activité du muscle qui capture moins de sucre ; l'activité du pancréas qui ne sécrète plus correctement l'insuline et le glucagon et l'activité du SNC qui n'arrive plus à répondre au contexte hyperglycémique. Ces altérations à terme mènent à l'aggravation de la résistance à l'insuline et du diabète. Cette résistance à l'insuline s'accompagne d'une hyper-glucagonémie aggravant le phénotype de tous les organes impliqués dans le métabolisme glucidique.

### *2. Altération du système nerveux : problème de détection du glucose et neuropathie diabétique*

#### *a) La neuropathie diabétique*

De manière globale, la neuropathie est une maladie touchant les neurones et les nerfs. Elle est caractéristique des types de neurones ou des nerfs qu'elle touche. Elle peut avoir plusieurs origines : induite par une chimiothérapie, l'alcoolisme ou encore l'infection du VIH. Encore aujourd'hui, cette atteinte nerveuse est mal diagnostiquée et mal prise en charge. Les patients atteints sont diagnostiqués trop tard, lorsque la maladie est avancée et montre ses premiers symptômes. La prévalence dans la population générale est estimée à 9-10%. Dans le cadre du diabète, plus de la moitié des patients sont atteints de neuropathie. Pour 70% des patients diabétiques, la neuropathie est polyneuronale : elle touche tous le SNA (parasympatique, orthosympatique et entérique) mais également le système nerveux moteur. Elle touche préférentiellement les fibres sensitives dans 39% des cas et affecte surtout les axones plutôt que les corps neuronaux [393]. Elle se caractérise par une atrophie axonale, une démyélinisation, une baisse de la capacité régénérative, une inflammation nerveuse et une perte quantitative des innervations distales, en périphérie. Ceci génère une mauvaise conduction et une perte d'amplitude des signaux nerveux. Elle est induite par différents mécanismes : la microangiopathie et l'ischémie induite, la production de protéines glyquées, le stress oxydant, un défaut d'action des facteurs neurotrophiques, les flux de polyols [394, 395]. Le gain de connaissance sur la mise en place de la neuropathie a été permis par l'utilisation de modèle de rongeurs diabétiques tels que les rongeurs traités à streptozotocine, les rats Zucker ou les souris db/db et ob/ob.

La microangiopathie caractérise l'altération des capillaires sanguins intra-nerf et elle est décrite par différentes altérations : un épaississement de la membrane basale des

vaisseaux, la fermeture des capillaires, des microtromboses, la prolifération des cellules musculaires lisses et une dégénérescence des péricytes. La diminution du diamètre des vaisseaux et l'épaississement de la membrane basale sont très précoces dès l'installation d'une intolérance au glucose. A terme, ces modifications vasculaires sont responsables de l'ischémie du nerf [396-399]. Ces altérations ont plusieurs origines : un défaut de libération endothéliale du NO et l'absence de vasodilatation, le stress oxydatif ou les altérations générées par le flux de polyols. Le NO produit se trouve complexé à des protéines glyquées limitant alors sa disponibilité et donc son pouvoir vasodilatateur [400, 401]. Les vaisseaux intra-nerfs sont également plus sensibles à certains vaso-constricteurs comme l'endothéline [402, 403]. De la même façon, la viscosité du sang est augmentée due à la déformation des hématies induite par l'hémoglobine glyquée – hémoglobine ayant fixé de manière covalente des molécules de glucose – et l'augmentation de l'agrégation plaquettaire. Tous ces mécanismes limitent l'apport en $O_2$ des neurones [404].

L'accumulation de polyols dans les nerfs, tel que le sorbitol, est due à une activité importante de l'aldose réductase exprimée dans les cellules gliales. Le flux de polyols engendre d'une part des dommages au niveau des cellules gliales et donc de la fonction axonale et neuronale ; et d'autre part, au niveau des neurones où il augmente l'activité de la PKC modifiant l'activité de la pompe $Na^+/K^+$. La PKC augmente l'entrée de $Na^+$ dans l'axone modifiant à long terme le potentiel de membrane et donc l'activité des canaux ioniques. L'ensemble de ces altérations ralentit l'influx nerveux [405-407] . Le niveau d'expression des canaux ioniques puis la conductivité des neurones peut être aussi modifiée par les protéines glycosylées ou l'inflammation à bas bruit [408-410]. A terme, les polyols induisent également une neuro-dégénération mais les mécanismes restent à éclaircir.

Le stress oxydant est délétère pour les neurones et les cellules gliales. Les produits glycosylés et le flux de polyols sont à l'origine de ce stress [411]. Comme pour les défauts observés dans les tissus périphériques, on observe la mise en place d'un stress oxydant important induit par 1) le catabolisme du glucose et la production de radicaux hydroxyles, d'ions hyperoxydes pouvant se complexer entre eux ou aux lipides ; et par 2) l'inhibition des protéines détoxifiantes par les protéines glyquées ou même le flux de polyols. De la même manière, on observe un stress nitrergique important. Le NO se complexe à des protéines possédant un groupement thiol, l'ADN ou même l'oxygène, très cytotoxiques. La NO synthase (NOS) possède une activité augmentée, afin d'augmenter la disponibilité du NO nécessaire à la vasodilatation, au niveau des ganglions et des neurones diabétiques. Cependant, cette production compensatrice s'accompagne de l'augmentation de la nitrotyrosine cytotoxique [411, 412].

Bien que les défauts vasculaires et de conductions apparaissent très précocement, la neuro-dégénération diabétique est très tardive chez l'animal comme chez l'homme. Chez le rat traité à la streptozotocine, elle apparaît après douze mois de traitement. On observe alors un réduction de 20% des neurones sensitifs du ganglion spinal dorsal sympathique [413]. Avant cela, le nombre de neurones et d'axones est conservé. Cependant, les

phénomènes apoptotiques apparaissent précocement [414] mais ils sont compensés par les phénomènes neurogénératifs. Après 12 mois, la surface et le volume du ganglion, le nombre de neurones par ganglion, la taille et le volume des neurones sont réduits. Au niveau des fibres, on observe une diminution de l'épaisseur de la gaine de myéline et du diamètre des axones et du nerf.

Lorsque le diabète s'installe, les neurones modifient leur profil d'expression pour répondre au stress. Ils expriment rapidement des marqueurs de stress et d'apoptose : la protéine de stress HSP-27 (heat shock proteins 27), la caspase 3 pro-apoptotique ou la protéine de détection d'altération de l'ADN PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) [414, 415]. D'autre part, on observe également une modification de l'expression et de l'état de phosphorylation des neurofilaments engendrant des modifications du cytosquelette du neurone et de l'axone, de leur conductivité et à terme la neurodégénération [416-419]. On observe également une modification de l'expression des récepteurs neurotrophiques et de leurs voies de signalisation (récepteurs au NGF (neuronal growth factor), à l'insuline partageant la voie de signalisation du NGF, des IGF, du GLP-1, …) contribuant à terme à la perte des capacités régénératives [420-422]. La neuro-dégénération est aggravée et ressentie lorsque la perte des capacités régénératives est présente [423].

La neuropathie détériore de manière importante la qualité de vie et touche l'ensemble de l'organisme. En effet, la neuropathie affecte de nombreux organes : le tube digestif, le système cardiovasculaire, le système génito-urinaire, l'appareil locomoteur. Les symptômes associés à la neuropathie autonome diabétique sont multiples : une altération du transit et de la vidange gastrique (diarrhée, constipation, *gastroparesis*, nausée, incontinence…), des défauts cardiovasculaires (tachycardie responsable dans de nombreux cas du décès [424], hypotension orthostatique, problème d'érection, …), défaut de régulation de la glycémie, sudation non contrôlée, défauts urinaires et sexuels, hypersensibilité (la marche devient douloureuse, intolérance à l'exercice) ou une hyposensibilité, perte des réflexes moteurs et de la posture, malaise hypotensif orthostatique, défauts hormonaux, …

La neuropathie diabétique participe également à l'aggravation de la maladie et de l'altération du métabolisme glucidique : la *gastroparesis* (entrée continue, lente et non régulée des nutriments dans le duodénum), des problèmes de transit et d'absorption de glucose, la perte de détection des nutriments par l'axe nerveux périphérie-cerveau et du glucose au niveau intestinal, l'aggravation des altérations du métabolisme par perte du contrôle central.

#### *b) La détection du glucose altérée au niveau central*

Au cours de l'obésité et du diabète, une inflammation à bas bruit s'installe. Par les mêmes mécanismes qu'en périphérie, elle altère des fonctions au niveau neuronal et central en activant des voies inflammatoires notamment la voie IKK/IκB/NF-κB [425]. Le TNFα semble également jouer un rôle déterminant dans l'inflammation hypothalamique et les

dérégulation périphériques associées au DT2 [426]. De la même manière, sous l'induction des acides gras libres saturés, les cellules gliales, particulièrement la microglie (macrophages du SNC), s'enflamment et transmettent des messages de stress aux neurones hypothalamiques [427]. De plus, l'ingestion d'un régime gras altère la fonction des neurones du noyau ARC en augmentant les transmissions nerveuses inhibitrices entre les neurones POMC et NPY, en diminuant le nombre de synapses et en activant l'inflammation de la microglie qui affecte l'intégrité de la BHE [428]. Enfin, le stress du RE dans les neurones semble aussi jouer un rôle déterminant dans la dysfonction neuronale : il dérégule l'homéostasie calcique, engendre un stress oxydatif, active des voies inflammatoires et produit des molécules cytotoxiques [429].

L'inflammation et le stress des neurones hypothalamiques ont une influence sur les fonctions périphériques. En effet, le stress du RE, la voie IKK/IκB/NF-κB ou encore le TNFα, au niveau hypothalamique, engendrent une sur-activation sympathique responsable d'une dérégulation de la fonction cardiovasculaire (augmentation de la pression sanguine) et des fonctions métaboliques (sensibilité à l'insuline, néoglucogenèse hépatique, …) [430, 431]. L'inhibition de la voie IKK/IκB/NF-κB au niveau de l'ARC ou l'inhibition des récepteurs adrénergiques au niveau périphérique améliore l'intolérance au glucose induite par un régime gras [431]. De plus, cette sur-activation sympathique induite par l'inflammation est responsable de la perte de la première phase de sécrétion de l'insuline, la sympathectomie étant suffisante pour stopper cette altération [190]. Des travaux ont montré que l'apeline, sécrétée entre autres par le tissu adipeux et augmentée au cours du diabète [432], *via* la production d'ERO et l'activation de NF-κB au niveau central, induit en périphérie des dérégulations comparables à l'obésité et au diabète, comme l'augmentation de la production hépatique de glucose, l'hyperinsulinisme ou la résistance à l'insuline. L'inhibition de la production des ERO est nécessaire pour diminuer les altérations métaboliques [433]. L'inflammation et le stress neuronal au niveau hypothalamique peuvent être également induits par un défaut autophagique [434]. Comme en périphérie, l'activation de TLR4 par les lipides induit une inflammation hypothalamique et des défauts métaboliques en périphérie tandis que son inhibition limite la surnutrition menant à l'obésité et la résistance à l'insuline [435]. Enfin, les souris IRS2 déficientes, diabétiques, montrent une inflammation hypothalamique et une altération des fonctions métaboliques de l'insuline en périphérie. De la même manière, l'invalidation du récepteur à l'insuline au niveau du VMH et de l'ARC dérégule la fonction endocrine du pancréas et la fonction néoglucogénique du foie [227, 228]. Ces dernières études mettent en évidence qu'hormis le stress nutritionnel, la résistance à l'insuline est suffisante pour générer un stress, une inflammation hypothalamique et des dérégulations périphériques [436].

Finalement, l'inflammation du SNC induite par une nutrition déséquilibrée modifie la morphologie du noyau ARC, induit une augmentation du nombre d'astrocytes et une augmentation de la couverture gliale par neurones mais également l'augmentation de l'expression des transporteurs au glucose, GLUT et au lactate, MCT [437]. Ces effets

seraient responsables de défauts en périphérie comme l'augmentation de la masse de tissu adipeux et de la prise alimentaire [438].

### *3. Tube digestif et rein : augmentation de l'absorption et de la production du glucose*

L'enrichissement en sucre de l'alimentation et dans le sang induit l'augmentation de l'expression des transporteurs au glucose (SGLT, GLUT) au niveau des épithéliums intestinaux et rénaux.

Au niveau intestinal, l'expression de SGLT1 est augmentée lorsque le régime est enrichi en sucre [264]. Les souris KO pour la protéine RS1, impliquée dans les mécanismes d'endocytose et d'exocytose régulateurs de l'activité de SGLT1, développent une obésité associée à une hyperphagie et une augmentation du transport intestinal de glucose [271]. L'ARNm de GLUT5 et l'absorption du fructose augmentent sous régime enrichi en fructose [264]. Enfin, la présence de glucose luminal augmente également l'expression de GLUT2 et son activité [264, 439]. Or, le fructose, tout comme le glucose, est délétère puisqu'en excès, ils deviennent des substrats clés de la lipogenèse et participent donc à l'aggravation du contexte lipidique. Ainsi, seul l'enrichissement en sucre d'un régime alimentaire est suffisant pour augmenter l'absorption du glucose. Chez des rats diabétiques, l'absorption du glucose est augmentée dans l'intestin grêle car SGLT1 et GLUT2 sont plus exprimés et plus actifs. De plus, cette augmentation d'expression touche à la fois le duodénum mais également les parties plus distales de l'intestin : le jéjunum et l'iléon [440, 441]. Chez l'homme diabétique, au niveau de l'intestin grêle, on observe une augmentation protéique de SGLT1 et des GLUT et une augmentation de l'ARNm codant GLUT2, SGLT1 et GLUT5 [270]. Il a été également observé une hyperplasie mucosale avec une augmentation du nombre d'entérocytes matures augmentant ainsi la surface d'absorption des nutriments [442, 443]. De la même manière, il a été observé une augmentation de la perméabilité intestinale au cours du diabète, favorisant le transport transépithélial du glucose et à terme la détérioration de la tolérance orale au glucose [444].

Comme au niveau du foie, la néoglucogenèse intestinale est dérégulée au cours du diabète. Chez des rats rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine, l'expression de la G6P intestinale est augmentée de 6 à 8 fois et l'activité de 300 fois [285].

Au niveau du rein d'animaux ou de patients diabétiques, la réabsorption du glucose est augmentée : les transporteurs SGLT et GLUT sont plus exprimés et plus efficaces [293, 445, 446] notamment sous l'induction de l'hyperglycémie, des voies intracellulaires dépendantes des ERO ou de NFκB. La quantité de glucose réabsorbée est dépendante de la capacité maximale de réabsorption du rein dépendante elle-même de la saturation des transporteurs au glucose. Cette capacité maximale est augmentée au niveau du rein diabétique (350mg/min versus 420mg/min) [447] notamment parce que le nombre de transporteur et leur activité sont augmentés. Bien que cette capacité soit augmentée, cela ne permet pas de réabsorber tout le glucose filtré, le sucre se retrouve dans les urines.

Chez des animaux ou des patients diabétiques, il y a aussi une augmentation du glucose libéré par le rein en période de jeûne, notamment due à l'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes impliquées dans la néoglucogenèse (G6P, PEPCK, …) [448, 449]. On estime que la néoglucogenèse hépatique augmente de 30% alors que celle du rein augmente de 300% [450]. La néoglucogenèse rénale est régulée par l'insuline ou encore les catécholamines mais pas par le glucagon [299]. Ainsi, les causes de l'augmentation de la néoglucogenèse rénale sont multiples : la résistance à l'insuline, l'augmentation des acides gras libres stimulant les voies néoglucogéniques (expression de gènes) mais aussi l'augmentation des substrats néoglucogéniques [451].

### *4. Conclusion*

Le DT2 est induit de manière nutritionnelle. Depuis, plusieurs années on l'associait à une obésité viscérale. Aujourd'hui, nous voyons apparaître une nouvelle forme de DT2 non associé à l'obésité. La qualité des acides gras et la localisation du tissu adipeux sont deux éléments clés dans le développement de la pathologie métabolique. Les acides gras saturés semblent être à l'origine des processus inflammatoires et des stress intracellulaires altérant la voie de signalisation à l'insuline au niveau des tissus. Ce défaut d'action de l'insuline affecte le tissu adipeux en modifiant la gestion de la lipolyse. Ceci engendre une hyperlipidémie importante et néfaste. De la même manière, le foie, le muscle, le SNC sont touchés aussi par le défaut d'action de l'insuline et participent alors à l'augmentation de la glycémie. Comme le foie, le rein et l'intestin produisent plus de glucose par néoglucogenèse mais sont aussi capables d'en absorber plus. Le contexte hyperglycémique s'installe. Le défaut d'action de l'insuline est aggravé par l'augmentation de la sécrétion de glucagon. La cellule β essaie de pallier ces défauts en augmentant la sécrétion d'insuline. D'autre part, le contexte hyperlipidémique et hyperglycémique associés au stress inflammatoire généré par le tissu adipeux et à terme par les autres tissus détériore les réponses cellulaires : induction de voies inflammatoires et de stress ; stress oxydatif, mitochondrial et du RE. Ces altérations mènent à l'apoptose des cellules notamment des cellules β responsable de l'insulinopénie et de l'insuffisance pancréatique mais aussi l'apoptose des cellules nerveuses responsable de la neuropathie. La neuropathie à son tour participe à l'aggravation de l'état diabétique en limitant la communication périphérie-intestin-périphérie, mais aussi en étant responsable des défauts cardiovasculaires.

# VI. Chapitre 3 : L'intestin et les incrétines

Au cours des deux premiers chapitres, nous avons vu que la cellule nécessite, pour vivre, du glucose afin de produire de l'énergie et se reproduire. En passant d'une cellule unique aux organismes pluricellulaires, des systèmes se sont mis en place afin de réguler le taux de glucose à proximité de chaque cellule : un liquide de transport (le sang), des systèmes hormonaux de régulation (insuline et glucagon) et des espaces de stockage (foie, muscle, tissu adipeux). La glycémie est donc un paramètre où différents organes, différents acteurs moléculaires, nutritionnels ou hormonaux entrent en jeu. Le dérèglement de certains d'entre eux peut engendrer de graves conséquences et générer les maladies métaboliques telles que le DT2. Le tube digestif, allant de la bouche à l'anus, est le seul organe permettant l'entrée des nutriments d'origine exogène. Etant en contact avec l'extérieur, il constitue un organe tissulaire hautement diversifié : il peut détecter des stimuli grâce aux neurones et aux cellules endocrines, se protéger grâce au système immunitaire, et tirer le maximum de l'énergie contenu dans l'alimentation grâce à une symbiose avec une population microbienne. Pour son unicité sur l'apport d'énergie exogène, par ces différentes fonctions absorptives, sensitives ou immunitaires, son implication dans la régulation du métabolisme énergétique et dans les pathologies associées est non négligeable.

De plus d'un point de vue ancestral, l'intestin est l'organe qui a été mis en place en premier pour faciliter et optimiser l'apport en nutriments. D'ailleurs, l'ensemble des organes se sont développés à proximité de ce dernier : les systèmes nerveux, le squelette, le système circulatoire et respiratoire. Au fil de l'évolution, l'appareil digestif s'est compartimenté puis complexifié. Chez les Vertébrés, on distingue l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le côlon. Ces différentes parties peuvent varier suivant le type d'organisme : herbivore, carnivore, et omnivore. Chez l'homme et chez les rongeurs, l'intestin grêle est subdivisé en différentes parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. L'intestin est le lieu de réception et d'absorption des aliments digérés par l'estomac.

## A. L'intestin, glande neuroendocrine

### *1. Introduction*

L'intestin est l'un des organes les plus primitifs mais aussi l'un des plus diversifiés d'un point de vue cellulaire. Il contient des cellules épithéliales, des cellules endocrines, des cellules immunitaires, des cellules musculaires, des cellules nerveuses et même des cellules procaryotes. Très longtemps, il a été attribué à l'intestin un rôle primaire d'absorption des nutriments. En fait il s'agit d'une véritable machinerie (**Figure 6**) :

- Au contact du milieu extérieur, il est non stérile. Il possède donc plusieurs lignes de défense : un épithélium plus ou moins hermétique, étanche, un mucus protecteur, des cellules de l'immunité innée et acquise organisées en organes lymphoïdes

secondaires, présentes dans la *lamina propria* sous-jacente à l'épithélium ou insérées dans l'épithélium.

- Il est colonisé par des bactéries en relation de symbiose avec l'hôte, le microbiote : par sa nutrition, l'hôte lui apporte les substrats essentiels qu'il métabolise en molécules nécessaires à l'hôte. L'intestin constitue également un lieu protégé regroupant des conditions optimales pour la survie et la prolifération microbienne.
- Par son rôle d'absorption des nutriments, il est capable de communiquer avec le reste de l'organisme pour le préparer à une arrivée massive d'éléments nutritifs. Pour cela, il possède un système endocrinien, des innervations sympathiques et parasympathiques lui permettant de communiquer avec le cerveau et un système nerveux qui lui est propre, le SNE.
- Un système musculaire pour faciliter l'absorption et l'élimination des déchets qui est contrôlé par les innervations de l'intestin.
- Une vascularisation très dense à la fois sanguine et lymphatique pour permettre le drainage des nutriments, des cellules immunitaires ou des hormones.

La détection de l'état du tissu (inflammation, état nourri-à jeun, douleurs, …) est dépendante de trois systèmes : les neurones afférents, les cellules entéro-endocrine et le système immunitaire. Par ces trois éléments, l'intestin communique au reste de l'organisme les informations essentielles sur son état physiologique. Il a été démontré que ce réseau cellulaire informatif était le plus dense de l'organisme [452] : il contient 20% de neurones afférents (sensitifs) ($10^8$ neurones intrinsèques, qui lui sont propres et 50 000 neurones extrinsèques, qui lui sont extérieurs), il sécrète une vingtaine de neuro-hormones par l'intermédiaire de milliers de cellules entéro-endocrines et il est protégé par 70-80% des cellules immunitaires contenues dans le corps humain.

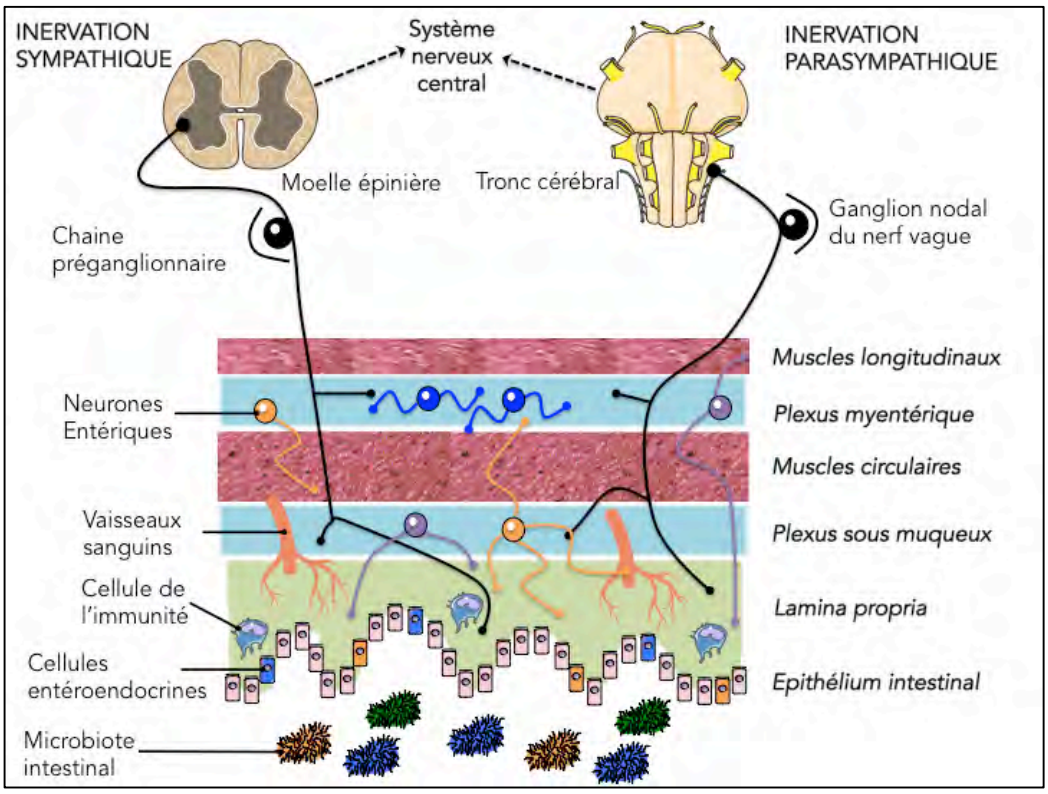



Figure 6 : Structure de la paroi intestinale, une diversité cellulaire.

### 2. *Le système épithélial et entéro-endocrinien*

#### *a) L'épithélium intestinal : fonction d'absorption et d'étanchéité*

Pour séparer le milieu extérieur du milieu intérieur, l'intestin dispose d'un épithélium monocouche et polarisé avec un pôle apical riche en microvillosités au contact du lumen et un pôle basal au contact du milieu intérieur. Il participe d'une part, à l'absorption des nutriments, des électrolytes et de l'eau et puis d'autre part, il garantit l'étanchéité du milieu intérieur vis à vis du milieu extérieur contenant des antigènes ou des xénobiotiques provenant des aliments ou des micro-organismes et de leurs métabolites. Pour assurer ces deux fonctions, les cellules épithéliales sont liées entre elles par des jonctions plus ou moins lâches et perméables, les jonctions serrées. L'absorption des nutriments se fait de manière transcellulaire (à travers la cellule) ou paracellulaire/transépithéliale (entre les cellules). Le transport transcellulaire implique que les cellules épithéliales possèdent des transporteurs spécifiques au glucose et aux autres sucres simples, aux différents lipides (acides gras, stérols, …), aux acides gras à chaîne courte (AGCC) - produits par la fermentation bactérienne, aux peptides et aux acides aminés, aux vitamines ou aux électrolytes, au niveau apical et basal. L'absorption de ces molécules est différentielle suivant l'axe bouche-anus. Comme vu précédemment, les sucres sont absorbés principalement au niveau du duodénum. Le glucose et le galactose sont absorbés essentiellement au niveau du duodénum et au début de jéjunum grâce au complexe SGLT1/GLUT2 et le fructose grâce au complexe GLUT5/GLUT2 [453]. Les électrolytes sont absorbés tout le long du tractus digestif *via* le canal à $Na^+$, ENaC, la pompe $Na^+/K^+$ ou encore le canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Les AGCC, *via* MCT ou SMCT (sodium monocarboxylate transporter, couplage avec du $Na^+$) sont absorbés principalement au niveau du côlon [454, 455]. Les acides gras libres et le cholestérol sont absorbés principalement au niveau du jéjunum par respectivement les transporteurs de type FATP, FABP, CD36, … et les transporteurs NPC1/L1 (Niemann–Pick C1-like 1), certains ABC (ATP binding cassette) et sont libéré par exocytose au pôle basal sous forme de chylomicrons [456-459]. Les acides aminés sont absorbés principalement au niveau du duodénum par différents transporteurs, suivant leur état ionique, en symport, en antiport avec le $Na^+$ ou le $Cl^-$; ou en uniport [460]. En plus d'être absorbés, ces nutriments peuvent également activer des protéines senseur localisées au niveau du pôle apical. Ils stimulent ainsi des voies de signalisations intracellulaires. Lorsqu'ils ciblent des cellules entéro-endocrine (CEE), ils induisent la sécrétion d'hormones. Cet aspect sera décrit par la suite.

Les nutriments peuvent aussi être absorbés de manière paracellulaire ou transépithéliale, ce transport est dépendant de l'activité des protéines d'adhérences dont les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions serrées (occludine, claudine, ZO-1). L'activité de ces jonctions garantit également l'état prolifératif des cellules épithéliales et l'intégrité de l'épithélium et limite l'intrusion d'éléments extérieurs (antigènes bactériens ou alimentaires, micro-organismes, …). Pour ces raisons, leur expression et leur activité sont

finement régulées par les nutriments, le système immunitaire, les bactéries, les hormones, ... La glutamine et le tryptophane restaurent l'imperméabilité intestinale notamment chez les personnes stressées et les animaux présentant une endotoxémie – augmentation du taux plasmatique de fragments bactériens – caractérisés par une perméabilité intestinale accrue. Il a été observé également qu'une privation en glutamine favorisait la perméabilité intestinale [461-464]. Les acides gras libres insaturés modulent également cette perméabilité tout comme les AGCC [465, 466]. De la même façon, les cytokines et les cellules immunitaires intestinales modulent la perméabilité intestinale. Le TNF$\alpha$ et l'interféron $\gamma$ (IFN$\gamma$), produits entre autres par les cellules immunitaires $CD4^+$, augmentent la perméabilité intestinale [467-469] tandis que l'IL10 anti-inflammatoire promeut son imperméabilité. En effet, les souris invalidées pour l'IL10 possèdent une perméabilité augmentée et une forte inflammation des tissus [470]. Les hormones et certains neurotransmetteurs intestinaux sont aussi capables de moduler la perméabilité intestinale. On distingue la 5-HT qui favorise la translocation de fragments bactériens *via* son récepteur le 5-$HT_3$r [471], le GLP-2 qui favorise l'imperméabilité intestinale sous l'influence des bactéries intestinales [472] et enfin le NO, produit par les cellules immunitaires, endothéliales et nerveuses, qui diminue la perméabilité intestinale et donc la translocation bactérienne [473].

Les bactéries présentes dans le lumen semblent déterminantes dans le contrôle de la perméabilité intestinale. L'infection intestinale par certaines bactéries pathogènes stimule l'augmentation de la perméabilité afin de faciliter leur entrée dans l'organisme et donc l'infection [474]. Les bactéries commensales, quant à elles, sont nécessaires au maintien de l'imperméabilité et de l'intégrité de l'épithélium. En effet, des souris entièrement stériles dites souris axéniques possèdent une forte augmentation de la perméabilité tandis que lorsque leur intestin est recolonisé avec de la flore provenant de souris contrôle, la barrière intestinale devient imperméable [475]. De la même façon, au cours de maladies métaboliques, le microbiote intestinal change. Ce changement modifie la perméabilité intestinale favorisant l'endotoxémie, soit l'augmentation de fragments bactériens dans le sang et l'augmentation de l'absorption des nutriments [476]. Les traitements antibiotiques qui détruisent des populations microbiennes intestinales de manière plus ou moins ciblées, et les traitements probiotiques, composés de bactéries vivantes bénéfiques pour la physiologie intestinale, suffisent à restaurer cette fonction intestinale [477-479]. Ce rôle du microbiote sur la perméabilité intestinale dépend des récepteurs bactériens NLR (NOD (nucleotide oligomerization domain receptor)- like receptor) et TLR (Toll-like receptor) qui seront traités ultérieurement [476, 480, 481]. Le microbiote peut également influencer la perméabilité *via* la production d'AGCC [466].

### *b) Les cellules entéro-endocrines, système senseur nutritionnel et bactérien*

L'intestin est un organe endocrinien complexe. Les cellules entéro-endocrines (CEE) sont des cellules épithéliales capables de sécréter des hormones mais elles sont très peu représentées au sein de l'épithélium et leur nombre est estimé à 1% des cellules épithéliales. Elles possèdent une polarité comme le reste des cellules épithéliales avec un pôle apical riche en microvillosités et un pôle basal et sont liées avec leurs voisines par des jonctions serrées. Les CEE jouent un rôle déterminant dans la communication entre le lumen et le reste de l'organisme. Leur principale source de stimulation sont les nutriments présents dans le lumen : peptides et acides aminés, acides gras libres et glucides simples (glucose, fructose, galactose, ...). Ces éléments ont pour but d'induire la libération de leurs vésicules contenant les hormones qui, une fois libérées, vont avoir de multiples rôles. Ces stimuli nutritionnels sont réalisés au niveau apical des cellules et induisent une sécrétion au pôle basal (la plupart du temps, sauf la 5-HT qui peut être sécrétée au pôle apical comme au pôle basal) des CEE. Les hormones peuvent être également libérées en réponse à d'autres stimuli, au pôle apical comme au pôle basal : en réponse à des fragments ou métabolites bactériens, aux changements ioniques ou de pH mais aussi par des cytokines et des neurotransmetteurs du SNA. Ces hormones jouent un rôle important et diversifié dans le métabolisme et la fonction gastro-intestinale, en modulant la vidange gastrique et le péristaltisme intestinal, la prise alimentaire, les sécrétions exocrines et endocrines pancréatiques, les sécrétions exocrines et endocrines gastro-intestinales, l'activité du SNA, le statut inflammatoire ou encore la production de mucus.

La compréhension des mécanismes des sécrétions entéro-endocrines a été permise par l'étude *in vitro* de lignées cellulaires humaines ou murines de CEE telles que les cellules GLUTag et NC1-H716 pour la sécrétion de GLP-1, les cellules STC-1 pour la sécrétion de la cholécystokinine (CCK), du GIP et du GLP-1 et de la sécrétine et enfin les cellules BON pour la sécrétion de 5-HT. De plus, la mise en place de modèles transgéniques de souris exprimant une protéine fluorescente sous les promoteurs des différentes hormones a permis d'isoler les CEE provenant de la souris (cellules L, K, I et X/A) et d'en faire des cultures primaires [482-484]. La compréhension des mécanismes d'action des hormones a été permise par l'étude de modèles murins invalidés pour l'hormone ou son récepteur et également, chez l'homme, par l'étude des effets de tumeurs entéro-endocrines touchant les CEE.

Les nutriments, les ions, les différents goûts, les fragments ou les métabolites bactériens activent des protéines senseurs, les récepteurs spécifiques localisées au niveau du pôle apical des CEE (**Figure 7**). Ces senseurs peuvent être des canaux ioniques ou des récepteurs couplés aux protéines G. Ils stimulent ainsi des voies de signalisation intracellulaires impliquant le $Ca^{2+}$ nécessaire aux mécanismes d'exocytose et de sécrétions, soit par changement du potentiel de membrane et l'activation de canaux $Ca^{2+}$ voltage-

dépendants, soit en activant la mobilisation du $Ca^{2+}$ provenant du RE, ceci étant dépendant de l'$IP_3$ [485].

Pour les récepteurs aux goûts, on distingue les canaux ioniques PKD2L1, sensibles à l'acide et transportant des protons ; l'ENaC, sensible au salé et transportant le $Na^+$ ; et les récepteurs couplés aux protéines G, T1R, T2R sensibles à tous les autres goûts : amer, sucré et umami. La détection du glucose se fait de différentes manières. Les récepteurs couplés aux protéines G, T1R2 et T1R3, ou récepteur à la gustudicine répondent aux fortes concentrations de glucose ou aux édulcorants artificiels. *In vitro*, ces récepteurs stimulent la sécrétion de GLP-1 et de GIP [486]. Leurs effets *in vivo* n'ont cependant pas été démontrés et il est possible que la détection *via* ces récepteurs induise l'augmentation de l'absorption du glucose qui stimule à terme la sécrétion des incrétines [486]. La détection du glucose se fait également par les co-transporteurs glucose/$Na^+$, SGLT1/3 [487, 488]. La détection des acides aminés et des protéines peut se faire de différentes manières : 1) par exemple, la détection de la glutamine se réalise *via* un co-transport avec du $Na^+$ [489] ; 2) les di ou tripeptides *via* un co-transport avec du $H^+$ par PEPT1 [490] ; ces deux derniers modifient le potentiel de membrane et activent des canaux voltage-dépendants ; 3) les récepteurs couplés aux protéines G sensibles au $Ca^{2+}$ extracellulaire, CaSR (calcium sensing receptor), détectent les acides aminés aromatiques et sont très présents au niveau des cellules G, D, I ; 4) les récepteurs couplés aux protéines G C6A, GPRC6A, sont sensibles aux acides aminés basiques et sont très présents au niveau des cellules G et D ; 5) les récepteurs couplés aux protéines G T1R1/T1R3 sont sensibles aux acide aminés aliphatiques ; 6) finalement, les récepteurs couplés aux protéines G GPR92/93 sont sensibles aux peptides et stimulent par exemple la sécrétion de CCK. Au niveau des nutriments lipidiques, les acides gras libres de moyenne à longue chaine carbonée activent les récepteurs couplés aux protéines G, GPR40 (G-protein coupled receptor 40) (ou FFAR1, free fatty acid receptor 1) et GPR120. Ils stimulent la sécrétion de GLP-1, GIP, CCK, 5-HT ou sécrétine. Ainsi, les goûts et les nutriments stimulent la sécrétion des hormones intestinales par des récepteurs particuliers que nous venons de citer. Cependant, ils peuvent activer des voies similaires par leur absorption ou leur métabolisme, *via* les protéines impliquées dans leur absorption comme c'est le cas du glucose *via* SGLT1 et des lipides *via* CD36.

Les bactéries peuvent également contrôler la sécrétion des hormones intestinales [491]. Chez les souris axéniques, dépourvues de microbiote intestinal, l'expression des hormones intestinales telles que la CCK, le GLP-1 ou le peptide dityrosine (PYY) et leur sécrétion sont modifiées [492]. Lorsque les bactéries fermentent, elles produisent des AGCC capables d'activer des récepteurs couplés aux protéines G tels que FFAR2 également appelé GPR43, sensible au $C_2$-$C_3$ ou FFAR3 également appelé GPR41, sensibles au $C_3$-$C_5$. L'activation de ces deux récepteurs induit la sécrétion de PYY, de GLP-1, de 5-HT ou de GLP-2 [493, 494]. Le traitement prébiotique constitue le substrat essentiel à certaines bactéries et ainsi permet leur survie. Les formes de prébiotique les plus utilisées et les plus connues sont les fibres alimentaires (inuline, fructoligosaccharides (FOS),

glucoligosaccharides (GOS), polydextrose (PDX) …) qui, une fois fermentées par les bactéries spécifiques, induisent la production d'AGCC. Ces prébiotiques, administrés chez le rongeur, modifient la sécrétion de GLP-1, GLP-2 ou la CCK [472, 495, 496] montrant le rôle essentiel des AGCC dans leur sécrétion. Des fragments de la paroi bactérienne, tels que les lipopolysaccharides (LPS), peuvent également stimuler la sécrétion d'hormones intestinales [497-500]. Cet effet passe par les récepteurs TLR, impliqués dans la détection des fragments bactériens, car ils sont exprimés au niveau des CEE et peuvent moduler leur sécrétion [497, 501]. Les bactéries peuvent également influencer la sécrétion des hormones en modifiant l'expression de certains récepteurs aux nutriments comme le récepteur GPR120 [502]. Par exemple, les souris axéniques possèdent des expressions de T1R3, SGLT1, GPR40, 41, 43, et 120 altérées [492, 503]. Les bactéries peuvent aussi modifier le contexte cytokinique [500, 504] ou modifier l'homéostasie de EEC [505].

On distingue plus de 20 hormones intestinales différentes sécrétées par plusieurs types de cellules :

- *les cellules L* sécrétant le GLP-1, le GLP-2 et le PYY dont le nombre augmente suivant l'axe antéro-postérieur. La sécrétion de ces hormones est stimulée par de nombreux nutriments : le glucose, les acides gras mono-insaturés, les goûts, les fibres alimentaires, certains acides aminés … Elles possèdent des rôles multiples comme la stimulation de sécrétion d'insuline, l'inhibition de la prise alimentaire et de la vidange gastrique, le contrôle de la motilité et de la perméabilité intestinale ou l'absorption du glucose. Ces effets s'effectuent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques comme le GLP-1r, le GLP-2r ou le récepteur du PYY, de manière paracrine, endocrine ou nerveuse *via* le nerf vague.
- *les cellules I* présente au niveau du jéjunum sécrètent la CCK. La CCK stimule la vidange de la vésicule biliaire et les sécrétions exocrines du pancréas. Ces actions permettent la digestion des protéines et des lipides dans l'intestin grêle proximal. La CCK inhibe la prise alimentaire et la vidange gastrique. Sa sécrétion est induite par les acides gras libres dont la taille est supérieure à C12, les protéines et les acides aminés aromatiques. Plus récemment, il a été démontré que les carbohydrates tels que le fructose pouvaient également stimuler sa sécrétion [506]. Une partie de la CCK peut être sécrétée par les neurones intestinaux. Les actions de cette hormone peuvent être induites de façon directe sur les tissus cibles ou indirecte *via* le nerf vague [507, 508]. Elles sont médiées par le récepteur CCK-1 de forte affinité et CCK-2 de faible affinité. Le récepteur CCK-1 est particulièrement exprimé au niveau du nerf vague, du SNC et des cellules pancréatiques.
- *les cellules G*, présentes dans l'épithélium gastrique notamment la partie antrale, sécrètent la gastrine. Cette hormone contrôle la sécrétion d'acides gastriques, la prolifération et la maturation des cellules épithéliales de l'estomac et également la motilité gastro-intestinale [509, 510]. Sa sécrétion est induite par les protéines et les acides aminés aromatiques *via* le récepteur CaSR [511]. D'un point de vue nerveux, le

nerf vague est capable de stimuler sa sécrétion *via* l'Ach et le GRP. Sa sécrétion est inhibée par le pH acide *via* l'influence inhibitrice de la somatostatine [512]. La bactérie, *Helicobacter pylori*, responsable des ulcères est également capable de stimuler sa sécrétion directement ou indirectement *via* les cytokines produites au cours de l'inflammation de l'estomac (TNFα, IL1β) suggérant un lien étroit entre le microbiote et les CEE [504]. Son action est médiée par les récepteurs CCK-1 de faible affinité et CCK-2 de forte affinité. Son action est essentiellement paracrine.

- *les cellules entérochromaffines ou cellules EC,* présentes tout le long du tractus digestif, sécrètent la 5-HT. L'intestin est la première source de 5-HT (95% contre 5% au niveau du SNC). Dans l'intestin, elle est libérée majoritairement par les cellules EC et également par le SNE [513]. Elle a été très étudiée, notamment par le groupe de Gershon, dans les années 1960, pour son rôle essentiel sur la motilité intestinale et la fonction des neurones entériques. La 5-HT intestinale a de multiples rôles : elle contrôle la motilité gastro-intestinale, de l'estomac jusqu'au côlon ou les sécrétions ioniques de l'épithélium intestinal directement ou indirectement *via* le SNE et le nerf vague. Sa sécrétion est induite par les nutriments ou les changements de pression au niveau du lumen. Les récepteurs qu'elle active sont multiples, de type canaux ioniques ou de type récepteurs couplés aux protéines G. On en distingue 7 différents mais ils ne sont pas tous exprimés au niveau de l'intestin : le 5-$HT_3$ ionique est exprimé au niveau du nerf vague et du SNE, le 5-$HT_1$ au niveau des nerfs sympathiques et des neurones entériques, le 5-$HT_4$ au niveau des neurones entériques, le 5-$HT_7$ au niveau de l'hypothalamus. De nombreux travaux attribuent un rôle métabolique à la 5-HT notamment en tant qu'hormone senseur au glucose.
- *les cellules K* sécrètent le GIP. Le nombre de cellules diminue suivant l'axe antéro-postérieur. Le GIP fait partie du groupe des incrétines. L'hormone inhibe la vidange gastrique, active la sécrétion d'insuline et favorise la lipogenèse. Il régule également la prolifération et la survie des cellules β et des neurones. Le GIP possède son propre récepteur, le GIPr, récepteur couplé aux protéines G. Ce dernier est couplé à la protéine Gαs. Il est essentiellement exprimé au niveau de l'estomac, du pancréas, du tissu adipeux, du cerveau, de l'intestin grêle ou même des cellules endothéliales. L'action de cette hormone se fait essentiellement de façon endocrine. En effet, le nerf vague n'exprime par le GIPr.
- *les cellules D*, présentes tout le long du tractus digestif (estomac et intestin), sécrètent la somatostatine. Cette hormone existe sous deux formes, S-14 et S-18, résultantes d'un clivage post-traductionnelle. Les deux formes sont exprimées par les cellules D intestinales. Les neurones entériques peuvent également produire la somatostatine. Sa sécrétion est induite par des régimes riches en gras et en protéines ou par le pH acide de l'estomac. La bactérie *Helicobacter pylori* altère l'homéostasie de ces cellules et donc la sécrétion de l'hormone [505]. Comme au niveau du pancréas, son rôle est de réguler la sécrétion des autres hormones de l'intestin. Elle contrôle, de manière

directe ou indirecte *via* les autres hormones intestinales, les sécrétions acides de l'estomac, les sécrétions exocrines du pancréas, les sécrétions cytokiniques du système immunitaire et l'absorption intestinale. Sa fonction est essentiellement paracrine. Elle est réalisée par les récepteurs SSTR-2 et SSTR-5 très exprimés au niveau intestinal. Il s'agit de récepteurs couplés aux protéines G et notamment Gαi lui attribuant un rôle plutôt inhibiteur.

- *les cellules A ou X,* présentes au niveau de l'estomac, sécrètent la ghréline. Elles constituent 20% des cellules endocrines de l'estomac. Une partie de la ghréline peut être sécrétée par l'intestin grêle et le côlon ou même des tissus extra-intestinaux. En effet, retirer l'estomac diminue de 65% la quantité de ghréline présente dans le sang [514]. Son rôle principal est la régulation de la prise alimentaire. D'ailleurs, l'effet de la gastrectomie, diminuant la quantité de ghréline et donc son action sur la prise alimentaire, constitue un des bénéfices des chirurgies bariatriques. Elle favorise également la sécrétion de l'hormone de croissance. Son action est médiée par un récepteur spécifique, le GHS-1 couplé à une protéine Gαq. Son action est directe, sur l'hypothalamus, ou indirecte, *via* le nerf vague[515].

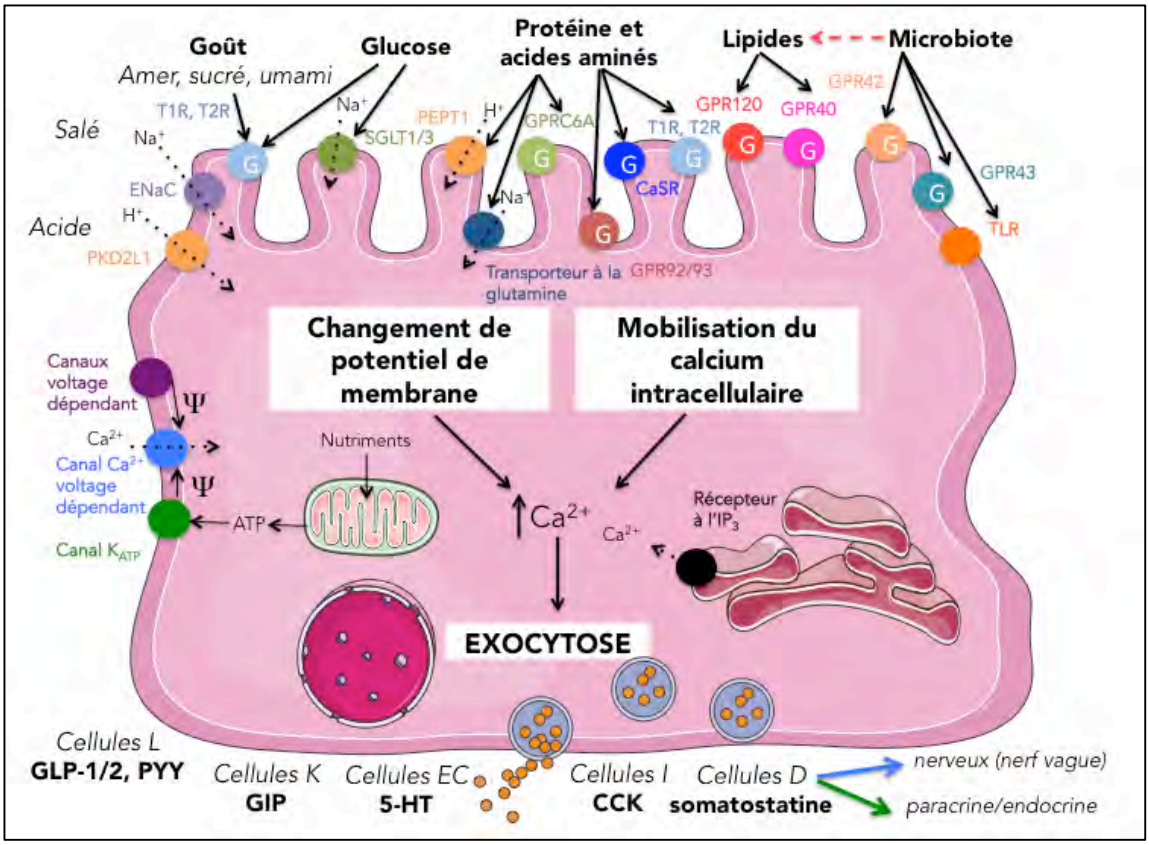



Figure 7 : La sécrétion des hormones intestinales. Les hormones intestinales sont sécrétées en réponse à des stimuli luminaux tels que les nutriments ou les fragments et les métabolites bactériens. La flèche représentée en rouge et pointillée met en évidence l'influence du microbiote sur la sensibilité de la CEE aux nutriments. Une fois stimulée, la concentration calcique augmente dans le milieu intracellulaire des CEE par deux types de mécanismes : un changement de potentiel de membrane et l'activation des canaux calcique voltage-dépendant ou par mobilisation des réserves calciques du RE. Cette augmentation calcique induit la sécrétion des hormones au niveau basale qui peuvent induire leurs actions de manière endocrine (en rejoignant la circulation sanguine) de manière nerveuse sur le nerf vague et enfin de manière paracrine sur les neurones entériques, les autres CEE ou les cellules immunitaires.

Cette liste d'hormones intestinales constitue une liste non-exhaustive. En effet, on en découvre encore aujourd'hui. Au sein de l'institut des maladies métaboliques et cardiovasculaire de Toulouse, il a été démontré que l'apeline, connue pour être une adipokine, était également sécrétée par les cellules intestinales en réponse au glucose. *Via* son récepteur APJ (apelin receptor), récepteur couplé aux protéines G, elle peut alors réguler la motricité de l'intestin [516] et également l'absorption du glucose en modifiant l'expression de SGLT1/GLUT2 [517].

Ces hormones induisent leurs actions de manière endocrine, par le sang mais également de manière paracrine, en agissant sur les afférences extrinsèques de l'intestin de type vagal, sur le SNE, sur les autres CEE ou sur les cellules du système immunitaire. Elles sont également, pour la plupart, sécrétées par des neurones entériques et centraux. Leurs actions sur - et leurs sécrétions par - le système nerveux leur attribuent le rôle de neuro-hormones.

Comme nous venons de le montrer, les hormones intestinales s'influencent entre elles. La sécrétion de la gastrine est inhibée par la somatostatine et celle de la somatostatine est activée par la CCK, la gastrine ou la 5-HT. L'apeline induit la sécrétion de GLP-1 et de CCK [518]. Le GIP influence la sécrétion de GLP-1 [519, 520]. La gastrine influence la sécrétion des cellules EC. La CCK stimule la sécrétion de GLP-1 [520]. Enfin, la 5-HT inhibe la sécrétion de GLP-1 [520]. Ces influences hormonales permettent de mettre en évidence qu'un message nutritionnel, en stimulant la sécrétion d'une hormone, peut influencer de nombreuses fonctions et que les différentes parties de l'intestin peuvent s'influencer indépendamment du contact direct avec les nutriments. Par exemple, le GLP-1 est sécrété très rapidement soit quelques minutes après l'ingestion d'un repas alors que les cellules L sont localisées au niveau iléal et colique, donc très distales. Ceci pourrait s'expliquer par une boucle hormonale duodéno-iléale activatrice [520]. Les hormones intestinales sont également sous l'influence d'hormones périphériques telles que l'insuline ou la leptine [521, 522], mais aussi certains neurotransmetteurs (Ach, GABA, …) [523, 524] pouvant être libérés par le SNE ou les innervations autonomes et enfin des cytokines (IL6, TNF$\alpha$, IL1$\beta$…) [500, 525, 526]

Au cours des maladies métaboliques, on observe des modifications nutritionnelles, inflammatoires et nerveuses, mais également microbiennes. Ainsi, la sécrétion et l'action de ces hormones peuvent donc être particulièrement altérées.

### *3. Le système nerveux entérique*

#### *a) La grande diversité de l'innervation intestinale*

Le tube digestif, de l'œsophage au rectum, possède un système nerveux qui lui est propre : le SNE. Le SNE constitue une des branches du SNA. Au cours du développement embryonnaire, il se développe à partir des cellules embryonnaires et pluripotentes de la crête neurale, d'origine ectodermique, située au-dessus du tube neural. Le tube neural est à

l'origine du SNC et de la moelle épinière. En empruntant différentes voies de migration et donc de différentiation, elles donneront, entre autre, le SNE et les autres parties du SNA, des cellules endocriniennes ou des mélanocytes [527]. Le SNE contient quelques dizaines à quelques centaines de millions de neurones suivant le type de mammifères.

Tout comme le reste du SNA, il est composé de neurones sensoriels (afférents), moteurs et/ou sécréteurs (efférents). Les neurones entériques sont en étroite relation avec des cellules gliales et se regroupent en ganglions. L'ensemble des cellules constituant le ganglion est entouré d'une membrane basale protectrice et se trouve à proximité de vaisseaux sanguins. Cette organisation et cette structure pourraient être comparées à la BHE au niveau cérébral.

Décrit au cours du 19ème siècle par les scientifiques Meissner, Billroth et Auerbach, les neurones entériques sont organisés en deux plexi ganglionnaires, possédant chacun leurs propres rôles. L'un est très proche de l'épithélium et du système immunitaire, puisqu'il est localisé dans la *lamina propria*, et possède à la fois une rôle sensitif (détection des changement luminaux) et un rôle moteur (contrôle des cellules épithéliales, immunitaires et vasculaires). Il est appelé plexus sous-muqueux ou de Meissner. Le second plexus est le plus développé et plutôt moteur, situé entre les deux couches de cellules musculaires lisses, circulaires et longitudinales. Il est appelé plexus myentérique ou plexus d'Auerbach (**Figure 6**). Les cellules musculaires longitudinales sont faiblement innervées en comparaison des cellules musculaires circulaires. Ainsi, leur contraction se fait par diffusion des neurotransmetteurs dans le milieu interstitiel, par les jonctions GAP qui relient le cytoplasme des cellules, et même par les cellules de Cajal. Ces cellules sont à l'interface entre les myocytes et les neurones et constituent un véritable réseau. Elles sont riches en dendrites et ramifications réalisant une interaction forte, *via* des jonctions serrées, entre les neurones et les myocytes. Comme observé au niveau du nœud atrial cardiaque, ces cellules servent de cellules « pacemaker », assurent des contractions continues et lentes de l'intestin lui attribuant un rythme électrique de base qui peut varier suivant les parties de l'intestin. Ces activités « pacemaker » sont assurées par l'ouverture et la fermeture de canaux voltage-dépendants. Chez les gros mammifères comme l'homme, on peut identifier deux types de plexus sous-muqueux, l'un est le plexus de Meissner, plexus sous-muqueux interne proche la muqueuse et le second est le plexus de Schabadash, plexus sous-muqueux externe, proches des muscles circulaires.

En plus de cette innervation qui lui est propre, comme tous les organes périphériques, le tube digestif possède également des innervations afférentes et efférentes issues du SNA appelées les innervations extrinsèques. Elles sont d'origine sympathique, émises par le chaine pré-ganglionnaire *via* les nerfs splanchniques, ou d'origine parasympathique, émise par les ganglions nodaux *via* le nerf vague et/ou le ganglion sacral *via* le nerf sacré. La chaîne ganglionnaire sympathique émet ses projections nerveuses de l'œsophage au côlon alors que le nerf vague émet sur toute la partie intestinale au-dessus du caecum et le nerf sacré en deçà. Les innervations extrinsèques motrices agissent

directement sur les cellules nerveuses entériques, musculaires, immunitaires, entéro-endocrines et épithéliales de l'intestin. Les innervations extrinsèques sensitives innervent l'ensemble des tissus de l'intestin et peuvent réceptionner tous les signaux du tractus digestif d'origine nutritifs, hormonaux, microbiens ou cytokiniques. Les innervations extrinsèques sont observables dans la *lamina propria* et insérées dans l'épithélium permettant au cerveau de s'informer directement de ce qui se passe au niveau de l'épithélium intestinal et dans le lumen. On estime que 75% des innervations extrinsèques sont d'origine sensitive plutôt que motrice (**Figure 6**).

L'existence du SNE et son autonomie vis à vis du SNC ont été suggérées par les premières expériences de contractilité intestinale sur un intestin grêle isolé, réalisées par Bayliss et Starling en 1899. En isolant l'organe et en le mettant dans un milieu de survie, les mouvements de contraction de l'intestin sont maintenus suggérant qu'il existe un voie nerveuse réflexe au sein de la paroi intestinale [528]. Au début du 20ème siècle, J.N. Langley, stimulant les innervations extrinsèques autonomes d'un intestin isolé, a suggéré que les contractions intestinales étaient sous le contrôle des autres branches du SNA [529] et a confirmé chez le chat et le lapin la thèse de Bayliss et Starling [530]. Malgré ces différents travaux attribuant à l'intestin l'existence d'un système nerveux qui lui est propre, au cours des années 60, on les décrivait comme étant des neurones post-ganglionnaires du SNP et du SNS. Ceci n'a rien d'aberrant, en 1973, Le Douarin et Teillet ont montré qu'en réalité, au cours du développement embryonnaire, la majorité des neurones de l'intestin grêle migrent de la crête neurale vagale ou de la crête du tronc et que les neurones du côlon dérivent de la crête neurale sacrale [531] montrant une origine embryonnaire commune entre le SNS, le SNP et le SNE. Cependant, au cours de ces mêmes années, Burnstock a été décrit une population de neurones Non Adrénergiques et Non Cholinergique : les neurones NANC. Ceci a permis de réfuter définitivement la thèse que les neurones entériques étaient des neurones post-ganglionnaires du SNS et du SNP, décrits comme sécrétant ces deux types de neurotransmetteurs.

A partir des expériences de Burnstock et jusqu'à la fin du 20ème siècle, la découverte des différentes catégories de neurones intestinaux et de leurs fonctions a été réalisée à l'aide de différentes techniques [532, 533]: l'immunohistochimie pour définir les neuropeptides qu'ils sécrètent ou leur morphologie, l'électrophysiologie pour caractériser leurs excitabilités, des lésions neuronales et le traçage rétrograde des projections neuronales pour étudier leurs communications avec le SNC ou encore des injections intracellulaires de sondes marquées. Ces neurones entériques et ces innervations extrinsèques sont de différents types [533, 534] :

- les neurones efférents moteurs des muscles circulaires et longitudinaux, activateurs ou inhibiteurs : ils contrôlent la motricité segmentaire et le péristaltisme intestinale,
- les inter-neurones ascendants (dirigés vers la bouche) et descendants (dirigés vers l'anus) qui forment une chaine communicante, de haut en bas du tube digestif, et qui contrôlent la motricité bucco-anale et le péristaltisme de l'intestin,

- les neurones efférents sécréto-moteurs et vaso-moteurs : ils contrôlent les sécrétions et les absorptions de l'épithélium et la vasomotricité des artérioles intestinales,
- les neurones afférents mécano-senseurs et chémo-senseurs (IPAN, intrinsic primary afferent neurone) sensibles aux nutriments, aux ions, au pH et aux distensions mécaniques.
- les neurones afférents intestino-fugaux (IFAN, intestinofugal afferent neurone) capables d'émettre des projections nerveuses au niveau du pancréas [535], de la vésicule biliaire, et de certains ganglions autonomes [536-538].
- Les afférences et les efférences extrinsèques autonomes (SNP et SNA) de l'intestin.

Comme les neurones du SNC, du SNP et du SNS, les neurones entériques libèrent leurs vésicules chargées de neurotransmetteurs - dites pré-synaptiques - suite à l'activation de canaux $Ca^{2+}$ voltage-dépendant, ils induisent des potentiels d'action post-synaptiques, inhibiteurs ou activateurs. On distingue deux types d'excitations post-synaptiques : rapides induites par l'Ach ou même comme plus récemment montré, par la 5-HT et lentes qui permet d'optimiser l'excitabilité des neurones à d'autres signaux post-synaptiques. Il existe également les inhibitions post-synaptiques. Elles sont hyperpolarisantes et lentes et diminuent le pouvoir excitateur d'autres signaux post-synaptiques. Enfin, il existe aussi les signaux auto-inhibiteurs ou inhibition pré-synaptique permettant le rétrocontrôle de la sécrétion des neurotransmetteurs.

Pour induire ces différentes fonctions, les neurotransmetteurs sont assez diversifiés au niveau intestinal [533]. De manière globale, les neurones sécrètent principalement l'Ach activatrice - ils sont alors positifs pour l'acétylcholine transférase (ChAT, choline acetyltransferase) - et le NO inhibiteur - ils sont alors positifs pour l'enzyme de synthèse du NO, la nNOS (neuronal nitric oxyde synthase). Dans certains cas, leurs vésicules de sécrétions contiennent d'autres neuro-transmetteurs un peu moins représentés dits neurotransmetteurs secondaires tels que le VIP, la 5-HT, les purines (ATP), PACAP, les tachykinines, la somatostatine, … Les neurones moteurs activateurs des muscles entériques libèrent pour la plupart de l'Ach comme neurotransmetteur primaire et induisent leur action *via* des récepteurs muscariniques. L'inhibition de ces récepteurs impacte de façon importante la motilité intestinale [539]. Les tachykinines (substance P, neurokinine A, …) sont les neurotransmetteurs secondaires co-sécrétés avec l'Ach, leur inhibition ayant des effets modestes sur la contractilité. La tachykinine joue le rôle de rétrocontrôle inhibiteur sur ces neurones moteurs excitateurs. Les neurones inhibiteurs de la contraction des muscles entériques sécrètent essentiellement le NO [540, 541]. L'inhibition de la production de NO n'impacte pas totalement l'inhibition du péristaltisme : en réalité, les purines de type ATP, le VIP, le PACAP ou le CO (monoxyde de carbone) sont capables aussi de ralentir le péristaltisme [533, 542, 543]. Les inter-neurones ascendants sont essentiellement cholinergiques alors que l'on distingue trois types d'inter-neurones descendants : 1) les neurones positifs pour la ChAT, la NOS et le VIP impliqués dans la motilité intestinale locale, 2) les neurones positifs pour la ChAT et la somatostatine impliqués dans la

conduction du signal myo-électrique de la bouche vers l'anus et 3) les neurones positifs pour la ChAT et la 5-HT, impliqués plutôt dans les réflexes sécréto-moteurs [533]. Les neurones chemo-sensibles, présents au niveau des plexi sous-muqueux et myentériques, sont activés de manière continue par le pH, les modifications ioniques, certains fragments ou métabolites bactériens ou les nutriments, de manière directe ou indirecte *via* les hormones intestinales [544-547]. Ceci se fait uniquement par l'épithélium intestinal : en effet, l'activité des neurones est maintenue bien qu'il n'y ait aucun stimulus appliqué. Par contre lorsque la muqueuse est retirée, alors les potentiels d'action cessent [548]. Les neurones mécano-sensibles sont présents au niveau du plexus sous-muqueux comme myentérique et sont activables lorsqu'un stress mécanique est appliqué sur la muqueuse [545], ou par le péristaltisme intestinal [549]. Les neurotransmetteurs primaires des IPAN sont les tachykinines et l'Ach [533]. Les neurones sécréto- et vaso-moteurs permettent les sécrétions ioniques et endocrines de l'épithélium intestinal mais aussi le contrôle de la vasomotilité des artérioles sous-jacentes. Ils sont de deux types : cholinergique et sécréteur du VIP. Dans ce type de neurones, les neurones cholinergiques peuvent également sécréter le neuropeptide Y plutôt vasomoteur ou la calretinine plutôt sécrétomotrice. Ainsi, suivant leurs fonctions, les neurones possèdent des neurotransmetteurs primaires mais également secondaires différents leur attribuant à la fois une spécificité mais également une diversité d'action.

Finalement, le SNE semble former un second cerveau, unique par sa proximité avec le monde extérieur, le monde microbien, un épithélium endocrinien et absorptif et, un système immunitaire très représenté et actif. Son but est d'informer les SNC et de contrôler les différents acteurs présents au niveau de l'intestin (muscles, vaisseaux, épithélium), en réponse à différents changements locaux, *via* une pléiade de neurotransmetteurs. De plus, les deux plexi – sous-muqueux et musculaire, dont les fonctions sont bien distinctes – communiquent entre eux pour le contrôle des fonctions intestinales et périphériques.

#### *b) Rôle moteur du système nerveux entérique : contrôle du péristaltisme, des sécrétions, de l'absorption et de l'immunité*

Suivant la zone du tube digestif, la proportion entre le SNS, le SNP et le SNE pour le contrôle du péristaltisme peut varier. Par exemple, l'œsophage, dont le rôle principal est d'évacuer le chyme vers l'estomac par péristaltisme, n'est pas innervé comme l'intestin. En effet, de par sa fonction, il contient sur sa partie haute des muscles striés dont l'activité dépend essentiellement des neurones vagaux bien qu'il possède un SNE structurellement fonctionnel. Détériorer le nerf vague revient à induire une paralysie de l'organe [550]. Le rôle du SNE dans cette fonction s'est perdu au cours de l'évolution parallèlement à la céphalisation. Ce même phénomène est observé au niveau stomacal : bien que l'organe et le pylore soient innervés par le SNE, leur fonctionnalité dépend essentiellement d'un réflexe vago-vagal. L'implication du SNE dans les mouvements de brassage et de contraction de l'organe est tout de même suggéré mais difficile à démontrer [551]. Cependant, pour

l'intestin grêle et le côlon, l'implication du SNE dans le péristaltisme est clairement démontrée et définie. Au sein de l'intestin grêle, on distingue différents types de mouvements induits par la stimulation des différents types de muscles par le SNE. La propulsion orthograde désordonnée et irrégulière définit le vrai péristaltisme et s'effectue à l'état nourri. La propulsion orthograde lente s'effectue entre les repas, en période de jeûne et permet d'évacuer les derniers déchets et de limiter la croissance bactérienne. La segmentation prandiale correspond au mouvement de mélange et de brassage au cours du repas. Enfin, la rétropulsion définit les vomissements. Ces mouvements peuvent varier suivant les espèces : par exemple, la propulsion orthograde est typique des carnivores qui possèdent des phases de jeûne *versus* de nutrition en comparaison aux herbivores et rongeurs. Le mouvement de rétropulsion est, par exemple, absent chez certains animaux comme la souris et le rat. Les mouvements orthogrades sont plutôt induits par la contraction des muscles longitudinaux alors que les mouvements de segmentation seront plutôt dus à l'activité des muscles circulaires. Ces mouvements de l'intestin grêle sont tous sous le contrôle du SNE et du SNA. Pour le côlon, tous les mouvements de propulsion sont médiés uniquement par le SNE, cependant les mécanismes de défécation au niveau du colo-rectum sont sous contrôle du SNC et du SNA, *via* le nerf sacré et le centre de la défécation localisé dans la zone lombo-sacrale de la moelle épinière.

En période postprandiale, la régulation de la motricité intestinale est sous le contrôle des nutriments, des neurotransmetteurs libérés par les neurones entériques ou les efférences extrinsèques ou encore les hormones sécrétées par les CEE [552]. Comme vu précédemment, le SNE sécrète l'Ach, la 5-HT et les tachykinines qui sont activatrices, contractiles ou le NO, le VIP ou le PACAP qui sont inhibiteurs, dilatateurs. De la même façon, le SNC, *via* le SNA, contrôle la motricité intestinale et l'activité musculaire. Ce contrôle se fait de manière directe ou indirecte *via* le SNE, sous l'induction d'arcs réflexes tube digestif-cerveau-tube digestif, notamment pour la vidange gastrique, et également sous l'induction du stress et des émotions. De plus, le SNP augmente le péristaltisme intestinal par la libération d'Ach [553-555] tandis que les efférences sympathiques sont plutôt inhibitrices *via* les catécholamines, la somatostatine, et le neuropeptide Y [556].

Bien qu'on ait longtemps associé au SNE des fonctions dans le broyage, le brassage et l'avancée du chyme dans le tube digestif, ses fonctions sont aujourd'hui multiples et diversifiées. Il permet de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale et la production de mucus, de contrôler les flux d'eau et d'électrolytes et l'absorption [533, 557]. Il peut également contrôler les systèmes endocriniens et immunitaires intestinaux. Pour ces fonctions, les neurones entériques efférents projettent des axones à proximité de l'épithélium et des CEE. Les neurones efférents émettent également des projections axonales dans les plaques de Peyer et dans la *lamina propria*, au contact des cellules immunitaires. Les efférences extrinsèques peuvent contrôler ces fonctions [558]. En effet, les cellules immunitaires intestinales [559-561], les cellules épithéliales [562-564] et les CEE

[523, 524] possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs tels que l'Ach, le VIP, l'ATP ou la 5-HT.

### *c) Les afférences intestinales – rôle senseur de l'intestin*

Comme nous venons de le voir, il existe un lien étroit entre le SNE et le SNC *via* le contrôle effecteur moteur du SNA sur le SNE. Qu'en est-il du rôle afférent des neurones entériques leur attribuant un rôle d'information vers la périphérie ? Comme nous l'avons vu précédemment, il existe des neurones mécano- et chémo-senseurs afférents, les IPAN, dans l'intestin. Suivant leurs stimulations par le stress mécanique, les nutriments, les hormones, ou même les fragments et les métabolites bactériens, ils peuvent contrôler le péristaltisme du tube digestif et également être à l'origine de la communication axe intestin-cerveau *via* une stimulation du SNA. D'autre part, il existe une population de neurones entériques particuliers capables de réaliser des communications nerveuses avec d'autres organes : des expériences d'injections de traceurs dans les plexi entériques, ont pu montrer que ces neurones sont capables de réaliser des synapses directement sur le pancréas [535], la vésicule biliaire ou les chaînes pré-ganglionnaires sympathiques.

L'existence des IPAN a été suggérée par Dogiel en 1899. Il les a décrits comme étant des neurones ronds ou ovales, larges capables de projeter des axones dans la muqueuse et de contrôle les neurones sous-jacents. Par la suite, ces neurones seront appelés les neurones Dogiel de type 2. 20 ans plus tard, ils ont été décrits par technique histologique dans les travaux de Kuntz. Il révéla également qu'ils pouvaient assurer une véritable connexion nerveuse entre les deux plexi entériques [565]. Dans les années 40, Kuntz a aussi suggéré l'existence des IFAN assurant un réseau neuronal intrinsèque afférent capable d'innerver les ganglions sympathiques au niveau colique [536, 537]. La description morphologique et fonctionnelle des IFAN et des IPAN fût complétée quelques décennies plus tard. En 1971, par isolement de l'intestin avec les ganglions pré-vertébraux associés, Crowfort décrit plus précisément IFAN innervant les ganglions autonomes sympathiques [538]. Dans les années 90, les IPAN ont été aussi clairement définit : la stimulation chimique ou mécanique de la muqueuse par voie luminale induit une activation des neurones sous-muqueux et un réflexe neuromusculaire au niveau de l'intestin [566].

Le rôle d'un neurone afférent est d'être sensibilisé par une variation mécanique ou chimique du milieu qui l'entoure, de l'intégrer et de la véhiculer à un neurone moteur qui induit par la suite une action en réponse à ce stimulus. Les IPAN, les IFAN et les afférences extrinsèques sont régies par cette loi. Plus le stimulus sera fort plus leur réponse sera intense. Chez les mammifères, la part afférente dans le SNE intestinales constitue environ 20% de l'ensemble des neurones, soit $10^8$ neurones de type IPAN/IFAN et 50000 afférences extrinsèques. Les IPAN possèdent leur corps cellulaire soit au niveau du plexus sous-muqueux soit au niveau du plexus myentérique. Chaque villosité intestinale contient environ 65 axones émis par les IPAN. Les IFAN, quant à eux, réalisent des synapses directement en périphérie. Les afférences extrinsèques sont émises par les ganglions nodaux ou jugulaires

(afférences vagales parasympathiques) ou émises à partir des ganglions de la chaine ganglionnaire pré-vertébrale.

Des études d'électrophysiologie ont montré qu'appliquer des acides inorganiques, des gaz comme le NO, des acides gras ou même du glucose sur la muqueuse permet d'induire une activation des IPAN [566-568]. La détection des stimuli mécaniques ou chimiques (nutritionnel, pH, ions, …) par le SNE ou par les afférences extrinsèques peut se faire directement par des récepteurs spécifiques : des canaux ioniques mécano-sensibles [569], des récepteurs au glucose, aux acides aminés ou aux peptides, ou des transporteurs au lactate de type MCT [570-573]. Mais la détection des changements luminaux peut aussi se faire par l'intermédiaire des hormones entériques. Par exemple, l'action mécanique sur la muqueuse ou même le glucose induisent une libération de 5-HT qui stimule ensuite les IPAN et même les afférences extrinsèques autonomes [574-576]. Ceci implique aussi d'autres hormones intestinales comme la CCK, le GLP-1 ou le GIP [577, 578]. Chez la souris, il a été montré récemment, que les CEE, en émettant des neuropodes (prolongements cytoplasmiques) peuvent directement réaliser des synapses avec les neurones entériques [579]. Les neurones peuvent être également activés par les cytokines et les facteurs immunitaires particulièrement au cours des stress inflammatoires et des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Par exemple l'IL6 et l'IL1β activent les neurones entériques pour le contrôle de neurones entériques sécréto-moteurs [580]. L'activité des afférences extrinsèques est également modulée par le système immunitaire intestinal notamment par le TNFα [581, 582]. Enfin, les neurones entériques et les afférences extrinsèques peuvent également détecter des fragments ou des métabolites bactériens. En effet, les AGCC modulent le transit et l'homéostasie neuronale intestinale *via* les transporteurs MCT [573]. Le SNE, notamment des neurones positifs pour le VIP, exprime également les récepteurs aux AGCC comme FFAR3 [583]. Le récepteur FFAR3 est également observé au niveau des fibres sympathiques mais leurs rôles sur l'activité de ces nerfs restent à éclaircir [583]. De la même façon, les AGCC peuvent contrôler les activités périphériques *via* le nerf vague [584, 585]. Enfin, les fragments bactériens sont aussi détectés par le SNE et le SNA puisqu'ils expriment les récepteurs TLR [586]. D'autre part, il a été montré que les LPS pouvaient influencer le transit intestinal en favorisant la survie et en diminuant l'apoptose des neurones entériques, notamment les neurones nitrinergiques [587].

Une fois activés, les IPAN véhiculent leurs messages au niveau des neurones moteurs (vaso-moteur, sécréto-moteur ou modulateur du péristaltisme) permettant ainsi le contrôle 1) du péristaltisme, 2) des sécrétions ioniques et hormonales de l'épithélium, 3) de la perméabilité, ou 4) de l'activité inflammatoire de l'intestin. De la même façon, l'activation des ramifications autonomes intestinales puis du SNC peut modifier le transit du tube digestif par des arcs réflexes intestin-cerveau-intestin mais également l'activité des tissus périphériques.

Les IPAN peuvent-ils être des neurones pré-synaptiques aux afférences extrinsèques ? Les innervations extrinsèques sensitives ou motrices de l'intestin ont été démontrées comme capable d'innerver les ganglions entériques. Ces innervations sont appelées terminaisons laminaires intra-ganglionnaires. Leur existence a été suggérée en 1975, par Rodriguo et ses collègues au niveau de l'œsophage puis confirmée dans les années 80-90, par injection intra-nodale (ganglions nodaux du nerf vague) de traceurs spécifiques chez le lapin, le chat et le rat. Chez ce dernier, l'injection a même révélé leur présence dans les ganglions sous-muqueux et myentériques de l'œsophage, de l'estomac, de l'intestin grêle et du gros intestin [588]. Les terminaisons laminaires intra-ganglionnaires sont présentes sur tout le tractus digestif avec une décroissance de leur nombre entre la bouche et l'anus et une richesse importante au niveau du jéjunum. Les études réalisées au niveau stomacale ont montré que les neurones positifs pour le NO et le NADPH effectuaient de nombreuses synapses avec ces terminaisons [589]. Enfin, un travail récent du groupe de Perez-Burgos a montré que l'effet d'une bactérie, le *Lactobacillus rhamnosus* JB-1, sur le SNC nécessitait une activation synaptique entre le SNE et les afférences du nerf vague *via* l'Ach [590]. Pour cela, ils ont isolé un intestin avec les fibres vagales et ils ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs à l'Ach diminuait de 60% l'activité vagale montrant ainsi la communication entre les IPAN et le nerf vague. Des afférences nerveuses extrinsèques ont été décrites au sein des muscles circulaires et au niveau de la *lamina propria*. En tant qu'afférences, au niveau musculaire, elles jouent un rôle mécano-senseur tandis que proches de l'épithélium intestinal, elles jouent un rôle de senseur des hormones entéro-endocrines, des nutriments, des cytokines ou des bactéries. Ainsi, l'intestin pourrait constituer un « ganglion nerveux » où les afférences extrinsèques, sensibles aux variations mécaniques et chimiques de l'intestin, seraient activées de manière post-synaptique par l'ensemble des cellules.

#### *d) Les cellules gliales intestinales – cellules de soutien et cellules de signalisation aux neurones entériques*

Les neurones intestinaux, comme les neurones au niveau cérébral nécessitent des cellules partenaires / de soutien : les cellules gliales. Elles sont plus petites que les neurones et projettent de nombreux gliofilaments directement à la surface des neurones, soit au sein des ganglions, soit le long de leurs axones. Dans l'iléon du cochon d'Inde, on estime qu'elles sont deux fois plus nombreuses que les neurones. Leurs structures phénotypiques se rapprochent des cellules astrocytaires du SNC. Elles expriment d'ailleurs les mêmes marqueurs comme S100β (S100 calcium binding protein β) ou GFAP (glial fibrillary acidic protein). Ces cellules ont été caractérisées et définit par les travaux de Gabella dans les années 80 [591]. On distingue différents types de cellules gliales : des cellules très présentes au sein de plexus ou sur les axones et des cellules un peu plus libres à proximité des cellules épithéliales dites cellules sentinelles. D'autres travaux ont montré que les cellules gliales s'organisaient en syncitium. En effet, une sonde injectée dans une cellule

gliale se propage dans plusieurs dizaines de cellules sur environ 300µm [592]. Cette communication inter-gliale est médiée par les jonctions GAP composées des connexines 43. Les souris dont les cellules gliales sont invalidées pour cette protéine ou traitées avec un inhibiteur des connexines 43 montrent une altération de la communication calcique inter-gliale qui engendre un défaut de transit [593].

Au niveau du plexus sous-muqueux, les neurones se trouvent à proximité de l'épithélium intestinal plus ou moins étanche. Les cellules gliales se trouvent également proches des vaisseaux sanguins dont l'intestin est fortement enrichi. Ainsi, comme au niveau de la BHE, les cellules gliales exercent un rôle protecteur et de filtre à la fois vis à vis des éléments en provenance du lumen mais également en provenance du sang. De la même manière, par leur pouvoir sécréteur, elles émettent des signaux permettant le maintien de la barrière intestinale dans le but de limiter l'inflammation induite par les antigènes présents dans le lumen. Ceci passe par un contrôle de la prolifération des cellules épithéliales et de leur adhésion au niveau des jonctions serrées [594]. Pour cela, les cellules gliales produisent le facteur de croissance TGFβ1 (transforming growth factor β1), libèrent la protéine détoxifiante GNSO (S-nitroglutathione), le facteur neurotrophique GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) ou le NO qu'elles peuvent produire sous l'induction de bactéries pathogènes *via* les voies TLR [594-597]. Les rongeurs possédant une gliopathie comme les souris transgéniques exprimant l'haemagglutinine dans les cellules gliales puis traitées avec des cellules $CD8^+$ anti-haemagglutinine [598] ou des animaux traités avec des gliotoxines (6-aminonicotinamide, fluorocitrate) [599, 600] présentent une augmentation de la perméabilité intestinale pouvant influencer la translocation bactérienne dans la *lamina propria* et également une augmentation du transit intestinale induite par une modification du nombre de neurones cholinergiques et nitrinergiques. Le contrôle de l'intégrité de la barrière intestinale par les cellules gliales est sous l'influence du nerf vague et l'activation de récepteurs nicotiniques [601]. Les cellules gliales entériques jouent donc un rôle important sur le péristaltisme et sur la perméabilité. D'ailleurs, les personnes présentant un problème de transit possèdent une homéostasie altérée des cellules gliales.

Les cellules gliales peuvent-elles avoir un rôle de microglie ? La microglie, particulièrement bien décrite au niveau cérébral, constitue une sous-famille de cellules gliales possédant les caractéristiques de macrophages, on parle alors de macrophages résidents du cerveau. Elles sont morphologiquement étoilées, petites et assez mobiles, possèdent toutes la machinerie nécessaire à la phagocytose, expriment les molécules de surface CMH1 et CMH2 (complexe majeur d'histocompatibilité 1 et 2), sécrètent des cytokines, des radicaux libres, … Au niveau intestinal, rien ne semblent établit aujourd'hui bien que les cellules gliales intestinales expriment les molécules CMH1 et 2 et interagissent avec les lymphocytes [602]. Elles adoptent dans certains cas le rôle de cellules présentatrices d'antigènes [603]. Elles expriment également des récepteurs de type TLR et produisent du NO sous l'induction de bactéries comme le ferait un macrophage [604]. Sous l'influence de fragments bactériens, elles libèrent des cytokines comme l'IL1β ou de l'IL6

[597, 605]. Un article récent a d'ailleurs montré que des macrophages étaient en interaction étroite avec le SNE, avec une localisation de type « sentinelle » (lamina propria, intra musculaire, mucosale) et une forme assimilable (étoilée) à des cellules microgliales [606].

De nombreuses études suggèrent aussi un possible rôle de précurseur pour ces cellules soit par une sous-population particulière soit par l'ensemble des cellules. Dans des conditions de pathologies où les ganglions nerveux se trouvent affectés, elles pourraient être amenées à se différencier pour produire de nouvelles cellules gliales. Ces cellules gliales pourraient également fournir de nouveaux neurones mais ceci reste controversé et limité. Des études ont montré qu'*in vivo* et *ex vivo*, la 5-HT, *via* son récepteur 5-$HT_4$, pouvait permettre aux cellules gliales d'acquérir un pouvoir neurogénique [607]. Les cellules gliales ont aussi un rôle neuroprotecteur notamment contre le stress oxydant garantissant ainsi la survie des neurones [608].

Au niveau cérébral, les neurones activent le développement des astrocytes tandis que les astrocytes modulent la transmission synaptique et la plasticité neuronale. Au niveau intestinal, Gabella a également démontré le lien étroit entre les neurones et les gliales parlant alors de jonctions neurogliales. Les astrocytes peuvent sécréter des glio-transmetteurs permettant l'activation ou l'inhibition hétérocellulaire des neurones : on distingue le GABA, le glutamate et l'ATP [609]. Les cellules gliales sécrètent des neurotrophines nécessaires au maintien, à la croissance, la prolifération ou la survie des neurones et au développement des axones et dendrites (NGF, GDNF, …) [596, 610]. D'autre part, de façon réciproque, les neurones entériques activent les cellules gliales par certains neurotransmetteurs comme l'ATP, la 5-HT ou même l'Ach. Enfin, les innervations extrinsèques parasympathiques et sympathiques sont capables également de moduler l'activité des cellules gliales. Enfin, existe-t-il un échange de lactate entre les neurones et les astrocytes intestinaux comme observé au niveau cérébral ? Ceci n'est pas démontré aujourd'hui. Cependant, MCT2 est exprimé au niveau des neurones entériques, comme au niveau du SNC, et médie les actions du butyrate sur l'homéostasie intestinale.

Le microbiote intestinal est détecté par les cellules gliales notamment au cours de pathologies inflammatoires. Cette détection induit en retour la restauration de la barrière intestinale, l'activation des cellules immunitaires et la modification du transit. En réalité, au cours de la vie post-natale, le microbiote joue un rôle essentiel dans le développement et la maturation des cellules gliales intestinales et donc leur fonctionnalité à l'état adulte [611]. Enfin, le lien entre les cellules gliales et les cellules endocrines n'est aujourd'hui pas très définit. Cependant, il a été montré, chez la souris, que les CEE pouvaient réaliser, *via* des neuropodes [612], des synapses avec les cellules gliales et que ces dernières pouvaient en retour, sécréter du NGF pour stimuler la production de ces pseudo-axones par les CEE [613].

### *e) Les neuropathies entériques*

Comme nous venons de le voir, le SNE joue un rôle prépondérant dans la fonctionnalité intestinale : transit, absorption, perméabilité, axe nerveux intestin-cerveau, immunité, … Une altération de sa fonction et de son intégrité mène à de graves pathologies telles que les maladies inflammatoires intestinales, les maladies d'origine génétiques comme la maladie de Hirshsprung (absence partielle ou totale de ganglions nerveux dans le côlon) ou la neuropathie diabétique. La plupart de ces pathologies sont caractérisées par un défaut neuronal menant à terme à une perte de l'intégrité épithéliale avec baisse de production de mucus et augmentation de la perméabilité et un contact anormal des cellules de la *lamina propria* avec des antigènes luminaux qui peuvent alors se retrouver dans le sang. Ces pathologies mènent également à terme à de gros problèmes de transit. Les défauts neuronaux peuvent être d'origine génétique, immunitaire ou nutritionnelle.

Dans le cadre des maladies métaboliques, toutes les cellules intestinales, dont les neurones, se trouvent au contact d'une plus grande quantité d'acides gras et de sucre d'origine alimentaire (luminale) ou d'origine sanguine. De nombreux travaux ont montré que ce contexte était délétère pour les neurones de l'ensemble du tractus digestif menant à la mort des neurones, un déséquilibre des neurones producteurs de NO et d'Ach, et un problème de transit. La prévalence de diarrhée chez les patients diabétiques est de 8-22% ; celle de la constipation de 29%, des douleurs abdominales de 11%, du reflux gastrique de 19%. Dans la plupart des cas, ces défauts du transit se trouvent souvent associés à une neuropathie diabétique périphérique. Aux stades avancés de DT2, 4 à 9% des patients souffrent d'incontinence fécale.

Chez le rat, une exposition chronique à un régime gras réduit la réponse neuronale aux acides gras tels que l'oléate au niveau du plexus sous-muqueux ou myentérique, mais également au niveau du tronc cérébral et de l'hypothalamus [614]. L'ingestion d'un régime gras induit un ralentissement du péristaltisme au niveau du duodénum, de l'iléon et du côlon notamment dû à une perte de neurones sous-muqueux et myentériques. Le palmitate, acide gras saturé, semble critique. Il induit *in vitro* la mort des neurones mais pas des cellules gliales. Il modifie la structure des ganglions avec des neurones moins nombreux et plus petits et des cellules gliales plus grosses. Ces altérations semblent associées à un stress mitochondrial ou du RE [615-618]. Les rats diabétiques montrent une baisse du nombre de neurones positifs pour la nNOS et la ChAT, conséquence d'une baisse du GDNF produit par les cellules gliales et de sa voie de signalisation [619]. Une étude *in vitro* confirme ce résultat. Elle montre que l'hyperglycémie induit une augmentation de la mort neuronale et que l'ajout de GDNF limite cet effet [620]. D'ailleurs, on observe une augmentation du nombre des protéines glyquées au niveau intestinal chez des rats diabétiques et ces molécules sont délétères pour les neurones entériques [621]. Ainsi, l'hyperglycémie ambiante ou un enrichissement en palmitate dans l'environnement proche des neurones semble délétère pour la survie des neurones intestinaux. Ces altérations

neuronales modifient le transit, la perméabilité intestinale et la physiologie globale de l'intestin, mais peuvent être également responsables de la perte de détection des nutriments et de l'activation de l'axe intestin-cerveau participant aux dérégulations périphériques du DT2 [614].

Les cellules gliales possèdent un rôle de soutien et de protection des cellules neuronales. Ainsi, on peut imaginer qu'une altération des cellules gliales puisse jouer un rôle dans les pathologies touchant le SNE. Lorsque l'on induit une gliopathie chez des rongeurs, on observe une diarrhée importante caractérisée par une baisse du nombre de neurones myentériques producteurs de NO, une augmentation du nombre de neurones myentériques producteurs d'Ach, une baisse du nombre de neurones sous-muqueux positifs pour le VIP et une infiltration immunitaire importante dans les plexi nerveux. On observe également une augmentation de la perméabilité [598]. Or, chez des souris sous régime gras, on observe une baisse du nombre de cellules gliales au niveau de l'intestin grêle [622]. On peut supposer que cette perte puisse avoir des actions délétères comme observées au cours de gliopathies.

Une des atteintes diabétiques en lien avec la neuropathie entérique et autonome est une altération de la vidange gastrique appelée *gastroparesie*. Cette maladie a été décrite dans un premier temps par un défaut des innervations extrinsèques de l'estomac [623] traduisant une modification de l'arc réflexe intestin-cerveau-estomac. Il semble également qu'il y ait un défaut des muscles lisses stomacaux (fibrose, dégénération, inclusion immunitaire). Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que les muscles intestinaux au contact du palmitate, l'accumulaient sous forme de gouttelettes puis mourraient [616]. Comme nous l'avons vu précédemment, le contexte lipidique et glucidique associé aux maladies métaboliques s'accompagne d'une perte neuronale au niveau de l'intestin. Au niveau de l'estomac, chez le rongeur et l'homme, on observe aussi une perte importante des neurones positifs pour la nNOS et une perte d'activité de l'enzyme [624]. Cette maladie empêche l'estomac de se vider correctement dans le duodénum, une bonne digestion par contraction stomacale des aliments, et induit une prolifération bactérienne par stagnation du bol alimentaire. Il est alors difficile de contrôler sa glycémie postprandiale car la gastroparesie engendre un flux continu et lent des nutriments au niveau du duodénum. Ceci empêche l'induction du pic hyperglycémique nécessaire à la régulation de la glycémie postprandiale par l'induction de la sécrétion d'insuline ou l'inhibition de la vidange gastrique mais également une sécrétion correcte de hormones gastro-intestinales [625].

#### *4. Détection intestinale du glucose*

Les cellules épithéliales sont en étroit contact avec les nombreuses molécules (lipides, glucides, protéines) présentes dans le lumen et essentiellement d'origine alimentaire ou bactérienne mais aussi de la desquamation de l'épithélium intestinal. Comme décrit précédemment, la détection de ces éléments est essentielle pour les fonctions

métaboliques de l'organisme. La détection du glucose intestinal a pour but principal de réguler le métabolisme glucidique postprandial.

Le glucose est détecté par différents types cellulaires au niveau intestinal : les cellules épithéliales, les CEE, les cellules nerveuses et les afférences autonomes toute en étroite relation entre elles (**Figure 6**). La détection du glucose au niveau épithélial s'effectue par différentes protéines senseurs (**Figure 7**). Les récepteurs couplés aux protéines G, T1R2 et T1R3 répondent aux fortes concentrations de glucose ou aux édulcorants artificiels. Leurs effets *in vivo* n'ont cependant pas été démontrés et il est possible que la détection du glucose, *via* ces récepteurs, induise l'augmentation de l'expression de certains transporteurs au glucose. La détection et l'absorption du glucose se fait aussi par les co-transporteurs glucose/$Na^+$, SGLT1/3. Le transport facilité du glucose à travers GLUT2 semble également impliqué dans les mécanismes de détection du glucose et de sécrétion des CEE [626].

Les CEE, stimulées par le glucose et impliquées dans la détection intestinale de glucose, sécrètent les incrétines comme le GIP, le GLP-1 ou le GLP-2, et la 5-HT [627, 628]. Plus récemment, il a été montré que l'apeline était sécrétée par les entérocytes en réponse au glucose [517]. Les mécanismes intracellulaires induits par le glucose sont identiques à ceux observés au niveau des cellules β et nerveuses (**Figure 7**). En effet, comme la cellule β, ces cellules expriment la sous-unité du $K_{ATP}$, Kir6.2, et le canal $Ca^{2+}$ voltage-dépendant de type L [488, 629] permettant le changement de potentiel de membrane activateur de l'exocytose des hormones. Mais il ne s'agit pas du seul mécanisme. L'absorption du glucose *via* SGLT1 permet aussi l'entrée de $Na^+$ et la faible variation du potentiel de membrane induite suffit à activer des canaux ioniques $Na^+$ puis $Ca^{2+}$ voltage-dépendant [488]. D'ailleurs, l'inhibition du transporteur SGLT1 par la phlorizine ou les souris invalidées pour SGLT1 diminue partiellement la sécrétion de la 5-HT et des incrétines [630, 631]. En réalité, cette fonction sécrétoire attribuée à SGLT1 serait réalisée par une autre protéine : le transporteur $Na^+$/glucose SGLT3. En fait, la fonction d'absorption du glucose serait attribuée uniquement au transporteur SGLT1 tandis que SGLT3 aurait plutôt le rôle senseur. Contrairement à SGLT1, SGLT3 est peu sensible au galactose. L'infusion intra-duodénale de galactose a un effet modeste sur la sécrétion de la 5-HT suggérant que seul le couple glucose/SGLT3 joue le rôle de senseur et d'inducteur de sécrétion hormonale [487]. L'expression des transporteurs au glucose est particulièrement augmentée au cours du DT2 de même que celle des récepteurs aux goûts T1R [632]. La modification de l'expression de ces transporteurs mène à terme au défaut de glycémie postprandiale mais également au défaut de sécrétion des hormones intestinales [633, 634].

Une fois la barrière épithéliale traversée, de manière transcellulaire ou paracellulaire, le glucose diffuse au niveau de la *lamina propria* où il se trouve au contact des neurones, des cellules gliales et du système immunitaire. Les deux plexi entériques sont stimulables directement par le glucose et les autres nutriments. Cependant, au cours des expériences de perfusion intestinale de nutriments, il a été montré que le glucose pouvait activer différemment les deux plexi. En effet, il semble qu'il active principalement le plexus sous-

muqueux sur tout le long de l'intestin grêle, tandis qu'il active uniquement le plexus myentérique du jéjunum. Il stimule préférentiellement des neurones nNOS positifs qui ont pour but de réduire les contractions musculaires et des neurones sensitifs, de type IPAN, positifs pour la calrétinine, protéine de liaison au $Ca^{2+}$ [546]. Pour mieux caractériser le lien moléculaire entre les neurones et le glucose, des études d'expression de récepteurs et transporteurs ont montré que les neurones intestinaux exprimaient SGLT1 et SGLT3 [635, 636]. L'effet du glucose sur les neurones entériques est assimilable à celui décrit au niveau des CEE : il modifie d'une part l'activité du canal $K_{ATP}$ en augmentant la quantité d'ATP intracellulaire [637] et d'autre part par son co-transport avec le $Na^+$ *via* SGLT, il peut modifier le potentiel de membrane. Les régulations induites par les nutriments sont d'adapter le péristaltisme, le flux sanguin, les sécrétions luminales, l'absorption des nutriments ou encore la perméabilité intestinale. D'ailleurs, à l'état postprandial, le péristaltisme iléal est augmenté par comparaison à l'état de jeûne [638]. D'autre part, le glucose, par l'activation du SNE, intervient comme régulateur de la sécrétion d'ions tels que le $Na^+$ ou le $Cl^-$ pour maintenir l'homéostasie ionique au niveau luminal [639]. Cependant, malgré ces études, l'influence du glucose sur les fonctions intestinales *via* la modulation de l'activité du SNE reste aujourd'hui à éclaircir.

L'activation du SNE par le glucose peut se faire également de manière indirecte *via* les sécrétions hormonales des EEC. En effet, la 5-HT, l'apeline, le GLP-2 ou le GLP-1 activent les neurones entériques *via* leurs récepteurs spécifiques [516, 640-642]. L'activation de ces neurones a des effets multiples comme l'absorption du glucose, le péristaltisme gastrique et intestinal, le contrôle de l'inflammation intestinale, les sécrétions luminales ou le flux sanguin.

Par les innervations extrinsèques intestinales, le glucose ou les hormones entéro-endocrines sécrétées en réponse au glucose peuvent informer le cerveau et réguler le fonctionnement des organes en périphérie, on parle de l'axe nerveux intestin-cerveau-périphérie. Cet axe régule la prise alimentaire, les fonctions intestinales par une boucle réflexe, la sécrétion d'hormones pancréatiques, la fonction métabolique des tissus, … L'activation du nerf vague par les nutriments absorbés ou les hormones sécrétées au niveau intestinal peut se faire sur les ramifications extrinsèques de l'intestin mais également les afférences de la veine porte entéro-hépatique. En effet, cette veine recueille des molécules provenant de l'intestin et son innervation permet d'envoyer des messages au cerveau. L'activation directe du glucose par le nerf vague se fait *via* les transporteurs au glucose GLUT (1, 3, 4), l'activité de la GK, l'activation des canaux $K_{ATP}$ et l'augmentation de $Ca^{2+}$ intracellulaire par l'activation des canaux $Ca^{2+}$ voltage-dépendant [197, 643]. L'invalidation du canal $K_{ATP}$ au niveau vagal altère les régulations périphériques telles que la vidange gastrique [644]. Tous comme le SNE, les afférences vagales peuvent être activées par les hormones entéro-endocrines pour le contrôle en périphérie. L'infusion intra-intestinale de glucose active à la fois les cellules EC sécrétant la 5-HT, le plexus myentérique, les ganglions nodaux du nerf vague, le NTS, le DMVx et l'AP et ces activations sont bloquées

par un inhibiteur du récepteur 5-$HT_3$ exprimé par le nerf vague ou un inhibiteur de SGLT3 uniquement exprimé au niveau des CEE [645]. Ceci traduit que le glucose a activé cet axe vagal intestin-cerveau *via* la sécrétion de 5-HT. De la même façon, un gavage de glucose active les cellules K et les cellules L, le plexi sous-muqueux et myentérique et les ganglions du nerf vague et cet effet du glucose était diminué chez des animaux diabétiques [646]. En terme d'incrétines, le nerf vague exprime uniquement les récepteurs au GLP-1 et au GLP-2 mais pas au GIP. Ainsi, seul le GLP-1 et le GLP-2 activent le nerf vague et l'hypothalamus [647, 648]. Enfin, la CCK, sécrétée en réponse aux protéines et aux lipides, est aussi une hormone intestinale capable de réguler de manière importante l'axe intestin-cerveau *via* le récepteur CCK1 [649]. Quelles sont les régulations induites en périphérie par modulation de l'activité vagale ? La 5-HT, le GLP-1, le GLP-2 ou la CCK sont capables de réguler par un arc réflexe la vidange gastrique [650-652]. Le GLP-1 peut induire la sécrétion d'insuline [653, 654]. La CCK régule également la production hépatique de glucose [655]. Enfin, la CCK, le GLP-2 et le GLP-1 peuvent réguler la prise alimentaire [234, 656, 657]. Dans le contrôle de la prise alimentaire par le nerf vague, il a été démontré que le SNE pouvait jouer un rôle [658]. La vagotomie troncale chez l'homme induit des défauts importants sur la vidange gastrique, la sécrétion d'insuline et la tolérance au glucose sans doute par un défaut de détection nutritionnelle au niveau intestinale [659], suggérant l'importance du nerf vague dans la régulation du métabolisme glucidique induite par les hormones intestinales.

Les hormones intestinales dont la sécrétion est induite par le glucose peuvent également agir de manière endocrinienne en rejoignant la veine porte irriguant le foie puis la circulation générale afin de cibler le pancréas, le cerveau, le tissu adipeux ou les muscles organes clés dans la régulation du métabolisme énergétique. Ces organes possèdent à leur surface des récepteurs aux hormones intestinales.

### *5. Conclusion*

L'intestin est un organe complexe dont le rôle est bien plus diversifié que de faire transiter les aliments de la bouche à l'anus en permettant l'absorption des nutriments. En effet, par ses neurones, ses innervations extrinsèques et ses CEE, il contribue à la détection des aliments et au contrôle du métabolisme glucidique en périphérie soit par l'activation d'un axe intestin-cerveau-périphérie, soit par libération des hormones intestinales dans la circulation générale. Lorsque les nutriments sont absorbés par l'intestin, ils peuvent contrôler l'activité du SNE puis du SNA, envoyant un message nutritionnel au niveau central de manière directe ou en stimulant la libération d'hormones intestinales. Ceci nécessite des neurotransmetteurs particuliers. Le contexte microbien et cytokinique ou l'activité des cellules gliales peuvent moduler ces activités nerveuses. Dans un contexte particulier comme les maladies métaboliques et le DT2, l'ensemble de ces éléments se trouve impacté et altéré et contribue à l'aggravation du phénotype diabétique.

## B. Les incrétines et le GLP-1

### *1. Introduction – La découverte des incrétines*

Le concept de molécules sécrétées par l'intestin en réponse aux nutriments pour le contrôle de la glycémie est suggéré depuis les années 1900. Bayliss et Starling montrent que l'acidité duodénale induit la sécrétion d'une hormone, sous le nom de sécrétine, régulant la libération d'insuline au niveau du pancréas. En effet, après dénervation de l'estomac, ils observent que l'acidité intestinale induit des sécrétions pancréatiques. Ils se disent alors que l'estomac produit une molécule en réponse à l'acidité gastrique qui circule dans le sang pour atteindre le pancréas et activer les cellules β. Pour vérifier cela, ils stimulent un estomac avec de l'acide, récupèrent des extraits de la paroi gastrique et réinjectent l'extrait dans un autre animal. Ils observent une nouvelle fois la production d'insuline. Ils appelèrent la molécule sécrétine puis définirent, pour la première fois, le terme « hormone » comme étant une molécule sécrétée à distance de son tissu cible et circulant dans le sang. Ce n'est que dans les années 1960 que McIntyre mesura la capacité du glucose à induire la sécrétion d'insuline en administrant le nutriment sucré en quantité identique soit dans le sang soit dans le tube digestif. Il montra que l'administration orale de glucose induit de manière plus importante (50 à 70%) la sécrétion d'insuline que lorsqu'il est administré en intraveineux [660]. Cet effet fut appelé l'effet incrétine – du terme « increase » en anglais ou « incrémentation » en français – permettant de décrire l'effet potentialisateur de l'intestin sur la sécrétion d'insuline. Ainsi, il existe un facteur intestinal capable d'être libéré en réponse au glucose et stimuler la sécrétion d'insuline. Une dizaine d'années plus tard furent définies et découvertes les incrétines. Le GIP est la première incrétine à avoir été découverte à partir d'extrait d'intestin de porc [661]. Cet extrait utilisé chez le chien a permis de montrer qu'il inhibait les sécrétions gastriques d'où son premier nom : gastric inhibitory peptide. Plus tard, on lui attribua un nouveau nom correspondant au nom actuel, pour une nouvelle fonction qu'on lui associa : cette hormone induit la sécrétion d'insuline chez l'homme et d'autres animaux.

Cependant quelques années plus tard, une étude montre que les personnes, dont certaines parties intestinales sont réséquées, présentent une réponse insulinémique différente suite à une charge orale en glucose en comparaison à des sujets sains, bien qu'ils aient des niveaux plasmatiques identiques de GIP. Ceci suggéra qu'il existerait une ou plusieurs autres hormones intestinales ayant cet effet incrétine [662].

La découverte du GLP-1 a été initiée par deux mouvances majeures des années 70-90 : les modifications post-traductionnelles et l'effet incrétine. En effet, on découvre que la diversification génétique de la cellule peut se faire autrement que par mutation de l'ADN. Elle peut se faire au niveau de l'ARN par épissage alternatif impliquant qu'un ARN peut donner plusieurs protéines et au niveau de la protéine par modifications post-traductionnelles impliquant qu'un fragment peptidique peut donner différentes protéines actives. On découvrit également qu'un même gène peut coder différentes protéines selon

le tissu. Ces phénomènes concernent les neurotransmetteurs, les hormones, les cytokines et les facteurs de différenciation cellulaire. Dans un premier temps, des études avaient montré, à partir de dosages protéiques spécifiques, que l'intestin contenait des protéines assimilables au glucagon. De la même façon, des cellules contenues dans l'épithélium intestinal étaient assimilables aux cellules $\alpha$ pancréatiques car elles étaient immuno-positives pour le glucagon ; elles furent appelées les cellules L. Il a été finalement montré que la libération du glucagon intestinal était induite par le glucose. Cependant, les dosages protéiques ont révélé une hétérogénéité très importante des résultats. Ce fût notamment les travaux de Holst et de Moody qui mirent en lumière les raisons de ces résultats. L'intestin produisait deux fragments protéiques assimilables au glucagon : l'oxyntomoduline et la glicentine. Les études sur la séquence protéique du glucagon et des différents fragments intestinaux ont montré que le glucagon était produit à partir d'un précurseur protéique, le proglucagon, par le pancréas et que la glicentine et l'oxyntomoduline étaient des peptides dérivés du même précurseur protéique mais sécrétés au niveau de l'intestin [663, 664]. Les analyses du gène et de l'ARNm codant le glucagon ont montré que ce gène pouvait produire deux autres protéines biologiquement actives appelées plus tard le GLP-1 et le GLP-2 [107, 665]. Le GLP-1 est donc découvert. Son effet sur la sécrétion d'insuline fut découvert au même moment : en injectant la protéine dans un pancréas isolé perfusé ou en mettant en contact des cellules pancréatiques avec l'hormone, le GLP-1, mais pas le GLP-2, induit la sécrétion d'insuline [666, 667].

Ainsi, l'intestin, en réponse à un repas, sécrète des hormones capables de réguler le métabolisme énergétique de la périphérie. Les incrétines ont pour rôle majeur de stimuler la sécrétion d'insuline. Pour cela, elles sont devenues très vite d'un grand intérêt pour le traitement du DT2. Les mécanismes d'action du GIP et du GLP-1 diffèrent. En effet, bien que les deux hormones stimulent la sécrétion d'insuline et inhibent la vidange gastrique en condition d'hyperglycémie postprandiale, le GIP a plutôt une action endocrine en agissant directement sur la cellule $\beta$ et l'estomac tandis que le GLP-1 recrute plutôt l'axe nerveux intestin-cerveau-périphérie pour induire ces deux actions. Le nerf vague exprime le GLP-1r mais pas celui du GIP [648]. Le GLP-1 et le GIP possèdent des demi-vies relativement courtes : elles sont estimées à 1,5-2min chez le rongeur (GIP : 5-7minute, GLP-1 : 3-5min chez l'homme). L'enzyme dipeptidylpeptidase 4 (DPP4) les dégrade sur leur site de sécrétion et dans la veine porte. Cependant, lorsqu'on infuse les deux hormones dans le sang, 40% du GIP reste intact *versus* 20% pour le GLP-1 montrant une moindre susceptibilité du GIP vis à vis de l'activité de la DPP4 et une demi-vie plasmatique plus importante [668-670]. D'autre part, l'action principale et majoritaire du GIP dans le métabolisme glucidique est la stimulation de la sécrétion d'insuline et de la vidange gastrique tandis que le GLP-1 régule également la prise alimentaire et la vidange gastrique et de manière minoritaire la production hépatique de glucose, la sensibilité à l'insuline, … De plus, le GIP active la lipogenèse ce qui contribue à augmenter la prise de poids. Enfin, au cours du DT2, lorsque l'on infuse les deux hormones en intraveineux en présence de

glucose, la stimulation de la sécrétion d'insuline par le GIP n'est pas maintenue tandis que celle du GLP-1 l'est, reflétant le maintien de l'action endocrine du GLP-1 [671]. Ainsi, le développement du GIP en tant que traitement antidiabétique a cessé. Les chercheurs et les entreprises pharmaceutiques ont vu dans le GLP-1 une nouvelle stratégie thérapeutique antidiabétique notamment par la diversité de ces actions sur le contrôle de la glycémie.

La compréhension des mécanismes de régulation de l'expression, de la maturation post-traductionnelle et de la sécrétion du GLP-1 a été permise par des techniques *in vivo* chez l'animal *via* l'ingestion de différents nutriments, molécules ou différents traitements, des techniques *ex vivo* sur des fragments d'intestin isolés ou bien des techniques *in vitro* sur des modèles cellulaires divers. Le premier modèle de cellule a été créé, en 1987, par le groupe de Brubaker, pionnier dans l'étude des mécanismes régulateurs de la production GLP-1. Ils ont isolé des cellules intestinales à partir de fœtus de rat qu'ils ont mises ensuite en culture. Cependant, la population cellulaire extraite était très hétérogène. Plus tard, en 1994 seront développées par Drucker, initiateur des études sur la production et l'action du GLP-1, les cellules GLUTag, Ces cellules murines expriment le gène du préproglucagon en très grande quantité et ont été immortalisées par l'antigène T de SV40. En 2008, le groupe de Gribble et Reimann a développé des souris exprimant la GFP (green fluorescent protein) sous le promoteur du préproglucagon, permettant d'isoler les cellules L par FACS (fluorescence-activated cell sorting) puis de les maintenir en culture. Enfin, il existe deux autres modèles cellulaires d'étude du GLP-1, les cellules humaines NC1-H716 et les cellules murines STC-1 [482-484]. Toutes ces cellules diffèrent en termes de sécrétion de GLP-1, soit au niveau de la sensibilité au glucose, soit sur les co-sécrétion hormonales, soit sur leur état de différenciation, mais ont permis de gagner en connaissance sur les mécanismes régulant la sécrétion de GLP-1.

### *2. L'expression intestinale du préproglucagon*

Le gène du préproglucagon (PPG) est commun au glucagon et au GLP-1. Il est exprimé à la fois au niveau des cellules $\alpha$ pancréatiques mais aussi au niveau des cellules L intestinales et des neurones du tronc cérébral et de l'hypothalamus. L'expression de ce gène permet la production d'un seul et unique ARNm qui est ensuite traduit en une séquence peptidique précurseur, le proglucagon, composé de 180 acides aminés.

L'expression du gène codant le préproglucagon dépend de la voie de signalisation impliquant l'AMPc, la PKA et EPAC2 [672, 673]. En effet, cette voie permet l'activation de la MAPK qui régule l'expression du gène. Le facteur de transcription PAX6 est important [674]. Les nutriments sont déterminants pour son expression. En effet, les expériences de jeûne puis renutrition chez le rongeur, ont montré qu'à jeun l'expression du gène était diminuée d'environ 20-40% selon les régions de l'intestin grêle et qu'elle ré-augmentait après renutrition [675]. Les triglycérides en infusion intra-intestinale augmentent également l'expression du PPG notamment au niveau du jéjunum [675].

Le microbiote semble déterminant pour l'expression du PPG. En effet, les souris axéniques montrent des altérations de son expression sur tous les fragments intestinaux [676]. Le traitement prébiotique et les métabolites microbiens tels que les AGCC augmentent l'expression du PPG [677-680]. Les autres hormones intestinales comme le GIP et le GRP peuvent également réguler l'expression du PPG. L'insuline est capable d'augmenter son expression [681]. Enfin, les cytokines modulent également l'expression de l'hormone : le TNFα diminue l'expression de l'ARNm [526] et l'IL6 l'augmente [525].

### *3. La maturation post-traductionnelle intestinale du proglucagon*

La séquence peptidique précurseur, le proglucagon, subit une importante modification post-traductionnelle : elle est clivée en différentes protéines actives ou inactives. Le clivage de ce précurseur dépend de l'expression de certaines proconvertases exprimées de façon tissu-spécifique. En effet, au niveau des cellules L de l'intestin, il y a expression de PC1/3 alors qu'au niveau des cellules α il s'agit de l'expression de PC2. Ainsi, les séquences peptidiques produites et donc les protéines sont différentes suivant les tissus.

Au niveau des cellules L, la PC1/3 permet la production de la glicentine (1-69), de l'oxyntomoduline (33-69), du GLP-2 (76-107/108), de l'IP2 (intervening peptide 2) et du GLP-1 (126-158). Ils sont tous co-sécrétés et ont tous une activité biologique démontrée sauf l'IP2. L'oxyntomoduline peut inhiber les sécrétions gastriques, les sécrétions exocrines pancréatiques et limiter le transport d'ions et de certains nutriments comme le glucose au niveau de l'épithélium intestinal [682]. Le GLP-2 régule également le transport intestinal d'ions et de glucose [683], réduit la prise alimentaire [657], module la contractilité intestinale et gastrique en agissant sur des neurones cholinergiques et nitrinergiques localisés au niveau du duodénum [684], possède un rôle anti-inflammatoire protégeant les neurones entériques et diminuant l'endotoxémie [472, 685] et stimule la prolifération des cellules épithéliales [686]. Le GLP-1 joue un rôle sur le métabolisme périphérique et le maintien de l'intégrité intestinale (actions décrites dans la suite du chapitre). La glicentine aurait un effet trophique sur l'épithélium intestinal [687]. Parmi tous ces peptides actifs, seuls le GLP-1 et le GLP-2 sont connus pour posséder des récepteurs spécifiques.

L'expression des proconvertases est essentielle dans la production des différentes hormones. Les souris invalidées pour la PC1/3 ne produisent ni de GLP-1, ni de GLP-2 et sont décrites comme ayant une taille diminuée (elles font 60% de la taille normale) associée à une obésité marquée. Les souris hétérozygotes pour la délétion sont intolérantes au glucose [688]. Certains patients possèdent également une mutation sur l'enzyme la rendant inactive ou absente. Ils sont obèses, hyperphagiques et possèdent une dysfonction des sécrétions entéro-endocrines et du transit intestinal [689].

Certaines modulations sont possibles pour les expressions de PC1/3 et PC2. En effet, dans certains contextes, les cellules α peuvent exprimer PC1/3 et sécréter du GLP-1. Ceci est observé au cours du développement embryonnaire du pancréas, lors de la destruction des cellules β comme au cours du diabète ou induite par l'exposition à des

cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 [525, 690]. Le microbiote peut également contrôler l'expression de ces enzymes. En effet, un traitement prébiotique (FOS) augmente son expression [680].

### *4. La sécrétion du GLP-1*

Les stimulateurs de la sécrétion de GLP-1 sont divers : nutritionnels (glucose, acides gras mono-insaturés, acides aminés essentiels, fibres alimentaires, goûts), nerveux (neurotransmetteurs tels que l'Ach), hormonaux, cytokiniques ou microbiens.

Chez l'homme et chez le rongeur, la sécrétion de GLP-1 est biphasique : le premier pic est atteint 10-15min après une prise alimentaire alors que le second a lieu tardivement 30 à 60min après. Dans le sang systémique, la concentration plasmatique de GLP-1 actif est de 5 à 10pmol/L chez l'homme et augmentée de 2-4 fois après la prise d'un repas. Le pourcentage d'augmentation peut varier suivant le type et la proportion de certains nutriments. Chez l'homme, il est difficile de déterminer la quantité de GLP-1 au niveau de la veine porte, veine récoltant les hormones intestinales mais on admet que 25% du GLP-1 sécrété atteint la veine porte et que 5 à 10% atteint le sang systémique [691]. Ainsi, après un repas, chez l'homme, on peut estimer que la concentration portale du GLP-1 actif oscille entre 50 et 100pM. Chez la souris, 15 minutes après un gavage de glucose, la concentration portale est d'environ 2pM.

La première phase de sécrétion du GLP-1 ne peut pas être induite par le contact direct des nutriments sur les cellules car ces cellules sont localisées dans l'intestin distal et le chyme n'a pas le temps d'y arriver. Comme cité plus tôt dans ce chapitre, des études ont montré que des hormones duodénale (5-HT, GIP, CCK, apeline, …) pouvaient contrôler la sécrétion de GLP-1 soit directement, soit par la modulation de l'activité du SNE, soit par l'intermédiaire d'un axe intestin-cerveau-intestin *via* le relai du nerf vague. On parle de boucle régulatrice duodéno-iléale [520]. Le nerf vague ou même le SNE sont déterminants dans la genèse de cette boucle puisqu'inhiber les récepteurs muscariniques empêche la sécrétion de GLP-1 induite par les nutriments (glucose, lipides, …), tandis que les agonistes de ces récepteurs la stimulent [523, 692]. D'autre part, un travail récent a montré que le SNC et le SNA pouvaient augmenter la sécrétion de GLP-1 et PYY par l'intermédiaire de l'αMSH (α-melanocyte-stimulating hormone) et de ses dérivés - ACTH, γMSH (γ-melanocyte-stimulating hormone), … - qui agissent alors sur le récepteur MC4R (melanocortin 4 receptor) exprimé par les cellules L. Ce récepteur est le second récepteur couplé aux protéines G le plus exprimé par ces cellules [693]. La seconde phase plus tardive, est, quant à elle, due au contact direct des nutriments ou même des acides biliaires libérés pour la digestion des lipides sur les cellules L.

Comme vu précédemment, le glucose module la sécrétion de GLP-1 *via* SGLT1/3, GLUT2 ou les récepteurs au goût sucré T1R [486, 488]. Une publication récente a d'ailleurs montré que l'ingestion de certains édulcorants comme l'erythritol ou le xylitol induisait la sécrétion de GLP-1 modifiant la vidange gastrique [694]. D'autres sucres comme le fructose

peuvent également, chez l'homme et le rat, augmenter la sécrétion de GLP-1 *via* sa métabolisation et la production d'ATP [695]. Les autres nutriments peuvent également stimuler la sécrétion de GLP-1 : les peptides *via* les transporteurs aux peptides PEPT [696], les acides gras libres de moyenne à longue chaine *via* GPR40 et GPR120 [697, 698] ou même des dérivés lipidiques comme les monoacylglycérol *via* GPR119 [699]. La glutamine *via* un symport glutamine/$Na^+$, l'ornithine *via* GPRC6A ou la phénylalanine *via* CaSR sont des acides aminés capables chez le rongeur et chez l'homme de stimuler la sécrétion de GLP-1 [489, 700, 701].

Les bactéries peuvent également contrôler la sécrétion de GLP-1. Les souris axéniques possèdent des altérations d'expressions et de sécrétions du GLP-1 [676]. Les stimulations bactériennes peuvent se faire par les AGCC qu'elles produisent à partir de fibres alimentaires et qui vont alors activer les récepteurs FFAR2 et FFAR3 stimulant la sécrétion de GLP-1 [493, 702]. De plus, des traitements prébiotiques modifient la sécrétion de GLP-1 [680, 703]. Un autre métabolite bactérien a été suggéré comme régulateur de la sécrétion de GLP-1 : l'indole [704]. Ce métabolite est produit à partir du tryptophane par certaines bactéries et module l'activité des canaux voltage-dépendant. Des fragments de la paroi bactérienne de type LPS peuvent également stimuler la sécrétion de GLP-1. En effet, l'endotoxémie peut induire une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose oral que l'on explique par l'augmentation de la sécrétion de GLP-1 [498, 705]. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la sécrétion de GLP-1 induite par les LPS reste aujourd'hui à éclaircir : mécanismes dépendants des TLR ? Par l'intermédiaire des cytokines ? Par l'intermédiaire de modifications d'expressions de protéines senseur des nutriments ? Ces différentes possibilités ont été en partie démontrées. Les fragments bactériens peuvent effectivement influencer la sécrétion de GLP-1 en modifiant l'expression de certains récepteurs aux nutriments comme le récepteur GPR120 [502] ou en modifiant le contexte cytokinique en induisant par exemple l'augmentation de l'IL6 ou de TNF$\alpha$ [525, 526, 705]. D'autre part, les expressions des récepteurs T1R3, SGLT1, GPR40, 41, 43, et 120 peuvent être altérées chez les souris axéniques [492, 503]. Enfin, une étude récente a montré qu'une protéine bactérienne, la ClpB (caseinolytic protease B) était un mimétique de l'$\alpha$MSH et pouvait moduler la sécrétion de GLP-1. Cette protéine est augmentée en période postprandiale [706].

Certaines hormones périphériques peuvent également contrôler la sécrétion de GLP-1. La leptine stimule la sécrétion de GLP-1 *via* son récepteur, *in vivo* et *in vitro*, chez le rongeurs et l'homme [522]. L'insuline est également capable de stimuler la sécrétion de GLP-1 *via* la voie PI3K/Akt et *via* la voie MAPK [707, 708]. Enfin, le glucagon semble inhibiteur de la sécrétion de GLP-1. En effet, les souris invalidées pour le récepteur au glucagon montrent une augmentation de la sécrétion de GLP-1 [709]. L'AMPK semble, comme le glucagon, inhibitrice de la sécrétion de GLP-1 [710].

Le GLP-1 est capable de stimuler sa propre sécrétion. En effet, les cellules L expriment à leur surface le GLP-1r [711] et les souris invalidées pour le récepteur montrent une diminution de la sécrétion de GLP-1 en réponse au glucose [519].

La régulation de la sécrétion de GLP-1 par ces différentes molécules peut se faire de deux manières (**Figure 6**) : soit en modifiant le potentiel de membrane qui induit alors l'entrée de $Ca^{2+}$ extracellulaire, soit en mobilisant le $Ca^{2+}$ en provenance du RE. Les mécanismes impliquent des changements de polarisation au niveau de la membrane qui peuvent être dépendants de l'activation des $K_{ATP}$ activés après métabolisation des nutriments comme c'est le cas du fructose ou alors directement par les flux de $Na^+$ induit par l'entrée de glucose *via* SGLT1/3 ou l'entrée de glutamine *via* son transporteur ; ou encore par l'activité de PEPT et le flux de $H^+$. Les protéines senseurs peuvent être également couplées aux protéines G de type Gαs (GPR119) activant la voie AC/AMPc/PKA modulant, entre autres, l'activité du canal $K_{ATP}$, de type Gαi (FFAR2/3, somatostatine) inhibant cette voie, ou de type Gαq (FFAR1/2, GPR120, CaSR, GPRC6A …) ou encore couplées à la gustudicine (T1R) activant la voie PLC/$IP_3$ permettant la libération de $Ca^{2+}$ provenant du RE.

Différentes formes de GLP-1 sont sécrétées : GLP-1 (1-37), (1-36) $NH_2$, GLP-1 (7-37) ou (7-36) $NH_2$ et elles sont toutes biologiquement actives. Les formes amides sont les plus représentées chez l'homme et la présence d'un amide les rend plus stable. Le GLP-1(1-37) a la capacité de reprogrammer les CEE en cellules sécrétrices d'insuline [712].

### 5. *La dégradation sanguine du GLP-1*

La demi-vie du GLP-1 sécrété est estimée à 2 minutes, chez le rongeurs et 3-5 minutes chez l'homme. En effet un fois libéré, il est dégradé rapidement par une serine protéase, la DPP4, aussi appelée CD26. Cette enzyme coupe des dipeptides en terminaison amine des protéines ayant en position 2 une alanine ou une proline. Le dipeptide libéré inhibe en retour la DPP4. Cette enzyme transforme donc le GLP-1 actif en GLP-1(9-37) ou (9-36)$NH_2$ [668]. Cette enzyme existe sous deux formes : soluble ou transmembranaire. Elle est exprimée par de nombreux tissus dont les lymphocytes, les macrophages circulants dans le sang ou résidants dans l'intestin et les cellules endothéliales. Ainsi, une fois sécrété, le GLP-1 se trouve rapidement en contact de la DPP4 présente dans la *lamina propria* puis dans les vaisseaux mésentériques et dans le système porte. Cette dégradation fait que la concentration de l'hormone décroit rapidement de son site de sécrétion à la circulation systémique [670, 713]. Des souris invalidées pour la DPP4 montrent une meilleure tolérance au glucose et une augmentation de la sécrétion d'insuline par l'augmentation de la demi-vie du GLP-1 actif [713]. Ainsi, une fois sécrété par les cellules L, on estime que 25% du GLP-1 reste actif en rejoignant le foie. Cependant, le foie possède une forte capacité de dégradation du GLP-1 et on estime alors que seulement 5-10% de GLP-1 actif sort du foie et rejoint les organes cibles par la circulation sanguine [691]. Une autre enzyme a été démontrée comme déterminante dans la dégradation du GLP-1 : la NEP24.11. Cette

enzyme est une métalloprotéase liée à la membrane des cellules et très concentrée au niveau du rein. Elle n'a pas de spécificité particulière. Elle permet l'épuration du GIP et du glucagon [714].

Les produits de dégradation du GLP-1 actif sont rapidement éliminés par voie rénale (demi-vie estimée à 5min). Des patients atteints d'insuffisance rénale présentent une augmentation des métabolites de dégradation du GLP-1 au niveau plasmatique [715].

### *6. L'homéostasie des cellules L*

Le nombre de cellules L croît selon un axe antéro-postérieur avec une forte abondance dans le côlon. Les bactéries intestinales jouent un rôle trophique sur ces cellules. En effet, les souris axéniques présentent une augmentation du nombre de cellules L dans l'iléon, dans le côlon et également dans le caecum [492, 676]. La recolonisation de ces souris avec de la flore de souris contrôles suffit pour diminuer leur nombre [676]. De plus, un traitement prébiotique augmente le nombre de cellules L suggérant que les AGCC pourraient jouer un rôle [716]. Ceci paraît paradoxal puisque les AGCC proviennent du microbiote, or les souris dépourvues de microbiote possèdent également une augmentation du nombre de cellules L. Les facteurs modifiant les cellules L, chez les souris axéniques ou chez les souris traitées aux prébiotiques, semblent donc provenir de voies différentes.

Le GLP-1 et les autres hormones dérivées du glucagon semblent également exercer un effet trophique sur les cellules L. En effet, les souris invalidées pour le récepteur au glucagon montrent une augmentation de 2-3 fois des cellules L dans l'iléon tandis que la quantité des autres CEE reste inchangée. Cet effet semble être médié par le GLP-1 puisque les souris invalidées pour le récepteur au glucagon montrent une augmentation de GLP-1 plasmatique et l'utilisation de l'exendine 9-39, antagoniste du GLP-1r, chez ces souris diminue l'effet de l'invalidation génétique sur les cellules L [709].

À l'inverse, l'AMPK semble empêcher la prolifération des cellules L. En effet, l'invalidation de la kinase chez le rongeur induit l'augmentation de la quantité de cellules L et suffit à améliorer la tolérance au glucose [710]. Ceci pourrait passer par la voie proliférative mTORC inhibée par l'AMPK.

Enfin, chez les rongeurs ayant subi une chirurgie bariatrique, le nombre de cellules L semble augmenter dans l'intestin grêle. Ceci pourrait suggérer qu'un contact précoce et plus important de l'épithélium iléal avec les nutriments induit une prolifération de cellules L [717].

Le précurseur des cellules L provient du même précurseur que les cellules sécrétant la CCK, le PYY, le GIP ou la sécrétine. Les cellules épithéliales intestinales et donc les CEE sont en renouvellement perpétuel. Les voies de différenciation de ces cellules pourraient dépendre de l'environnement immédiat : bactéries, cytokines, hormones ou nutriments [718]. Cependant les mécanismes restent encore à éclaircir.

### 7. *Le GLP-1 au cours du DT2*

Pour son rôle sur la glycémie et notamment sur la sécrétion d'insuline, la mesure de la concentration plasmatique du GLP-1 au cours du DT2 a été primordiale afin d'étudier une possible dérégulation de son métabolisme dans la pathologie. Cependant, les difficultés de mesure font qu'aucun consensus n'est aujourd'hui établi et sa concentration plasmatique au cours du diabète est très controversée. En effet, certaines études, chez l'homme et les rongeurs, ont montré une augmentation de la concentration [719-721], d'autres une absence de variation [634, 722] et d'autres une diminution [723]. Ces variations peuvent dépendre de différentes choses : l'âge et l'avancée du diabète, l'état de jeûne ou l'état nourri, le contexte cytoplasmique ou également le fait que le sang soit prélevé en veine systémique et non pas en veine porte, lieu où le GLP-1 est le plus concentré. Pour limiter ces biais, il faudrait suivre des patients ou des animaux à différents stades du diabète et étudier la valeur du GLP-1 plasmatique de l'état prédiabétique à l'état diabétique avancé, induire le même stimulus nutritionnel et enfin mesurer le sang en veine porte. La résistance à l'insuline et à la leptine observée au cours des maladies métaboliques, l'état inflammatoire, l'augmentation des senseurs au glucose ou les altérations nerveuses sont des facteurs confondants et expliquent aussi l'hétérogénéité des quantités de GLP-1 mesurées.

La variation du nombre de cellules L au cours du DT2 semble aussi controversée. Dans certains cas, la quantité de cellules L semble augmenter dans tous les fragments intestinaux [724], tandis que dans d'autre cas et notamment chez l'homme, elle ne semble varier [725]. De la même manière, la quantité et l'activité de la DPP4 ne sont pas clairement déterminées. En effet, au cours du DT2, la quantité et l'activité de la DPP4 dans le sang augmentent dans certain cas [726], diminuent dans d'autres cas [727] et varient suivant l'état d'avancée du diabète [728]. Ainsi, ces études semblent mettre en évidence un manque de consensus sur des dérégulations de la production et de la dégradation de GLP-1 au cours du DT2.

Dans des expériences *in vitro*, des cellules GLUTag ont été mises au contact d'un milieu riche en glucose et en lipides pendant plusieurs heures. Les cellules ne résistent pas à ce contexte au même titre que les cellules β. En effet, on observe une augmentation du stress oxydant, du stress du RE qui mène à terme à l'apoptose. La sécrétion de GLP-1 est diminuée sans variation de l'expression du gène du préproglucagon [729, 730]. Le problème majeur de l'analyse *in vitro* est qu'elle restreint le champ d'analyse. En effet, le DT2 est associé à un changement du contexte nutritionnel au niveau plasmatique certes, mais également à des variations hormonales, cytokiniques et bactériennes. Les LPS, les cytokines IL6 ou TNFα modulent la sécrétion de GLP-1 en exposition aigüe mais qu'en est-il en exposition chronique ? Ces questions restent à éclaircir et permettront de définir les possibles altérations associées au DT2.

## C. Actions nerveuses et endocrines du GLP-1

### 1. *Introduction*

Comme nous l'avons vu, le GLP-1 est une hormone intestinale impliquée dans la régulation du métabolisme glucidique dont l'action principale est de diminuer la glycémie. Le GLP-1 agit de deux manières : nerveuse ou endocrinienne. Une fois sécrété par les cellules L, il se retrouve dans la *lamina propria*. Il peut y activer les afférences du nerf vague également présentes dans la paroi de la veine porte. Il active alors un axe nerveux intestin-cerveau. Le nerf vague véhicule alors un message intestinal au tronc cérébral puis à l'hypothalamus qui, après avoir intégré l'information, la véhicule vers des organes cibles en périphérie. Une fois dans la *lamina propria*, il peut rejoindre la circulation sanguine générale *via* les capillaires présents dans les villosités intestinales, puis la veine porte. En rejoignant la circulation sanguine ; il active de manière endocrine directement les organes cibles exprimant le GLP-1r. Comme expliqué précédemment, l'activité de la DPP4 à proximité des cellules L et au niveau de la circulation limite l'action endocrine du GLP-1. On estime que l'action du GLP-1 est à 80-90% nerveuse et à 10-20% endocrinienne [691].

Le GLP-1 possède 3 actions principales : stimuler la sécrétion d'insuline, diminuer la vidange gastrique et la prise alimentaire. Par ces trois mécanismes, il garantit la diminution de la glycémie particulièrement en état postprandial. Il possède également des rôles plus modestes : la régulation de la production hépatique de glucose, l'augmentation de la sensibilité à l'insuline, des effets trophiques sur les cellules β, les neurones, l'endothélium et l'épithélium intestinal, le contrôle du transit intestinal, le contrôle des autres sécrétions entéro-endocrines, le contrôle de la fonction cardiaque et de la vasodilatation, …

L'importance du GLP-1 dans le contrôle de la glycémie a été mise en évidence sur des modèles murins invalidés pour son récepteur ou par l'utilisation d'antagonistes du GLP-1r, l'exendine 9-39. Les souris invalidées pour le GLP-1r montrent une hyperglycémie à jeun, des intolérances orales et intra-péritonéales au glucose associées à un défaut de sécrétion d'insuline [731]. Chez des personnes saines, l'utilisation de l'exendine 9-39 induit une hyperglycémie à jeun, une augmentation du glucagon, une baisse de la production d'insuline induite par le glucose [732].

### 2. *Le GLP-1r, ses voies de signalisation, son action endocrine.*

Le GLP-1r est un récepteur couplé aux protéines G tout comme celui du glucagon, du GLP-2, du GIP et de nombreuses hormones intestinales. Ce récepteur possède une affinité pour toutes les formes de GLP-1, soit GLP-1(1–37), GLP-1(1–36) $NH_2$, (7–36) $NH_2$, et le GLP-1(7–37), mais également pour l'oxyntomoduline. Ce récepteur est caractérisé par une longue extrémité N-terminale cytosolique avec une région hélice α et 7 domaines transmembranaires. La région N-terminale joue un rôle essentiel dans la liaison avec les différentes molécules affines pour le récepteur *via* leur extrémité C-terminale.

Dans quels tissus le GLP-1r est-il exprimé ?

Depuis la découverte du GLP-1, beaucoup de scientifiques ont cherché à définir les tissus où est exprimé ce récepteur. Comme pour la plupart des récepteurs et protéines, les analyses d'expression du GLP-1r se sont basées sur des techniques d'immunohistologie ou de western blot utilisant des anticorps ciblés contre le GLP-1r. Cependant, tous les anticorps actuellement disponibles commercialement ont montré des cellules ou des tissus positifs chez les souris invalidées pour le GLP-1r remettant en cause leur spécificité pour le récepteur. Des techniques d'hybridation in situ ciblant l'ARNm du GLP-1r ont été utilisées mais montrent une faible sensibilité surtout lorsque la cible cellulaire est faiblement enrichie en ARNm cible. L'utilisation de ligands marqués (fluorescence ou radioactivité) a été envisagée mais bien que fonctionnelle, cette technique montre, comme pour l'hybridation *in situ*, une sensibilité limitée [733]. Suite à cette controverse, notamment sur le manque de spécificité des anticorps, certains chercheurs ont proposé l'existence de différentes isoformes de GLP-1r. En 2014, le groupe de Fiona Gribble a créé une souris exprimant une protéine fluorescente sous le promoteur du GLP-1r ([734],commenté dans [735]). Grâce à ce modèle, on a pu définir pour la première fois les lieux d'expression du GLP-1r : les cellules β et δ pancréatiques (très faible au niveau des cellules α), l'endothélium et les cellules musculaires lisses des vaisseaux, le pylore et l'antrum gastriques, les neurones entériques, le nerf vague, les afférences sympathiques sensitives émanant de la moelle épinière, l'hypothalamus, le tronc cérébral et les tissus nerveux cardiaques. Il y avait une importante controverse sur l'expression du GLP-1r au niveau des hépatocytes. Cette étude révèle que les hépatocytes murins n'expriment pas le GLP-1r. Sa présence sur les cellules immunitaires n'a pas été analysée dans cette étude.

Le GLP-1r est un récepteur couplé à de nombreuses protéines G, Gαs, Gαi/o ou Gαq [736, 737]. La voie la plus décrite est celle associée à la cellule β impliquant la protéine Gαs. Chez les souris invalidées pour le GLP-1r KO, on observe une altération de la production d'AMPc induite par les GLP-1 et une altération de la réponse calcique au niveau des cellules β [738]. De manière globale, le GLP-1r une fois activé permet l'activation de la PKA, la PKC, la PI3K, l'AKT, EPAC2 ou des voies MAPK (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1/2) et induit des modifications de la concentration intracellulaire de $Ca^{2+}$ [739-741]. Cependant, le GLP-1r est capable d'induire une voie indépendante des protéines G impliquant la β-arrestine, protéine d'ancrage à la membrane, également capable de stimuler la production AMPc et d'activer la voie ERK, CREB et IRS2 [742, 743]. Le GLP-1 peut avoir différents effets suivant le recrutement de la protéine G ou de la β-arrestine. Par exemple, lorsque la protéine G est recrutée, la PKA est activée et active à son tour les protéines ERK. Ces dernières transitent alors vers le noyau où elles régulent l'activation ou l'inhibition de facteurs de transcription. Dans le cas où la β-arrestine est recrutée, alors les ERK activées restent dans le cytoplasme et modulent par phosphorylation l'activité des substrats cytosoliques.

#### *a) Effet direct sur la cellules β*

En plus de stimuler la sécrétion d'insuline induite par le glucose [666], le GLP-1 garantit l'homéostasie des cellules β et des granules d'insuline. Le contrôle de la sécrétion d'insuline est permis grâce à la production de l'AMPc et l'activation de la PKA et de EPAC2. De plus, l'activité du GLP-1r promeut la trans-activation du récepteur EGFR (epidermal growth factor receptor) menant à l'activation de la PI3K, IRS2, AKT et de la PKC impliquées aussi dans la production et la sécrétion d'insuline. De la même façon, son interaction avec la β-arrestine favorise la sécrétion d'insuline [742].

L'activation de l'ensemble de ces voies permet de maintenir la dépolarisation membranaire induite par le glucose et une augmentation plus intense de la concentration intracellulaire en $Ca^{2+}$ *via* 1) le maintien de la fermeture de canal $K_{ATP}$ potentialisant l'effet du glucose sur la dépolarisation membranaire, 2) l'activation des canaux calciques au niveau du RE, 3) l'inhibition des canaux $K^+$ permettant la repolarisation et 4) l'augmentation de la production d'ATP au niveau de la mitochondrie [744]. D'autre part, le GLP-1 peut avoir des effets à plus long terme sur la sécrétion d'insuline. Il stimule l'expression de la sous-unité Kir.6.2 du canal $K_{ATP}$, des transporteurs au glucose GLUT2 et de la GK [745].

Le GLP-1 a également une influence sur l'expression de l'insuline : il stimule l'expression du gène codant l'insuline et stabilise l'ARNm, contribuant ainsi à l'homéostasie des granules de réserve [739]. Ces régulations passeraient par l'augmentation de l'expression de PDX-1 et sa fixation sur son promoteur ou par la potentialisation de l'effet du glucose sur la production d'insuline [131, 746, 747].

Enfin, le GLP-1 contribue à la survie et à la prolifération des cellules β : il inhibe les voies pro-apoptotiques et active des facteurs de transcription impliqués dans les voies de différenciation et de prolifération. En effet, dans un contexte cytotoxique (cytokines pro-inflammatoires, glucotoxicité, stress du RE, …) le GLP-1 limite l'apoptose des cellules β [743, 748-750]. Les effets anti-apoptotiques du GLP-1 sont associés à une baisse des protéines apoptotiques (Bcl2) ou de leur état activé phosphorylé (bad) dans le cytosol. L'induction de la prolifération par le GLP-1 passe par la voie dépendante de PDX-1. En effet, chez les animaux invalidés pour PDX-1, le GLP-1 ne peut plus induire la prolifération des cellules β [131]. L'effet proliératif peut passer par l'induction de la voie EGFR activant alors la PI3K puis ERK et la PKC. Ces protéines activent à leur tour l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, l'inhibition de FOXO1 inhibiteur de l'expression de PDX-1 [751].

#### *b) Effet direct sur les cellules endothéliales et les neurones entériques*

Le GLP-1r est très exprimé au niveau de l'endothélium. Il semble que son effet soit multiples : il favorise la prolifération des cellules endothéliales, leur protection dans des contextes lipotoxiques ou inflammatoire et l'angiogenèse [751-755] et la vasodilatation [756-758]. Pour cela, le GLP-1 active la eNOS par phosphorylation et la production de NO. Les phosphorylations seraient médiées par différentes kinases : dépendante de l'Akt

(phosphorylation de la eNOS sur la Ser 1177), dépendante de l'AMPK, dépendante de la PKC ou encore dépendante de la PKA (phosphorylation de la eNOS sur la Ser 1177) [753, 754, 756, 759-761]. Les effets vasodilatateurs seraient responsables de l'augmentation de la sensibilité à l'insuline en périphérie et de la capture du glucose par le muscle [758, 760]. Les petits vaisseaux de l'intestin semblent exprimer en très grande quantité le GLP-1r suggérant que le GLP-1 pourrait jouer un rôle non négligeable sur l'absorption des nutriments [734].

Le GLP-1 est capable de réguler la vidange gastrique et la motilité intestinale. Pour la vidange gastrique, le GLP-1 contribue à la relaxation de l'estomac proximal et à une diminution de la contractilité antrale et duodénale favorisant ainsi l'entrée du bol alimentaire dans le duodénum, zone d'absorption du glucose, et le pic glycémique postprandial. Ce pic est nécessaire pour une sécrétion correcte de l'insuline en période postprandiale. Son effet sur la motilité gastrique est diminué chez des patients atteints de gastroparesie [762]. La régulation de la vidange gastrique par le GLP-1 est, comme au niveau endothélial, dépendante du NO [762, 763]. Les souris possédant le GLP-1r fluorescent ont permis de mettre en évidence qu'au niveau du tube digestif le récepteur était exprimé en très grande quantité sur des neurones positifs pour NOS et connus pour induire la relaxation des muscles lisses du tube digestif. La même étude a d'ailleurs montré que le GLP-1 était capable d'exciter les neurones entériques en augmentant le nombre de potentiels d'action [734]. D'autre travaux ont également montré que le GLP-1 pouvait ralentir le transit de l'intestin grêle et du gros intestin *via* la production de NO [676, 764].

Ainsi, le GLP-1, en activant la NOS, peut produire du NO et réguler des mécanismes endothéliaux et neuronaux.

#### *c) Effet direct sur les neurones centraux*

Le GLP-1 est une molécule produite en périphérie par les cellules L et au niveau central par des neurones hypothalamiques ou du tronc cérébral (NTS, LHA, PVH, ...). Le GLP-1r est présent au niveau hypothalamique [734]. Le GLP-1 est une molécule relativement petite capable, une fois dans le sang, de traverser la BHE et de stimuler directement les neurones cérébraux pour essentiellement réguler la prise alimentaire [765-767]. Les neurones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire au niveau central sont de type $\alpha$-MSH (ou $\alpha$ melanocyte stimulating hormones) /POMC (propiomelanocortin) et de type neuropeptide Y (NPY) pour ceux situés au niveau de l'ARC, de type neurotensin au niveau du PVN, et de type ghreline au niveau de l'ARC, PVN et PVH [768]. Il a été également montré que le GLP-1 cérébral pouvait stimuler la sécrétion d'insuline et favoriser le stockage du glycogène au niveau hépatique [238, 769].

Quelle est la voie intracellulaire impliquée ? Dans un premier temps, il a été montré que l'activation des neurones hypothalamiques induisait une augmentation de l'AMPc intracellulaire et une activation de la PKA [768] mais une étude récente a décrit la voie que le GLP-1 pouvait activer au niveau des noyaux hypothalamiques, notamment pour le contrôle de la prise alimentaire. Ce travail a montré que le GLP-1 injecté en ICV active la

PKA dans les neurones du NTS. La voie PKA active alors la voie des kinases ERK1/2 et inhibe la voie AMPK. Les deux voies induites pourraient activer les voies de transcription dépendantes de CREB. Pour la première fois, une voie neuronale induite par le GLP-1 est ainsi décrite [770]. D'ailleurs, au niveau cérébral, ces voies semblent capables de moduler la production de NO *via* l'activation ou l'inhibition de la nNOS [771-773].

Le GLP-1 possède également un effet protecteur et neurotrophique sur les neurones. Il permet la prolifération mais aussi l'inhibition de l'apoptose des cellules neuronales, favorise le développement des dendrites et protège contre le stress oxydatif [774, 775] ou réduit l'accumulation des plaques d'amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer [775]. Il possède des propriétés neuro-protectives dans les neuropathies périphériques comme la neuropathie diabétique [776]. Le GLP-1r est exprimé au niveau de l'hippocampe, et semble favoriser les processus d'apprentissage et de mémoire [777]. En plus, de favoriser les connexions et la survie neuronales, le GLP-1 est également capable de moduler la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate [778] et le niveau d'excitation des neurones [779]. Par quels mécanismes peuvent passer ces régulations ? Il est possible que les voies soient identiques à celles observées au niveau de la cellule β. En effet, le GLP-1 module, au niveau de l'hippocampe, l'activation de canaux $Ca^{2+}$ voltage-dépendant [780]. Cependant, cela ne reste que de l'analogie et les mécanismes impliqués restent à éclaircir. D'autre part, il semble que l'effet protecteur sur les dysfonctions nerveuses périphériques diabétiques soient dépendantes de la voie ERK activable par le GLP-1 [781]. La question des effets du GLP-1 sur les neurones entériques reste entière.

#### *d) Effet direct sur les cellules α controversé*

L'effet inhibiteur sur la sécrétion de glucagon reste aujourd'hui controversé. Les cellules α semblent exprimer le GLP-1r mais très peu d'entre elles (10%) l'expriment [734]. L'effet du GLP-1 sur la sécrétion du glucagon pourrait passer par l'action inhibitrice de l'insuline. En effet, l'absence de cellule β induite par invalidation génétique de PDX-1 empêche l'effet inhibiteur du GLP-1 sur la sécrétion de glucagon [131]. Cependant, chez des patients diabétiques de type I caractérisés par l'absence de cellules β, le GLP-1 conserve sa capacité d'inhibiteur de la sécrétion de glucagon suggérant un rôle indépendant de l'insuline [782]. L'effet du GLP-1 sur la sécrétion du glucagon reste aujourd'hui à éclaircir.

#### *e) Les autres cellules cibles*

##### *(1) Les tissus métaboliques*

Les données à partir d'expériences *in vitro* montrent que le GLP-1 influence l'activité métabolique des muscles, du tissu adipeux ou du foie. En effet, le GLP-1 permet la production de glycogène et la capture du glucose au niveau des hépatocytes, des adipocytes et des myocytes en culture primaire. D'autre part, chez l'homme, le GLP-1 inhibe

la néoglucogenèse hépatique [783]. La capture du glucose dans les tissus périphériques induite par le GLP-1 est en fait une potentialisation de l'effet insuline [784].

Le GLP-1 a aussi des effets sur le métabolisme lipidique du tissu adipeux et du foie mais les effets restent contradictoires. En effet, dans certains cas, il diminue la lipolyse et dans d'autres cas, il active la lipolyse et diminue la lipogenèse. Ceci pourrait dépendre de la provenance des adipocytes ou des hépatocytes (animaux ou humains, lignées cellulaires). Il réduit aussi la stéatose hépatique des souris ob/ob et cet effet serait lié à une augmentation de l'AMPc dans les hépatocytes, montrant qu'il passerait par l'action du GLP-1 sur son récepteur [744].

*In vivo*, il est plus difficile d'étudier le rôle direct du GLP-1 dans les régulations du métabolisme de ces tissus. En effet, on observe un effet confondant avec l'activation de l'axe intestin-cerveau qui peut également contrôler la néoglucogenèse hépatique [785]. Il peut y avoir également l'effet confondant de la modulation de la sécrétion des hormones telle que l'insuline ou le glucagon [786]. Une manière d'aborder la question est de savoir si ces organes expriment le GLP-1r. Chez les souris possédant le GLP-1r fluorescent, les hépatocytes ne semblent pas l'exprimer. Dans cette même étude rien n'a été rapporté sur les muscles squelettiques et le tissu adipeux [734]. Les effets observés sur les cultures *in vitro* pourraient être dû 1) à l'existence d'un autre récepteur au GLP-1, 2) à l'affinité du GLP-1 pour le récepteur au glucagon et une voie induite différente. Ces propositions restent cependant hypothétiques.

#### *(2) Le cœur*

Le GLP-1 semble agir sur le cœur : il augmente la fréquence cardiaque, la pression diastolique et systolique et la moyenne de la pression sanguine. Ceci est spécifique au GLP-1 et a lieu indépendamment des régulations adrénergiques puisque les effets sont abolis lorsque l'on injecte l'exendine 9-39 en périphérie comme au niveau central suggérant un axe cerveau-cœur induit par le GLP-1 [787, 788]. Le GLP-1r est exprimé au niveau des vaisseaux cardiaques mais également au niveau des oreillettes [734]. Il a été également démontré que le GLP-1 pouvait jouer un rôle protecteur en cas d'ischémie ou d'insuffisance cardiaque : il réduit la taille de la zone infarctée, augmente la fonction cardiaque, favorise la capture de glucose et inhibe le stress oxydatif [788-793]. Les souris invalidées pour le GLP-1r montrent une baisse de la contractilité ventriculaire, une baisse de la fréquence cardiaque et une hypertrophie cardiaque [794]. Les voies intracellulaires impliquent l'augmentation d'AMPc, l'activation de la PKA/EPAC, la voie PI3K/AKT et les kinases ERK1/2.

#### *(3) L'intestin – Effet trophique et contrôle du système immunitaire*

Le GLP-1, par son récepteur, peut contrôler la prolifération de cellules épithéliales notamment en régulant FGF7, dans l'intestin grêle comme le gros intestin. FGF7 et son

récepteur FGFR2 sont très présents au niveau des neurones entériques [795]. FGFR2 est augmenté dans les cancers du côlon et favorise la prolifération des cellules épithéliales [796]. Ainsi, le GLP-1 *via* une action paracrine sur le SNE et la production du facteur FGF7 pourrait contrôler la prolifération des cellules épithéliales intestinales et favoriser l'intégrité de la barrière [797].

Le GLP-1 pourrait également jouer un rôle dans la tolérance du système immunitaire intestinale vis à vis du microbiote. En effet, le GLP-1r est exprimé au niveau des lymphocytes intra-épithéliaux. Lorsqu'ils sont mis en culture et stimulés avec le GLP-1, l'AMPc augmente dans leur cytoplasme ce qui réduit la production de cytokines par les lymphocytes activés. Cette action est inhibée chez les souris invalidées pour le GLP-1r ou lors d'un traitement avec l'antagoniste Ex9-39. Les souris invalidées pour le GLP-1r ont plus d'espèces bactériennes dans leurs fèces et sont plus sensibles aux altérations intestinales induites par le dextran sodium sulfate. Ces résultats suggèrent un rôle anti-inflammatoire du GLP-1 et dans la tolérance au microbiote [798].

#### *f) Modulation de l'expression du GLP-1r à la membrane cellulaire*

L'expression du GLP-1r à la membrane peut être modifiée dans certaines conditions. En effet, une exposition chronique à des agonistes du GLP-1r – le GLP-1 ou l'exendine 4 – induit une perte de production d'AMPc [799]. Le contexte hyperlipidémique ou hyperglucidique altère également la réponse au GLP-1 au niveau de la cellule β [800, 801]. Ce contexte est particulièrement retrouvé au cours du diabète associé à l'obésité et il a d'ailleurs été démontré qu'au cours de ces pathologies, l'action du GLP-1 pouvait être altérée [802]. A défaut de pouvoir évaluer grâce à un anticorps spécifique, l'expression à la membrane du GLP-1r, il est admis que mesurer l'expression de son ARNm permettait d'évaluer de façon simple et succincte l'état de la voie de signalisation au GLP-1. Au cours de ces pathologies métaboliques, son expression est diminuée au niveau des ganglions du nerf vague, de l'estomac, de l'hypothalamus et de la cellules β [720, 802, 803]. L'expression à la membrane du récepteur pourrait être également modulée par la prise alimentaire car à l'état nourri, le GLP-1r se trouve exposé de manière importante à la membrane [804]. Cependant, le biais de cette étude est qu'elle utilise un anticorps ciblant le GLP-1r dont la spécificité est aujourd'hui contestée.

Les mécanismes de désensibilisation sont de deux types, homologue et hétérologue. On parle de désensibilisation homologue lorsqu'il y a découplage entre le récepteur et sa protéine G après stimulation avec l'agoniste. Ce phénomène est induit par l'interaction du récepteur avec deux protéines : la kinase des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) qui phosphoryle le récepteur, puis la β-arrestine. La contrainte stérique empêche alors l'interaction avec la protéine G. La désensibilisation hétérologue implique que la voie d'un autre récepteur induit la phosphorylation du récepteur d'intérêt pour empêcher l'interaction avec la protéine G. Ces phosphorylations peuvent impliquer la PKA,

la PKC ou les MAPK de type ERK. Elles ont lieu au niveau de l'extrémité C terminale du récepteur, notamment sur des sérines [805]. Elles peuvent induire à terme l'endocytose du récepteur *via* des interactions avec les clathrines ou les calvéolines [805-807]. Deux avenirs sont alors possibles : il est recyclé ou alors dégradé.

### *3. Les actions nerveuses du GLP-1*

La voie la plus décrite pour médier les actions du GLP-1 est la voie nerveuse *via* un axe intestin-cerveau-périphérie [808]. Cette voie implique les afférences vagales présentes dans l'intestin et la veine porte capable de réceptionner l'information véhiculée par le GLP-1. En effet, les ganglions nodaux du nerf vague expriment le GLP-1r [648, 734]. D'ailleurs l'invalidation partielle du GLP-1r au niveau du nerf vague suffit à déréguler le métabolisme glucidique et notamment la prise alimentaire, la sécrétion d'insuline et la vidange gastrique [809]. Des expériences de vagotomies chimiques ou mécaniques ou des mesures électrophysiologiques de l'activité du nerf vague induite par le GLP-1 ont également permis de mettre en évidence l'importance du nerf vague dans le transport de l'information véhiculée par le GLP-1. Chez l'homme ayant subi une vagotomie troncale, le métabolisme du glucose est altéré par modification de la vidange gastrique, de la sécrétion d'insuline induite par le glucose, … [659]. L'information véhiculée par le nerf vague suffit à activer des noyaux du tronc cérébral et de l'hypothalamus [234].

#### *(1) La stimulation de la sécrétion d'insuline*

Lorsque l'on infuse du GLP-1 dans la veine porte, veine récoltant toutes les sécrétions intestinales, on observe une augmentation de la sécrétion d'insuline [200, 653, 654, 810]. De la même façon, l'infusion d'un inhibiteur de DPP4 dans la veine porte, permet de stimuler la sécrétion d'insuline [811]. Cette augmentation de la sécrétion d'insuline par le GLP-1 est médiée par le nerf vague puisque des vagotomies réalisées à l'aide de capsaïcine – molécule détruisant les fibres afférentes pauvres en myéline – ou de manière mécanique, ou alors l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs cholinergiques, inhibent l'effet du GLP-1 sur la cellules β [653, 654, 810]. Les mêmes résultats sont obtenus si le GLP-1 est injecté de manière intra-péritonéale [654]. À de très fortes doses de GLP-1, l'effet de la vagotomie est absent, supposant que le GLP-1, à de telles doses, réalise plutôt son action endocrine [810]. Les effets nerveux semblent bien médiés par le GLP-1r puisque la co-infusion dans la veine porte avec l'exendine 9-39 annule l'effet du GLP-1 [200, 659]. D'autres expériences ont également montré qu'un inhibiteur de la DPP4 administré oralement pouvait stimuler l'activité électrique du nerf vague et que cet effet était annulé lorsque de l'exendine 9-39 était co-injecté ou que l'expérience était effectuée chez des souris GLP-1rKO [812]. Ainsi, l'activation de la sécrétion d'insuline par le GLP-1 est médiée par son récepteur exprimé au niveau des afférences vagales intestinales et portales. Le nerf vague retransmet l'information au niveau cérébral qui, par les efférences vagales et la sécrétion d'Ach, la retransmet au niveau du pancréas pour induire la sécrétion d'insuline.

### (2) *L'inhibition de la vidange gastrique*

Bien que le GLP-1r soit exprimé au niveau stomacal, le GLP-1 est capable d'inhiber la vidange gastrique *via* un axe intestin-cerveau-périphérie [813]. En effet, l'administration exogène de GLP-1 chez des rats dénervés du nerf vague empêche l'action inhibitrice de l'hormone [651]. Chez les patients ayant subi une vagotomie troncale ou les patients diabétiques atteints de neuropathie autonome, le GLP-1 n'a aucun effet inhibiteur sur la vidange gastrique [659, 814]. L'injection périphérique d'exendine 9-39 inhibe l'effet du GLP-1 périphérique sur la vidange gastrique tandis que l'injection cérébrale de l'antagoniste n'induit aucun effet suggérant l'absence d'un rôle cérébral du GLP-1 périphérique dans cette fonction [651]. L'invalidation du GLP-1r au niveau du nerf vague inhibe également l'action du GLP-1 périphérique sur la vidange gastrique [809]. L'activation du DMVx par le GLP-1 engendre une réponse vagale efférente contrôlant l'activation de la nNOS au niveau stomacal contribuant à l'inhibition de la vidange gastrique [815]. Une étude chez l'homme a montré l'importance du contrôle de la vidange gastrique pour l'effet insulinotropique du GLP-1 [816], montrant le lien étroit entre ces deux actions du GLP-1.

### (3) *La régulation de la prise alimentaire*

La prise alimentaire est à la fois médiée par le GLP-1 périphérique et le GLP-1 du SNC. Le GLP-1 central peut avoir deux origines : une origine périphérique puisque le GLP-1 peut traverser la BHE et une origine centrale puisque l'hypothalamus possède des neurones sécréteurs de GLP-1. Chez le rongeur, l'administration d'agonistes du GLP-1r tel que l'exendine 4 par injection ICV, par injection intrapéritonéale ou dans la veine porte induisent la baisse de la prise alimentaire [234, 817, 818]. De la même façon, l'infusion d'un inhibiteur de DPP4 au niveau de la veine porte réduit la prise alimentaire [811]. Lorsque le GLP-1 est injecté ou protégé en périphérie (inhibiteur de DPP4), son effet satiétogène est aboli par la vagotomie ou l'injection intra-péritonéale de l'exendine 9-39. Ceci démontre l'importance du nerf vague, de l'axe intestin-cerveau et du GLP-1r périphérique dans l'effet satiétogène du GLP-1 [234, 817]. Cependant, lorsque l'antagoniste du GLP-1r est injecté au niveau cérébral, l'effet du GLP-1 périphérique n'est pas aboli. Ceci révèle que l'effet du GLP-1 périphérique est uniquement vagale et pas du tout cérébral [819]. L'activation des noyaux cérébraux par le GLP-1 périphérique pour le contrôle de la prise alimentaire s'effectue au niveau du NTS, de l'AP, et de l'amygdale, différents centres impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et contenant les neurones POMC et AgRP [234, 235]. L'influence du GLP-1 périphérique sur la prise alimentaire est caractérisée par une diminution de la quantité ingérée au cours d'un seul repas [234]. Le GLP-1 cérébral peut être sécrété suite à une distension gastrique comme au cours d'un repas [765]. La régulation de la prise alimentaire par le GLP-1 cérébral est essentiellement due, chez le rongeur, à une baisse du nombre de repas [770]. Ainsi, suite à l'ingestion d'un repas, le GLP-1 périphérique dont la sécrétion est induite par les nutriments, puis le GLP-1 cérébral dont la sécrétion est induite

par la distension gastrique, jouent en synergie pour diminuer la prise alimentaire par la quantité ingérée et par l'intervalle entre les repas et le nombre de repas.

### *4. BILAN*

Les nutriments, les bactéries, le SNA, le système entéro-endocrinien et le système immunitaire sont tous des facteurs intestinaux capables de moduler l'homéostasie du GLP-1 en période de jeûne comme en période postprandiale. Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression, la sécrétion et la dégradation du GLP-1 restent aujourd'hui à éclaircir notamment au cours des maladies métaboliques comme le DT2. Existe-t-il une dérégulation ou une cinétique dans la dérégulation ? L'action du GLP-1 est médiée par un récepteur spécifique dont l'exposition à la membrane et la sensibilité à l'hormone sont particulièrement régulées et semblent modifiées dans des contextes inflammatoires et lipo- et glucotoxiques que l'on pourrait retrouver au cours des maladies métaboliques. Tous ces points sont encore largement méconnus et restent donc à explorer.

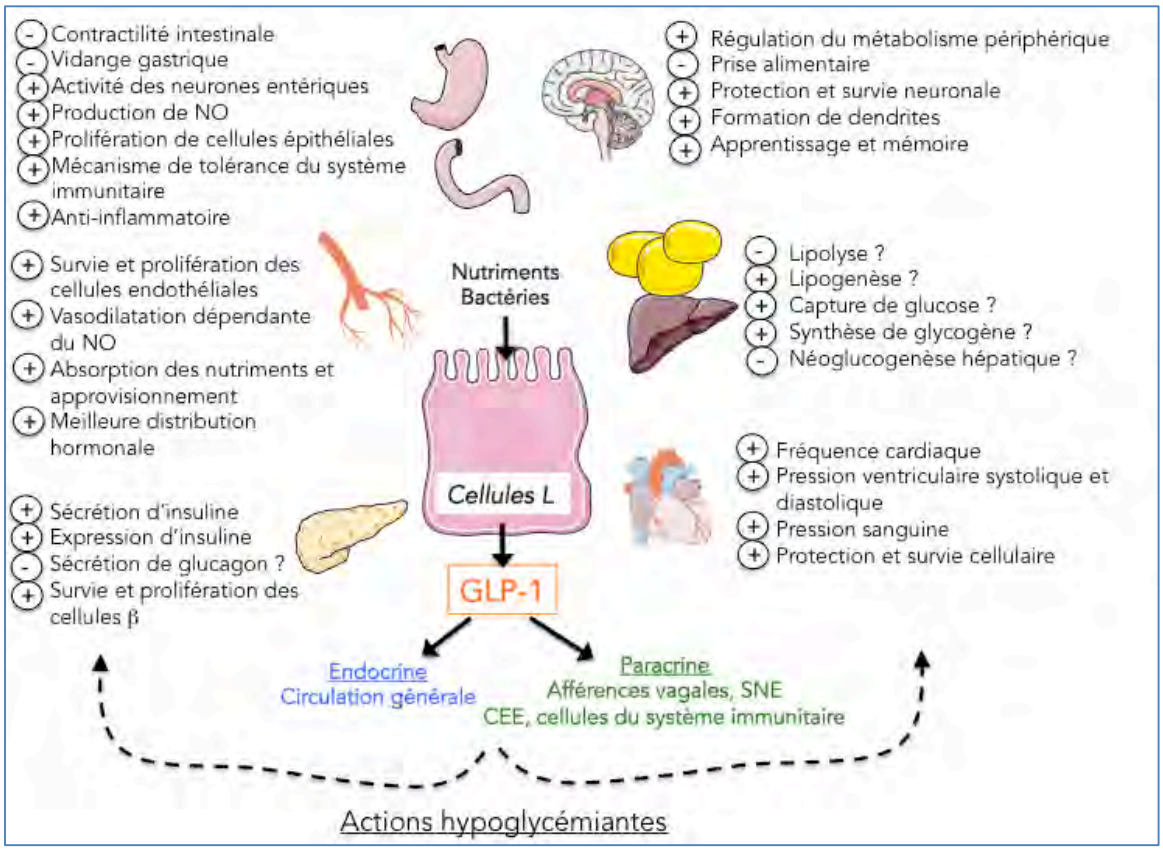



**Figure 8 :** Les actions du GLP-1. Le GLP-1 est sécrété entre autres après l'ingestion d'un repas ou sous l'influence des bactéries. Une fois libéré, il peut rejoindre la circulation sanguine ou agir de manière paracrine sur les cellules présentes sur son site de sécrétion (les cellules immunitaires, les neurones entériques, les afférences vagales, les CEE). Par ces différentes voies, il agit sur ces différents organes cibles. Les actions notées avec un point d'interrogations sont aujourd'hui controversées. Les actions du GLP-1 ont pour but de réduire la glycémie, à court terme en période postprandiale ou à long terme notamment en favorisant la survie cellulaire. En agissant sur le système cardiovasculaire il optimise la distribution des nutriments et des hormones dans tous les tissus. En agissant sur l'intestin, il optimise la digestion, l'absorption des nutriments, la tolérance vis à vis du microbiote, l'étanchéité de l'épithélium. Au niveau cérébral, or ses actions métaboliques, il protège les neurones et optimise leur activité.

L'action du GLP-1 est essentiellement de diminuer la glycémie postprandiale *via* l'augmentation de la sécrétion d'insuline, l'inhibition de la prise alimentaire et de la vidange gastrique de manière endocrine au niveau du pancréas, de l'estomac et du SNC ou *via* l'activation d'un axe nerveux intestin-cerveau périphérie. Le GLP-1 régule également la vasodilatation des vaisseaux et la fonction cardiaque permettant un meilleur approvisionnement en nutriments des organes, une imperméabilité de l'épithélium intestinal et une modulation de l'immunité protégeant l'hôte des antigènes extérieurs et enfin facilite le transit de nutriments. Le GLP-1 présente également des effets protecteurs et anti-apoptotiques sur la cellule β, les neurones, les vaisseaux sanguins et le cœur (**Figure 8**).

## D. L'intestin - site de symbiose – relation hôte/microbiote

### *1. Introduction*

La symbiose est une association constante, durable, étroite et obligatoire entre deux organismes issus d'espèces différentes, ne pouvant vivre l'un sans l'autre et dont chacun tire un bénéfice de cette association. Ce terme est utilisé pour les associations entre les procaryotes et les eucaryotes végétaux et animaux. Nous vivons en symbiose avec des procaryotes à la fois au niveau cellulaire mais également au niveau de notre organisme.

#### *a) « Symbiose intracellulaire » [820]*

Dans les années 1960, Lynn Margulis a émis l'hypothèse de l'endosymbiose : les organites, tels que les mitochondries, dont sont pourvues les cellules eucaryotes, sont des systèmes semi-autonomes disposant de leur propre patrimoine génétique et dont la duplication est indépendante de la cellule. Ainsi, ils seraient d'origine procaryotique, auraient été ingérés par phagocytose par d'autres cellules procaryotes et seraient conservés au sein de leur cytoplasme. Cette théorie est appuyée par le fait que : 1) les mitochondries comme les chloroplastes possèdent leur propre génome, sous forme de plasmides sans compartimentation nucléaire et leur propre machinerie de transcription, 2) leur réplication se fait par division et clonage sans reproduction sexuée, 3) ils possèdent des proximités génétiques et biochimiques avec certaines bactéries (chloroplaste et cyanobactérie, mitochondrie et α-proteobactérie).

Au cours de l'évolution, un embranchement des procaryotes s'est dissocié, il s'agit des archées. Ces procaryotes ancestraux possèdent des points communs avec les eucaryotes qui les différencient des procaryotes : la présence d'histones pour protéger l'ADN, l'absence de paroi cellulaire, un cytosquelette, l'existence d'un protéasome, des voies de signalisation calcique, des protéines de surface glycosylées. Pour ces raisons, il a été établi que les archées pouvaient constituer le nucléocytoplasme ancestral, avant endosymbiose, des cellules eucaryotes.

Ainsi grâce à l'étude du génome des eucaryotes et procaryotes, il a été établi que les eucaryotes étaient issus de l'endocytose d'un procaryote par une archée. Pour les eucaryotes animaux, possédant des mitochondries, ce procaryote était une α-protéobactérie. Mais pour quelles raisons et par quels mécanismes ? Plusieurs théories co-existent :

1) une infection parasitaire du cytonucléoplasme par une α-protéobactérie qui au cours des générations s'est transformée en mutualisme bénéfique : la mitochondrie ancestrale obtenait des nutriments d'origine cytoplasmiques (pyruvate) et en retour produisait de l'énergie disponible pour la cellule,

2) un système syntrophique qui définit une symbiose mutuelle, c'est à dire qu'un élément produit par un organisme est toxique pour lui-même mais peut être dégradé par un autre organisme qui en tire un bénéfice. Ainsi, le cytonucléoplasme fermente pour

produire son énergie et se trouve en contact de l'$O_2$ toxique pour la cellule. Il s'est associé avec une $\alpha$-protéobactérie aérobie qui consomme de l'$O_2$ par oxydoréduction. En échange, le cytonucléoplasme fournit à la bactérie les nutriments correspondant aux produits de fermentation tels que le pyruvate.

3) un autre système syntrophique a été envisagé dans lequel, le cytonucléoplasme, en fermentant, produit des acides organique (lactate, pyruvate, glutamate, …) toxiques pour lui-même. Ils sont métabolisés par une $\alpha$-protéobactérie qui libère alors du $CO_2$. Cette théorie ne peut cependant être validée puisqu'une bactérie, quelle qu'elle soit, préfère consommer le glucose environnant que les acides organiques.

4) La syntrophie méthanogénique dans laquelle l'$\alpha$-protéobactérie produit du $CO_2$ et de l'$H_2$ à partir d'éléments organiques. Le nucléoplasme méthanogène modifie $H_2$ en $CH_4$. Cette hypothèse n'est pas privilégiée car un organisme méthanogène est anaérobie strict, or les cellules eucaryotes sont aérobies et aucune évidence montre des modifications évolutives d'un état à l'autre.

5) La syntrophie sulfurique dans laquelle le couple ions sulfure/$H_2S$ est le couple redox pour le transfert d'énergie entre l'archée et l'$\alpha$-protéobactérie. Cette hypothèse reste privilégiée. En effet, il a été établi que la mitochondrie partage des points communs avec des bactéries sulfuriques et l'archée, notre ancêtre eucaryote, est capable de réduire le sulfure en $H_2S$. Ceci a été vérifié *in vitro* par le laboratoire de Wolf et Plenning. Il a été également montré l'existence ancestrale d'une protéine eucaryote : la rhodanese, une sulfure transférase qui dans notre cellule actuelle est sans fonction réelle. D'autre part, la cellule eucaryote peut aussi produire de l'$H_2S$ au sein de son cytoplasme à partir d'ions sulfure et la mitochondrie est capable d'oxyder l'$H_2S$ (à proximité du complexe III) en utilisant les électrons de la chaine respiratoire.

Ainsi, il existe une relation de symbiose eucaryote/procaryote à l'échelle cellulaire. Cette relation est basée sur une aide et un bénéfice mutuel entre les deux organismes notamment en termes de production d'énergie. Ces théories d'endosymbiose sont actuellement admises pour tous les organites qui composent la cellule eucaryote moderne. En effet, le noyau proviendrait de l'endosymbiose avec une eubactérie thermophile, le cytosquelette viendrait de l'endosymbiose avec une spirochaetes, ...

#### *b) « Symbiose intercellulaire »*

Chez les organismes pluricellulaires comprenant les mammifères, une autre forme de symbiose existe : la relation hôte/microbiote. En effet, sur notre peau, dans notre bouche, nos intestins, sur les organes génitaux, nous vivons avec des milliards de bactéries. Notre intestin en est particulièrement enrichi. Les premières colonisations bactériennes de l'intestin datent d'il y a environ 600 millions d'années, soit bien antérieur à la naissance de l'être humain (-300 millions d'années). Chez l'homme, on estime que notre intestin contient $10^{14}$ bactéries soit 10 fois plus que de cellules eucaryotes. Cela représente 1,5kg et constitue la plus large population procaryotique au sein de notre organisme. En colonisant

les intestins, les bactéries trouvent un écosystème non-hostile et un approvisionnement régulier en nutriments. Inversement, l'hôte en tire un bénéfice : comme il ne peut pas digérer certains nutriments (absence d'enzymes), les bactéries en les consommant produisent des molécules métabolisables et stockables dans l'unique but pour l'hôte de tirer le maximum d'énergie provenant à partir de son alimentation. C'est le cas pour les fibres alimentaires (polysaccharides végétaux, cellulose, xylanes, inuline, …), source principale de nutriments pour le microbiote qui en les digérant, libère des AGCC et des sucres simples absorbables au niveau de notre intestin. Ce même processus symbiotique est observé chez le termite : il se nourrit de bois mais ne peut en digérer les fibres et vit donc en symbiose avec un procaryote qui les dégrades en molécules consommables par le termite.

Ainsi, au cours de l'évolution, l'hôte et le microbiote qui le compose ont dû s'adapter l'un à l'autre pour que l'un et l'autre puissent survivre, on parle de mutualisme ou d'écologie mutualisée [821]. Ainsi, leur génome a évolué conjointement pour que l'un tire un bénéfice de l'autre. Les études réalisées sur le microbiote ont montré que l'influence du microbiote est bien plus subtil que l'apport en certains nutriments : il aide à la maturation du système immunitaire, du SNC et du SNP, des systèmes endocriniens, il régule le comportement et les fonctions cognitives, le métabolisme, la reproduction et la production d'hormones sexuelles, la croissance *via* la régulation de l'hormone de croissance [822].

Le microbiote de notre intestin peut être subdivisé en 4 phyla principaux qui sont les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* avec 9 autres moins représentés [821]. De la bouche au côlon, notre flore est très différente et reliée aux caractéristiques de la niche écologique de la partie intestinale concernée : au niveau de la bouche, on distingue des bactéries aérobies et anaérobies ; au niveau de l'estomac, des bactéries acidophiles et vers l'intestin grêle distal et le côlon des bactéries anaérobies strictes (*Streptococcus, Lactobacillus, Clostridium* et *Bacteroides*) et méthanogéniques. De plus, le long du tractus digestif le nombre de bactéries croit passant de $10^4$/mL au niveau de l'estomac à $10^{12}$/g de fèces au niveau du côlon.

Au cours de notre vie fœtale, nous vivons dans un environnement dit stérile et notre intestin est dépourvu de microbiote vivant. Cependant, le placenta et le liquide amniotique semblent riches en ADN microbien [823-825] suggérant un possible rôle des fragments bactériens dans la maturation des différents organes en période prénatale. Lorsque l'on nait par voie naturelle, dès les premiers instants, nous acquérons un microbiote provenant du vagin, de l'anus et de l'air environnant. Ce microbiote est aérobie et anaérobie, de type Gram positif. Il s'agit des bactéries violettes à la coloration de Gram. Ces bactéries sont unimembranées avec une épaisse couche de peptidoglycanes à la surface de la membrane plasmique. L'intestin d'un nouveau-né jusqu'au sevrage est riche en *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, des bactéries fermentescibles. Lors du sevrage, en nous nourrissant d'aliments variés, notre flore s'enrichie en bactéries Gram- roses à la coloration de Gram, bimembranées et possédant une paroi. Ainsi, nous acquérons progressivement une flore

stable et diversifiée. Cette composition bactérienne peut évoluer en fonction de notre hygiène de vie : nos régimes alimentaires, les antibiothérapies orales, les infections ou les inflammations intestinales.

L'importance de la flore intestinale a pu être définie en étudiant des organismes dépourvus de celle-ci à la naissance, notamment les souris axéniques. Ces souris possèdent un système immunitaire intestinal inné et acquis atrophié avec une faible capacité de réponse [826-828] et un SNE dont la fonction est altérée [829, 830]. Les souris axéniques ont des fonctions cognitives, la mémoire, l'anxiété, le comportement social ou la réponse au stress différents d'une souris conventionnelle [831]. Les sécrétions hormonales sont modifiées (hormones sexuelles, intestinales, pancréatiques, du stress, de croissance, …) [822] et leur métabolisme est différent (poids faible, glycémie faible, prise alimentaire accrue, faible taux d'AGCC, faible quantité de glucose et triglycérides hépatiques, taux de leptine, de ghréline ou de GLP-1 différentes, …). Ces données révèlent l'importance de la flore dès notre naissance sur les développements endocriniens, nerveux ou immunitaires nécessaires à terme pour la régulation du métabolisme, des fonctions cognitives, du stress, de la reproduction ou de la réponse à une infection par un pathogène.

#### *c) La ligne de défense intestinale*

La relation de symbiose entre notre intestin et le microbiote intestinal est un état stable et pacifique : on parle de tolérance. Cette tolérance intestinale est possible grâce à la fonction de notre système entéro-épithélial et de notre système immunitaire. Le microbiote toléré est dit commensal et est acquis très précocement, en période post-natale. C'est au cours de cette période que se fait la tolérance aux antigènes luminaux nutritionnels et microbiens. La première ligne de défense intestinale est réalisée par l'épithélium. 1) Il produit un mucus épais contenant des mucines, des défensines et des immunoglobulines A empêchant les bactéries de traverser la barrière épithéliale. D'ailleurs, la partie du mucus la plus proche des cellules épithéliales est considérée comme stérile. 2) Il possède des jonctions serrées imperméables aux bactéries dont l'ouverture est particulièrement contrôlée. 3) Il possède un système immunitaire inséré entre les cellules épithéliales et directement au contact du lumen. Ce système immunitaire comprend les cellules dendritiques, les macrophages ou encore les lymphocytes intra-épithéliaux. Ces cellules immunitaires jouent alors le rôle de senseurs et de vigilance. Leur activation contrôle le recrutement dans la lamina propria de cellules immunitaires de l'immunité innée et acquise.

Les immunoglobulines de type A dirigées contre la flore commensale sont plutôt tolérogènes. En effet, elles sont sécrétées par des lymphocytes de type B indépendamment d'une activation par des lymphocytes de type T et possèdent des épitopes différents que ceux des immunoglobulines de type A dirigées contre les bactéries pathogènes. D'ailleurs, dans le cas de bactéries pathogènes, les immunoglobulines de type A sont produites en réponse à des lymphocytes T activés [832]. Les bactéries commensales peuvent agir directement sur l'épithélium en activant certaines voies tolérogènes plutôt décrites comme

anti-inflammatoires ou même parfois des voies stimulant la régénération de l'épithélium [833, 834]. Les bactéries agissent alors tel un probiotique leur permettant ainsi de vivre en état de paix, en symbiose avec l'hôte [833].

Cette relation symbiotique n'est pas hostile mais peut le devenir. En effet, le microbiote commensal, que notre intestin tolère, peut devenir pathogène suite à une infection par une bactérie étrangère ou alors par une perte de tolérance de notre système immunitaire. Des bactéries commensales telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacterium*, nous protègent contre l'infection par des bactéries pathogènes [835]. Les maladies inflammatoires intestinales telles que le syndrome du côlon irritable, les colites ou la maladie de Crohn sont dues à une trop grande activation du système immunitaire dans le côlon. Cette suractivation est due, en partie, à une perte de tolérance vis à vis de notre microbiote commensal, modifiant alors soit l'intégrité de la barrière épithéliale favorisant l'entrée des bactéries, soit une perte de l'activation de l'immunité mucosale [836, 837].

Le microbiote a deux façons d'influencer l'organisme : *via* les métabolites qu'il produit ou *via* les fragments bactériens qui le composent (ADN, lipides, glucides, protéines, …). Parmi les fragments bactériens, on distingue les LPS, fragments de la paroi bactérienne Gram- et composés de lipides et de sucres ; les peptidoglycanes, fragments de la paroi bactérienne Gram+ et composés de sucres et de fragments peptidique ; les glycoprotéines ; les lipoprotéines ; les fragments d'ADN ou d'ARN double brin et simple brin.

Parmi les métabolites bactériens produits à partir des aliments de la nutrition [838], on distingue :

- <u>Les molécules produites à partir des protéines et des acides aminés</u> :

Elles sont métabolisées principalement par les *Bacteroides* et les *Clostridium* dans le côlon.

- ***Les indoles et les phénols***, issus de la dégradation de la tyrosine et du tryptophane, ***le méthane ou les acides organiques***. La détoxification des phénols est réalisée par le foie et les colonocytes, cellules épithéliales du côlon. Ces composés augmentent la perméabilité. Les indoles diminuent les bactéries productrices d'acide lactique. Le p-Crésol ou le 4-methylphenol sont très toxiques pour les cellules.
- ***L'ammoniac***. Il est issu de la déamination des acides aminés et il est absorbé puis convertit en urée par le foie. Il possède une influence sur la durée de vie des cellules et favorise la multiplication des cellules endommagées.
- ***Les composés N-nitrosés***. Ils sont issus de la nitrosation des composés organiques tels que les amines par des nitrites, du NO, de l'acide nitrique, des nitrosothiols. Ils ont une influence sur le transit ou sur l'athérosclérose [839], quelques-uns ont des effets carcinogènes en réalisant des interactions avec l'ADN.
- ***Les composés sulfurés*** ($H_2S$ ou ions sulfide, thiazoles, thiophènes, …) Ils sont produits par certaines bactéries comme les *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*,

*Escherichia coli* ou les *Clostridium*. Ils altèrent la physiologie intestinale par l'induction de processus inflammatoires intestinaux et une diminution de la perméabilité [840].

- Les molécules produites à partir des sucres, des saccharides ou des fibres alimentaires :

Elles sont produites par les bactéries fermentescibles telles que les *Lactobacillus*, les *Bifidobacterium*, les *Bacteroides*. Les molécules produites sont plutôt bénéfiques et sont les AGCC (propionate, butyrate et acétate), le méthane, le $CO_2$, et parfois de l'éthanol. Leurs effets sont multiples et dans la plupart des cas bénéfiques : ils assurent le contrôle du transit, sont les supports nutritionnels des colonocytes ou des neurones ou peuvent contrôler des sécrétions entéro-endocriniennes, …

Globalement, les métabolites bactériens jouent trois rôles : la détoxification, la signalisation et l'apport nutritionnel. Ils peuvent réguler quelques fonctions : la perméabilité intestinale, la prolifération épithéliale ou le transit. Mais lorsqu'ils se retrouvent en trop grande quantité ils deviennent délétères : carcinogénèse, augmentation de la perméabilité, de la mort cellulaire, surstockage énergétique, au niveau intestinal comme au niveau du foie et du rein.

Il a été démontré que quelques métabolites bactériens pouvaient mimer ou produire certaines hormones comme des mimétiques de l'αMSH (ClpB), de la 5-HT, de la dopamine, de la noradrénaline ou du NO [706, 841-843]. Ainsi ils peuvent directement influencer les cellules de l'hôte *via* les récepteurs aux hormones et aux neuro-transmetteurs. Inversement, les hormones de l'hôte peuvent aussi influencer les bactéries. Par exemple, l'adrénaline et la noradrénaline augmentent la virulence et favorisent la prolifération bactérienne alors que les hormones sexuelles diminuent la virulence [822]. Par exemple, *Salmonella*, sous l'influence de l'adrénaline, diminue l'expression de ses facteurs de résistance vis-à-vis des peptides antimicrobiens de l'hôte, ou modifie le stress oxydatif dans le milieu intracellulaire. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs adrénergiques α et β annule l'effet de l'adrénaline sur *Salmonella*.

#### *(1) Reconnaissance des fragments bactériens*

Pour reconnaître les fragments bactériens, les cellules de l'organisme disposent à leur surface de récepteurs spécifiques appelés PRR (pattern recognition receptor) dont les ligands bactériens sont appelés les MAMP (microbial associated molecular patterns). Ce groupe de récepteurs et subdivisé en 4 sous-groupes : les TLR membranaires, les NLR cytosoliques (récepteur NOD), les RLR (RIG-I like receptors) et la famille des lectines de type C (RegIIIγ). Ces récepteurs sont principalement exprimés à la surface des cellules immunitaires et épithéliales, mais peuvent aussi être exprimés par d'autres cellules comme les neurones ou les CEE. Les voies intracellulaires qu'ils activent sont de type pro- ou anti-

inflammatoires, pro ou anti-apoptotiques dépendantes de NFκB, MAPK, des ERO, ou des caspases [844].

Chacun de ces récepteurs bactériens est spécifique d'un type de MAMP. Au sein des TLR, on distingue : 1) TLR1, 2, 4, 5 et 6, transmembranaires (membrane cytoplasmique) qui reconnaissent plutôt des fragments de la paroi bactérienne (TLR1 et lipopeptides, TLR2 et peptidoglycanes, TLR4 et LPS, TLR5 et flagelline, TLR6 et lipoprotéines) et 2) les TLR3, 7, 8 et 9 cytosoliques qui reconnaissent plutôt des fragments d'ARN et d'ADN. Les récepteurs de type TLR, une fois associés avec les MAMP, se complexent avec deux protéines intracellulaires différentes permettant la transduction du signal : Myd88 et TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) qui modulent ensuite les voies MAPK/JNK et NFκB stimulant la transcription de cytokines et d'interférons pro-inflammatoire. Les récepteurs NOD1/2 sont cytosoliques. Une fois activés par les MAMP de type peptidoglycanes, ils s'oligomérisent, recrutent la protéine RIP2 (receptor-interacting protein 2) et modulent les voie NFκB et MAPK. Ces voies peuvent être activées au niveau des cellules présentatrice d'antigènes mais également d'autres cellules intestinales. La production de cytokines induite permet le recrutement des lymphocytes T et B.

Ces voies ont longtemps été décrites comme étant essentielles dans l'initiation des mécanismes de défense par le système immunitaire inné pour la défense contre les infections. Hormis ces actions immunitaires, il a été montré que ces récepteurs jouent un rôle déterminant sur l'homéostasie intestinale. Les fragments des bactéries commensales, contrairement aux bactéries pathogènes ne sont pas équipés de facteurs de virulence. L'activation des récepteurs épithéliaux par les facteurs de virulence permet l'ouverture des jonctions serrées et leur passage dans la *lamina propria* où ils accèdent à tous les types cellulaires [845]. Les études sur des souris invalidées pour les récepteurs PRR ou des souris axéniques ont montré des rôles non immunitaires de ces récepteurs tels que le renouvellement et la protection épithéliale, l'homéostasie neuronale et gliale, le transit, le contrôle des sécrétions entéro-endocriniennes, …

#### *(2) Utilisation et reconnaissance des métabolites bactériens*

Les bactéries peuvent aussi influencer notre organisme par les métabolites qu'elles produisent. Les plus connus et les plus décrits sont les AGCC libérés au niveau colique et répartis de la façon suivante : 60% acétate, 25% propionate, 15% butyrate dans le côlon et les fèces. 95 à 99% de ces derniers sont absorbés soit par diffusion passive suivant le gradient de concentration s'ils sont sous forme non ionique/protonée et donc liposolubles, soit à l'aide d'un co-transport avec des ions bicarbonates, des ions $Na^+$ (transporteurs SMCT) ou des ions $H^+$ (transporteurs MCT) s'ils sont sous forme ioniques. Ces transports dépendent du fonctionnement de transporteurs ioniques antiport $Na^+/K^+$, $Na^+$/ions bicarbonates ou $Cl^-$/ions bicarbonates. Ceux qui ne sont pas absorbés sont éliminés dans les fèces. Ces AGCC constituent 5 à 10% d'apport en énergie quotidienne de l'organisme. Ils sont à 70% consommés par les colonocytes. S'il est présent en quantité suffisante, les

colonocytes utilisent préférentiellement le butyrate qui est alors transformé en corps cétoniques tels que le β-hydroxybutyrate ou l'acétoacétate utilisables comme substrat néoglucogénique par le foie ou comme source énergétique par les tissus périphériques. D'ailleurs, le métabolisme du butyrate dans les colonocytes inhibe celui du glucose, de la glutamine et des autres AGCC. Lorsqu'ils ne sont pas consommés, ils rejoignent la circulation portale et sont traités par le foie : le propionate est un substrat de la néoglucogenèse hépatique. La moitié de l'acétate échappe au foie et est utilisé par les autres organes (muscle, cœur, rein). Dans les tissus périphériques, l'acétate est un substrat de la lipogenèse *de novo* puisqu'il est un précurseur des acides gras à longue chaine mais peut être également transformé en glutamine et en β-hydroxybutyrate, substrat de la néoglucogenèse.

Les AGCC sont également des molécules de signalisation *via* les récepteurs FFAR2/3. Les deux récepteurs possèdent environ 40% d'homologie et reconnaissent les fragments carbonés de 2 à 5 carbones. Comme précisé plus tôt, FFAR2 est plutôt affin pour les fragments carbonés $C_2$-$C_3$ et FFAR3 pour $C_3$-$C_5$ et ces deux récepteurs influencent les sécrétions entéro-endocriniennes, la fonctionnalité des neurones entériques et l'activation de l'axe intestin-cerveau [493, 583, 585].

D'autres métabolites peuvent être produits par le microbiote comme les indoles. Ils sont capables de moduler l'activité de canaux ioniques tels que le canal $K_{ATP}$ [704]. D'autres métabolites peuvent également servir à mimer les hormones de l'hôte et dans ces cas-là, ils sont reconnus par les récepteurs spécifiques de l'hôte [706, 841-843]. Enfin, les acides biliaires primaires sont métabolisés par le microbiote pour donner les acides biliaires secondaires qui peuvent donc être considérés, de manière secondaire, comme des métabolites bactériens. Les acides biliaires sont sécrétés au cours d'un repas pour faciliter l'émulsion et la digestion des lipides et servent également de molécules de signalisation, notamment dans la régulation du métabolisme lipidique, *via* le facteur nucléaire FXR (farnesoid X receptor) et le récepteur TGR5 ou Gpbar1 (G-protein-coupled bile acid receptor Gpbar1) au niveau intestinal comme hépatique. La modification de leurs structures par le microbiote influence leurs activités [846].

### *2. Influence du microbiote sur le métabolisme, la détection des nutriments et les maladies métaboliques*

#### *a) Microbiote et métabolisme*

Le gain de connaissance sur le lien entre métabolisme et microbiote a été permis par la manipulation de ce dernier chez le rongeur : souris axéniques, souris axéniques recolonisées avec différentes flores, souris traitées aux antibiotiques, souris traitées aux prébiotiques, aux probiotiques ou aux symbiotiques (association de bactéries et de leur substrat) et l'analyse de ce dernier chez l'homme (analyses de l'ADN 16S, analyse du métabolome, …).

Une souris axénique du même fond génétique et du même âge est plus mince (40% de moins) qu'une souris dite colonisée ou conventionnelle. Lorsqu'une souris axénique est recolonisée avec une flore normale, elle prend rapidement du poids (augmentation de 60% de la masse grasse) et développe une légère résistance à l'insuline malgré une baisse de la prise alimentaire. Ce changement métabolique est induit par différents mécanismes permettant la mise en disponibilité de métabolites stockables. En effet, il a été montré, par les travaux de Fredrick Bäckhed, que chez la souris axénique, l'intestin produit une grande quantité d'un inhibiteur de la LPL dont l'expression est normalement induite par le jeûne [847] la protéine FIAF (fasting-induced adipocyte factor). La sécrétion de FIAF est induite par le tissu adipeux et l'intestin. Cette étude montre également que lorsque la souris axénique est recolonisée, alors on observe une baisse de l'expression de cet inhibiteur facilitant ainsi le stockage des acides gras libres. De plus, chez la souris axénique recolonisée, on observe une augmentation de l'absorption intestinale de glucose ou du fructose, substrat de la lipogenèse *de novo*, et une augmentation d'insuline stimulant la lipogenèse *de novo*. D'ailleurs, le foie d'une souris axénique recolonisée possède une activité lipogénique accrue [848]. Cette étude de Fredrick Bäckhed a été une étude précurseur dans le lien entre microbiote et métabolisme. D'autre part, les souris axéniques présentent une faible quantité d'AGCC, substrats néoglucogéniques et lipogéniques. Ceci est associé à une diminution de la glycémie à jeun, un faible taux d'insuline inducteur de la lipogenèse *de novo*. Le faible taux d'insuline est associé à une baisse du nombre de cellule β. De plus, la souris axénique est caractérisée par une meilleure tolérance orale au glucose. Ces derniers résultats suggèrent un rôle essentiel du microbiote sur la gestion de la glycémie [676]. De plus, la souris axénique possède une augmentation de la phosphorylation activatrice de l'AMPK, senseur énergétique des cellules musculaires et hépatiques, contribuant à la diminution de lipogenèse *de novo* et l'augmentation de l'oxydation des acides gras [849].

D'autre part, au sein du laboratoire, nous avons montré que gaver des souris avec des prébiotiques de type FOS induisait une baisse de masse du tissus adipeux, une baisse de la prise alimentaire, une amélioration de la triglycéridémie, de la sensibilité à l'insuline, de la glycémie et de l'insulinémie à jeun, de la tolérance au glucose, une baisse de la production hépatique de glucose chez des rats ou des souris nourries avec HFD ou des rats traités à la streptozotocine [679, 680, 850]. Ces effets semblent médiés par le GLP-1 puisque lorsque l'on utilise de l'exendine 9-39 ou les souris invalidées pour le GLP-1r alors les effets des FOS sur le métabolisme sont annulés. De plus, le traitement prébiotique augmente l'expression du PPG, le nombre de cellules L, la quantité de GLP-1 actif au niveau intestinal et portal [679, 680, 716, 850]. Au cours d'une étude chez l'homme sain, il a été déterminé que les FOS étaient satiétogènes constituant un des effets du GLP-1 pour le contrôle de la glycémie [851]. Enfin, des souris invalidées pour les récepteurs aux AGCC, FFAR2/3, sont moins tolérantes au glucose oral car elles sécrètent moins d'insuline et moins de GLP-1 [493, 852]. Hormis leurs expressions au niveau de l'intestin, il a été démontré que

ces récepteurs étaient fortement exprimés au niveau du tissu adipeux. Ils stimulent l'adipogenèse et inhibent la lipolyse [853, 854] contribuant à diminuer la quantité d'acides gras libres dans le sang.

Les souris invalidées pour le récepteur au TLR4 ou une protéine soluble permettant l'activation de TLR4, CD14, sont protégées contre l'obésité et le diabète induit par un régime gras. Ceci s'explique par une baisse de l'adiposité et une augmentation de la consommation d'oxygène et de la sensibilité à l'insuline [477, 855, 856]. Au laboratoire, nous avons montré que l'infusion de LPS dans le sang était suffisant à induire des dérèglements métaboliques [857, 858] et que les LPS étaient augmentés au niveau sanguin (endotoxémie métabolique) au cours des maladies métaboliques. Les souris ob/ob, traitées aux antibiotiques montrent une baisse de l'endotoxémie et une amélioration du phénotype diabétique obèse [477]. Chez l'homme, la quantité de LPS est associée à une augmentation de la prise alimentaire [857]. Ces résultats restent cependant difficiles à confirmer notamment due à la méthode de dosage des LPS qui est aujourd'hui très controversée [859]. D'autre part, il a été montré récemment que les récepteurs NOD1/2 étaient aussi déterminants pour le métabolisme [481, 860, 861]. Au cours d'un régime gras, l'invalidation de NOD2 induit une augmentation de la translocation bactérienne, une inflammation du tissu adipeux et du foie menant à une importante résistance à l'insuline. D'autre part, l'activation de NOD1 au niveau de cultures d'explants adipeux humains favorise la résistance à l'insuline des adipocytes par activation des voies inflammatoires [861].

#### *b) Détection intestinale des nutriments et influence du microbiote*

Au niveau intestinal, les bactéries influencent le fonctionnement de tous les types cellulaires et dans un premier lieu, le système immunitaire et la muqueuse intestinale, premiers remparts entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. Cependant, le microbiote peut également moduler les sécrétions entéro-endocriniennes et l'activité nerveuse du SNA de manière directe *via* des fragments et des métabolites bactériens, ou indirectement *via* l'activation du système immunitaire.

Les cellules épithéliales expriment des récepteurs aux bactéries type TLR. Les récepteurs TLR1, 2 et 4 et les récepteurs FFAR2/3 sont exprimés par les CEE [501, 862, 863] où ils peuvent induire différentes voies pour moduler : la perméabilité intestinale [472], les sécrétions entéro-endocriniennes [493, 501] ou la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires [501, 862, 863].

Le SNE (neurones et cellules gliales), le nerf vague et même le SNC (neurones et cellules gliales) expriment les récepteurs TLR 2, 3, 4, 5, 7, 9 [864, 865] et FFAR2/3 [866]. Ils régulent alors leurs activités (axe intestin-cerveau ou transit) [604, 867-869] et leur homéostasie (nombre de neurones, de dendrites ou d'axones) [611, 868-870]. Il a également été montré que le récepteur NOD2 pouvait être exprimé dans la microglie et contrôler sa fonctionnalité immunitaire [867]. La souris axénique est caractérisée par une

très faible excitabilité basale au niveau des neurones myentériques de type IPAN et la colonisation par de la flore saine restore l'excitabilité neuronale [829, 871]. Ceci est dû au faite que le potentiel de membrane déjà très haut est résistant aux stimuli. Le traitement pendant quelques jours de rats avec un *Lactobacillus* améliore l'excitabilité des neurones entériques [872]. Cet effet peut s'expliquer par le fait que certains fragments bactériens, comme les polysaccharides, notamment en provenance de *Lactobacillus* ou de *Bacteroides*, sont capables de moduler l'excitation des neurones entériques [873]. De plus, certaines bactéries telles que les *Lactobacillus* peuvent produire du NO ou des catécholamines, neurotransmetteurs modulant l'activité neuronale intrinsèque ou extrinsèque [706, 841-843].

### *3. Microbiote et maladie métabolique*

Dans le principe du mutualisme hôte / microbiote, il semble facile de concevoir que si l'un évolue différemment de l'autre alors l'autre s'en retrouve impacté. Ainsi, lors d'un changement de notre régime alimentaire (enrichissement en gras et en sucre) ou une forte antibiothérapie, l'écosystème procaryotique de notre intestin, ayant la capacité de se reproduire, de se développer et de s'adapter très rapidement, se trouve complétement modifié et cette modification non contrôlée et rapide peut impacter notre santé intestinale et générale [821]. Dans nos sociétés actuelles, l'hygiène de vie (régime enrichi en gras et en sucre et privé de fibres, trop grande utilisation des antibiothérapies) et le rythme de vie ont changé plus rapidement que nos capacités adaptatives. Ces changements ont modifié profondément notre flore intestinale plus rapidement que le reste de notre organisme.

Les travaux du groupe de J. Gordon ont permis de mettre en évidence un lien de causalité entre la flore et les maladies métaboliques. Il a montré dans un premier temps que chez les patients obèses, la flore est bien différente des patients sains : le rapport des phyla *Bacteroidetes* / *Firmicutes* est diminué par la réduction de la quantité de *Bacteroidetes* sans variation de celle des *Firmicutes*. Ce rapport s'inverse si le patient adopte un régime pauvre en sucre et en graisse et cette inversion est associée avec une perte de poids. Puis il a montré que la baisse du rapport *Bacteroidetes* / *Firmicutes* est aussi observée chez les rongeurs obèses, souris ob/ob, dont le gène de la leptine est invalidé [874, 875]. En réalité, il a été montré que ce microbiote modifié est responsable d'une forte capacité de stockage de l'énergie provenant du régime de l'hôte [847, 875, 876]. Enfin, en colonisant une souris axénique avec de la flore de souris ob/ob, il a montré que ces souris, sous régime normal, devenaient obèses notamment par une capture plus importante de l'énergie présente dans les nutriments associée à une baisse de la quantité de calories dans les fèces [876].

Or, le biais génétique d'une souris ob/ob sur sa flore n'est pas négligeable et ne reflète pas ce qui se passe en réalité chez l'homme : un régime enrichi en gras et en sucre induit des changements métaboliques. Cependant, chez des rongeurs nourris avec un régime gras, on observe également une augmentation de masse grasse associée à une baisse du rapport *Bacteroidetes* / *Firmicutes* [877, 878]. En fait, une étude récente montre que 1) deux types de phénotypes pouvaient être observés au cours de l'ingestion d'un

régime gras chez le rat : résistants et sensibles à l'obésité ; 2) seul le groupe des rats obèses possède un rapport *Firmicutes / Bacteroides* augmenté ; 3) lors du transfert de la flore de ces groupes dans des souris axéniques, les phénotypes des deux groupes sont conservés : les souris conventionnalisées avec de la flore de rat obèse devenaient hyperphagiques, avec une masse grasse augmentée et une lipogenèse *de novo* accrue ; 4) le microbiote des rats obèses est caractérisé par certaines bactéries telles que *Clostridium* ou *Oscillibacter* activant des voies pro-inflammatoires et favorisant l'adipogenèse [877]. Une autre étude a montré qu'au cours de l'obésité, il y avait une augmentation de bactéries opportunistes et pathogènes telles que les *Enterobacterium* (*Escherichia coli*) et les *Mollicutes* (*Mycoplasma*) et une baisse des bactéries productrices d'AGCC [858]. Ainsi, l'ensemble de ces études montre que la dysbiose associée à l'obésité contrôle la prise alimentaire, les mécanismes d'adipogenèse et de lipogenèse observés chez les patients obèses. Ces mêmes études laissent suggérer que les bactéries associées à la dysbiose pourraient augmenter l'inflammation de bas bruit par leur pouvoir inflammatoire. Des souris traitées avec des antibiotiques à faible dose au cours des stades précoces de la vie, possèdent une adiposité accrue et une augmentation de l'expression des gènes favorisant la lipogenèse au niveau hépatique. Ces modifications sont associées à une diminution du rapport *Bacteroidetes / Firmicutes* [879]. Cette dernière étude montre que les traitements antibiotiques peuvent être aussi déterminants que l'ingestion d'un régime gras. Enfin, au cours du DT2, il a été observé au sein de cohortes de patients : une augmentation de bactéries opportunistes et une baisse de la quantité des bactéries Gram+, productrices d'AGCC [880, 881].

Le DT2 et l'obésité sont associés à l'augmentation des acides gras libres et à une augmentation de la quantité de cytokines (IL6, TNFα, IL1β, …) reflétant une inflammation de bas bruit qui participent toutes deux à la mise en place de la résistance à l'insuline. Pendant de nombreuses années, cette inflammation de bas bruit a trouvé son origine dans le tissu adipeux. Elle est induite par la nécrose du tissu adipeux, son infiltration par les macrophages, leur stimulation par les acides gras libres et le recrutement d'autres cellules du système immunitaire acquis et inné. Le laboratoire a trouvé une autre origine à l'inflammation de bas bruit : le microbiote. En effet, les bactéries Gram -, comme les *Bacteroides* dont la quantité est diminuée chez les patients obèses diabétiques, possèdent à la surface de leur paroi un fragment inflammatoire, les LPS. En se fixant sur son récepteur spécifique, le TLR4, les LPS activent les voies inflammatoires spécifiques au TLR4, participant au recrutement des cellules immunitaires sur le site inflammé. Le laboratoire et d'autres groupes ont montré au cours du diabète une augmentation de ces fragments bactériens dans le sang. Cette augmentation est observée deux semaines seulement après l'ingestion d'un régime gras, à la fois chez l'homme et les rongeurs. D'autre part, l'infusion sanguine seule de LPS peut détériorer le métabolisme du glucose et la sensibilité à l'insuline tandis que l'absence de TLR4 ou de CD14, protéine soluble dans le sang fixant les LPS et permettant l'activation du TLR4, limite l'installation de maladies métaboliques sous régime gras [477, 855-858, 882]. Une fois dans le sang, les LPS contribuent à l'inflammation à bas

bruit et favorisent la résistance à l'insuline périphérique. De plus, des travaux récents ont montré que les LPS favorisaient le recrutement de macrophages au niveau du tissu adipeux [883].

Comment les LPS parviennent-ils à entrer dans l'organisme ? Est-ce une translocation ou un transport ? Les LPS sont des molécules hydrosolubles mais dont la partie active, le lipide A est liposoluble. Sa détoxification est réalisée au niveau du foie. Pour cela, ils sont pris en charge par les macromolécules plasmatiques telles que les lipoprotéines (VLDL ou chylomicrons) qui sont ensuite capturées par le foie. L'injection intraveineuse de LPS radioactifs a montré que la majorité des LPS se retrouvait au niveau du foie mais que 37% pouvait rester dans la circulation sanguine. Il semble cependant que la proportion restante ne possède plus les mêmes caractéristiques physicochimiques, les LPS ne sont alors plus toxiques. Ceci est la conséquence de leur détoxification par le foie. La prise en charge des LPS en période postprandiale est réalisée en grande partie par les chylomicrons dont la quantité augmente chez les personnes obèses [884]. Cette forme d'absorption semble protectrice de l'inflammation car elle permet de masquer les épitopes antigéniques des LPS jusqu'au foie [885]. D'autre part, dans certaines maladies inflammatoires (VIH, maladies inflammatoires intestinales, maladies cirrhotiques, …), la translocation de LPS est plus importante par une augmentation de la perméabilité intestinale et un défaut immunitaire. Au cours du DT2, on observe une augmentation de la perméabilité intestinale, favorisant d'une part l'absorption nutritionnelle mais également le passage des LPS, l'endotoxémie et l'inflammation à bas bruit [472, 886, 887].

Pour valider l'importance de la qualité du microbiote, des études ont été réalisées sur des souris axéniques placées sous régime gras ou des souris obèses diabétiques placées sous probiotiques ou prébiotiques. Les souris axéniques placées sous régime gras et sucré gagnent moins de poids et développent moins d'altérations glycémiques en comparaison des souris conventionnelles placées sous le même régime. Ceci s'explique entre autres par la surexpression de l'inhibiteur de la LPL, le FIAF, limitant les mécanismes de lipogenèse et d'adipogenèse chez la souris axénique [849]. D'autres études ont montré que traiter des souris ob/ob ou nourries avec un régime gras, par des cocktails antibiotiques permet la baisse de la glycémie à jeun et une meilleure tolérance au glucose, une augmentation de la sensibilité à l'insuline, une baisse du taux de triglycérides hépatiques, une augmentation de la quantité de glycogène hépatique et une baisse de l'inflammation à bas bruit [849, 888, 889].

Il a été démontré que les bactéries fermentescibles, productrices AGCC, de type *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, sont diminuées au cours des maladies métaboliques. Ainsi, il a été envisagé des traitements prébiotiques, fibres alimentaires substrats de ces bactéries, puisque les régimes gras et sucrés en sont pauvres ou des traitements probiotiques, qui consistent à apporter par gavage ces bactéries vivantes. L'utilisation de traitement prébiotiques et leurs effets sur les maladies métaboliques ont été clairement étudiés au cours des travaux de Patrice Cani. En effet, il a montré dans un premier temps que

l'utilisation des FOS améliorait le phénotype diabétique des rongeurs sous régime gras ou traités à la streptozotocine *via* la production d'AGCC, l'amélioration du métabolisme du GLP-1 et le contrôle de l'adipogenèse et de la lipolyse [679, 680, 716, 850]. En réalité, le traitement prébiotique est associé à l'augmentation de bactéries Gram + fermentescibles, productrices d'AGCC telles que les *Bifidobacterium* [478]. Traiter des animaux diabétiques avec des *Bifidobacterium* améliore la sensibilité à l'insuline et limite l'inflammation de bas bruit liée à IL6 notamment par une baisse de la translocation bactérienne [890, 891]. De la même manière, *Akkermansia municiphila* est diminuée au cours de l'obésité. Lorsqu'elle est administrée en tant que probiotique à des souris nourries d'un régime HFD, elle diminue la perméabilité *via* le GLP-2 et les endocannabinoïdes, et limite ainsi la translocation bactérienne et l'endotoxémie [887].

Les *Lactobacillus*, bactéries Gram+ et fermentescibles, sont largement utilisés en tant que probiotiques dans nos yaourts notamment pour induire un meilleur transit intestinal. D'ailleurs une étude a montré que la consommation quotidienne de yaourt était associée avec un moindre de risque de DT2 [892]. Ce sont également, dans certains cas, des bactéries capables de produire du NO, particulièrement en situation anaérobie comme c'est le cas dans le lumen intestinal (notamment *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* et *Lactobacillus farciminis*) [841, 843, 893]. Nous avons préalablement vu que ce métabolite, produit entre autre par les *Lactobacillus*, est clé dans la contrôle de la fonction intestinale notamment en terme de transit, perméabilité, translocation bactérienne, système immunitaire et inflammation intestinale [473, 843, 894]. D'ailleurs, les *Lactobacillus* activent le nerf vague et le SNE [590, 872]. Une supplémentation en *Lactobacillus* améliore le statut diabétique chez le rongeur et l'homme : meilleure sensibilité à l'insuline, meilleure tolérance au glucose. Ces effets seraient liés à différents processus : une baisse de la stéatose hépatique, une meilleur effet incrétine, la production de NO et la baisse du stress oxydant ou encore l'inhibition des glucosidases de la bordure en brosse intestinale limitant l'absorption du glucose [895-899].

### *4. CONCLUSION*

De par sa localisation et son rôle sur la fonction intestinale globale, le microbiote est déterminant dans la physiologie et dans la physiopathologie de l'hôte. Notre mode de vie a changé de manière rapide et nos cellules procaryotiques intestinales ont modifié leur écologie ce qui a eu une incidence non négligeable sur le développement de maladies nutritionnelles et métaboliques. L'étude du modèle de souris axéniques a permis de mettre en évidence que le microbiote jouait également un rôle déterminant dans la mise en place et le fonctionnement des différents systèmes nerveux et immunitaires. Pour ces raisons, l'implication du microbiote dans certaines pathologies inflammatoires, nerveuses ou psychologiques est aujourd'hui étudiée.

## E. Les traitements du DT2

Au cours des précédents chapitres nous avons pu constater la complexité des maladies métaboliques et nutritionnelles telles que l'obésité ou le DT2. Elles touchent l'ensemble des organes et se traduisent par l'augmentation du taux de sucres dans le sang ou de l'hémoglobine glyquée (Hb1Ac) responsables des aggravations de la maladie. Ainsi, les stratégies thérapeutiques envisagées ont essentiellement pour but de diminuer la glycémie et donc l'Hb1Ac. Elles diffèrent suivant le stade du DT2 : lorsqu'une intolérance au glucose ou un DT2 sont découverts, les médecins orientent surtout vers un changement des habitudes hygiéno-diététiques du patient. Si le contrôle glycémique ne s'améliore pas, les recommandations sont d'utiliser des agents pharmacologiques anti-diabétiques reposant sur des mécanismes d'action différents, administrées seules ou associées entre elles, tels que : 1) les biguanides, comprenant la metformine, qui modifient la sensibilité à l'insuline, 2) les sulfonylurées qui augmentent la sécrétion d'insuline, 3) les glitazones (interdit en France) qui augmentent la sensibilité à l'insuline mais par contre sont liés à une prise de poids, 4) les inhibiteurs des $\alpha$-glucosidases qui inhibent l'absorption du glucose au niveau intestinal 5) les inhibiteurs de SGLT2 qui inhibent la réabsorption rénale du sucre, 6) les traitements basés sur le GLP-1 qui stimulent la sécrétion d'insuline, inhibent la prise alimentaire et inhibent la vidange gastrique. Dans les stades très avancés du DT2, pour pallier l'insulinopénie et l'insuffisance pancréatique, l'insuline est utilisée. Dans les cas d'obésités morbides sont utilisées les chirurgies bariatriques contribuant à une perte de poids massive et une amélioration du contrôle glycémique. Le but thérapeutique peut varier suivant le traitement, l'âge du diabète ou les pathologies associées mais il est globalement d'atteindre une Hb1AC<6,5-7%.

Chacun de ces traitements est cependant associé à différents effets secondaires : prise de poids (insuline, glitazones, sulfonylurées), nausées et mal-être intestinal (traitements basés sur le GLP-1, metformine), rechute et dépression (chirurgie bariatrique) … De plus, les patients ne sont pas égaux par rapport à leur réponse aux traitements et le taux d'Hb1Ac reste parfois très élevé.

Les traitements basés sur le GLP-1 sont aujourd'hui très diversifiés. On distingue les inhibiteurs de DPP4 et les agonistes du GLP-1r. Dans ces deux groupes, il existe différentes molécules qui selon leur structure physico-chimique possèdent des actions différentes dans l'organisme. Bien que la thérapie soit prometteuse, comme pour les autres traitements, on observe une grande hétérogénéité de réponse en terme d'Hb1Ac.

Dans ce cadre-là, j'ai eu l'occasion d'écrire une revue en français « Traitement du diabète par les agonistes du récepteur au GLP-1 – Bases mécanistes justifiant la réévaluation » dans le journal Diabète et Obésité, en Novembre 2015 (Volume 10 ; Numéro 92 ; page 180-186). Elle résume les différentes molécules basées sur le traitement au GLP-1, leurs actions et en quoi aujourd'hui elles nécessitent d'être discutées et réévaluées.

# TRAITEMENT DU DIABÈTE PAR LES AGONISTES DU RÉCEPTEUR AU GLP-1

## Bases mécanistes justifiant la réévaluation

Estelle Grasset[1, 2], Rémy Burcelin[1, 2]

**Selon l'Organisation mondiale de la Santé, les maladies métaboliques, incluant l'obésité et le diabète de type 2, se répandent de manière pandémique pour atteindre 30 % de la population mondiale d'ici 2050.**

### INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise par une dérégulation du métabolisme glucidique induite principalement par une altération d'une part de la sécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie (rapport insuline/glucose trop bas, évoluant vers une insuffisance pancréatique) et, d'autre part, de son action (résistance périphérique à l'insuline) générant un hyperinsulinisme, cependant insuffisant pour normaliser la glycémie. L'hyperglycémie (supérieure à 5,6-7 mmol/l à jeun), modifiant l'hémoglobine en hémoglobine glycquée (HbA1c, taux supérieur à 6,5-7 %), est responsable de complications microvasculaires telles que la cécité ou la neuropathie autonome. De multiples traitements ont été proposés allant de la mise en place de recommandations hygiénodiététiques, aux traitements pharmacologiques comprenant : metformine (insulinorésistance), sulfonylurées (insulinosécrétion), insulinothérapie, jusqu'à la chirurgie bariatrique (dans les cas d'obésités morbides). Cependant, dans la plupart des cas, l'amélioration thérapeutique obtenue est transitoire (de quelques mois à quelques années) et n'atteint que minoritairement l'objectif thérapeutique d'une HbA1c à 6,5 %. D'autre part, ces traitements n'agissent que peu ou pas sur le poids, voire même augmentent la prise de poids, notamment pour l'insuline et les sulfonylurées. De plus, aucun traitement n'améliore la fonctionnalité des cellulesß. Enfin, des effets secondaires indésirables et parfois dangereux peuvent survenir, tels que la prise de poids et des hypoglycémies sévères.

*1. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse*
*2. Université de Toulouse Paul Sabatier (1), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut des Maladies Métaboliques Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse*

Cette dernière décennie a été caractérisée par la mise sur le marché d'une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur la découverte plus ancienne des incrétines. Il s'agit de deux hormones intestinales, le GLP-1 (*glucagon-like peptide 1*) et le GIP (*gastric insulinotropic peptide*), capable de stimuler la sécrétion d'insuline en présence d'une hyperglycémie uniquement. Cette caractéristique physiologique majeure a permis d'éviter les hypoglycémies iatrogènes sévères observées au cours d'autres traitements antidiabétiques. Cependant, une peptidase, la DPP4 (*dipeptidyl peptidase 4*), réduit la demi-vie des hormones à moins d'une minute ce qui rend impossible l'utilisation des peptides natifs en thérapeutique. Ainsi, il a été créé d'une part des agonistes des récepteurs aux incrétines qui soient résistants à la dégradation par la DPP4 et, d'autre part, des inhibiteurs de cette enzyme. Pour des raisons d'efficacité, seul le GLP-1 a donné lieu à des développements thérapeutiques. Ces deux classes de molécules, agonistes du récepteur au GLP-1 (aGLP-1r) et inhibiteurs de la DPP4 (iDPP4), ont également des effets

thérapeutiques supplémentaires : en plus de contrôler la glycémie, elles diminuent la prise de poids en favorisant la satiété et n'induisent pas d'hypoglycémie iatrogène.

Cependant, si les activités insulinosécrétagogues et hypoglycémiantes du GLP-1 sont clairement admises, les modes d'action des différents traitements sont encore mal compris. De plus, les analyses épidémiologiques montrent des résultats controversés à proposer des traitements par aGLP-1r et iDPP4. En effet, en monothérapie, suivant le type de traitement, seulement 40 à 65 % des diabétiques atteignent une HbA1c inférieure à 7 % (1, 2). De plus, ces thérapies sont souvent associées à des risques de pancréatites sévères et des effets secondaires intestinaux indésirables (nausées, problèmes de transit). L'optimisation des traitements pourrait passer par une meilleure compréhension des modes d'action et des profils physiopathologiques des patients, afin d'optimiser les thérapies en fonction des patients DT2.

## MODE D'ACTION DES INCRÉTINES

La notion d'incrétine vient de l'observation que suite à une ingestion de glucose, les concentrations d'insuline sont de 3 à 5 fois supérieures à celles obtenues lors d'une injection intraveineuse de glucose, suggérant l'existence d'hormones intestinales produites en réponse au glucose et capables de décupler la sécrétion d'insuline en conditions d'hyperglycémie. Ces incrétines (GIP et GLP-1) sont synthétisées respectivement dans les cellules K (duodénum et jéjunum) et L (iléon et colon) de l'épithélium intestinal. Ces hormones se lient chacune à un récepteur spécifique : le récepteur au GLP-1 (GLP-1r) localisé dans le système nerveux central et périphérique, dans le pancréas et dans le tractus digestif, et le récepteur au GIP (GIPr) possédant une distribution plus ubiquiste incluant le tissu adipeux, le foie et le système nerveux. Une fois libérées, leur demi-vie est très courte, moins d'une à deux minutes. En effet, ces peptides sont rapidement dégradés par la DPP4 et la *neutral endopeptidase* ce qui suggère que leur mode d'action est essentiellement local et donc intestinal (3). Ainsi, l'action du GLP-1 est principalement nerveuse, médiée par le système nerveux entérique et par le nerf vague innervant l'intestin, plutôt que de manière endocrinienne. D'autre part, le GLP-1 et le GIP peuvent traverser la barrière hématoencéphalique pour agir directement sur les cellules cérébrales. Ils peuvent également être sécrétés par quelques neurones du système nerveux central et y agir localement.

Le GLP-1 et le GIP stimulent tous deux la sécrétion d'insuline en conditions d'hyperglycémie (supérieure à 4,5 mmol/l) et peuvent également favoriser la synthèse d'insuline. Le GLP-1 se distingue du GIP en inhibant la prise alimentaire, la vidange gastrique et la sécrétion du glucagon par les cellules α contribuant à diminuer fortement la glycémie. Pour la sécrétion d'insuline, ces deux hormones constituent une bonne stratégie thérapeutique dans le cadre du DT2. Cependant, par la diversité de ses actions pour le contrôle de la glycémie, le GLP-1 semble plus intéressant comme stratégie thérapeutique.

La physiologie des incrétines chez les patients DT2 est encore mal connue. Ces patients sont caractérisés par une forte augmentation plasmatique de la sécrétion du GIP, alors que celle du GLP-1 est soit augmentée, soit inchangée, soit réduite (4, 5). De plus, par comparaison à des sujets normaux, les patients diabétiques ont une baisse de leur capacité à stimuler la sécrétion d'insuline de 30 % pour le GLP-1 et de 50 % pour le GIP (6, 7). La perte d'action du GIP s'explique par une baisse de l'expression du GIPr par la cellule β (8, 9). Chez les DT2, l'effet insulinotropique du GIP est réduit. Ceci est dû à la diminution du nombre de récepteurs et à la réduction de l'activation du signal intracellulaire.

**Le GLP-1 a ainsi un potentiel thérapeutique important. En plus de stimuler la synthèse et la sécrétion d'insuline en hyperglycémie, il inhiberait la prise alimentaire, la vidange gastrique et la sécrétion de glucagon ce qui contribuerait à la baisse de l'hyperglycémie.**

## LES INHIBITEURS DE LA DPP4

La DPP4 est présente à la surface des capillaires sanguins et des lymphocytes et existe aussi sous forme soluble dans le sang. Elle dégrade les incrétines dès leur sécrétion réduisant ainsi fortement leur demi-vie à quelques minutes. Au cours du DT2, l'expression, la quantité et l'activité de cette enzyme sont augmentées (10). Des modèles animaux invalidés pour cette enzyme montrent une résistance au développement de l'obésité et du DT2 induite par un régime riche en graisses et

en sucres. Des iDPP4 (classe des gliptines) ont ainsi été développés pour augmenter la demi-vie des incrétines natives, sécrétées par l'intestin. Administrées par voie orale, ces molécules hypoglycémiantes (sitagliptine, vidalgliptine...) se différencient par leur biodisponibilité et leur durée d'action.

Chez des patients diabétiques, l'utilisation aiguë ou chronique de ces inhibiteurs a montré une baisse significative de la glycémie et de l'HbA1c (environ 0,7 %). Au cours d'un repas-test, des patients traités de manière aiguë avec un iDPP4 (vidalgliptine) ont montré une baisse de la glycémie et de la glucagonémie et une augmentation de l'insulinémie (11). Ni perte ni prise de poids ne sont observées chez les patients traités avec les iDPP4. Chez des modèles de rongeurs diabétiques, des traitements par iDPP4 (sitagliptine) ont montré des résultats identiques et mis en évidence une augmentation de la survie des cellules B (12).

D'autre part, l'administration de faibles concentrations de sitagliptine, protégeant le GLP-1 endogène de sa dégradation et augmentant par conséquent la concentration du peptide actif localement dans l'intestin, active le système nerveux entérique et vagal. Des doses de sitagliptine faibles permettent de réduire l'activité de la DPP4 uniquement de l'intestin tout en stimulant la sécrétion d'insuline (13). De plus, la perfusion d'iDPP4 dans la veine porte n'induit plus de sécrétion d'insuline lorsqu'une vagotomie a été effectuée (14). L'action des iDPP4 semble donc essentiellement nerveuse (système nerveux entérique et vagal) et localisée exclusivement au niveau de l'intestin et du système porte.

**Les iDPP4 administrés par voie orale augmentent la demi-vie du GLP-1 et stimulent la sécrétion d'insuline via le nerf vague. Lors d'un traitement chronique, ils augmenteraient la quantité de cellules bêta et diminueraient l'activité et l'expression de la DPP4 principalement intestinale et entérique.**

## LES AGONISTES DU RÉCEPTEUR AU GLP-1

Deux classes d'agonistes du GLP-1r (aGLP-1r), ou agents incrétinomimétiques, ont été développées :

### LES DÉRIVÉS DE L'EXENDINE 4 (EXÉNATIDE)

Découvert dans les glandes salivaires d'un lézard géant "le monstre de Gila", l'**exénatide** possède 53 % d'homologie avec le GLP-1, mais se différencie par les deux premiers acides aminés N-terminaux qui ne sont pas le substrat de la DPP4. Cette différence protège le peptide de l'action de la DPP4 durant plusieurs heures. Deux dérivés ont été développés. Le **lixisenatide**, résistant à l'activité de la DPP4, possède les 39 premiers acides aminés en commun avec l'exénatide. Cependant, la proline 38 est absente et 6 résidus lysine sont ajoutés. **L'exénatide-LAR**, où l'exénatide est piégé dans une capsule de polymère biodégradable, est une forme encore plus stable, avec une action de très longue durée.

### LES ANALOGUES DU GLP-1

Dérivant de la forme active (7-36) du GLP-1 humain, le **liraglutide** conserve 97 % d'homologie. Ce peptide est cependant caractérisé par la substitution de l'arginine 34 par une lysine et l'addition d'un groupement acide glutamique lié à un acide gras de type C16 en position 26. In vitro, il est clivé par la DPP4, mais in vivo sa liaison à l'albumine par la partie acylée le protège de l'activité de l'enzyme, augmentant sa demi-vie. Approximativement 2 % de la quantité totale circulante de liraglutide se trouve sous forme libre active. Le **taspoglutide** a 93 % d'homologie avec le GLP-1. Il se différencie par une substitution de l'alanine 8 et de la glycine 35 par un acide 2 alpha-aminoisobutyrique, rendant la molécule résistante à la DPP4 in vitro et in vivo. L'**albiglutide** résulte de la fusion d'un dimère de GLP-1 résistant à la DPP4 avec de l'albumine humaine, le rendant encore plus résistant.

Administrés par voie sous-cutanée, ces peptides ont des modes d'action in vivo distincts, car leur durée de vie et leur pharmacologie sont différentes. Des variations relatives à leur capacité à traverser la barrière hématoencéphalique, leur affinité pour le GLP-1r, leur action endocrinienne versus nerveuse ou les effets sur la glycémie à jeun ou en état postprandial ont été observés. On distingue ainsi les agonistes à action immédiate, mais de courte durée (quelques heures, exénatide, lixisenatide), et ceux à action progressive, mais de longue durée (jours voire semaines, liraglutide, taspoglutide, albiglutide, exenatide-LAR).

> **Les agonistes de courte durée**

**L'exénatide :** (2 injections/jour).

Chez les patients diabétiques, il améliore la fonction des cellules ß pour la sécrétion d'insuline et diminue ainsi la glycémie et l'HbA1c (inférieure à 7 % pour 46 % des patients traités [2]). Cependant, ces actions ne sont pas maintenues après arrêt du traitement. Des données précliniques confirment ces effets et montrent que l'effet hypoglycémiant nécessiterait, entre autres, l'augmentation de la masse des cellules ß (15). Chez les patients obèses, il réduit le poids par diminution de la prise alimentaire (16).

**Le lixisenatide :** (1-2 injections/jour).
Malgré une demi-vie plus courte que les autres et bien qu'il ne passe pas la barrière hématoencéphalique, il possède une forte affinité pour le GLP-1r (plus importante que l'exénatide et le liraglutide) et diminue l'HbA1c. Son action sur la glycémie postprandiale est plus intense que celle des autres molécules (jusqu'à 75 % de diminution), car il agit fortement sur la réduction de la vidange gastrique (17).

### > Les agonistes de longue durée

**Le liraglutide :** (1 injection/jour).
Son interaction avec l'albumine ralentit sa dégradation par la DPP4 et favorise le passage de la barrière hématoencéphalique. Il améliore la glycémie postprandiale et à jeun sans risque d'hypoglycémie permettant d'obtenir un taux d'HbA1c inférieur à 7 % chez 47 % des patients (2). Cette action glycémique est médiée par l'augmentation de la sécrétion d'insuline, l'inhibition de la vidange gastrique et la diminution de la sécrétion du glucagon, ce qui contribuerait à un bon contrôle de la glycémie à jeun comme postprandiale. D'autre part, il induit une perte de poids importante ce qui serait dû à l'effet satiétogène et sur la dépense énergétique de cette molécule en agissant directement sur le cerveau (18-21). Des études précliniques sur rongeurs diabétiques ont montré que le liraglutide contrôlait le métabolisme glucidique notamment en augmentant la masse des cellules ß (22). De plus, elles ont montré que sa bonne accessibilité au cerveau favoriserait l'activation directe du noyau arqué induisant la baisse de la prise alimentaire sans variation de la dépense énergétique et expliquerait la perte de poids (23).

**Le taspoglutide :** (1 injection/semaine).
Chez des patients DT2, il permet de diminuer la glycémie à jeun et en postprandial, mais également le poids (24). En effectuant un repas-test chez des patients diabétiques, il diminue la glycémie et la glucagonémie et augmente la sécrétion d'insuline (25). In vivo, chez des rongeurs diabétiques, in vitro, dans des cultures d'îlots et ex vivo, sur du pancréas perfusé de rats ZDF, le taspoglutide augmente la sécrétion d'insuline induite par le glucose (26). Contrairement au liraglutide, sa stabilité est compatible avec un effet thérapeutique sur la base d'une injection hebdomadaire favorisant une bonne observance des patients.

**L'albiglutide :** (1 injection/semaine).
Chez l'Homme, il baisse également la glycémie à jeun et postprandiale (27). Son action chez les souris saines est à la fois périphérique et centrale : la molécule améliore la tolérance au glucose par la stimulation de la sécrétion d'insuline sans modification de la glucagonémie, inhibe la vidange gastrique et la prise alimentaire via l'activation des noyaux hypothalamiques (28).

**L'exénatide-LAR :** (1 injection/semaine).
Il agit comme l'exénatide, mais s'en démarque par une meilleure régulation journalière de la glycémie à jeun et postprandiale (29). Son effet est marqué sur la baisse de l'HbA1c (inférieure à 7 % pour 63 % des patients traités [2]).

**Les agonistes de courte durée (exénatide, lixisenatide) ont un temps d'exposition de quelques heures et sont souvent administrés juste avant ou pendant un repas. Leur action sur la glycémie est essentiellement prandiale en ciblant des mécanismes tels que la vidange gastrique ou la sécrétion d'insuline induite pendant ou juste après un repas.**

**Les agonistes de longue durée (liraglutide, taspoglutide, albiglutide, exénatide-LAR) ont un temps d'exposition de un jour à une semaine favorisant une meilleure observance des patients. Leurs actions hypoglycémiantes opèrent quotidiennement à la fois sur la glycémie postprandiale et sur la glycémie à jeun par le contrôle de la sécrétion journalière d'insuline et du glucagon permettant ainsi des régulations dépendantes de ces hormones plus profondes comme la néoglucogenèse hépatique ce qui facilite le contrôle de la glycémie à jeun.**

**Injectées de manière chronique, ces molécules ont pour action commune une augmentation de**

**la masse des cellules β et un effet insulinotropique plus important les démarquant de tout autre traitement utilisé dans le DT2. Cependant, bien qu'observés chez l'animal de laboratoire, les effets rémanents des incrétines postaction thérapeutique ne sont pas observés chez l'Homme.**

**Les molécules pouvant passer la barrière hématoencéphalique agissent directement sur l'hypothalamus pour diminuer la prise alimentaire et ont une meilleure action sur la perte de poids** *(Fig. 1)*.

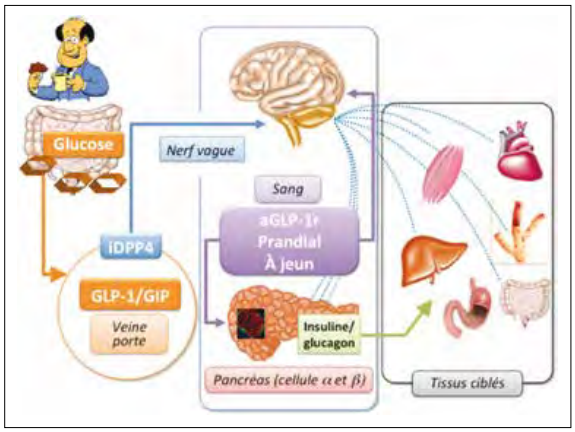



**FIGURE 1 - Action des iDPP4 et des aGLP-1r. Les iDPP4, en protégeant les incrétines endogènes, activent le nerf vague pour la régulation de la glycémie prandiale via l'inhibition de la vidange gastrique et la sécrétion d'insuline. Les aGLP-1r injectés en sous-cutané agissent sur la glycémie à jeun et prandiale suivant leur demi-vie plus ou moins longue. Leur action est à la fois vagale et endocrinienne, pour la sécrétion d'insuline et l'inhibition de la vidange gastrique. Par leur capacité à traverser la barrière hématoencéphalique, certains des aGLP-1r contrôlent la satiété et la dépense énergétique et induisent une perte de poids.**

## LE DT2 : DIFFÉRENTS ÉTATS, DIFFÉRENTES ÉVOLUTIONS ET DES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES MULTIPLES

Le DT2 est une maladie multiorganique, associée à l'obésité, avec une évolution différentielle des paramètres physiopathologiques au cours du temps (Tab. 1). Les traitements avec les aGLP-1r et les iDPP4 doivent donc être adaptés à chaque patient en fonction des caractéristiques physiopathologiques qui peuvent rendre compte de l'efficacité d'une stratégie thérapeutique plutôt qu'une autre.

L'hyperglycémie à jeun, régulée par la production hépatique de glucose sous l'influence du glucagon et de l'insuline sera diminuée par les aGLP-1r de longue durée (liraglutide, albiglutide, exénatide-LAR) qui contrôlent la sécrétion journalière des ces hormones. L'hyperglycémie postprandiale sera abaissée par les aGLP-1r de courte durée (exénatide, lixisenatide) ou les iDPP4 puisqu'ils régulent la sécrétion d'insuline postprandiale, la vidange gastrique, la prise alimentaire et l'action nerveuse rapide du GLP-1. En associant ces deux types d'aGLP-1r, voire en les combinant avec des iDPP4, l'hyperglycémie pourrait être plus aisément contrôlée. Une thérapie associant les inhibiteurs de SGLT2 (diminuant l'absorption intestinale et rénale de glucose)/aGLP-1r peut être aussi intéressante pour le contrôle de la glycémie.

À des stades avancés de DT2, la quantité d'insuline sécrétée est fortement réduite par des mécanismes non élucidés, mais relatifs au contexte glucolipotoxique. On privilégiera donc des traitements aux aGLP-1r ciblant la vidange gastrique ou la prise alimentaire. Plusieurs études ont montré qu'une bithérapie aGLP-1r/insuline pouvait pallier le manque d'insuline et améliorer la glycémie, le taux d'HbA1c et la perte de poids sans risque d'hypoglycémie (30).

Pour réduire l'insulinorésistance périphérique, notamment due à l'obésité et aux hyperlipidémies, les aGLP-1r traversant la barrière hématoencéphalique (liraglutide) seront privilégiés, car ils permettent dans un premier temps de diminuer la prise de poids, ce qui favorisera à terme une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Les aGLP-1r (lixisénatide) contrôlant la vidange gastrique pourront aussi être utilisés pour favoriser l'envoi de messages de satiété.

Enfin, lorsque le diabète se caractérise par une neuropathie autonome

marquée, des aGLP-1r de longue durée seront envisagés pour favoriser le rôle endocrinien plutôt que nerveux du GLP-1 *(Tab. 1)*.

## TRAITEMENTS BASÉS SUR LE GLP-1 : NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ?

In vitro, une exposition chronique au GLP-1 ou à l'exénatide induit une désensibilisation de son récepteur (31, 32). D'autre part, la perfusion sanguine de GLP-1 à forte dose induit une diminution de son action inhibitrice sur la vidange gastrique lors d'une seconde exposition à la molécule ce qui est défini par la tachyphylaxie. Ces effets seraient médiés par une désensibilisation au GLP-1 du nerf vague (33). On peut ainsi envisager une certaine alternance thérapeutique lorsque la perte d'efficacité est constatée au cours du temps. D'autre part, une combinaison dans le temps de plusieurs molécules pourrait aussi être plus favorable.

La signalisation du récepteur peut être perturbée par l'hyperlipidémie plasmatique observée dans le DT2. En effet, au niveau de la cellule ß, la lipotoxicité engendre une perte d'action du GLP-1 pour la sécrétion d'insuline (34). Le contrôle de l'hyperlipidémie pourrait améliorer la réponse aux aGLP-1r et iDPP4.

La signalisation du GLP-1r (notamment nerveuse) est encore méconnue, tout comme la sensibilité au GLP-1 des personnes diabétiques. Même si l'efficacité des traitements aGLP-1r ou iDPP4 chez ces patients est reconnue, le fonctionnement moléculaire du

**TABLEAU 1 - DIFFÉRENTS ÉTATS DE DT2. Différents paramètres peuvent être mesurés pour évaluer l'état du DT2. Chaque paramètre peut être associé à des caractéristiques physiopathologiques garantissant la plus ou moins bonne efficacité de chaque traitement. Pour chaque patient, évaluer ces paramètres permettrait d'associer un traitement garantissant une meilleure efficacité via un contrôle coordonné de plusieurs fonctions physiopathologiques, c'est-à-dire sécrétion d'insuline, de glucagon, vidange gastrique, satiété etc.**

| Paramètres mesurés | | Caractéristiques physiopathologiques |
|---|---|---|
| **Glycémie** | Hyperglycémie à jeun modérée | Production hépatique de glucose excessive |
| | Hyperglycémie à jeun marquée | Insulinorésistance hépatique/ périphérique et sécrétion d'insuline réduite |
| | Hyperglycémie prandiale modérée | Défaut de sensibilité hépatique, périphérique et défaut de sécrétion d'insuline |
| | Hyperglycémie prandiale marquée | Défaut de sensibilité hépatique, périphérique et défaut de sécrétion d'insuline |
| **Poids** | Obésité androïde | Risque de lipotoxicité et inflammation (action et sécrétion d'insuline réduites) |
| | Obésité gynoïde | Stockage du glucose et des lipides |
| | Habitudes alimentaires | Système nerveux central |
| **Insulinémie** | Hyperinsulinisme à jeun adapté à la glycémie | Insuline : action réduite mais sécrétion maintenue |
| | Hyperinsulinisme prandial adapté à la glycémie | Insuline : action réduite mais sécrétion maintenue |
| | Hyperinsulinisme à jeun inadapté à la glycémie | Insuline : action et sécrétion réduites |
| | Hyperinsulinisme prandial inadapté à la glycémie | Insuline : action et sécrétion réduites |
| **Autres** | Signe de neuropathie autonome diabétique | Problèmes cardiovasculaires, sécrétions d'insuline/de glucagon inadaptées |
| | Dyslipidémies | Risque de lipotoxicité et inflammation (action et sécrétion d'insuline réduites) |
| | Glucagon élevé | Hyperglycémie à jeun et prandiale |
| | Âge/sexe/ménopause | Risque de dysfonctionnement multi-organique |
| | Durée du diabète, complications associées | Risque de dysfonctionnement multi-organique |
| | Etc. | Etc. |

GLP-1r reste encore à éclaircir d'un point de vue fondamental et pourrait ouvrir d'autres pistes dans le traitement du DT2.

Le lien de causalité entre le microbiote intestinal ou buccal et les maladies métaboliques est aujourd'hui clairement admis. En effet, en gavant le microbiote provenant de patients diabétiques et obèses à une souris axénique, c'est-à-dire dépourvue de bactéries, la souris devient diabétique et obèse. D'autre part, le lien entre le microbiote et l'homéostasie neuronale intestinale est de plus en plus reconnu (35, 36). Le microbiote joue également un rôle important sur la sécrétion du GLP-1 : via les lipopolysaccharides et via les métabolites qu'il produit (type acides gras à chaîne courte comme butyrate, propionate), il stimule la sécrétion de l'hormone (37, 38). Ainsi, mettre en place une stratégie thérapeutique ciblant le microbiote (probiotique, prébiotique) et le GLP-1 pourrait être également envisagé.

## CONCLUSION

La thérapie antidiabétique basée sur l'action du GLP-1 n'est pas satisfaisante puisque 50 % des patients n'atteignent pas l'objectif thérapeutique de 6,5 % d'HbA1c. Elle doit être potentialisée soit en associant plusieurs aGLP-1r, soit en associant aGLP-1r/iDPP4, soit en les combinant à d'autres traitements antidiabétiques (inhibiteurs de SGLT2, insuline...), afin d'adapter la thérapie à chaque patient selon son stade de développement du diabète, ses paramètres métaboliques, physiologiques et anthropomorphiques. De plus, la compréhension des mécanismes de fonctionnement du GLP-1r d'un point de vue fondamental, à la fois en physiologie et en physiopathologie, est aujourd'hui nécessaire pour développer de nouvelles stratégies permettant d'améliorer les thérapies basées sur le GLP-1. ■

✖ *Liens d'intérêts.*

**MOTS-CLÉS**

**Diabète de type 2, Incrétines, GLP-1, DPP4**

## Bibliographie

1. Jones AG, Shields BM, Hyde CJ et al. Identifying good responders to glucose lowering therapy in type 2 diabetes: implications for stratified medicine. PLoS One 2014 ; 9 : e111235.
2. Esposito K, Mosca C, Brancario C et al. GLP-1 receptor agonists and HBA1c target of <7% in type 2 diabetes: meta-analysis of randomized controlled trials. Curr Med Res Opin 2011 ; 27 : 1519-28.
3. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36) amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. Endocrinology 1999 ; 140 : 5356-63.
4. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes : what is up, what is down? Diabetologia 2011 ; 54 : 10-8.
5. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF et al. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. Diabetes 2001 ; 50 : 609-13.
6. Aulinger BA, Vahl TP, Wilson-Pérez HE et al. Beta-Cell Sensitivity to GLP-1 in Healthy Humans Is Variable and Proportional to Insulin Sensitivity. J Clin Endocrinol Metab 2015 ; 100 : 2489-96.
7. Nauck MA, Heimesaat mm, Orskov C et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. J Clin Invest 1993 ; 91 : 301-7.
8. Lynn FC, Pamir N, Ng EH et al. Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats. Diabetes 2001 ; 50 : 1004-11.
9. Younan SM, Rashed LA. Impairment of the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in obese and diabetic rats is related to the down-regulation of its pancreatic receptors. Gen Physiol Biophys 2007 ; 26 : 181-93.
10. Lee SA, Kim YR, Yang EJ et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2013 ; 98 : 2553-61.
11. Balas B, Baig MR, Watson C et al. The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses endogenous glucose production and enhances islet function after single-dose administration in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 2007 ; 92 : 1249-55.
12. Mu J, Petrov A, Eiermann GJ et al. Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. Eur J Pharmacol 2009 ; 623 : 148-54.
13. Waget A, Cabou C, Masseboeuf M et al. Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice. Endocrinology 2011 ; 152 : 3018-29.
14. Fujiwara, K., et al., Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats. J Neurochem, 2012. 121(1) : p. 66-76.
15. Xu G, Gotoh K, Chiba S et al. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. Diabetes 1999 ; 48 : 2270-6.
16. Rosenstock, J., et al., Effects of exenatide and lifestyle modification on body weight and glucose tolerance in obese subjects with and without pre-diabetes. Diabetes Care, 2010. 33(6) : p. 1173-5.
17. Lorenz M, Klaff LJ, Schwartz S et al. Effects of lixisenatide once daily on gastric emptying in type 2 diabetes--relationship to postprandial glycemia. Regul Pept 2013 ; 185 : 1-8.
18. Degn KB, Juhl CB, Sturis J et al. One week's treatment with the long-acting glucagon-like peptide 1 derivative liraglutide (NN2211) markedly improves 24-h glycemia and alpha- and beta-cell function and reduces endogenous glucose release in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2004 ; 53 : 1187-94.
19. Mayor S. Liraglutide improves weight loss in people who are overweight or obese, study shows. BMJ 2015 ; 351 : h3545.
20. Nagai Y, Hashimoto E, Oikawa R et al. Differing effects of liraglutide on gastric emptying in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab 2014 ; 16 : 573-6.
21. Seino Y, Rasmussen MF, Zdravkovic M, Kaku K. Dose-dependent improvement in glycemia with once-daily liraglutide without hypoglycemia or weight gain: A double-blind, randomized, controlled trial in Japanese patients with type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pract 2008 ; 81 : 161-8.
22. Shimoda M, Kanda Y, Hamamoto S et al. The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes. Diabetologia 2011 ; 54 : 1098-108.
23. Secher A, Jelsing J, Baquero AF et al. The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss. J Clin Invest 2014 ; 124 : 4473-88.
24. Nauck MA, Ratner RE, Kapitza C et al. Treatment with the human once-weekly glucagon-like peptide-1 analog taspoglutide in combination with metformin improves glycemic control and lowers body weight in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone: a double-blind placebo-controlled study. Diabetes Care 2009 ; 32 : 1237-43.
25. Gastaldelli A, Balas B, Ratner R et al. A direct comparison of long- and short-acting GLP-1 receptor agonists (taspoglutide once weekly and exenatide twice daily) on postprandial metabolism after 24 weeks of treatment. Diabetes Obes Metab 2014 ; 16 : 170-8.
26. Uhles S, Wang H, Bénardeau A et al. Taspoglutide, a novel human once-weekly GLP-1 analogue, protects pancreatic beta-cells in vitro and preserves islet structure and function in the Zucker diabetic fatty rat in vivo. Diabetes Obes Metab 2011 ; 13 : 326-36.
27. Matthews JE, Stewart MW, De Boever EH et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, safety, and tolerability of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in patients with type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2008 ; 93 : 4810-7.
28. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. Diabetes 2004 ; 53 : 2492-500.
29. Kim D, MacConell L, Zhuang D et al. Effects of once-weekly dosing of a long-acting release formulation of exenatide on glucose control and body weight in subjects with type 2 diabetes. Diabetes Care 2007 ; 30 : 1487-93.
30. Eng C, Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist and basal insulin combination treatment for the management of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Lancet 2014 ; 384 : 2228-34.
31. Baggio LL, Kim JG, Drucker DJ. Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. Diabetes 2004 ; 53 : S205-14.
32. Fehmann HC, Habener JF. Homologous desensitization of the insulinotropic glucagon-like peptide-I (7-37) receptor on insulinoma (HIT-T15) cells. Endocrinology 1991 ; 128 : 2880-8.
33. Nauck MA, Kemmeries G, Holst JJ, Meier JJ. Rapid tachyphylaxis of the glucagon-like peptide 1-induced deceleration of gastric emptying in humans. Diabetes 2011 ; 60 : 1561-5.
34. Hodson DJ, Mitchell RK, Bellomo EA et al. Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity. J Clin Invest 2013 ; 123 : 4182-94.
35. Anitha M, Vijay-Kumar M, Sitaraman SV et al. Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. Gastroenterology 2012 ; 143 : 1006-16 e4.
36. Kabouridis PS, Lasrado R, McCallum S et al., Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. Neuron 2015 ; 85 : 289-95.
37. Kahles F, Meyer C, Möllmann J et al. GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering. Diabetes 2014 ; 63 : 3221-9.
38. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes 2012 ; 61 : 364-71.

# VII. PROBLEMATIQUE

Par cette étude bibliographique, nous avons mis en évidence que la régulation de la glycémie à l'échelle cellulaire, tissulaire, puis de l'organisme entier est précise, fine et essentielle pour le bon fonctionnement de l'organisme. De nombreux organes sont clés dans cette régulation. Le foie, le tissu adipeux et les muscles assurent le stockage/déstockage des nutriments. Le foie, le rein et l'intestin assurent la production de glucose et de lipides en période de carence nutritionnelle. Le SNC, le SNA et le pancréas contrôle de manière nerveuse et endocrinienne l'activité de ces tissus.

Le DT2 est une pathologie caractérisée par une mauvaise régulation de la glycémie. C'est une maladie essentiellement d'origine nutritionnelle et environnementale. Elle est très complexe puisqu'elle touche de nombreux tissus et est à l'origine de graves complications physiologiques et d'une détérioration importante de la qualité de vie. Tous les mécanismes impliqués dans sa mise en place et sa physiopathologie restent encore à éclaircir. Elle est également d'un enjeu sociétal majeur car elle touche de plus en plus de monde et est de plus en plus coûteuse pour les différents états à travers le monde. Longtemps associée à une obésité, elle est caractérisée aujourd'hui par un nouveau phénotype non associé à l'obésité. De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été envisagées depuis plusieurs dizaines d'années avec, aujourd'hui comme les plus efficaces, la metformine dont le mécanisme d'action reste encore à éclaircir, les thérapies basées sur le GLP-1 ou encore la chirurgie bariatrique lorsque le DT2 est associé à une obésité morbide. Malheureusement, une partie des patients traités ne voient pas leur niveau d'Hb1Ac atteindre l'objectif < 6,5-7%. Ces réponses différentielles peuvent s'expliquer par le phénotype et le génotype du patient qui diffèrent entre chaque individu suivant l'âge du diabète, l'observance et plus récemment le microbiote intestinal.

Le GLP-1, hormone intestinale contrôlant la glycémie, ne nous a pas encore révélé tous ses secrets. Beaucoup d'inconnues persistent quant à la régulation de son expression, de sa sécrétion, de sa dégradation et de son action. En effet, bien qu'aujourd'hui il est clairement démontré que le GLP-1 active un axe intestin-cerveau *via* le nerf vague, les voies de signalisation nerveuses impliquées notamment au niveau intestinal restent à éclaircir. Aujourd'hui l'influence du microbiote sur le métabolisme, la physiologie intestinale (immunité, système endocrinien, nerveux, axe intestin-cerveau) n'est plus à démontrer. La proximité entre les cellules L sécrétant le GLP-1, les neurones entériques, les afférences vagales et le microbiote suggère que ce dernier pourrait influencer la réponse au GLP-1 comme il module sa sécrétion.

Ainsi, dans ce contexte, nous nous sommes posés les questions suivantes : quels mécanismes moléculaires peuvent expliquer les absences de réponse au GLP-1 chez certains patients diabétiques ? Quelles sont les voies de signalisation du GLP-1 au niveau entérique et vagal ? Quels sont les acteurs modulant ces voies pouvant expliquer les différentes réponses aux traitements basés sur le GLP-1 ?

Pour l'ensemble de l'étude nous avons travaillé sur différents modèles de souris mâles adulte C57/B6 ou sur les neurones en culture primaire issus de ces souris. Le DT2 a été induit de manière nutritionnelle à l'aide d'un régime gras et sucré noté HC-HFD (high-carbohydrate high-fat diet) ou à l'aide d'un régime uniquement enrichi en gras noté HFD (high-fat diet), pendant 3 mois.

# VIII. CHAPITRE 4 : ARTICLE - La dysbiose associée au diabète de type 2 induit une perte de la réponse au GLP-1 par des mécanismes dépendants du NO et de l'axe intestin-cerveau

## A. Résumé

Au cours de cette étude, nous avons montré que des souris rendues diabétiques après 3 mois de régime riche en gras (HFD) et dépourvu de sucre, présentent une baisse de sensibilité au GLP-1 pour la sécrétion d'insuline, l'inhibition de la vidange gastrique et de la prise alimentaire. Cette perte de sensibilité est associée à une neuropathie entérique caractérisée par une baisse des marqueurs neuronaux et gliaux en RT-qPCR et en immunohistochimie et à une baisse de l'expression du GLP-1r intestinal et vagal. Nous avons étudié la voie de signalisation du GLP-1 dépendante du NO et montré que l'utilisation d'inhibiteur (L-NAME) ou d'activateur (L-Arginine) de la NOS module l'action du GLP-1 pour le contrôle de la sécrétion d'insuline et la vidange gastrique. Sur des cultures primaires de neurones entériques, nous avons montré que la production de NO induite par le GLP-1 est diminuée chez les souris diabétiques. Lorsque l'on administre un donneur de NO à des souris diabétiques (traitement aigu et chronique), nous améliorons la sécrétion d'insuline en réponse au GLP-1.

Dans un second temps, nous avons évalué l'influence du microbiote sur la sensibilité au GLP-1. Nous avons tout d'abord caractérisé le microbiote iléal des souris diabétiques. Nous avons constaté que les Lactobacillus étaient diminués chez les souris diabétiques et que leur fréquence est corrélée avec la quantité des ARNm iléaux codant le GLP-1r et la nNOS. Ensuite, nous avons étudié des souris axéniques ou traitées avec des antibiotiques, sous régime normal et nous avons observé : une neuropathie entérique marquée, une baisse de l'expression du GLP-1r et de la NOS neuronale, entérique et vagale, et une baisse de la production de NO induite par le GLP-1 sur des neurones entériques en culture. Cependant, lorsque les souris diabétiques sont traitées aux antibiotiques, nous observons une amélioration de l'action du GLP-1 et ceci est associé avec une augmentation des marqueurs de neurones intestinaux et une augmentation de l'expression du GLP-1r et de la nNOS. Enfin, pour établir un lien moléculaire entre microbiote et action du GLP-1, nous avons étudié l'action du GLP-1 chez des souris invalidées pour les récepteurs TLR4, CD14 et NOD2 et nous observons une baisse de la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1.

Ce travail a été soumis au journal « Cell Metabolism » fin Juillet 2016. Nous sommes invités à le resoumettre. Cet article est actuellement en cours de correction.

## B. Manuscrit de l'article

**A specific gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP-1 unresponsiveness through an enteric NO-dependent and gut-brain axis mechanism**

**Estelle Grasset[1,2], Anthony Puel[1,2], Julie Charpentier[1,2], Xavier Collet[1,2], Jeffrey Christensen[1,2], François Tercé[1,2], Rémy Burcelin[1,2,§].**

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France.
[2]Université Paul Sabatier (UPS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Team 2 : 'Intestinal Risk Factors, Diabetes, Dyslipidemia' F-31432 Toulouse Cedex 4, France.

**Running title:**

[§] Corresponding authors: remy.burcelin@inserm.fr

Telephone: +33 561 325 614

Key words: microbiota; metabolic diseases; autonomic nervous system; incretins

**Abstract**

Glucagon Like Peptide-one (GLP-1) based therapies control glycemia in type 2 diabetic (T2D) patients. However, in some patients the corresponding efficiency is reduced so that the treatment has to be discontinued defining a state of GLP-1 unresponsiveness. Through different animal models we identified that a specific gut microbiota dysbiosis impairs GLP-1-activated gut-brain axis. Notably, the frequency of Lactobacilli in the ileum microbiota was tightly and positively correlated with GLP-1 responsiveness of the enteric nervous system (ENS). The dysbiotic gut microbiota induces enteric neuropathy, impairs the gut-brain axis and reduces GLP-1 receptor and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA concentrations and GLP-1-induced nitric oxide production for the control of insulin secretion and gastric emptying. Our data opens a novel route for the improvement of GLP-1 based therapies for T2D patients.

## Introduction

The Glucagon Like Peptide-one (GLP-1) in an insulinotropic hormone secreted by enteroendocrine L cells in response to a meal. The hormone plays a key role on the glucose control since it regulates insulin and glucagon secretions, gastric emptying, food intake and blood flow, to cite a few [900]. Two modes of action co-exist to explain these physiological actions. The first one involves the paracrine action of GLP-1 secreted by intestinal L-cells which binds locally to GLP-1 receptor (GLP-1r) expressed by the enteric nervous system (ENS) and vagus nerves [734]. Through the triggering of the gut-brain-periphery axis the enteric hormonal signal is transmitted to the brain. The latter organ then redistributes the neuro-hormonal message to peripheral tissues that engages numerous physiological functions involved in the control of glucose homeostasis [808]. The second mode of action is endocrine where blood GLP-1 triggers receptors expressed by distant cells notably the β cells from the Langerhans islets [734], to cite the most studied one [739, 901]. The respective contribution of both pathways on the control of glycemia is unknown and could vary according to the physiology of each individual. G proteins, adenylate cyclase, cAMP, EPAC, PKA, CREB, PKC, Akt, ERK, nitric oxide (NO), and NO synthase (NOS) are the main signaling molecules responsible for GLP-1 intracellular signaling and action [739, 743, 760, 902, 903]. Similarly, the respective contribution of each signaling molecule on the triggering of a GLP-1-dependent function is not known but could follow the rule of individual diversity leading to different sensitivity to GLP-1.

The insulinotropic action of the native GLP-1 has been the basis for strategies aiming at treating type 2 diabetes (T2D). However, the active peptide GLP-$1_{7\text{-}37}$ is rapidly degraded by the dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), an amino-terminal peptidase largely distributed throughout the gut, into an inactive GLP-$1_{9\text{-}37}$ peptide [670]. To overcome this issue GLP-1 receptor agonists resistant to the DPP4 and DPP4 inhibitors (DPP4i) have been developed [904]. Both aim at increasing GLP-1r signaling and the corresponding physiological functions. However, it is now currently observed in clinical practice that not all T2D patients reach therapeutic target in response to GLP-1-based therapies, i.e. HbA1c lower than 6.5%. Some of them even have to discontinue the treatment due to the lack of efficacy. Therefore, various GLP-1 responsiveness are expected according to the T2D patient considered which could be linked to the multifactorial origin of the disease. For instance, the lipo-glucotoxicity [800-802, 905] and autonomic neuropathy [646, 906] could reduce the gut-brain axis hampering numerous GLP-1 dependent physiological functions. A more recent hypothesis concerns the importance of gut microbiota dysbiosis in the development of metabolic diseases [848, 875, 907]. The mechanisms discovered so far involve microbial-produced factors such as lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans, short chain fatty acids (SCFA), and secondary bile acids. Regarding bacterial recognition mechanisms microbial associated molecular pattern receptors TLRs and NLRs have been described as important for the glycemic control [477, 481, 858, 908] and could therefore be involved in the mechanisms responsible for GLP-1 physiology. To explore this issue, we generated two mouse

models of T2D characterized by different signatures of gut microbiota dysbiosis. We studied GLP-1 induced enteric neuron-mediated nitric oxide (NO) production for the control of the gut-brain induced insulin secretion. Gastric emptying and food intake were simultaneously studied. The differences in GLP-1 responsiveness of the two high-fat diet (HFD)-fed mouse models allowed us to compare the impact of specific gut microbiota dysbiosis separately from the direct impact of the fat-enriched diet itself.

## Materials and Methods

### Animals.

To generate metabolic abnormalities of T2D, six-week old C57Bl6/J male mice were fed for three months with a normal chow diet (NCD), or a high-fat high-carbohydrate diet (HC-HFD), or a high-fat carbohydrate-free diet (HFD). After 2 months a sub group from these mice was treated for one additional month with antibiotics.

### Subdiaphragmatic vagotomy

To study the role of GLP-1 on the gut to brain axis, mice underwent a subdiaphragmatic vagotomy [909]. They were allowed to recover for 3 weeks before analyses.

### Glucose and insulin tolerance tests.

After 3 months of HFD, an intraperitoneal (i.p.) (IPGTT) and oral (OGTT) glucose tolerance test and an i.p. insulin tolerance test (IPITT) were performed. Plasma insulin and GLP-1 concentrations were assessed. A GLP-1 resistance index for each mouse was calculated as Glucose x GLP-1 concentration / insulin concentration 15 min after the oral glucose load.

### *In vivo* GLP-1 dose-response procedures.

To evaluate GLP-1 sensitivity three GLP-1 regulated parameters were quantified: insulin secretion, gastric emptying, and food intake (**Figure 1**). To prevent from the degradation of exogenous GLP-1, a DPP4i (400µg/mouse, Sitagliptin) was given orally 30min before the GLP-1 challenge. The dose-response curve was calculated by curve interpolation with 4-Parameter Logistic (4PL) sigmoidal model using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; www.graphpad.com) and the $EC_{50}$ calculated.

### *In vivo* nitric oxide related procedures.

30min before all 3 GLP-1 challenge procedures, a NO synthase (NOS) inhibitor (L-NAME, Abcam) was administered i.p. at different doses: 0, 50, 100, 200µg/kg (**Figure 2A**).

In a different set of mice, a NO donor (L-Arginine, 1g/kg, Sigma-Aldrich) was administered orally in the presence or absence of the GLP-1r antagonist, Exendin 9 (1nmol/mice, 100µL, i.p. injection, Bachem) 30min before an oral glucose (2g/kg) or an oral acetaminophen (100µg/kg) and glucose (2g/kg) load or before refeeding **(Figure 2B)**.

To study the chronic effect of L-arginine in GLP-1 sensitivity, the molecule was administered for one week (0.5g/kg, 300µL, 1xgavage/day). Then, GLP-1-induced insulin secretion was quantified as described on Figure 1.

**mRNA quantification**

Total RNAs were extracted from the ileum and the nodose ganglion. The concentration of mRNAs was evaluated by quantitative RT-PCR analysis.

**Immunohistochemistry**

*Longitudinal muscle / myenteric plexus*

A 3 cm of distal ileum longitudinal muscle / myenteric plexus (LMMP, i.e. ENS) obtained from mice in a fed state was fixed with PFA 4% and kept in $NaN_3$ 0.1%. For HuC/HuD, nNOS and S100β immunostaining, the samples were incubated overnight at room temperature (RT) with the 1$^{st}$ antibodies, and then incubated 90min at RT with the 2$^{nd}$ antibodies. For HuC/HuD and nNOS, we quantified the number of positive cells per area and for S100β, we quantified the percentage of fluorescent area.

*c-FOS immunostaining in the brain stem*

The activation of brain neurons was identified by quantifying cFOS immunostaining 90min following the GLP-1-induced insulin secretion procedure described on Figure 1. We quantified cells from the Nucleus Tractus Solitary (NTS) and dorsal motor nucleus of vagus nerve (DMNx) as defined on mouse brain atlas [910].

**Enteric neurons primary culture**

The protocol was adapted from Smith and colleagues [911]. The outer layers containing muscular cells and myenteric neurons (LMMP) were digested with firstly with collagenase II and secondly with trypsin. The digested cells were transferred to complete neuron media, filtered and maintained up to one week in Poly-D-lysine and Laminin coated-glass coverslips in 24-wells plate.

**Measurement of NOS activity in primary cultures of neurons**

To record NO production by enteric neurons in response to GLP-1 (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100nM), we incubated enteric neurons with NO specific probe, DAF-FM. The cells were fixed with PFA 4%, and cells containing nNOS were identified by immunostaining. A region of interest (ROI) corresponding to nNOS and DAF-FM positive cells was studied. The ratio of both values for each ROI was then calculated.

**Statistical analysis**

Results are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical significance was evaluated by Student's t test, One-Way Anova or Two-Way Anova (followed by post hoc Tukey's multiple comparisons tests), using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, San

Diego, CA, USA; www.graphpad.com). Linear regression was performed with Pearson correlation coefficient. The level of significance was set at $P<0.05$.

## Results

***Animal models of high-fat diet-induced GLP-1 resistance.***

To identify whether gut microbiota regulates GLP-1 responsiveness *in vivo*, we have set up two different mouse models previously characterized with a gut microbiota dysbiosis [912-914]. A first set of mice was fed a high-carbohydrate high-fat diet (HC-HFD). The second one was fed a high-fat but carbohydrate-free diet (HFD). Others and we have previously characterized the main metabolic features of both animal models [887, 915]. Briefly, mice fed a HC-HFD are obese and diabetic whereas mice fed a HFD are diabetic but remained mainly lean although the latter are characterized by a slight increase of fat mass and decrease of lean mass (**Figure 3A-C, Figure S1A,B**). Both models are characterized by a similar glucose intolerance and an impaired insulin resistance. However, the major difference between both models is that 15min after an oral glucose challenge, plasma insulin concentration was twice higher in HC-HFD-fed obese diabetic mice while reduced in HFD-fed lean diabetic mice when compared with NCD-fed mice (**Figure 3D**). The mechanism responsible for the impaired glucose sensitivity was not related to a reduced glucose-induced GLP-1 secretion since in response to an oral glucose load we observed a dramatic increased portal vein plasma GLP-1 concentration 3-4 times higher in both diabetic mice than what observed when compared to NCD-fed mice (**Figure 3E**). This was previously observed in response to high-fat diet [916] and we here confirmed this result. However, the major novel observation was that despite the excessive plasma GLP-1 concentration of both animal models, glucose-induced insulin secretion could be triggered only in HC-HFD obese diabetic mice since plasma insulin concentration remained low in the HFD-fed lean diabetic mice (**Figure 3D**). In our experimental conditions, where a DPP4i was administered to the mice just before the glucose challenge, the portal concentration of GLP-1 reflects the actual secretion of GLP-1, as described [812], preventing from putative differences of DPP4 activities between groups which could have modified the concentration of GLP-1 (**Figure 3E**). Since at the 15 minute-time point following the glucose challenge, NCD and HC-HFD-fed mice were characterized by the same glycemia while HFD-fed mice glycemia was lower (**Figure 3F**) we then calculated a glucose-dependent GLP-1 resistance index (**Figure 3G**). We showed that the HFD-fed lean diabetic mice were characterized by a strong GLP-1 unresponsiveness, which was not the case for the HC-HFD-fed obese diabetic mice (**Figure 3G**). To better estimate GLP-1-induced insulin secretion without the confounding effect of endogenously released GLP-1, we administered GLP-1 intraperitoneally at different doses rapidly followed an i.v. glucose injection and quantified plasma insulin concentrations (**Figure 3H and S1C**). Plasma glucose concentrations increased in all groups generating a hyperglycemic context required for GLP-1 responsiveness. The injection of 7nmol/kg of GLP-1 allows reaching the maximal percentage of insulin secretion in NCD and HC-HFD-fed mice. However, this was not the case for the HFD-fed lean diabetic mice suggesting that GLP-1 sensitivity was impaired. To further understand the corresponding kinetic features of GLP-1 sensitivity we quantified the dose-response curves corresponding to the fold change of GLP-1-induced insulin

secretion in all groups. This allows the calculation of EC50 (**Figure 3H**). The data show that the EC50 doubled in HC-HFD mice and dramatically increased in the HFD-fed lean diabetic mouse group when compared to NCD mice demonstrating a state of resistance to GLP-1 in both models, although the maximal efficacy of GLP-1 was for higher doses of the peptide in the HFD-fed mice (**Figure 3I**). Altogether, our data show that the lean-diabetic mice are GLP-1 unresponsive. In humans, the change in efficacy of incretin-based therapies is mostly evaluated on the change in HbA1c. This biomarker integrates the overall glycemic profiles over a 2-3 month period that are the consequences of changes in insulin and glucagon secretions, reduced gastric emptying, increased food intake, and insulin resistance. Therefore, to determine whether GLP-1 unresponsiveness affected other GLP-1-regulated physiological functions, we studied gastric emptying (**Figure S1D, E**) and food intake (**Figure S1F-H**). Some degree of GLP-1 resistance was detected since the plasma concentrations of acetaminophen remained elevated after GLP-1 administration in both diabetic mice (**Figure S1D**). Like insulin secretion, gastric emptying is mediated through the activation of a nervous gut-brain-stomach axis. GLP-1 secreted after a meal induces the ileum break through a reduction of gastric, pyloric and duodenal motility [651, 917]. Therefore, our data show that GLP-1 resistance is upstream in the cascade of events responsible for GLP-1 action and most likely concerns the gut-brain to periphery axis. Data from our laboratory demonstrated in type 1 diabetic patients that the glucagonostatic action of DPP4i was dramatically hampered in those with autonomic neuropathy preventing from the activation by gut released GLP-1 of the gut-brain to α cell axis [906]. This conclusion is also supported by the present data since the amount of energy intake during the feeding period (darkness for 6 hours) and during refeeding following a period of fast was increased (**Figure S1F, G**) while increasing doses of GLP-1 only modestly reduced energy intake in the both high-fat diet-fed mice when compared to NCD-fed mice (**Figure S1H**). The control of food intake by GLP-1 is mediated by the central and the peripheral nervous systems [918] showing that all nervous system-dependent actions are affected, although to different extent, by GLP-1 unresponsiveness. Importantly, out of the two fat-diet models, the HFD-fed lean diabetic mouse model was the most affected one and was defined as GLP-1 resistant. Conversely, only very mild GLP-1 unresponsiveness was detected in HC-HFD-fed obese diabetic mouse. We defined this second mouse model as “GLP-1 sensitive”. The corresponding molecular mechanisms of this difference could affect directly the insulin-secreting β cell and indirectly the GLP-1 sensitive neural mechanism notably the gut-brain axis that involves the action of GLP-1 on neurons from the ENS and the vagus nerve [641, 651, 653, 917]. To discriminate between both hypotheses, we studied insights of neuropathy in the mouse and performed vagotomy in NCD-fed mice.

***High-fat diet alters the enteric nervous system to brain axis and induces GLP-1 resistance.***

GLP-1 triggers the vagus nerve activity in response to an oral glucose challenge [651, 653, 812] that could be linked to the presence of the GLP-1r on enteric and vagal neurons [734]. Therefore, we first

quantified by immunohistochemistry the number of HuC/HuD positive cells, i.e. enteric neurons [618] and observed that the GLP-1 resistant HFD-fed mice were characterized by a reduced number of enteric neurons (**Figure 4A1,A2**) defining neuropathy [618]. Conversely, the number of S100β positive cells i.e. glial cells [611], remained normal, or even slightly increased in the HC-HFD-fed mice showing that HFD affects neurons only. To comfort the reduction of the number of enteric neurons in the HFD-fed lean diabetic mice, we quantified the concentrations of ileum mRNA encoding for neuronal proteins, i.e. PGP9.5, axonal protein, i.e. peripherin (prph) and glial proteins, i.e. GFAP and S100β. PGP9.5 mRNA concentration was reduced in both animal models while prph, GFAP and S100β mRNA concentrations remained unchanged (**Figure 4B**). The impact of the diet was restricted to neurons from the ENS since the mRNA concentration encoding neuronal and glial proteins from the nodose ganglion remained similar in all groups (**Figure 4C**). This result confirms that diabetic autonomic neuropathy does not affect vagal neuron bodies but rather the vagal ends and enteric neurons, as previously suggested [393, 618]. Therefore, the gut-brain axis could be impaired by the fat-enriched diets. This is not due to the fat moiety itself since the quality of fat was similar in both groups. This is in line with the concept that GLP-1 unresponsiveness also affects subsets of T2D patients at different extent which fits the concept of personalized medicine. To demonstrate that, the gut-brain axis was functionally affected, we then performed a functional bioassay. We recorded the number of cFos positive cells in the brain stem in response to the administration of GLP-1 into the peritoneal cavity at the active dose, i.e. 7nmol/kg. This dose is the lowest one triggering the maximal response to GLP-1-induced insulin secretion in control mice (**Figure 3H, S1C**). The hindbrain medulla includes the nucleus of the tractus solitarius (NTS) where primary visceral afferents end. It also includes the dorsal motor nucleus (DMNx) where preganglionic motor neurons innervating the gastrointestinal tract are located. The data show that the number of cFos positive neurons increases in response to GLP-1 in NCD mice but not in HFD-fed mice (**Figure 4D1,D2**) arguing for a functional impairment of the GLP-1 dependent gut-brain communication in response to a fat diet. The activation of brain stem neurons through enteric rather than systemic GLP-1 has been previously described [234, 919]. GLP-1, when directly infused in hepatoportal vein of rats activate cells from the NTS through the vagal nerve, witnessing the direct GLP-1 dependent gut-brain connection, as reported also elsewhere [234, 919]. The role of the molecular mechanisms of glucose sensing i.e. the GLP-1r and the glucose transporter GLUT2 were also reported on the gut-brain axis in NCD condition [197, 200]. Therefore, we here add to the knowledge that a fat-enriched diet hampers the gut-brain axis. We further validated this observation by assessing GLP-1 sensitivity in NCD-fed mice following subdiaphragmatic vagotomy (SDVx). This increases the GLP-1 resistance index 15min after a glucose challenge as shown by an increase of GLP-1 concentration while a decrease of insulin concentration (**Figure 4E&S2A-C**). GLP-1-induced insulin secretion at the active dose of 7nmol/kg was reduced by the vagotomy procedure further demonstrating the importance of a functional gut-brain axis as the mode of action of GLP-1 (**Figure 4F**). Interestingly, vagotomy induced GLP-1 resistance of gastric

emptying (**Figure S2D,E**). Conversely, energy intake during the feeding period, in response to refeeding and after GLP-1 administration was similar between sham and SDVx-operated mice (**Figure S2F-H**) suggesting that the regulatory role of GLP-1 when administered pharmacologically is, at least in part, direct on the brain and does not uniquely require the gut-brain axis for the control of food intake.

Altogether, the impairment of GLP-1 physiological actions such as insulin secretion and gastric emptying induced by vagotomy mimicked what observed in response to HFD i.e. the GLP-1 resistant diabetic lean mouse model. This conclusion further reinforces the role played by an impaired ENS on the induction of GLP-1 unresponsiveness through the gut-brain axis. Our results are also supported by data from human clinical trials where it was reported an increased glucose-induced GLP-1 secretion, an increased gastric emptying but a reduced incretin-induced insulin secretion suggesting a state of GLP-1 resistance following trunk vagotomy [659]. Although GLP-1 triggers the vagus nerve [651, 653, 811, 812], some data show that the gut-brain axis is not required for GLP-1-based therapies to induce insulin secretion [920]. This is most likely due to the large doses of GLP-1 receptor agonist used allowing a direct action of exogenous GLP-1 on pancreatic β cells. It is noticeable that, in our study we cannot definitely rule out that a state of β cells GLP-1r unresponsiveness exists.

To validate our hypothesis in human, specific clinical trials could be set up where non obese T2D patients such as the mild onset diabetes of the youth (MODY) would be compared to obese diabetics. As an example, the proportion of lean diabetic patients tends to increase particularly in developing countries in which such study could provide insights for the treatment of such diabetic patients [300]. Similarly, the impact of autonomic diabetic neuropathy on the efficacy of GLP-1 based therapies in T2D patient remains to be studied. Such results could help the clinician to determine the best therapeutic strategy performing hence evidence-based precision medicine.

***Enteric GLP-1 sensitivity requires the production of NO by enteric neurons and is impaired in HFD-fed mice.***

To identify the enteric neuron molecular mechanisms responsible for GLP-1 resistance, we first quantified the concentration of GLP-1r mRNA in the ileum of the different mouse models. It is noteworthy that recent data show that the expression of the GLP-1r gene is restricted in enteric neurons within the ileum and in the left nodose ganglion [734]. We observed that in HFD-fed mice the concentration of the GLP-1r mRNA was dramatically reduced in both the ileum and left nodose ganglion whereas in HC-HFD obese diabetic mice the decrease of the GLP-1r mRNA concentration was restricted to the nodose ganglion (**Figure 5A**). These results could explain GLP-1 resistance as it mimics what observed in GLP-1r KO mice regarding insulin secretion, gastric emptying and food intake (**Figure S3A-D**). The impaired GLP-1 signaling in the enteric neurons could be linked to nNOS since the GLP-1r mRNA concentration is mainly located in nNOS positive enteric neurons [641, 734]. We and others we have previously demonstrated that a NO-dependent GLP-1 signaling controls blood

flow and gastric emptying [760, 902, 921]. Both functions control glucose metabolism. Similarly, GLP-1 triggers the ENS by decreasing the excitatory cholinergic neurotransmission through presynaptic GLP-1r, which modulates NO release [641]. GLP-1r agonists such exendin-4 and liraglutide can significantly increase phospho-Akt (p-Akt) and phospho-eNOS (p-eNOS) concentrations indicating activation of the p-Akt/p-eNOS signaling pathways [752]. Eventually, data show that in endothelial cells GLP-1 induces eNOS-mediated NO production through the triggering of the AMP-activated Kinase (AMPK) pathway [756]. Therefore, we first measured the nNOS mRNA concentration in the ileum and in the left nodose ganglion in all animal models and observed a decreased concentration in the ileum that was even more marked in the left nodose ganglion of the HFD-fed, GLP-1-resistant mice (**Figure 5B**). In HC-HFD mice, we observed a decrease of nNOS mRNA concentration in left nodose ganglion only (**Figure 5B**). Interestingly, the number of nNOS positive neurons in the ileum remained similar in all groups of mice (**Figure 5C**). Linear regression analyses between nNOS and GLP-1r mRNA concentrations showed a strong correlation in both the ileum and the nodose ganglion suggesting a causal relationship (**Figure 5D,E**). Altogether, the mRNA concentration analyses suggested that HFD-induced GLP-1 resistance could be linked to an impaired GLP-1r expression and the corresponding induction of NO production through nNOS signaling. To further demonstrate this hypothesis, we treated mice with different doses of the nNOS inhibitor (L-NAME). This procedure partially reduced GLP-1-induced insulin secretion in NCD mice (**Figure 5F)**. Similarly, the NOS inhibitor altered GLP-1-induced gastric emptying inhibition but not GLP-1-control food intake (**Figure S3E, F).** Conversely, the oral acute treatment with the NO donor L-Arginine, before an oral glucose challenge in NCD-fed mice, induced insulin secretion (**Figure 5G**). This increased insulin secretion was specific to the action of GLP-1 since the co-treatment with Exendin 9 prevented the effect of GLP-1 (**Figure 5G**). Eventually, L-Arginine induced gastric emptying inhibition through the GLP-1r but has no effect on food intake (**Figure S3G**). On HFD-GLP-1 resistant mice an acute and chronic (one week) oral administration of the NO-donor improved GLP-1-induced insulin secretion in the diabetic mice (**Figure 5H,I**). Interestingly, L-arginine also improved gastric emptying, another feature of the GLP-1-dependent ENS gut-brain axis (**Figure S3H**) but not food intake since this function does not only require the gut-brain axis (**Figure S3F-H)**. To ascertain that GLP-1 directly increases NO production from enteric neurons, we incubated increasing doses of GLP-1 with primary culture of enteric neurons from NCD and HFD-fed GLP-1-resistant mice. The enteric neurons from the HFD-fed mice were dramatically resistant to GLP-1-induced NO production (**Figure 5J**). We here show that enteric NO production is a signaling molecule of GLP-1 for the control of GLP-1-regulated metabolic features and that this signaling pathway is impaired in HFD-fed mice. Numerous mechanisms could be responsible for the impairment of NO production. NOSs are notably substrates of the AMPK [756, 922, 923] that is considered as a master molecular switch in energy sensing. In addition, high-fat diet-induced ileum microbiota dysbiosis could be responsible as

we and others previously suggested [912-914]. HFD dramatically modifies the gut microbiota ecology, which varies according to individuals.

***Gut microbiota dysbiosis is responsible for the GLP-1 resistance.***

To identify bacterial taxa associated with GLP-1 resistance, we performed targeted 16S sequencing of the ileum microbiota since GLP-1 producing cells are mostly located in the ileum of the mouse intestine. The discriminant analysis of differences (LefSe) showed taxonomic signatures specific for each mouse group (**Figure 6A**) and identified, through linear regression analyses on all taxonomic features, that the Lactobacillus genus was tightly correlated with the ileum GLP-1r and nNOS mRNA concentrations (**Figure 6B,C**). These correlations are also observed at the family, class, and order taxonomic levels (**data not shown**). The frequency of Lactobacillus among the overall taxa was dramatically reduced in the ileum from the HFD-fed GLP-1-resistant mice while modestly reduced in the HC-HFD-fed GLP-1 sensitive mice (**Figure 6D**). To demonstrate the causality of the role played by gut microbiota we quantified GLP-1 resistance in germ free mice. The data showed that the absence of microbiota prevented from GLP-1-induced insulin secretion demonstrating a strong state of GLP-1 resistance (**Figure 6E, S4D**). This impairment was associated with a lack of activation of the gut-brain axis since the number of cFos positive cells in the brain stem could not be increased by GLP-1 i.p. administration (**Figure S4A1, A2)**. It is further supported by the dramatic increased plasma concentration of GLP-1 when compared to conventional mice, whereas plasma insulin concentration remain lower (**Figure S4B)**. This was previously reported as well in other instances and shows that the overall GLP-1 physiology i.e. secretion and action is under the control of gut microbiota [489, 498, 676]. Although the bacteria responsible for the control of GLP-1 action remain unknown, we here identified that the proportion of Lactobacillus genus was highly correlated with GLP-1r and nNOS mRNA concentrations. Our data is supported by the concept that Lactobacillus and Bifidobacteria are probiotics that could be suitable for metabolic management [924, 925]. Recent data also show that in humans, Lactobacillus reuturi administration improves glucose-induced incretin and insulin secretion [899]. The mechanism could be linked to the production of SCFA in the gut, through GPR41/43 i.e. FFAR2/3 or LPS through TLR4/CD14 that could enhance GLP-1 secretion [493, 495, 498]. Other evidence show that the FFAR3 and TLRs are also expressed in the neuronal cells of the submucosal and myenteric ganglia suggesting that SCFA or LPS could directly trigger enteric neurons [865, 866]. Very convincing data show that acetate trigger insulin secretion through a parasympathetic gut-brain axis [926]. However, following one-month prebiotic treatment, which increases SCFA production [913], we did not restore GLP-1-induced insulin secretion, gastric emptying and food intake (**data not shown**). Therefore, the mechanism has to be different from the production of SCFA by gut microbiota. Conversely, it could be NO-dependent, as show previously [841, 843] since Lactobacillus modulate intestinal NO synthesis. We validated this hypothesis by studying the production of NO by enteric neurons from germ free mice and showed that NO production could not be stimulated by GLP-

1 demonstrating that gut microbiota is a required feature for the activation of the gut-brain axis by GLP-1 through the production of NO (**Figure S4C**). The GLP-1-resistant state in germ free mice can be linked to a decreased number of enteric neurons (PGP9.5, prph), glial cells (S100β, GFAP), GLP-1r and nNOS mRNA concentrations in the ileum but not in the nodose ganglion (**Figure 6F-I**). Eventually, the antibiotic treatment induced a strong GLP-1 resistance to insulin secretion in NCD-fed mice (**Figure 6J & S4D**) suggesting that some beneficial microbes were responsible for the improvement of GLP-1 sensitivity. The antibiotic treatment of fat-enriched diet-fed mice conversely improved GLP-1 sensitivity (**Figure 6J**) suggesting that some deleterious bacteria from the dysbiotic microbiota were eliminated. The impact of antibiotics was also observed on neuron specific proteins PGP9.5 and glial specific proteins S100β (**Figure 6K**). While the antibiotics reduced the expression of the corresponding gene expression in NCD-fed mice, the treatment conversely increased the gene expression in fat-enriched diet-fed mice (**Figure 6K**). Similar results were obtained for the GLP-1r and for the nNOS mRNA concentrations in the ileum and the nodose ganglion (**Figure 6M, N).** This last set of data strongly supports the notion that a eubiotic gut microbiota enhances GLP-1 sensitivity while a dysbiotic microbiota reduces it. The impact of antibiotics was extended to the control of gastric emptying by GLP-1 (**Figure S4E,F**). This set of data further reinforces the importance of the ileum microbiota on the GLP-1 dependent gut-brain axis. The control of food intake in fat-enriched diet fed mice, which is not under the control of the GLP-1-dependent gut-brain axis, remained unaffected by antibiotics (**Figure S4G,H**).

Altogether, changes in ileum microbiota, putatively through changes in Lactobacillus, were causally influencing GLP-1 responsiveness through the activation of the gut-brain axis and notably the stimulation of insulin secretion. The precise identification of the Lactobacillus species responsible remains too elusive and speculative to be envisaged here.

***The microbial associated molecular pattern receptors NOD2, CD14, and TLR4 controls GLP-1 sensitivity.***

The mechanisms ensuring a normal GLP-1 physiology and gut-brain axis control could be related to the role played by the microbial associated molecular pattern receptors NOD2, TLR4 or CD14. We previously demonstrated that NOD2, CD14 and TLR4 were involved in the glycemic control in response to a high-fat diet [477, 481, 858, 908]. Therefore, since our data demonstrate the importance of a change in gut microbiota on the control of GLP-1 responsiveness, we analyzed NOD2, CD14 and TLR4 KO mice. The data show that GLP-1-induced insulin secretion was dramatically reduced in all KO when compared to WT mice (**Figure 7A**). However, in all KO mice, the downstream effectors of GLP-1 responsiveness, such as the number of enteric neurons and glial cells, as assessed by the concentration of mRNA for PGP9.5, prph, GFAP and S100β, in the ileum and the nodose ganglion, and the mRNA concentrations encoding for the GLP-1r and nNOS, remained similar to WT mice

(**Figure 7B-E**). Gastric emptying was also impaired in all KO mice (**Figure S5A**) while food intake remained unchanged (**Figure S5B**). This set of data further reinforces the role played by gut microbiota on the control of GLP-1-induced insulin secretion and gastric emptying inhibition. We here add to the knowledge that PRR signaling is important for the control of GLP-1 signaling.

**Discussion**

We here identified in different mouse models of T2D that a gut microbiota dysbiosis, associated with the reduced frequency of Lactobacillus in the ileum, is responsible for GLP-1 unresponsiveness of enteric neurons. Gut microbiota dysbiosis hampers GLP-1-induced NO production by enteric neurons that prevent an efficient activation of the gut-brain to periphery axis. Insulin secretion and gastric emptying but not food intake are directly under the control of this mechanism.

To identify mechanisms responsible for the sensitivity of an individual patient to a given incretin-based strategy, there is a need for a concept that could encompass the susceptibility of each individual to develop a metabolic disease with the multiple etiologic origins. The discovery of the major impact of gut microbiota on metabolic disease, of its diversity, and that T2D patients are characterized by a gut microbiota dysbiosis is opening opportunities to gain knowledge about the mechanisms of GLP-1 resistance or unresponsiveness [477, 848, 858, 875].

In healthy situation, a first molecular mechanism responsible for GLP-1 sensitivity would be the capacity of Lactobacillus to ferment complex carbohydrate into SCFA [493, 716, 866, 926, 927]. However, we ruled out this hypothesis since changes in SCFA concentrations observed in prebiotic-treated mice (data not shown) were not correlated with GLP-1 responsiveness. A second mechanism would be that the peptidoglycans from the Lactobacillus are recognized by the PRR, NOD2. We explored this second avenue and show that NOD2 is required to ensure GLP-1-induced insulin secretion. NOD2 recognizes peptidoglycan motifs from the bacterial cell wall that consists of N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. Precisely, NOD2 receptor can sense intracellular muramyl dipeptide (MDP), typical for gram-positive bacteria such as Lactobacillus that regulate intestinal inflammation homeostasis [475, 928]. Linked to that mechanism Lactobacillus could produce NO favoring favor GLP-1 responsiveness [841, 843]. Numerous bacteria-related molecules are detected by the host and influence GLP-1 physiology such as SCFA which bind to fatty acid receptors FFAR2-3 [493] LPS when binding to CD14/MD2/TLR4 [498] or indole [704]. Intestinal microbiota determinants and produced molecules through TLR and FFAR3 are also important to regulate functions under the control of the ENS such as intestinal transit [611, 676, 866, 869, 929] and gut-brain axis [927, 930]. In this context, we observe that CD14/TLR4 could be important receptors to control GLP-1 sensitivity in mice. Such functions could be mediated by intestinal NO production and on the control of intestinal transit [841, 843].

Another hypothesis is that the pro and anti-inflammatory cytokines produced by the gut microbiota dysbiosis to host crosstalk would regulate glucose and GLP-1 effectiveness of the β cell [931, 932]. The molecular mechanisms of GLP-1 resistance could be linked to the down regulation and the desensitization of the GLP-1 receptor [799, 805] that will reduce the production of secondary

messengers such as cAMP, and NO in different cell [739, 743, 760, 902, 903]. In the intestine, the GLP-1r is localized mainly on nNOS positive neurons [734]. In animal models of T2D or in diabetic patients, a reduced number of GLP-1r at the surface of β cells and hypothalamic neuronal cells has been observed that was induced by hyperglycemia and hyperlipidemia [800, 801, 808, 905, 916, 933] and that could hamper NO production. In human, the NO-donor L-arginine improves meal-induced insulin secretion when administered orally in healthy, T2D patients, and diabetic mice [934, 935]. Our results show that acute and chronic NO treatment in T2D mice restore the GLP-1 sensitivity for insulin secretion and gastric emptying. Therefore, our data support the hypothesis that a reduced GLP-1r signaling for the production of NO could exist in the ENS in response to gut microbiota dysbiosis as induced by a fat-enriched diet. This hypothesis is supported by the following results. Furhtermore, it was shown that germ-free mice are characterized by enteric and neuronal atrophy and that conventionalization restores the neuronal function [871]. We also observed a state of neuropathy in T2D mice as evidenced by the reduced number of neurons and neuronal proteins of the ENS showing the importance of microbiota on the healthy development of the gut brain axis, as reported in other instances [936].

In conclusion, we here show that in subsets of high-fat diet fed mice with T2D, a specific gut microbiota dysbiosis hampers GLP-1-induced NO production through a NOD2/TLR4/CD14-dependant mechanism preventing hence the activation of the gut-brain axis for the control of insulin-secretion.

**Acknowledgements**

We would like to thank Pr Claude Knauf, and Drs Audren Fournel and Simon Nicolas for helpful criticisms. We also thank Myrtha Arnolds, Drs Carla Cirillo and Drs A. Granado for technical help and advice. We thank Pr Daniel Drucker for the kind gift of the GLP-1 receptor KO mice. We thank J.-J. Maoret from the Quantitative Transcriptomic Facility (I2MC Inserm/UPS UMR1048) and Drs R. D'Angelo and M. Zanoun for assistance and advice with imaging (Cellular Imaging Facility Rangueil-I2MC/TRI Plateform). We also thank Y. Barreira and her team from the Animal Care Facility of Rangueil Hospital (UMS US006/Inserm). This grant was supported by subsides from the Fondation pour la Recherche Médicale, Novo-Nordisk and Sanofi-Aventis, and the Région Midi Pyrénées to R.B.

**Figure Legends**

**Figure 1: Summary of the experimental procedures performed to assess GLP-1 functions in vivo. 1.** Insulin secretion; **2.** Gastric emptying; **3.** Food intake phenotypes were quantified in different sets of mice. The interventions and the corresponding time points are mentioned for each procedure labeled 1,2,3.

**Figure 2: Summary of the experimental procedures performed to assess GLP-1 functions in vivo in the presence of A:** a NOS inhibitor (L-NAME)**; B:** a NO donor (L-Arginine).

**Figure 3: Animal models of high-fat diet-induced GLP-1 resistance.** Mice were fed 3 months with NCD, HC-HFD or HFD. (**A**) i.p. glucose tolerance test (1g/kg); (**B**) i.p. insulin tolerance test (0.75U/kg). Values are expressed in % of initial glycemia; (**C**) weight gain. **(D**) plasma insulin concentration, (**E**) plasma portal GLP-1 concentration, (**F**) glycemia and (**G**) GLP-1 resistance index 15 minutes after an oral glucose challenge (2g/kg); (**H**) plasma insulin index (in % of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21, 63nmol/kg); (**I**) half maximal effective concentration of GLP-1 (EC50). Values with similar superscript letters are not different, $p>0.05$. Lowercase letters are used to compare individual values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between NCD and HC-HFD, and HFD-fed mice.

**Figure 4: High-fat diet alters the enteric nervous system to brain axis and induces GLP-1 resistance.**

**A-D**: Mice were fed 3 months with NCD, HC-HFD, or HFD. (**A1**) longitudinal muscular myenteric plexus (LMMP) immunohistochemistry; (**A2**) quantification of the number of HuC/HuD positive cells (as neuronal marker) and % of S100β fluorescent area (as glial marker); (**B**) ileum and (**C**) nodose ganglion mRNA concentrations of neuronal markers (NeuN, PGP9.5 and peripherin-prph) and glial markers (GFAP, S100β). Values with similar superscript letter are not different, $p>0.05$. The values are compared between NCD and HC-HFD, and HFD-fed mice for each set of mRNA. (**D1**) immunohistochemistry of cFos positive cells; (**D2**) quantification of the number of cFos positive cells per dotted area depicting the nucleus of the tractus solitarius (NTS) and the dorsal motor vagal nucleus (DMNx) in NCD and HFD-fed mice stimulated with vehicle or with GLP-1 (7nmol/kg). Values with similar superscript letter are not different, $p>0.05$. The values are compared between vehicle-injected mice and GLP-1-injected mice. **E-F**: Mice were sham-operated or subdiaphragmatic vagotomy (SDVx)-operated; (**E**) GLP-1 resistance index; (**F**) Plasma insulin index (in % of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg). Values with similar superscript letter are not different, $p>0.05$. The values are compared between Sham and SDVx-operated mice.

**<u>Figure 5</u>: Enteric GLP-1 sensitivity requires the production of NO by enteric neurons that is impaired in HFD-fed mice.**

**A-E**: Mice were fed 3 months with NCD, HC-HFD or HFD. Ileum and nodose ganglion mRNA concentrations of (**A**) GLP-1r and (**B**) nNOS; (**C**) quantification of the number of nNOS positive cells in the longitudinal muscular myenteric plexus (LMMP); pearson correlation analyses between GLP-1r and nNOS mRNA concentrations in (**D**) ileum and (**E**) nodose ganglion. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between NCD and HC-HFD, and HFD-fed mice. **F-I**: Plasma insulin index (% of vehicle-injected mice); (**F**) after GLP-1 (0, 7nmol/kg) and nNOS inhibitor injections (L-NAME, 0, 50, 100, 200µg/kg) in NCD mice, (**G**) after L-Arginine (0, 1g/kg) and Exendin 9 (0, 1nmol/mouse) in NCD and (**H**) HFD-fed, (**I**) after chronic treatment with L-Arg (0, 0.5g/kg/day, during 1 week) and GLP-1 injection (7nmol/kg). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between all groups. (**J**) GLP-1-induced NO production by enteric neurons from NCD and HFD mice expressed as percentage of NO from control cells (cells without GLP-1 incubation). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. Lowercase letters are used to compare individual values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between neurons from NCD and HFD-fed mice.

**<u>Figure 6</u>: Gut microbiota dysbiosis is responsible for the GLP-1 resistance.**

**A-D**: Mice were fed 3 months with NCD, HC-HFD or HFD. (**A**) LefSe analyses represented as Cladogram for bacterial taxa from ileum microbiota. Taxa highlighted are significantly increased in one group of mice when compared to the others (least discriminant analysis); Pearson correlation analyses between (**B**) nNOS or (**C**) GLP-1r ileum mRNA concentrations and Lactobacillus genus frequency; (**D**) Lactobacillus genus frequency in the ileum from NCD, HC-HFD, and HFD-fed mice. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between NCD and HC-HFD and HFD-fed mice. **E-I**: Germ-free (GF) mice. (**E**) Plasma insulin index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injection (0, 7nmol/kg), (**F**) ileum and (**G**) nodose ganglion mRNA concentrations of neuronal markers (NeuN, PGP9.5 and peripherin-Prph) and glial markers (GFAP, S100β); (**H**) GLP-1r and (**I**) nNOS mRNA concentrations in the ileum and the nodose ganglion. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between GLP-1-untreated mice and GLP-1-treated mice or between control (Ctrl) and germ-free. **J-N**: NCD, HC-HFD or HFD mice were treated one month with antibiotics (Abx); (**J**) Plasma insulin index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injection (0, 7nmol/kg); (**K**) ileum and (**L**) nodose ganglion mRNA concentrations of neuronal markers (NeuN, PGP9.5 and peripherin-Prph) and glial markers (GFAP, S100β); (**M**) GLP-1r and (**N**) nNOS mRNA concentrations in the ileum and in the nodose ganglion. The values are compared between GLP-1-untreated mice and GLP-1-treated mice or between antibiotic-untreated mice and antibiotic-treated mice.

**Figure 7: The microbial associated molecular pattern receptors NOD2, CD14, and TLR4 control GLP-1 sensitivity.** NOD2, TLR4 and CD14 KO mice were compared to wild type (WT) NCD mice. (**A**) Plasma insulin index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injection (7nmol/kg); (**B**) ileum and (**C**) nodose ganglion mRNA concentrations of neuronal markers (NeuN, PGP9.5 and peripherin-Prph) and glial markers (GFAP, S100β); (**D**) GLP-1r and (**E**) nNOS mRNA concentrations in the ileum and nodose ganglion. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between WT and KO mice.

**Figure 8: Summary - Gut microbiota dysbiosis of type 2 diabetic mice induces GLP-1 unresponsiveness through an enteric NO-dependent mechanism.**
In non-diabetic individuals a eubiotic ileum microbiota favors GLP-1 induced nitric oxide production (NO) by enteric neurons. Microbial associated molecular pattern receptors NOD2, CD14, TLR4 are required in this process. The enteric signal is sent to the brain *via* the vagus nerve, which reduces gastric emptying and increases glucose-induced insulin secretion. In diabetic state the dysbiotic ileum microbiota impairs GLP-1 induced gut-brain axis. A reduction of GLP-1r mRNA, nNOS mRNA concentrations and NO production are observed.

**Figure S1: Animal models of high-fat diet-induced GLP-1 resistance. (A**) Fat mass; (**B**) Lean mass; (**C**) Plasma insulin 15min after GLP-1 i.p. injections (0, 2.2, 7, 21, 63nmol/kg); (D) Plasma acetaminophen concentration 15 minutes after gavage; (**D**) Plasma acetaminophen index (in % of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg); (**E**) Dark period-food intake; (**F**) Refeeding-food intake after 16h of fast; (**G**): Food intake index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. Lowercase letters are used to compare individual values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between NCD and HC-HFD, and HFD or between all doses of GLP-1.

**Figure S2: High-fat diet alters the enteric nervous system to brain axis and induces GLP-1 resistance.** Mice were sham operated or subdiaphragmatic vagotomy-operated (SDVx); (**A**) plasma portal GLP-1 concentration, (**B**) glycemia, (**C**) plasma insulin concentration 15 minutes after oral glucose challenge (2g/kg); (**D**) Plasma acetaminophen concentration 15 minutes after gavage; (**E**) Plasma acetaminophen index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg); (**F**) Dark period-food intake; (**G**) Refeeding-food intake after 16h of fast; (**H**) Food intake index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. Lowercase

letters are used to compare values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between Sham and SDVx-operated mice.

**<u>Figure S3</u>: Enteric GLP-1 sensitivity requires the production of NO by enteric neurons that is impaired in HFD-fed mice.**

(**A**) GLP-1 resistance index 15 min after an oral glucose challenge (2g/kg) in wild-type (WT) and GLP-1r knockout (KO) mice. **B-D**: WT and GLP-1r KO mice were treated with GLP-1 (0 and 21nmol/kg); (**B**) plasma insulin index, (**C**) plasma acetaminophen index and (**D**) food intake index, (in % of vehicle-injected mice). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between WT and GLP-1rKO. (**E**) Plasma acetaminophen index and (**F**) food intake index (in % of vehicle-injected mice) in NCD-fed mice treated with L-NAME (0 or 200µg/kg) and GLP-1 (0 or 7nmol/kg); (**G**) NCD-fed mice and (**H**) HFD-fed plasma acetaminophen index and food intake index (in % of vehicle-injected mice) following acute treatment with L-Arg (0 or 1g/kg) and with exendine 9 injection (0, 1nmol/mouse). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between all groups.

**<u>Figure S4</u>: Gut microbiota dysbiosis is responsible for the GLP-1 resistance.**

**A-B**: Germ-free (GF) and conventional (Ctrl) mice; **(A**) number of cFos positive cells in the nucleus tractus solitarius (NTS) and dorsal motor vagal nucleus (DMNx) after GLP-1 injection (0, 7nmol/kg); (**B**): plasma portal GLP-1 concentration, plasma insulin concentration, glycemia and GLP-1 resistance index 15 minutes after oral glucose challenge (2g/kg). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between control and germ-free mice. (**C**) GLP-1 induced NO production by enteric neurons from germ-free mice expressed as percentage of NO from control cells (cells without GLP-1 incubation). Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between all concentrations. (**D**) Plasma insulin index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injections (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg) in germ-free, antibiotic-treated (Abx) and control (Ctrl) mice. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. The values are compared between control, germ free and antibiotic-treated mice. **E-H**: NCD, HC-HFD and HFD mice were treated one month with antibiotics (Abx). Plasma acetaminophen index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injection (**E**) at 0, 2,2, 7, 21nmol/kg (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg) in NCD antibiotic-treated and antibiotic-untreated mice or (**F**) at 0 (Vehicle) or 7nmol/kg in NCD, HC-HFD and HFD mice treated our untreated with antibiotics. Food intake index (% of vehicle-injected mice) after GLP-1 injection, (**G**) (0, 2,2, 7, 21nmol/kg) (x axis represented as log of 0, 2.2, 7, 21nmol/kg) in NCD antibiotic-treated and antibiotic-untreated mice (**H**) at 0 (vehicle) or 7nmol/kg) in NCD, HC-HFD and HFD mice treated our untreated with antibiotics. Values with similar superscript letter are not different, p>0.05. Lowercase letters are used to compare

values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between antibiotic-untreated mice and antibiotic-treated mice.

**<u>Figure S5</u>: The microbial associated molecular pattern receptors NOD2, CD14 and TLR4 control GLP-1 sensitivity.** NOD2, TLR4, and CD14 knockout (KO) and wild-type (WT) mice were injected with GLP-1 (0, 7nmol/kg); (**A**) Plasma acetaminophen index (in % of vehicle-injected mice); (**B**) Food intake index (in % of vehicle-injected mice). The values are compared between WT and KO mice. Values with similar superscript letter are not different, $p>0.05$. Lowercase letters are used to compare values and capital letters are used to compare curves. The values are compared between antibiotic-untreated mice and antibiotic-treated mice.

## References


Amato, A., Cinci, L., Rotondo, A., Serio, R., Faussone-Pellegrini, M.S., Vannucchi, M.G., and Mule, F. (2010). Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors. Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society *22*, 664-e203.

Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S.V., Gewirtz, A.T., and Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility *via* Toll-like receptor 4 signaling. Gastroenterology *143*, 1006-1016 e1004.

Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F., and Gordon, J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 15718-15723.

Baggio, L.L., Kim, J.G., and Drucker, D.J. (2004). Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo. Diabetes *53 Suppl 3*, S205-214.

Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., and Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. J Histochem Cytochem *57*, 1013-1023.

Baumgartner, I., Pacheco-Lopez, G., Ruttimann, E.B., Arnold, M., Asarian, L., Langhans, W., Geary, N., and Hillebrand, J.J. (2010). Hepatic-portal vein infusions of glucagon-like peptide-1 reduce meal size and increase c-Fos expression in the nucleus tractus solitarii, area postrema and central nucleus of the amygdala in rats. J Neuroendocrinol *22*, 557-563.

Brun, P., Giron, M.C., Qesari, M., Porzionato, A., Caputi, V., Zoppellaro, C., Banzato, S., Grillo, A.R., Spagnol, L., De Caro, R., et al. (2013). Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system. Gastroenterology *145*, 1323-1333.

Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A., and Thorens, B. (2002). Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab *282*, E834-842.

Burcelin, R., Da Costa, A., Drucker, D., and Thorens, B. (2001). Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor. Diabetes *50*, 1720-1728.

Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000). Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. Diabetes *49*, 1643-1648.

Burcelin, R., Serino, M., and Cabou, C. (2009). A role for the gut-to-brain GLP-1-dependent axis in the control of metabolism. Curr Opin Pharmacol *9*, 744-752.

Cabou, C., Vachoux, C., Campistron, G., Drucker, D.J., and Burcelin, R. (2011). Brain GLP-1 signaling regulates femoral artery blood flow and insulin sensitivity through hypothalamic PKC-delta. Diabetes *60*, 2245-2256.

Canabal, D.D., Song, Z., Potian, J.G., Beuve, A., McArdle, J.J., and Routh, V.H. (2007). Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology *292*, R1418-1428.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., et al. (2007a). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes *56*, 1761-1772.

Cani, P.D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A.M., Delzenne, N.M., and Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. Diabetes *57*, 1470-1481.

Cani, P.D., Hoste, S., Guiot, Y., and Delzenne, N.M. (2007b). Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. The British journal of nutrition *98*, 32-37.

Chimerel, C., Emery, E., Summers, D.K., Keyser, U., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2014). Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. Cell reports *9*, 1202-1208.

Dalle, S., Burcelin, R., and Gourdy, P. (2013). Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic beta-cell impairments in type 2 diabetes. Cellular signalling *25*, 570-579.

De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Goncalves, D., Vinera, J., Zitoun, C., Duchampt, A., Backhed, F., and Mithieux, G. (2014). Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits *via* gut-brain neural circuits. Cell *156*, 84-96.

Denou, E., Lolmede, K., Garidou, L., Pomie, C., Chabo, C., Lau, T.C., Fullerton, M.D., Nigro, G., Zakaroff-Girard, A., Luche, E., et al. (2015). Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance. EMBO Mol Med *7*, 259-274.

Ding, L., and Zhang, J. (2012). Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. Acta Pharmacol Sin *33*, 75-81.

Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L., and Habener, J.F. (1987). Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. Proc Natl Acad Sci U S A *84*, 3434-3438.

Duca, F.A., Sakar, Y., and Covasa, M. (2013). Combination of obesity and high-fat feeding diminishes sensitivity to GLP-1R agonist exendin-4. Diabetes *62*, 2410-2415.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J.P., Druart, C., Bindels, L.B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G.G., Delzenne, N.M., et al. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 9066-9071.

Everard, A., and Cani, P.D. (2014). Gut microbiota and GLP-1. Rev Endocr Metab Disord *15*, 189-196.

Everard, A., Lazarevic, V., Gaia, N., Johansson, M., Stahlman, M., Backhed, F., Delzenne, N.M., Schrenzel, J., Francois, P., and Cani, P.D. (2014). Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity. ISME J *8*, 2116-2130.

Farilla, L., Bulotta, A., Hirshberg, B., Li Calzi, S., Khoury, N., Noushmehr, H., Bertolotto, C., Di Mario, U., Harlan, D.M., and Perfetti, R. (2003). Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets. Endocrinology *144*, 5149-5158.

Franklin, K.B.J., and Paxinos, G. (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates. (San Diego: Academic Press).

Fujiwara, K., Gotoh, K., Chiba, S., Masaki, T., Katsuragi, I., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2012). Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats. Journal of neurochemistry *121*, 66-76.

Garidou, L., Pomie, C., Klopp, P., Waget, A., Charpentier, J., Aloulou, M., Giry, A., Serino, M., Stenman, L., Lahtinen, S., et al. (2015). The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORgammat and Controls Metabolic Disease. Cell Metab *22*, 100-112.

George, A.M., Jacob, A.G., and Fogelfeld, L. (2015). Lean diabetes mellitus: An emerging entity in the era of obesity. World J Diabetes *6*, 613-620.

Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., and Nelson, K.E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. Science *312*, 1355-1359.

Green, A.D., Vasu, S., Moffett, R.C., and Flatt, P.R. (2016). Co-culture of clonal beta cells with GLP-1 and glucagon-secreting cell line impacts on beta cell insulin secretion, proliferation and susceptibility to cytotoxins. Biochimie *125*, 119-125.

Han, L., Yu, Y., Sun, X., and Wang, B. (2012). Exendin-4 directly improves endothelial dysfunction in isolated aortas from obese rats through the cAMP or AMPK-eNOS pathways. Diabetes Res Clin Pract *97*, 453-460.

Hansen, L., Deacon, C.F., Orskov, C., and Holst, J.J. (1999). Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. Endocrinology *140*, 5356-5363.
Hodson, D.J., Mitchell, R.K., Bellomo, E.A., Sun, G., Vinet, L., Meda, P., Li, D., Li, W.H., Bugliani, M., Marchetti, P., et al. (2013). Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity. J Clin Invest *123*, 4182-4194.
Holst, J.J. (2007). The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. Physiol Rev *87*, 1409-1439.
Hosoi, T., Okuma, Y., Ono, A., and Nomura, Y. (2002). Subdiaphragmatic vagotomy fails to inhibit intravenous leptin-induced IL-1beta expression in the hypothalamus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *282*, R627-631.
Imeryuz, N., Yegen, B.C., Bozkurt, A., Coskun, T., Villanueva-Penacarrillo, M.L., and Ulusoy, N.B. (1997). Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying *via* vagal afferent-mediated central mechanisms. The American journal of physiology *273*, G920-927.
Ishii, M., Shibata, R., Kondo, K., Kambara, T., Shimizu, Y., Tanigawa, T., Bando, Y.K., Nishimura, M., Ouchi, N., and Murohara, T. (2014). Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization *via* an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism. J Biol Chem *289*, 27235-27245.
Kabouridis, P.S., Lasrado, R., McCallum, S., Chng, S.H., Snippert, H.J., Clevers, H., Pettersson, S., and Pachnis, V. (2015). Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. Neuron *85*, 289-295.
Kozakova, H., Schwarzer, M., Tuckova, L., Srutkova, D., Czarnowska, E., Rosiak, I., Hudcovic, T., Schabussova, I., Hermanova, P., Zakostelska, Z., et al. (2016). Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. Cell Mol Immunol *13*, 251-262.
Krieger, J.P., Langhans, W., and Lee, S.J. (2015). Vagal mediation of GLP-1's effects on food intake and glycemia. Physiol Behav *152*, 372-380.
Landowski, L.M., Dyck, P.J., Engelstad, J., and Taylor, B.V. (2016). Axonopathy in peripheral neuropathies: Mechanisms and therapeutic approaches for regeneration. J Chem Neuroanat.
Lee, J., Cummings, B.P., Martin, E., Sharp, J.W., Graham, J.L., Stanhope, K.L., Havel, P.J., and Raybould, H.E. (2012). Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *302*, R657-666.
Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 11070-11075.
Lobinet, E., Reichardt, F., Garret, C., Cazals, L., Waget, A., Dejajer, S., Labrousse, F., Senard, J.M., Holst, J.J., Hanaire, H., et al. (2015). Autonomic Diabetic Neuropathy Impairs Glucose and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor-Regulated Glucagon Concentration in Type 1 Diabteci Patients. Journal of Endocrinolgy and Metabolism *5*, 229-237.
Macho Fernandez, E., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., and Grangette, C. (2011). Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. Gut *60*, 1050-1059.
Mayer, E.A., Tillisch, K., and Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. The Journal of clinical investigation *125*, 926-938.
McVey Neufeld, K.A., Perez-Burgos, A., Mao, Y.K., Bienenstock, J., and Kunze, W.A. (2015). The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by changes in calbindin. Neurogastroenterol Motil *27*, 627-636.
Mekkes, M.C., Weenen, T.C., Brummer, R.J., and Claassen, E. (2014). The development of probiotic treatment in obesity: a review. Beneficial microbes *5*, 19-28.
Morita, H., Yoshikawa, H., Sakata, R., Nagata, Y., and Tanaka, H. (1997). Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by Lactobacillus fermentum. J Bacteriol *179*, 7812-7815.
Murphy, B.A., Fakira, K.A., Song, Z., Beuve, A., and Routh, V.H. (2009). AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. Am J Physiol Cell Physiol *297*, C750-758.
Nguyen, A.T., Mandard, S., Dray, C., Deckert, V., Valet, P., Besnard, P., Drucker, D.J., Lagrost, L., and Grober, J. (2014). Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. Diabetes *63*, 471-482.
Nishizawa, M., Nakabayashi, H., Uehara, K., Nakagawa, A., Uchida, K., and Koya, D. (2013). Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways. Am J Physiol Endocrinol Metab *305*, E376-387.
Nohr, M.K., Pedersen, M.H., Gille, A., Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Husted, A.S., Sichlau, R.M., Grunddal, K.V., Poulsen, S.S., Han, S., et al. (2013). GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. Endocrinology *154*, 3552-3564.
Ochoa-Reparaz, J., and Kasper, L.H. (2016). The Second Brain: Is the Gut Microbiota a Link Between Obesity and Central Nervous System Disorders? Curr Obes Rep *5*, 51-64.
Ozbek, M., Erdogan, M., Karadeniz, M., Cetinkalp, S., Ozgen, A.G., Saygili, F., Yilmaz, C., and Tuzun, M. (2009). Evaluation of beta cell dysfunction by mixed meal tolerance test and oral L-arginine in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes *117*, 573-576.
Panwar, H., Rashmi, H.M., Batish, V.K., and Grover, S. (2013). Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives. Diabetes Metab Res Rev *29*, 103-112.
Perry, R.J., Peng, L., Barry, N.A., Cline, G.W., Zhang, D., Cardone, R.L., Petersen, K.F., Kibbey, R.G., Goodman, A.L., and Shulman, G.I. (2016). Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome. Nature *534*, 213-217.
Plamboeck, A., Veedfald, S., Deacon, C.F., Hartmann, B., Wettergren, A., Svendsen, L.B., Meisner, S., Hovendal, C., Knop, F.K., Vilsboll, T., et al. (2013). Characterisation of oral and i.v. glucose handling in truncally vagotomised subjects with pyloroplasty. European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies *169*, 187-201.
Prajapati, B., Jena, P.K., Rajput, P., Purandhar, K., and Seshadri, S. (2014). Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes. Curr Diabetes Rev *10*, 190-200.
Pujadas, G., De Nigris, V., La Sala, L., Testa, R., Genovese, S., and Ceriello, A. (2015). The pivotal role of high glucose-induced overexpression of PKCbeta in the appearance of glucagon-like peptide-1 resistance in endothelial cells. Endocrine.
Quoyer, J., Longuet, C., Broca, C., Linck, N., Costes, S., Varin, E., Bockaert, J., Bertrand, G., and Dalle, S. (2010). GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells. J Biol Chem *285*, 1989-2002.
Richards, P., Parker, H.E., Adriaenssens, A.E., Hodgson, J.M., Cork, S.C., Trapp, S., Gribble, F.M., and Reimann, F. (2014). Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model. Diabetes *63*, 1224-1233.
Rotondo, A., Amato, A., Lentini, L., Baldassano, S., and Mule, F. (2011). Glucagon-like peptide-1 relaxes gastric antrum through nitric oxide in mice. Peptides *32*, 60-64.
Ruttimann, E.B., Arnold, M., Hillebrand, J.J., Geary, N., and Langhans, W. (2009). Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat *via* different mechanisms. Endocrinology *150*, 1174-1181.
Serino, M., Luche, E., Gres, S., Baylac, A., Berge, M., Cenac, C., Waget, A., Klopp, P., Iacovoni, J., Klopp, C., et al. (2012). Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut *61*, 543-553.

Simon, M.C., Strassburger, K., Nowotny, B., Kolb, H., Nowotny, P., Burkart, V., Zivehe, F., Hwang, J.H., Stehle, P., Pacini, G., et al. (2015). Intake of Lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept. Diabetes care *38*, 1827-1834.
Smith, T.H., Ngwainmbi, J., Grider, J.R., Dewey, W.L., and Akbarali, H.I. (2013). An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse. J Vis Exp.
Stenkamp-Strahm, C.M., Kappmeyer, A.J., Schmalz, J.T., Gericke, M., and Balemba, O. (2013). High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. Cell Tissue Res *354*, 381-394.
Tang, Z.Q., Wu, T., Cui, S.W., Zhu, X.H., Yin, T., Wang, C.F., Zhu, J.Y., and Wu, A.J. (2013). Stimulation of insulin secretion by large-dose oral arginine administration in healthy adults. Exp Ther Med *6*, 248-252.
Ten Kulve, J.S., van Bloemendaal, L., Balesar, R., RG, I.J., Swaab, D.F., Diamant, M., la Fleur, S.E., and Alkemade, A. (2015). Decreased hypothalamic glucagon-like peptide-1 receptor expression in type 2 diabetes patients. J Clin Endocrinol Metab, jc20153291.
Tolessa, T., Gutniak, M., Holst, J.J., Efendic, S., and Hellstrom, P.M. (1998). Glucagon-like peptide-1 retards gastric emptying and small bowel transit in the rat: effect mediated through central or enteric nervous mechanisms. Dig Dis Sci *43*, 2284-2290.
Tolhurst, G., Heffron, H., Lam, Y.S., Parker, H.E., Habib, A.M., Diakogiannaki, E., Cameron, J., Grosse, J., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion *via* the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes *61*, 364-371.
Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F., and Gribble, F.M. (2011). Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca2+ and cAMP. Endocrinology *152*, 405-413.
Varin, E.M., Wojtusciszyn, A., Broca, C., Muller, D., Ravier, M.A., Ceppo, F., Renard, E., Tanti, J.F., and Dalle, S. (2016). Inhibition of the MAP3 kinase Tpl2 protects rodent and human beta-cells from apoptosis and dysfunction induced by cytokines and enhances anti-inflammatory actions of exendin-4. Cell Death Dis *7*, e2065.
Veedfald, S., Hansen, M., Christensen, L.W., Larsen, S.A., Hjollund, K.R., Plamboeck, A., Hartmann, B., Deacon, C.F., and Holst, J.J. (2016). The insulinotropic effect of exogenous GLP-1 is not affected by acute vagotomy in anaesthetized pigs. Exp Physiol.
Waget, A., Cabou, C., Masseboeuf, M., Cattan, P., Armanet, M., Karaca, M., Castel, J., Garret, C., Payros, G., Maida, A., et al. (2011). Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice. Endocrinology *152*, 3018-3029.
Wichmann, A., Allahyar, A., Greiner, T.U., Plovier, H., Lunden, G.O., Larsson, T., Drucker, D.J., Delzenne, N.M., Cani, P.D., and Backhed, F. (2013). Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. Cell Host Microbe *14*, 582-590.
Widmann, C., Dolci, W., and Thorens, B. (1997). Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites. Mol Endocrinol *11*, 1094-1102.
Xu, G., Kaneto, H., Laybutt, D.R., Duvivier-Kali, V.F., Trivedi, N., Suzuma, K., King, G.L., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2007). Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. Diabetes *56*, 1551-1558.
Yang, L., Yao, D., Yang, H., Wei, Y., Peng, Y., Ding, Y., and Shu, L. (2016). Puerarin protects pancreatic beta-cells in obese diabetic mice *via* activation of GLP-1R signaling. Mol Endocrinol, me20151213.
Yarullina, D.R., Mikheeva, R.O., Sabirullina, G.I., Zelenikhin, P.V., Ilinskaya, O.N., and Sitdikova, G.F. (2016). Role of Nitric Oxide Produced by Lactobacilli in Relaxation of Intestinal Smooth Muscles. Bull Exp Biol Med *160*, 343-346.
Younan, S.M., and Rashed, L.A. (2007). Impairment of the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in obese and diabetic rats is related to the down-regulation of its pancreatic receptors. Gen Physiol Biophys *26*, 181-193.

**Supplementary materials**

**Animals.**

C57BL/6 wild type (WT), TLR4, CD14 and NOD2 knockout (KO) male mice were initially purchased from the Charles Rivers laboratories. The GLP-1 receptor (GLP-1r) KO male mice were a kind gift from DJ Drucker's laboratory (Toronto, Canada). Mice were housed in a controlled environment (inverted 12h daylight cycle, light off at 10:00 a.m.) with free access to food and water. Mice were fed diets (NCD: proteins 22%, carbohydrates from cereal origins: starch and fiber 67%, lipids 11% of total kcal, Safe), or a high-fat high-carbohydrate diet (HC-HFD: proteins 20%, carbohydrates as sucrose, maltodextrin, and fiber 20%, lipids 60% of total kcal, Research Diet), or a high-fat carbohydrate-free diet (HFD: proteins 22%, carbohydrates <1%, 78% lipids of total kcal, Safe). After 2 months a sub group from these mice was treated for one additional month with antibiotics (Ampicillin, Neomycin, Metronidazol 0.1g/100ml of each in water, in free access). Eight-week old C57BL/6 germ-free male mice were initially purchased from TAAM (Orléans, France). All animal experimental procedures were approved by the local ethical committee of the Rangueil hospital and by the local ethical committee of the University of Paris Diderot.

**Subdiaphragmatic vagotomy**

They were anesthetized by intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamin (100mg/kg) and Xylasin (10mg/kg) and maintained under isofluran (0.5 to 1% of air). From an upper midline laparotomy (2cm), vagal trunks were exposed and 1cm of the visible ventral vagus nerve and all neural and connective tissues surrounding the esophagus were cut off. For sham-operated animals, the vagus nerve was similarly exposed but not cut.

**Glucose and insulin tolerance tests, plasma and tissue sample collection.**

Mice fasted for 6h or 4h were injected with glucose for IPGTT (1g/kg) or insulin for IPITT (0.75U/kg), respectively, into the peritoneal cavity. One microliter from the tip of tail blood was collected before and for up to 90min following the glucose or insulin challenges to quantify the concentration of glucose using a glucose-meter (Accu Chek, France).

To identify oral glucose-induced insulin and GLP-1 secretions, all sets of mice were gavaged with glucose (2g/kg). After 15min, 30µl of blood from the tip of the tail vein were sampled to assess plasma insulin concentration. 300µl of portal vein blood were collected following an intravenous (i.v.) administration of a Ketamin (10mg/kg) / Xylasin (1mg/kg), to ensure an immediate anesthesia of the mice. This procedure allows performing portal vein blood sampling since it dramatically minimizes the impact of anesthesia on blood parameters. In addition, to prevent from the *in vivo* degradation of GLP-1 by DPP4, a DPP4 inhibitor (DPP4i) (400µg/mouse, Sitagliptin, MSD Rahway, NJ) was administered orally 30min before the oral gavage with glucose. Eventually, the portal blood was collected in the presence of protease inhibitors diprotin A (1mM), aprotinin (0.2 µM) and EDTA (1mM). Plasma hormones were assessed by ELISA (insulin, Mercodia; active GLP-$1_{7\text{-}36}$, Alpco). A

GLP-1 resistance index for each mouse was calculated from glucose, insulin and GLP-1 concentrations 15min after the oral glucose load. Since the insulinotropic activity of GLP-1 depends upon the glycemic level, we set the following equation: Glucose x GLP-1 concentration / insulin concentration. In some experiments, distal ileum and left nodose ganglion were harvested from mice.

***In vivo* GLP-1 dose-response procedures.**

Since GLP-1 insulinotropic effect is glucose dependent, we first assessed *in vivo* GLP-1 stimulated insulin secretion in hyperglycemic conditions. The mice were first fasted for 6h before the GLP-1 and glucose challenges. Active GLP-$1_{7-36}$ (BACHEM, Switzerland) was then administered intraperitoneally at different doses (0, 2.2, 7, 21, 63nmol/kg, diluted in distilled water) 5min before the glucose challenge. In some sets of experiments a single active dose of 7nmol/kg was tested. To induce hyperglycemic conditions a retrorbital i.v. glucose (1g/kg) injection was realized. This procedure avoids the confounding effect of the oral glucose-induced gut-secreted GLP-1. Blood (30µl) was collected from the tail vein 15min after glucose challenge. Plasma insulin concentration was determined.

For gastric emptying the glucose challenge was replaced by an oral administration of acetaminophen (SIGMA-Aldrich, 100µg/kg). The plasma acetaminophen concentrations were assessed by colorimetric-based assay (SEKISUI diagnostics, Canada) in the plasma from tail blood 15min after acetaminophen gavage.

Food intake was recorded for 30min following a 16-hour period of fast and for 6 hours during the dark feeding period.

**mRNA quantification**

Total RNAs were extracted with TriPure Reagent from the ileum and with RNAeasy Microkit, (Qiagen) from the nodose ganglion. The concentration of mRNAs was evaluated by quantitative RT-PCR analysis. PCRs were performed using ViiA7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The concentration of each mRNA was normalized for RNA loading for each sample using RPL19 rRNA (r: CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT, f: GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA) as an internal standard and the primers are listed:

| | | |
|---|---|---|
| GLP-1R F | NM_021332.2 | ATGGCCAGCACCCCAAGCCTCCTGCGCCT |
| GLP-1R R | | ACTCTTCACACTCCGACAGGTCCCTCCAG |
| NeuN F | NM_001039167.1 | TTGCTTCCAGGGTCGTGTAT |
| NeuN R | | TGGTTCCGATGCTGTAGGTT |
| PGP95 F | AF172334.1 | AGTCTGGGGAGAGAGAACCA |
| PGP95 R | | ACCGTAGAGAGCAAGGTACG |
| nNOS F | NM_008712.2 | CCTGTGCGAGATCTTCAAGC |
| nNOS R | | GAGACGCTGTTGAATCGGAC |
| Prph F | BC046291.1 | ATCTCAGTGCCGGTTCATTC |

| | | |
|---|---|---|
| Prph R | | GGGCCAAGCTTAGGAATAGG |
| s100b F | NM_009115.3 | CAAGAGGAGGCACAGCAAAG |
| s100b R | | GGAATGCCTAGCCTAGCAGA |
| GFAP F | NM_001131020.1 | GAGGGACAACTTTGCACAGG |
| GFAP R | | TCCTCCAGCGATTCAACCTT |

**Immunohistochemistry**

*Longitudinal muscle / myenteric plexus*

To prepare longitudinal muscle / myenteric plexus (LMMP, i.e. enteric nervous system) 3 cm of distal ileum obtained from mice in a fed state, were cut longitudinally and soaked in a Silgard coated plate containing ice-cold PBS. The mucosal layer was removed and the LMMP was dropped into paraformaldehyde (PFA) 4% overnight, at room temperature (RT) washed with cold PBS and kept in a sodium azide solution (0.1% in PBS) at 4°C. Samples were blocked for 1h at RT with PBS containing Triton X100 (0.5%), sodium azide (0.1%) and goat serum (4%). For HuC/HuD immunostaining, bovine serum albumin (BSA, 4%) was added to the previous solution. Then samples were incubated overnight at RT with the primary antibodies diluted in the blocking solution (HuC/HuD, Lifetechnologies; S100β, Abcam; or nNOS, R&D system; 1/500), washed 3 times with PBS, incubated 90min at RT with the secondary antibodies (Alexa 488 or Alexa 568, Lifetechnologies; 1/400) and washed 3 times with PBS. Samples were mounted with fluorescent mounting medium (Dako). The fluorescence of different tissues was measured on confocal Zeiss Laser Scanning Microscope LSM-780 equipped with 20x/0.8 NA objective and Black Zen software and analysed with Image J software.

*c-FOS immunostaining in the brain stem*

90min following the GLP-1-induced insulin secretion challenge procedure mice were anesthetized with pentobarbital and tissues were fixed by intra-cardiac injection of PFA 4% diluted in PBS. Brain was removed and kept on PFA 4% overnight at 4°C. After washing in cold citrate buffer for 6h, brain was warmed until boiling, washed in PBS, cooled to 4°C, then immersed in cold sucrose solutions (10% then 30% in PBS). After freezing on dry ice, the brain was stored at -80°C and cut into 20 µm thick slices (cryostat, Thermo). The slices were washed 3 times with PBS, blocked with PBS, 0.3% Triton X100, 2% donkey serum and incubated with the c-fos antibody diluted in the same solution (1/10000, Santa Cruz) overnight at RT. After 16h, the brain slices were washed 3 times with PBS and incubated with biotinylated antibody (1/2000, Jackson ImmunoResearch) diluted in the PBST solution (PBS, 0.3% Triton X100) for 1h at RT. Brain slices were washed 3 times in PBS and incubated with the reagent A (avidin) and B (biotinylated enzyme) from Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) diluted in the PBST solution, 30min at RT. Then, brain slices were washed 3 times in PBS and incubated with biotinylated tyramine solution (tyramine and biotin diluted in borate buffer/3% $H_20_2$, pH=8.4), 20min at RT. After 3 washes in PBS, samples were incubated with alexa

568 conjugated streptavidin diluted in the blocking solution (1/1000, Lifetechnologies), during 3h, at 37°C. Brain slices were washed five times with PBS. Samples were mounted with fluorescent mounting medium (Dako). The fluorescence was analysed as above. We identified the Nucleus Tractus Solitary NTS and dorsal motor nucleus of vagus nerve DMNX area using a mouse brain atlas [910] and we counted the number of cFOS positive cells/ area corresponding to the NTS-DMNx.

**Enteric neurons primary culture**

The protocol was adapted from Smith and colleagues [911]. The ileum (last 9 cm) was harvested and kept in ice cold-carbogen bubbled-Krebs solution. The tissue was cut into 3cm slices and kept on plastic rod. An incision was realized with a forceps where the mesentery was attached. The outer layers containing muscular cells and myenteric neurons (LMMP) were obtained by moving from top to bottom, along the gap. The LMMP were digested with collagenase II (1.3mg/mL, Worthington) and BSA (0.3mg/mL) in Krebs solution bubbled with carbogen 30min in a 37°C shaking bath. Digested cells were transferred in Hank Balanced salt Solution (HBSS)/trypsin solution (0.05%) 7min in a 37°C shaking bath. Trypsin was neutralized with the rince media (F12 media from SigmaAldrich with 10% FBS and antibiotic/antimycotic 1X from Gibco) and the digested cells were filtered on nitex mesh (500µm) and transferred to complete neuron media (Neurobasal A media with B-27 supplement 1X from Life Technologies, 2mM L-glutamine, 1% FBS, 0.1% glial-derived neurotrophic factor from Neuromics and antibiotic/antimycotic 1X). Primary cells were maintained up to one week in Poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) and Laminin (BD Bioscience) coated-glass coverslips in 24-wells plate in an incubator (37°C, 5%$CO_2$) and the complete neuron media was changed every 2 days.

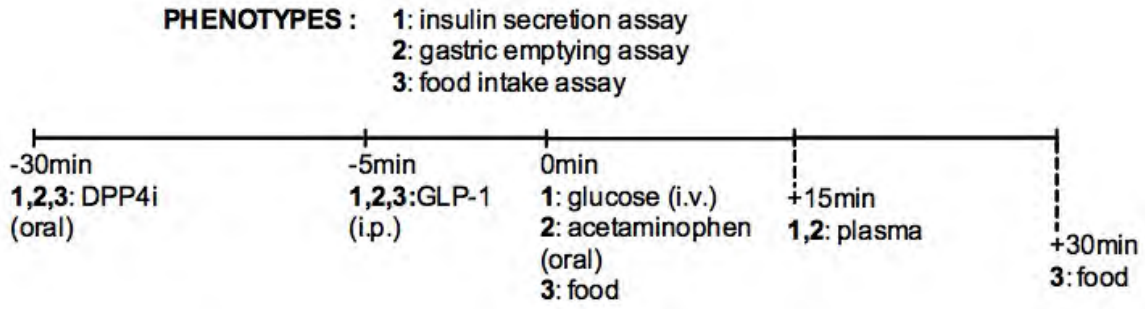
**Measurement of NOS activity in primary cultures of neurons**

Primary enteric neurons were grown for 7 days in culture. To record NO production the neurons were washed 2 times with HEPES buffer pH 7.38 and incubated with the NO specific probe, DAF-FM (2µM, Molecular Probes) for 30min. Cells were washed twice with HEPES Buffer and kept 15min in the incubator. Then, cells were stimulated with active GLP-$1_{7\text{-}36}$ diluted in HEPES buffer, at different concentrations (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100nM, BACHEM) during 15min and kept in the incubator. After GLP-1 stimulation, cells were washed twice with PBS buffer, fixed with PFA 4%, washed twice with PBS and once with PBS/Triton X100 (0.1%) and saturated with BSA 1% 30min at RT. Positive cells for nNOS were identified following nNOS immunostaining with nNOS antibody (1/300, BSA 1%, Abcam) overnight at 4°C. Cells were washed twice with PBS, once with PBS/Triton X100 (0.1%) and incubated with an Alexa 568 antibody (1/800, BSA 1%, Lifetechnology) 1h at RT. After 3 washes with PBS and incubation with DAPI 5min at RT, cells were washed 3 times with PBS and mounted with fluorescent mounting medium (Dako). The fluorescence was measured on confocal Zeiss Laser Scanning Microscope LSM-780 equipped with 63x/1.4 NA oil immersion objective and a GaAsP detector with quantum yield of 45% with Black Zen software and analysed with Image J software. A region of interest (ROI) corresponding to identified nNOS positive cells was defined from

where the DAF-FM or nNOS fluorescence mean per ROI was measured. The ratio of both values for each ROI was then calculated.

**Figures**

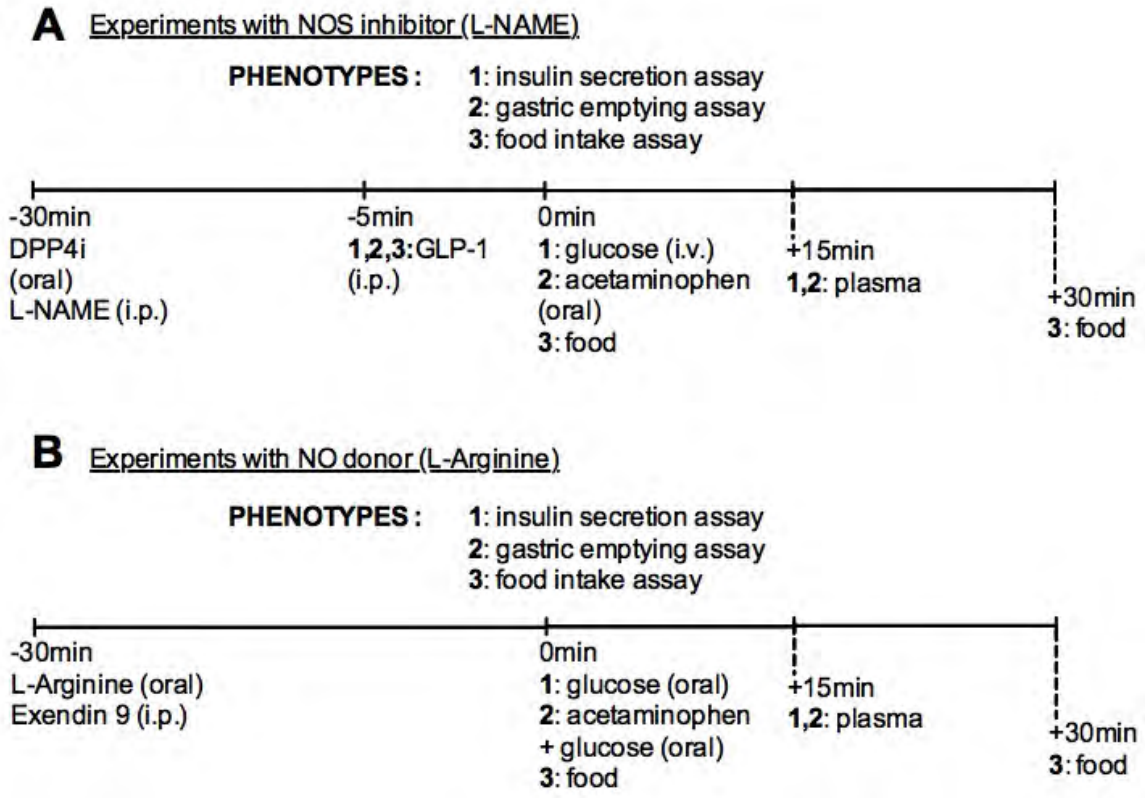
Figure 1




Grasset, Figure 1

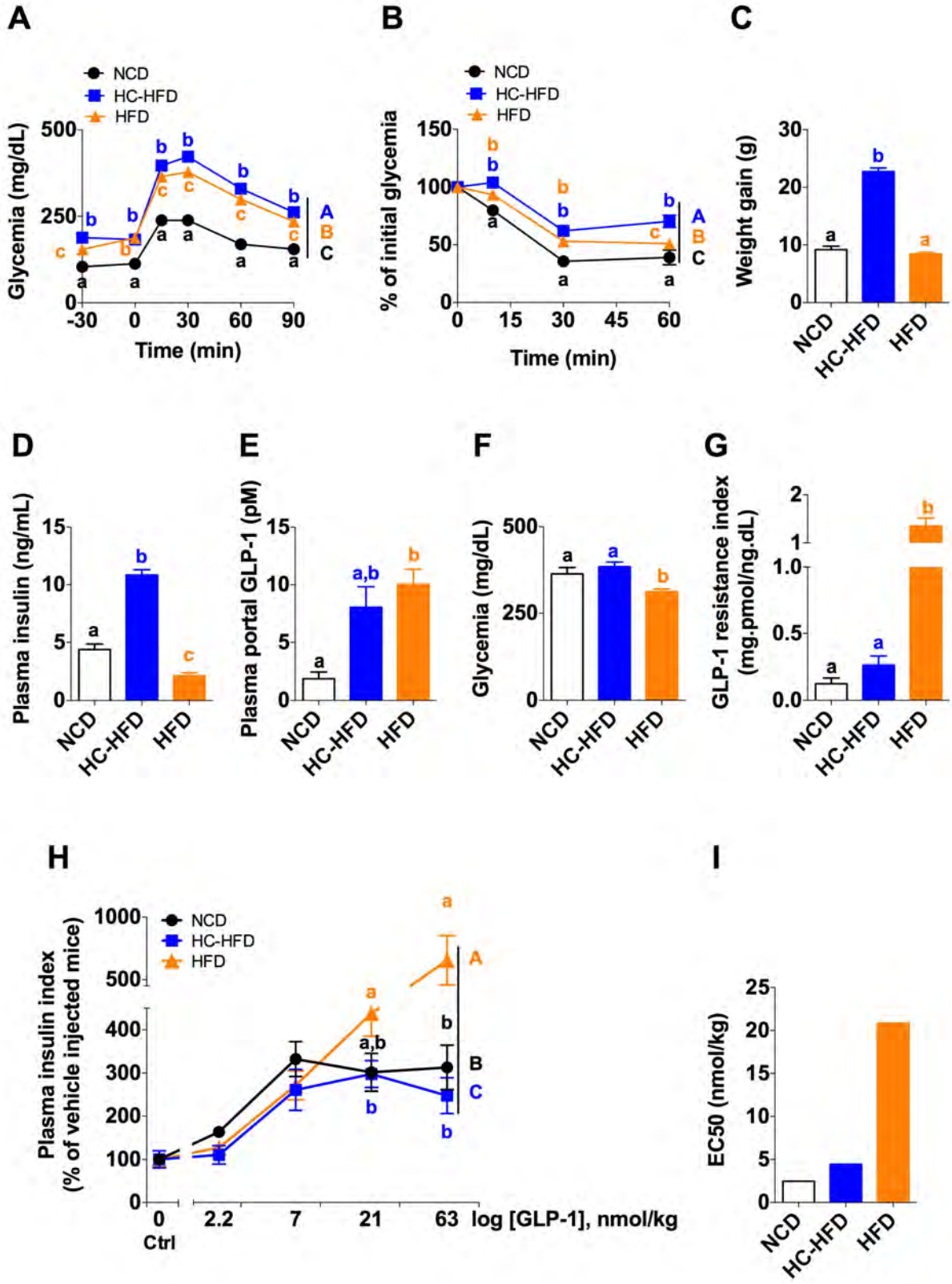
---

Figure 2



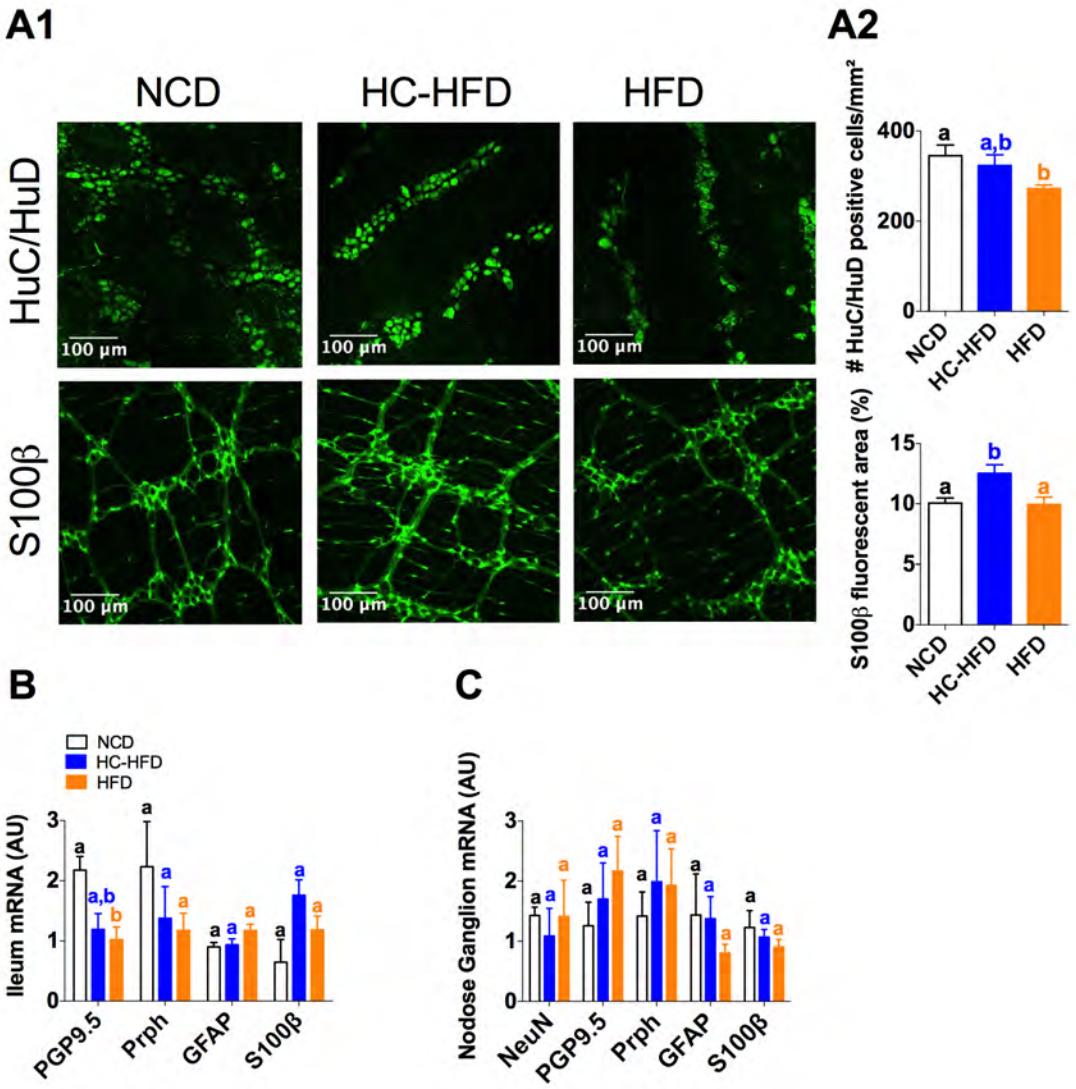

Grasset, Figure 2

Figure 3



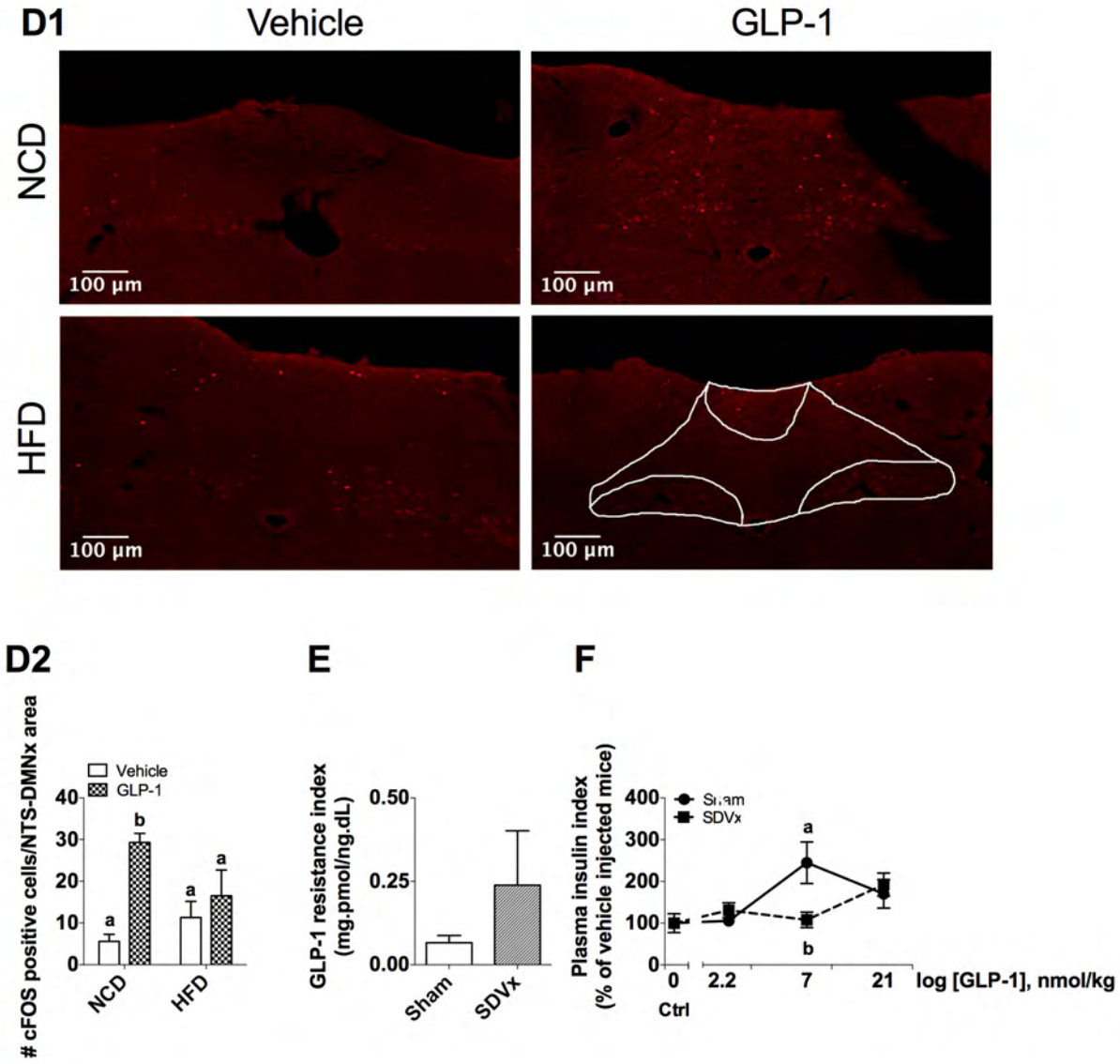

Grasset, Figure 3

Figure 4



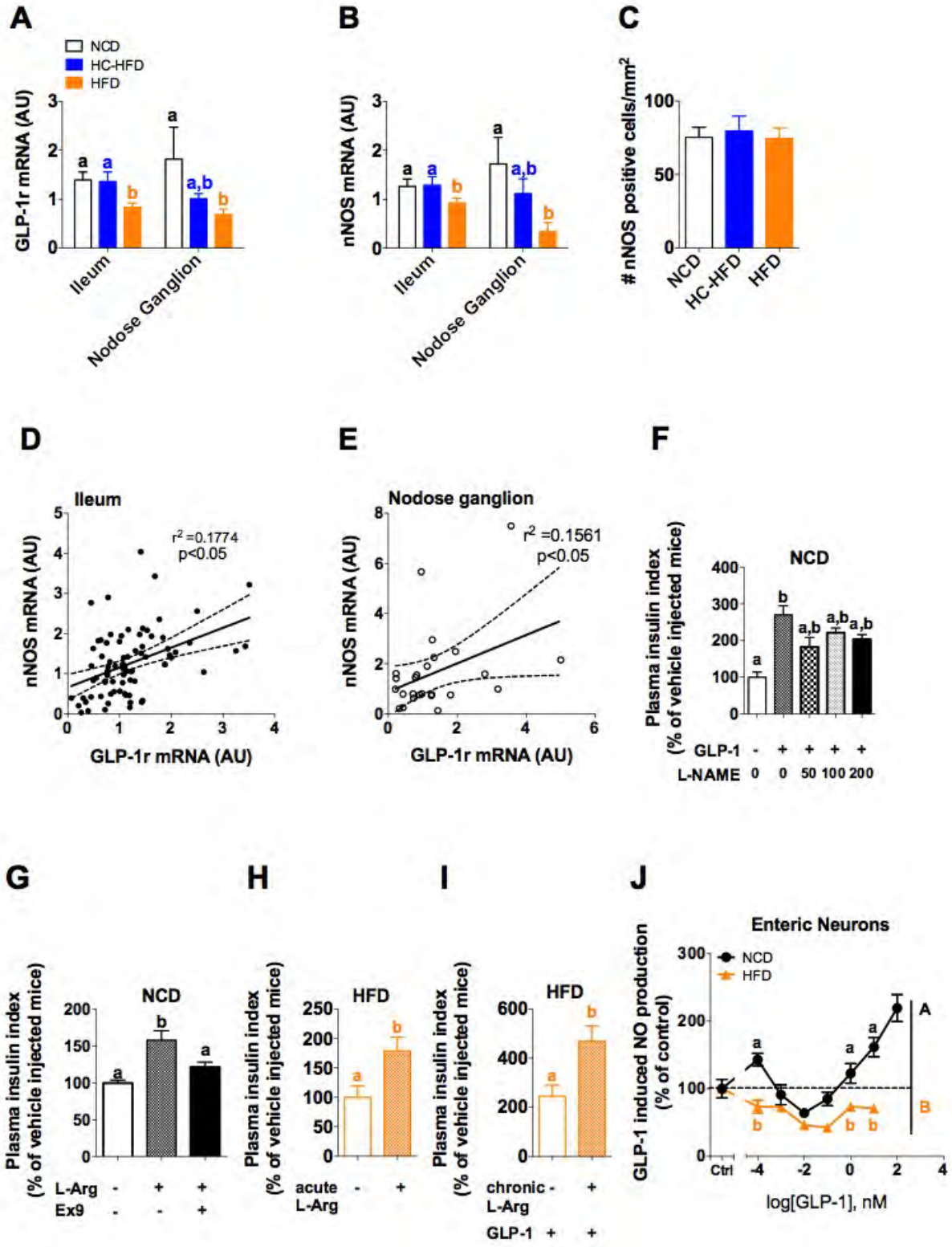

Grasset, Figure 4

Figure 4



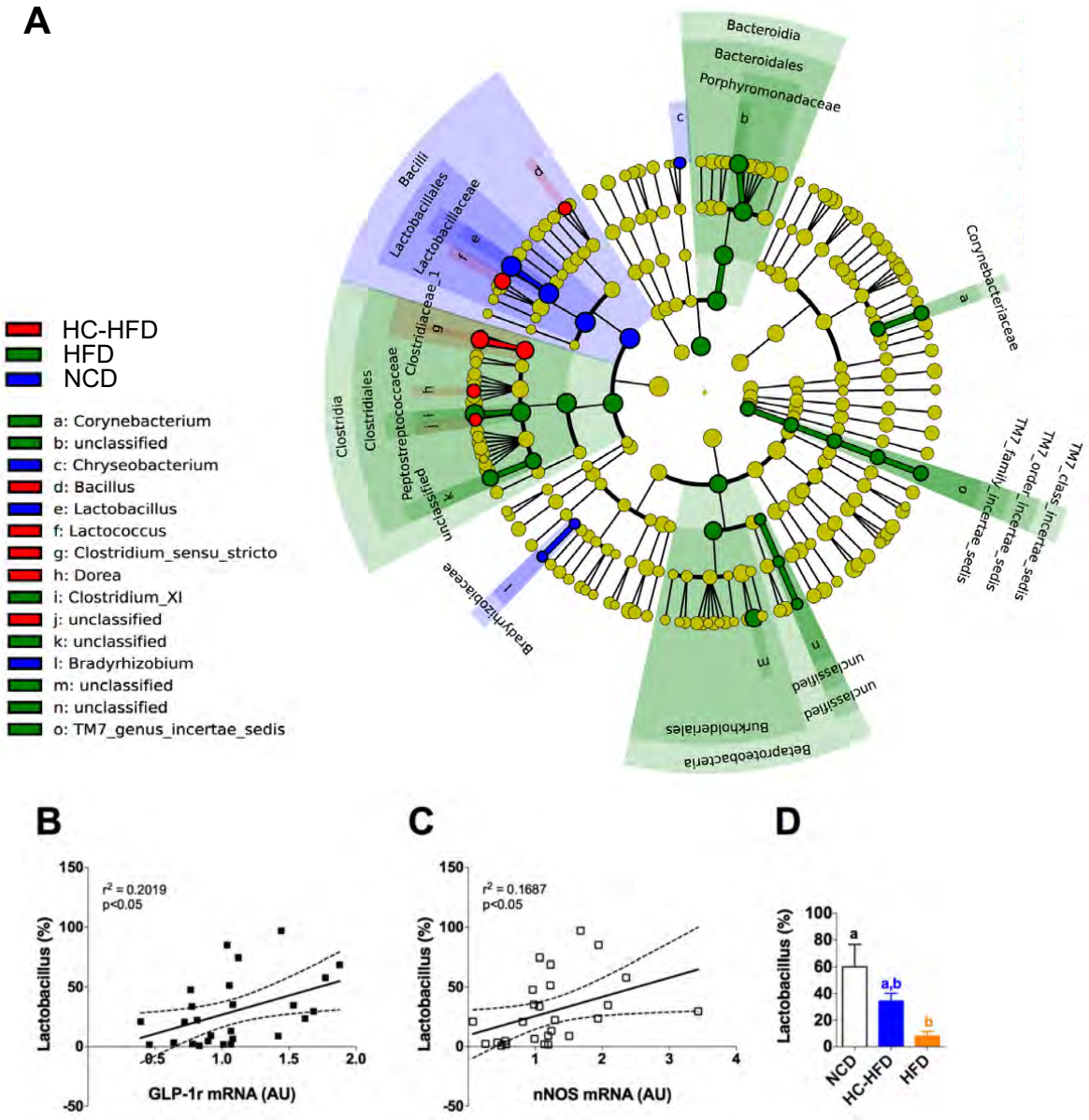

Grasset, Figure 4

Figure 5



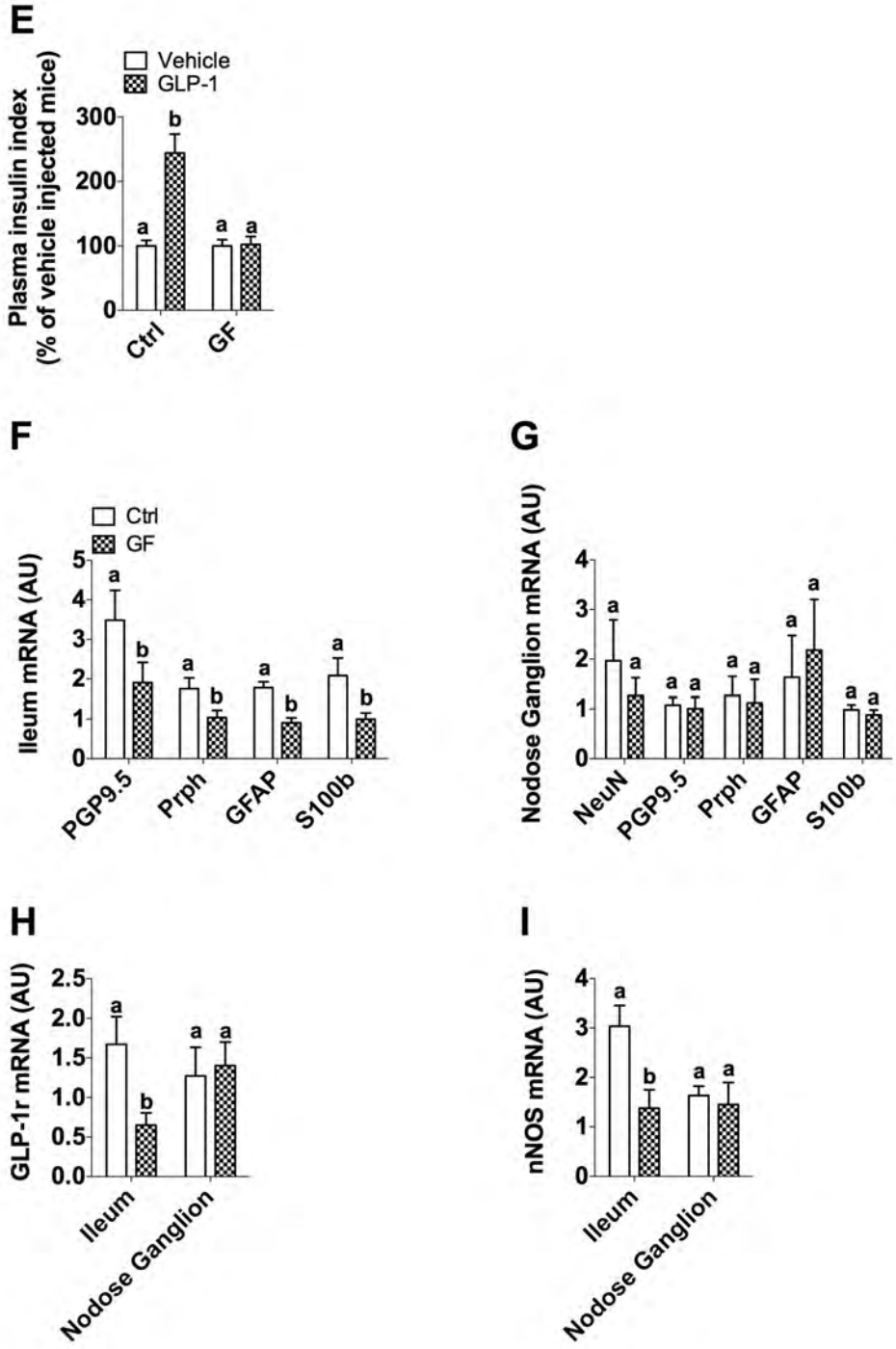

Grasset, Figure 5

Figure 6



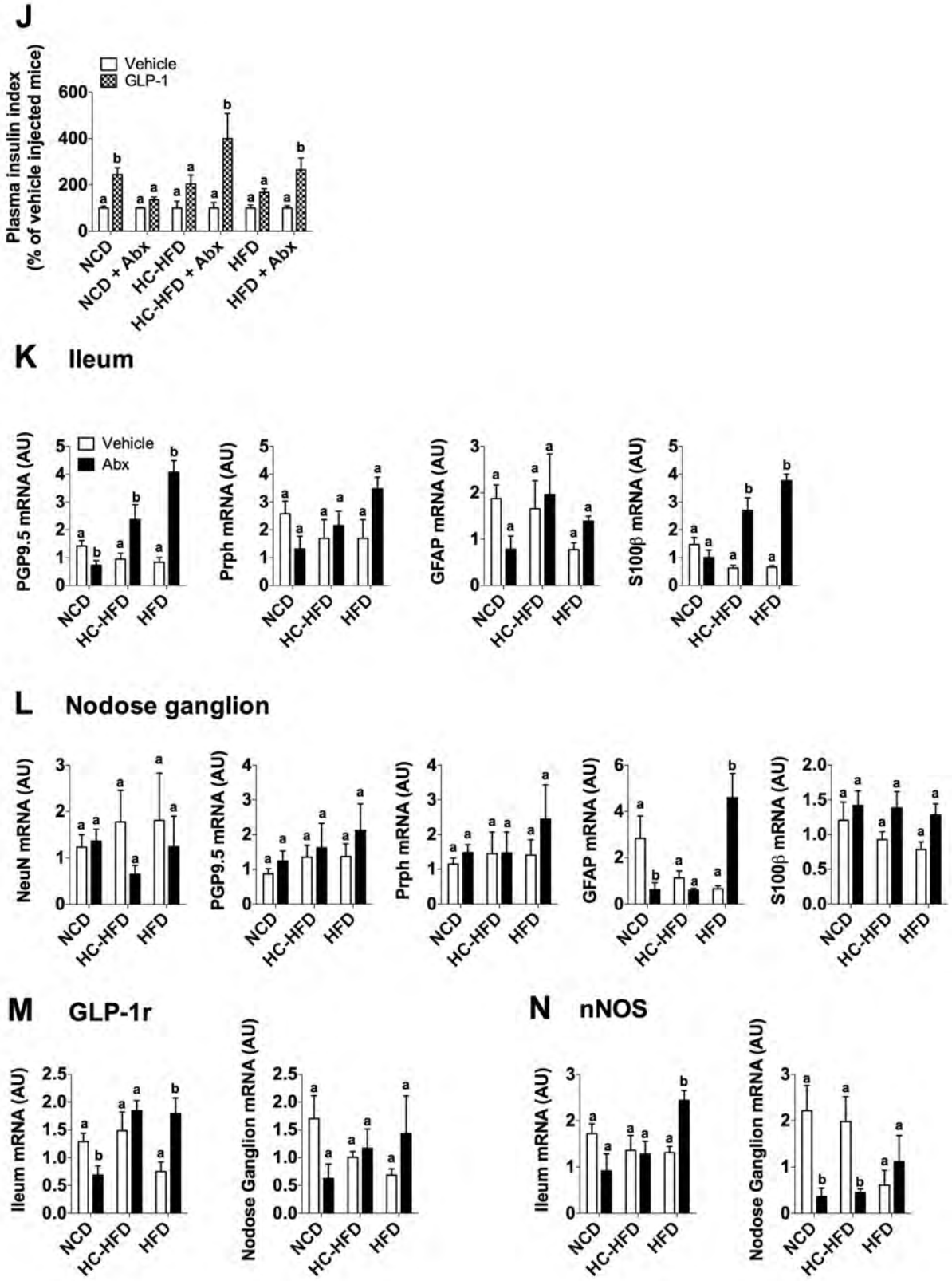

Grasset, Figure 6

Figure 6



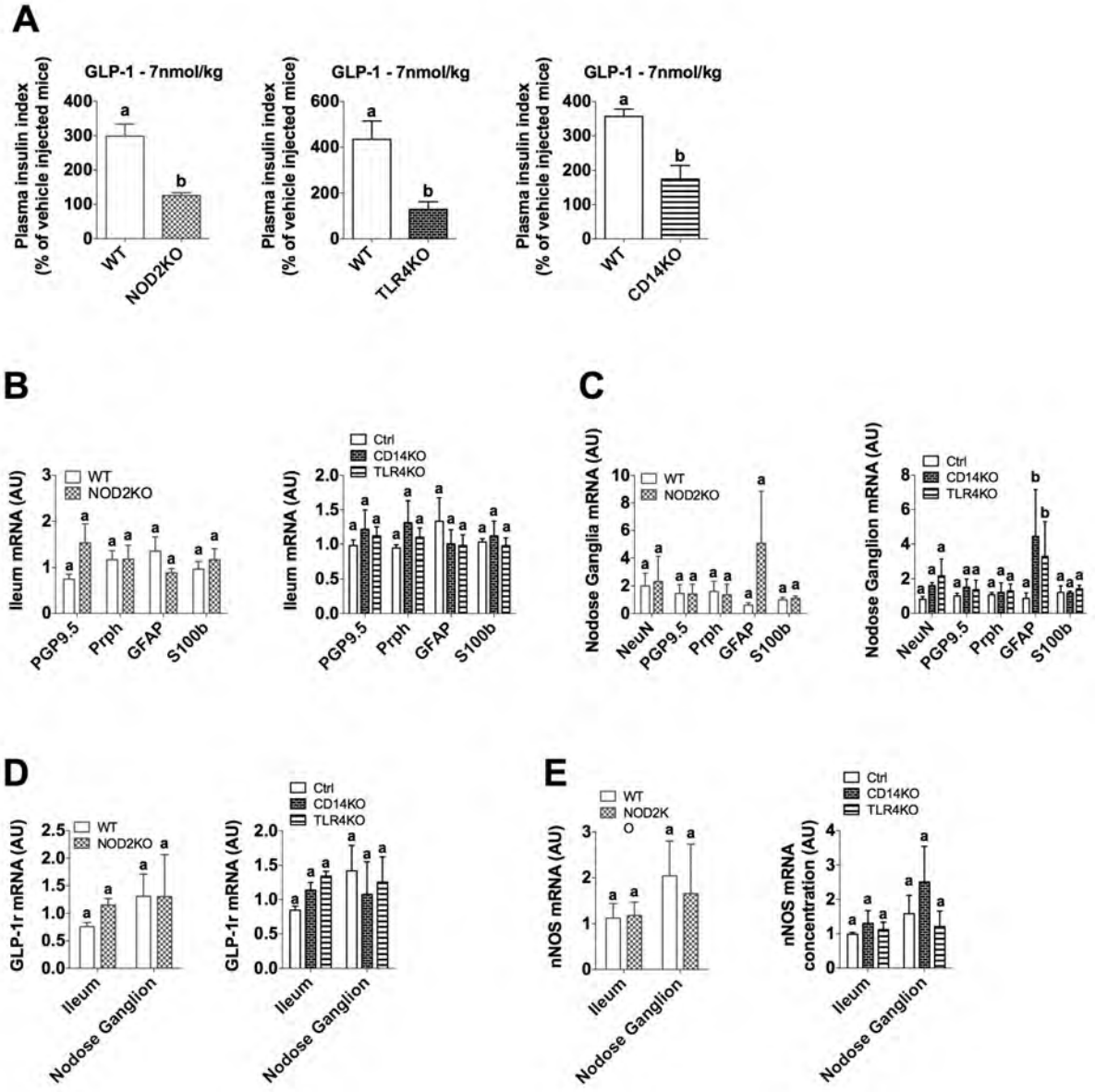

Grasset, Figure 6

Figure 6



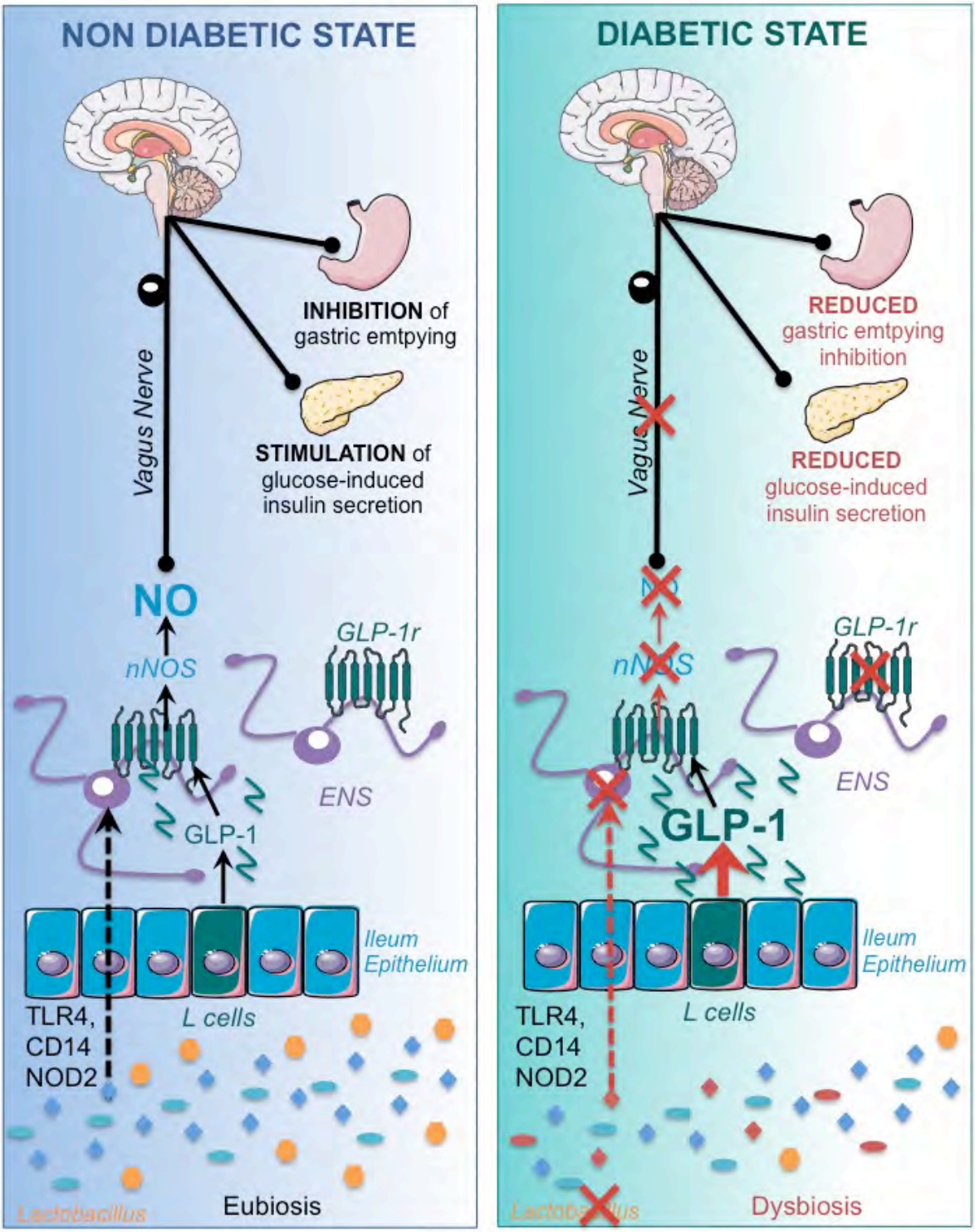

Grasset, Figure 6

Figure 7



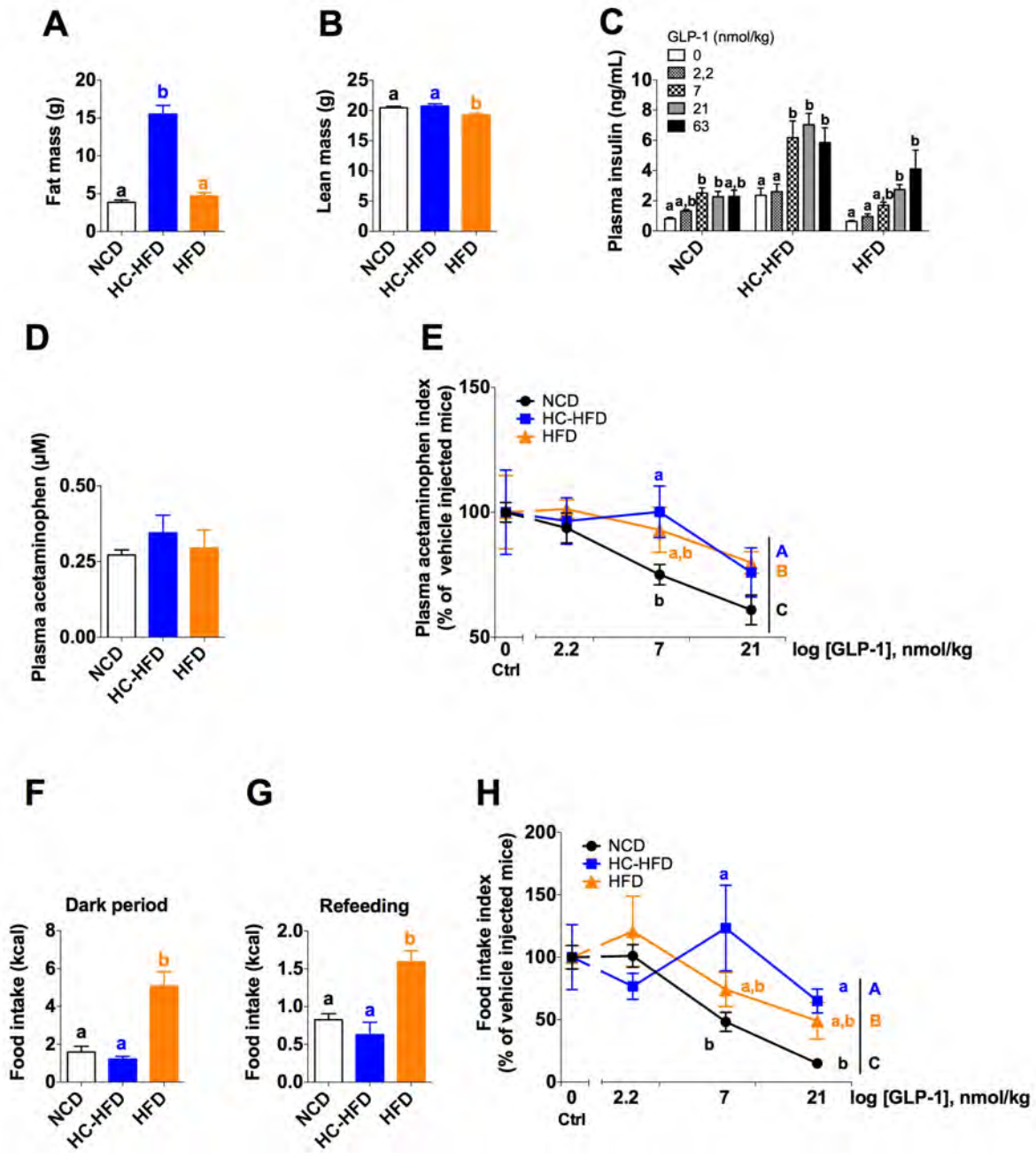

Grasset, Figure 7

Figure 8



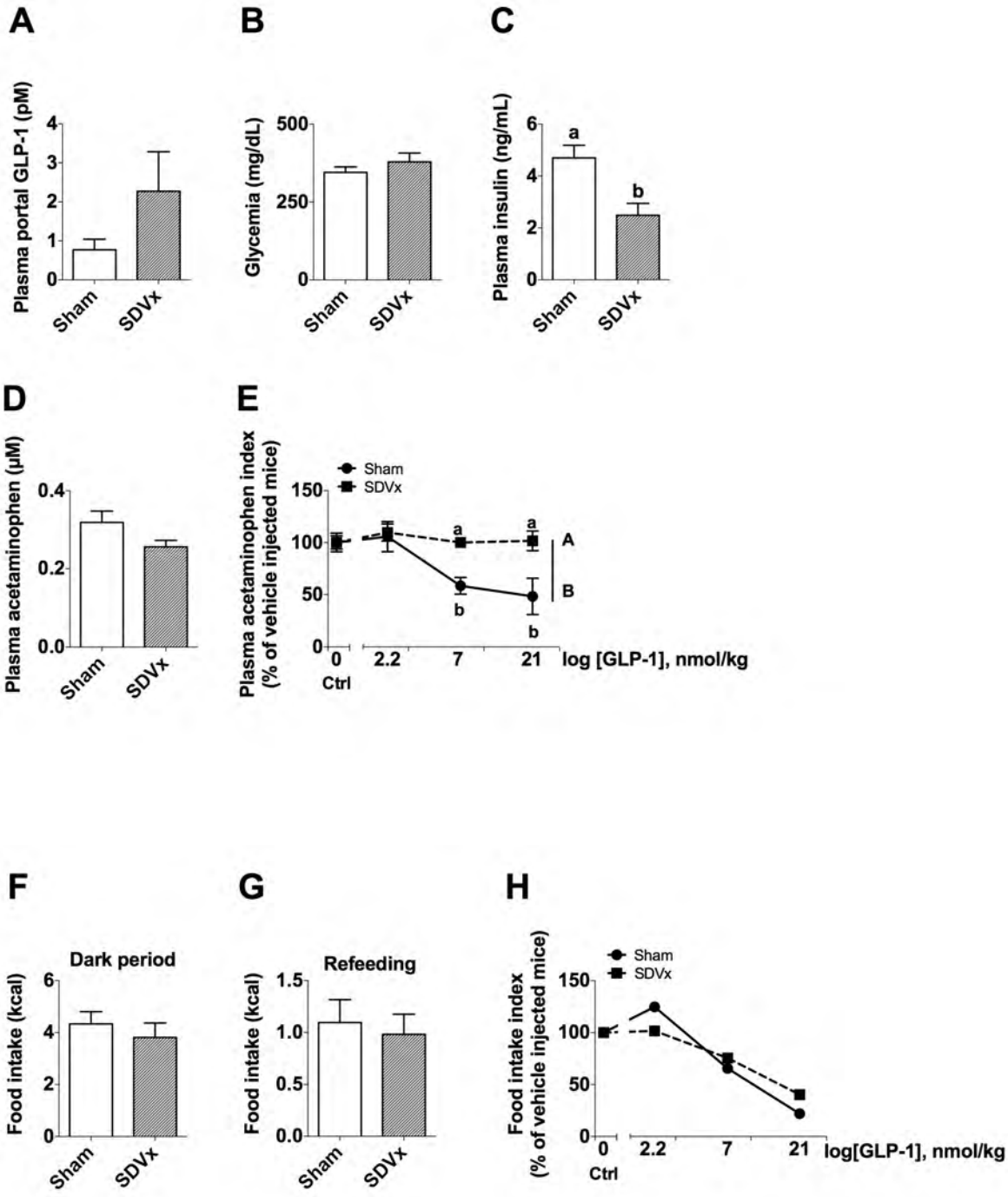

Grasset, Figure 8

Figure S1



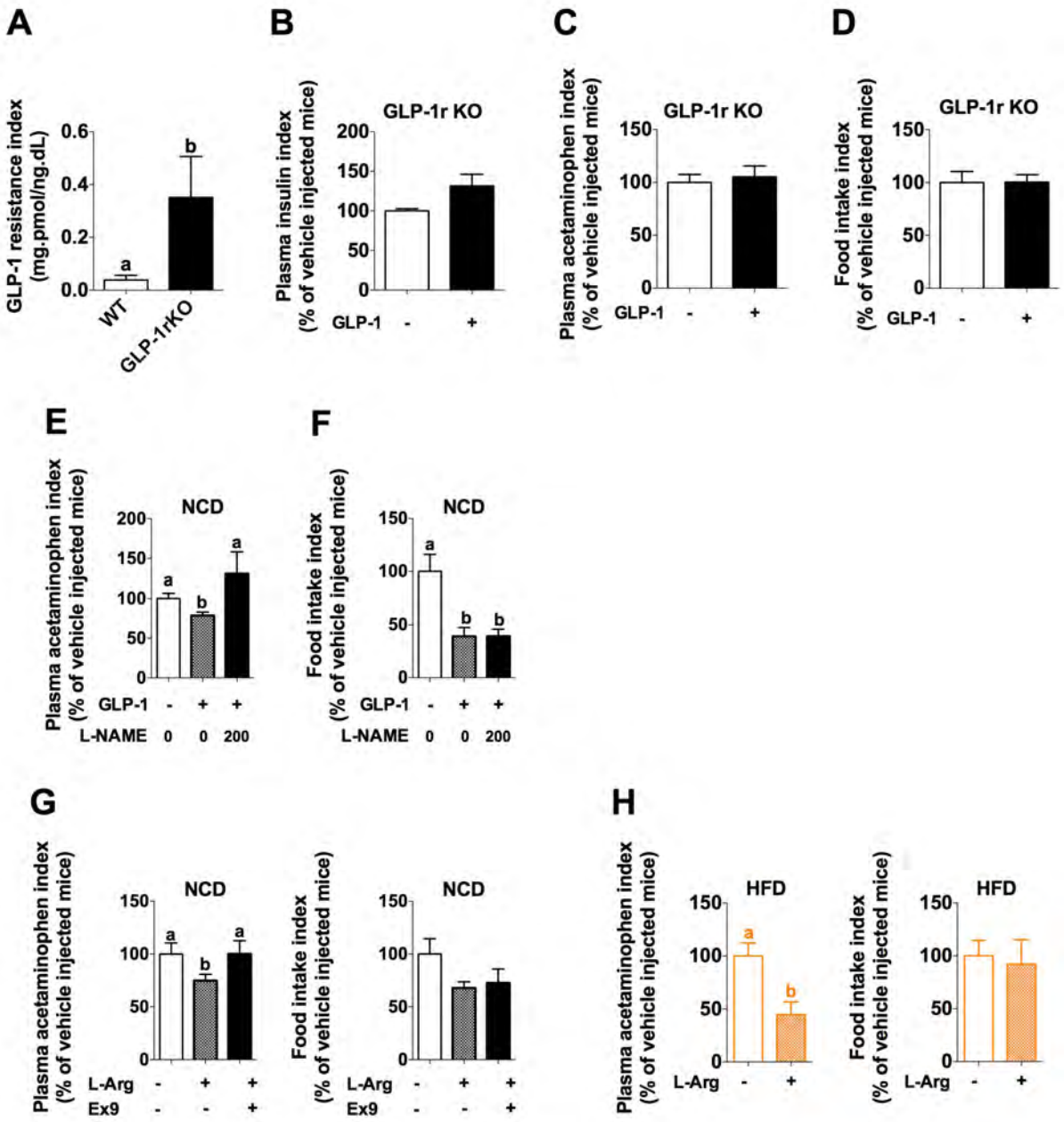

Grasset, Figure S1

Figure S2



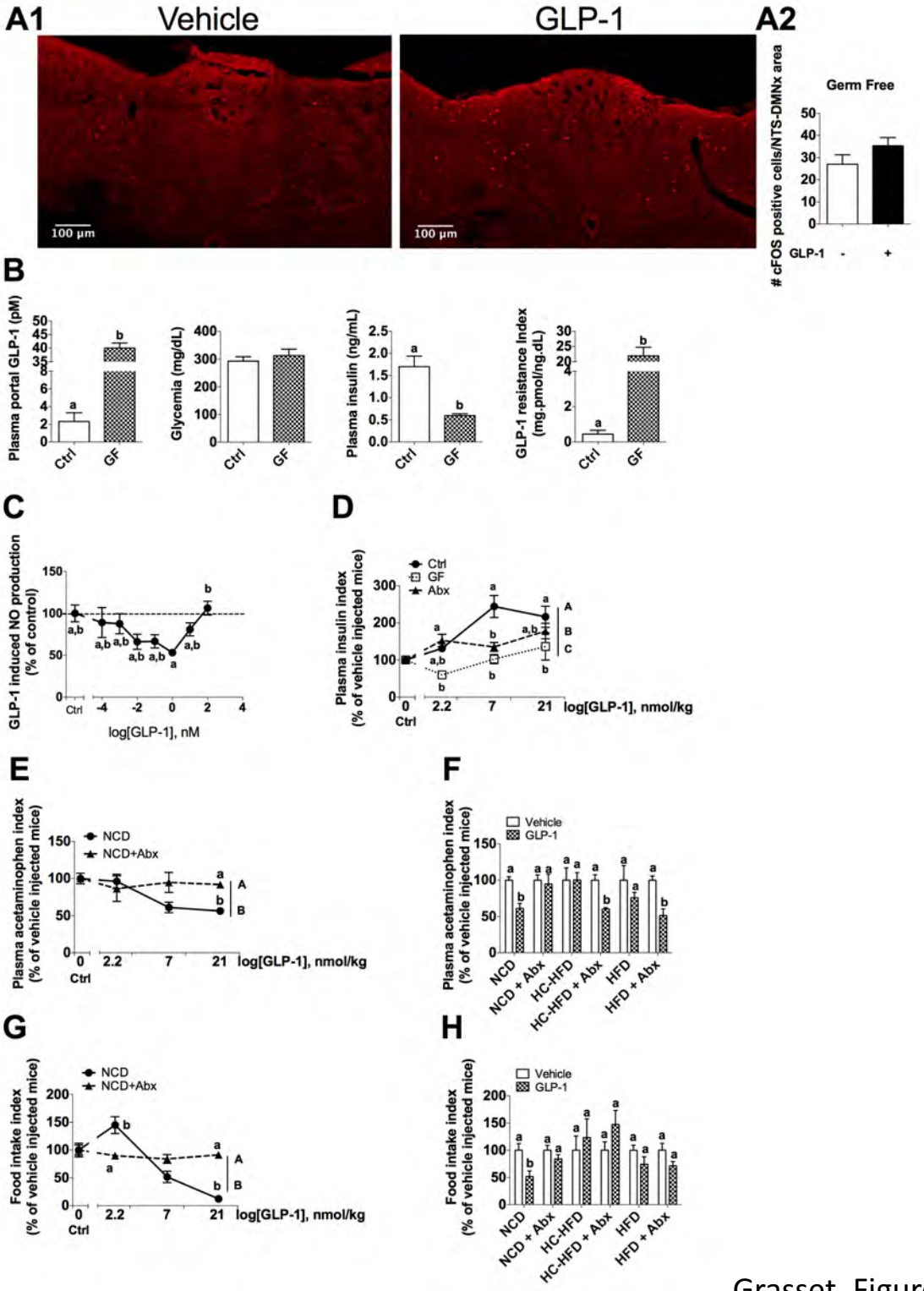

Grasset, Figure S2

Figure S3



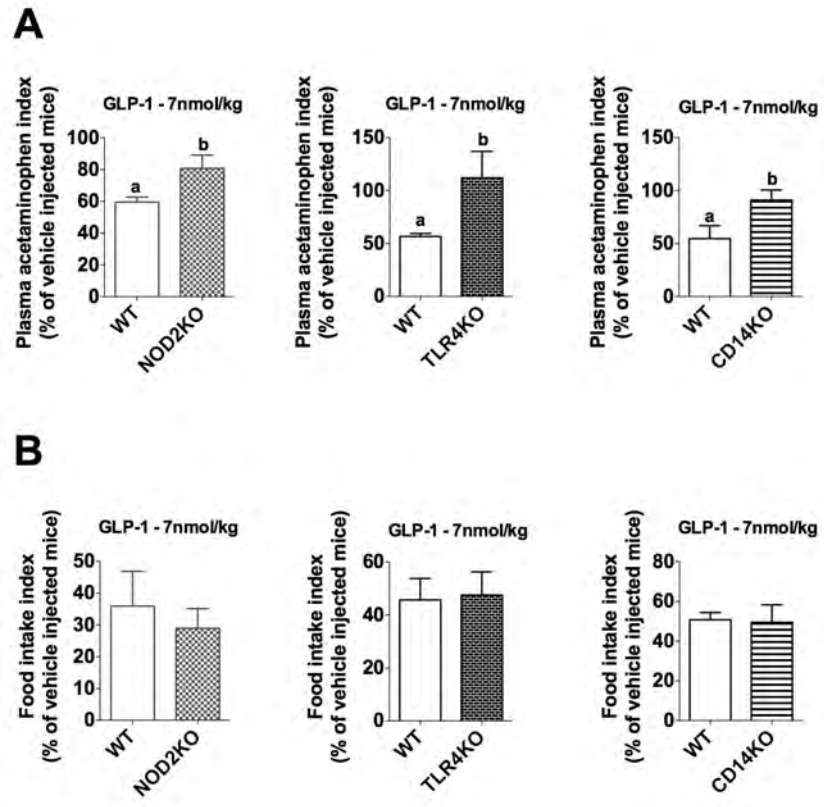

Grasset, Figure S3

Figure S4




Grasset, Figure S4

Figure S5




Grasset, Figure S5

# IX. Chapitre 5 : Le liraglutide, agoniste du GLP-1r, améliore l'activité vagale impliquée dans l'axe intestin-cerveau-cellule β

## A. Introduction

Pour traiter le DT2, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont vu le jour. Parmi elles, on distingue les thérapies basées sur le GLP-1 : les inhibiteurs de la DPP4, les « gliptines », et les agonistes du GLP-1r, les « glutides » comme cité à la fin du Chapitre 3. Au laboratoire nous avons montré que l'inhibiteur de la DPP4, la sitaglitpine à très faible dose était capable d'améliorer la tolérance au glucose en diminuant juste l'activité de la DPP4 intestinale. L'amélioration de la tolérance au glucose passe par la stimulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose oral. Par mesures électrophysiologies, il a été démontré que les doses efficaces de la sitagliptine stimulent l'activité électrique du nerf vague. Cette activité est diminuée lorsque l'on administre un inhibiteur du GLP-1r, l'exendine 9-39 ou lorsque les expériences sont réalisées chez les souris invalidées pour le GLP-1r [812]. L'infusion d'inhibiteur de DPP4 dans la veine porte suffit à activer les neurones du tronc cérébral et de l'hypothalamus [937]. Il a été montré d'autre part que les inhibiteurs de DPP4, après deux semaines de traitements, augmentaient la sécrétion d'insuline en réponse au glucose chez des animaux diabétiques [938]. L'effet bénéfique des inhibiteurs de DPP4 sur la glycémie est également observé chez les patients DT2 [939]. Ces effets pourraient passer par une augmentation de masse des cellules β [940] et également une amélioration de la neuropathie [941].

Les agonistes du GLP-1r ont été également développés (cf. fin du Chapitre 3). Parmi eux, on distingue le liraglutide. Il s'agit d'un analogue du GLP-1 possédant une chaine aliphatique sur l'acide aminé n°26 le rendant affin pour l'albumine. Cette affinité lui assure une protection et donc une demi-vie plus longue que le GLP-1 natif et également la capacité de traverser la BHE. Par cette dernière caractéristique, il stimule directement les neurones POMC pour réguler la prise alimentaire et diminuer le poids [942]. Le liraglutide est également capable de réguler la sécrétion d'insuline et la glycémie chez des souris diabétiques et chez l'homme [943, 944]. Bien que l'effet hypoglycémiant du liraglutide ne soit plus à démontrer, ses effets sur l'axe nerveux intestin-cerveau et sur l'activité du nerf vague sont aujourd'hui inconnus.

Dans ce cadre-là, nous avons étudié l'activité électrique du nerf induite par le liraglutide, chez des souris normales, saines et chez les souris diabétiques en traitement aigue et chronique.

B. Résultats

Chez une souris C57/Bl6 mâle, saine et adulte, le liraglutide (100µg/kg, injection intrapéritonéale 30 minutes avant l'injection de glucose) augmente la concentration plasmatique d'insuline 15 minutes après une injection intrapéritonéale de glucose (1g/kg) ou un gavage de glucose (2g/kg) (**Figure 9A, B**). Ces effets ne sont pas observés chez les souris GLP-1rKO, révélant que l'action du liraglutide passe par le GLP-1r, et chez les souris ayant subi une vagotomie subdiaphragmatique suggérant l'importance du nerf vague (**données non montrées**). Des souris C57/Bl6 âgées de 8 semaines ont été nourries avec un régime gras dépourvu de sucre et riche en gras (HFD) pendant 2 mois, temps nécessaire pour qu'elles deviennent intolérantes au glucose. Chez ces souris, lorsque le glucose est donné oralement, le liraglutide augmente la concentration plasmatique d'insuline mais pas lorsqu'il est injecté en intrapéritonéal (**Figure 9A, B**). D'autre part, chez ces mêmes souris, le glucose donné oralement ne stimule pas la sécrétion d'insuline tandis que lorsqu'il est injecté dans le péritoine, il la stimule.

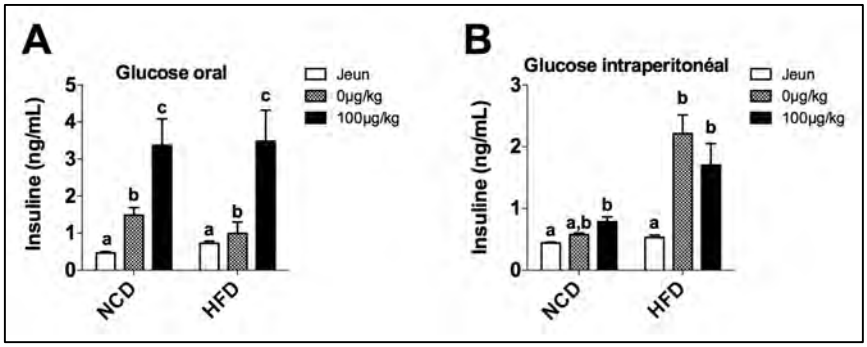



Figure 9 : Concentration d'insuline plasmatique des souris NCD et HFD, à jeun ou 15 min après un challenge en glucose oral (A) ou intrapéritonéal (B), en présence ou non de liraglutide. Les valeurs représentées avec les mêmes lettres ne sont pas différentes, la comparaison statistique des moyennes ± écart type à la moyenne se fait entre les différentes conditions pour chacun des groupes de souris.

Pour déterminer comment est activé le nerf vague en réponse au liraglutide, des expériences d'électrophysiologie ont été réalisées. Les souris sont anesthésiées à l'isoflurane. Un cathéter est placé dans le duodénum afin d'y injecter du glucose (2g/kg). Le nerf vague est isolé de l'artère carotide et de la veine jugulaire au niveau cervical et deux électrodes de platine dénudées sont placées directement au contact du nerf. La souris est ensuite placée dans une cage de Faraday. L'activité du nerf vague est mesurée sur une fréquence de 25 à 30Hz, à l'aide du logiciel LabChart 7.3 (AD Instruments), afin d'enregistrer les potentiels d'action lents caractérisant l'activité afférente du nerf. Dans le but d'évaluer l'effet du liraglutide sur la réponse vagale en réponse au glucose, les souris sont injectées en intrapéritonéal avec la molécule, endormies puis opérées. Les souris contrôles reçoivent du NaCl 9°/₀₀. 30 minutes après le traitement avec le liraglutide, le glucose est injecté dans le duodénum grâce au cathéter.

Les résultats nous montrent que chez les souris NCD, le liraglutide stimule l'activité électrique du nerf vague entre 0 et 15min après une charge duodénale de glucose (**Figure 10A-E**). Cette activation est médiée par le GLP-1r puisque chez les souris GLP-1rKO, aucune activité vagale n'est observée en réponse au liraglutide (**Figure 10F**). Chez les souris HFD, la première phase (0-7min) d'activation du nerf vague par l'agoniste est absente tandis que sur les temps plus tardifs (8-15min), le liraglutide stimule correctement le nerf (**Figure 10A-E**).

Au cours d'une autre expérience, nous avons traité chroniquement des souris HFD pendant 2 semaines avec du liraglutide (100µg/kg, 1 injection intrapéritonéale/jour) ou du NaCl 9°/$_{oo}$. Le jour de la mesure d'activation du nerf vague en réponse au glucose des souris HFD traitées chroniquement, les animaux ne reçoivent ni NaCl, ni liraglutide mais uniquement du glucose en injection intra-duodénale afin d'étudier l'effet propre du traitement chronique sur l'activité vagale. Les résultats nous montrent que la phase précoce d'activation du nerf vague est restaurée chez les souris HFD traitées chroniquement avec le liraglutide (**Figure 10H, I**). D'autre part, le traitement chronique au liraglutide induit une meilleure réponse au glucose du nerf vague (**Figure 10H, I**).

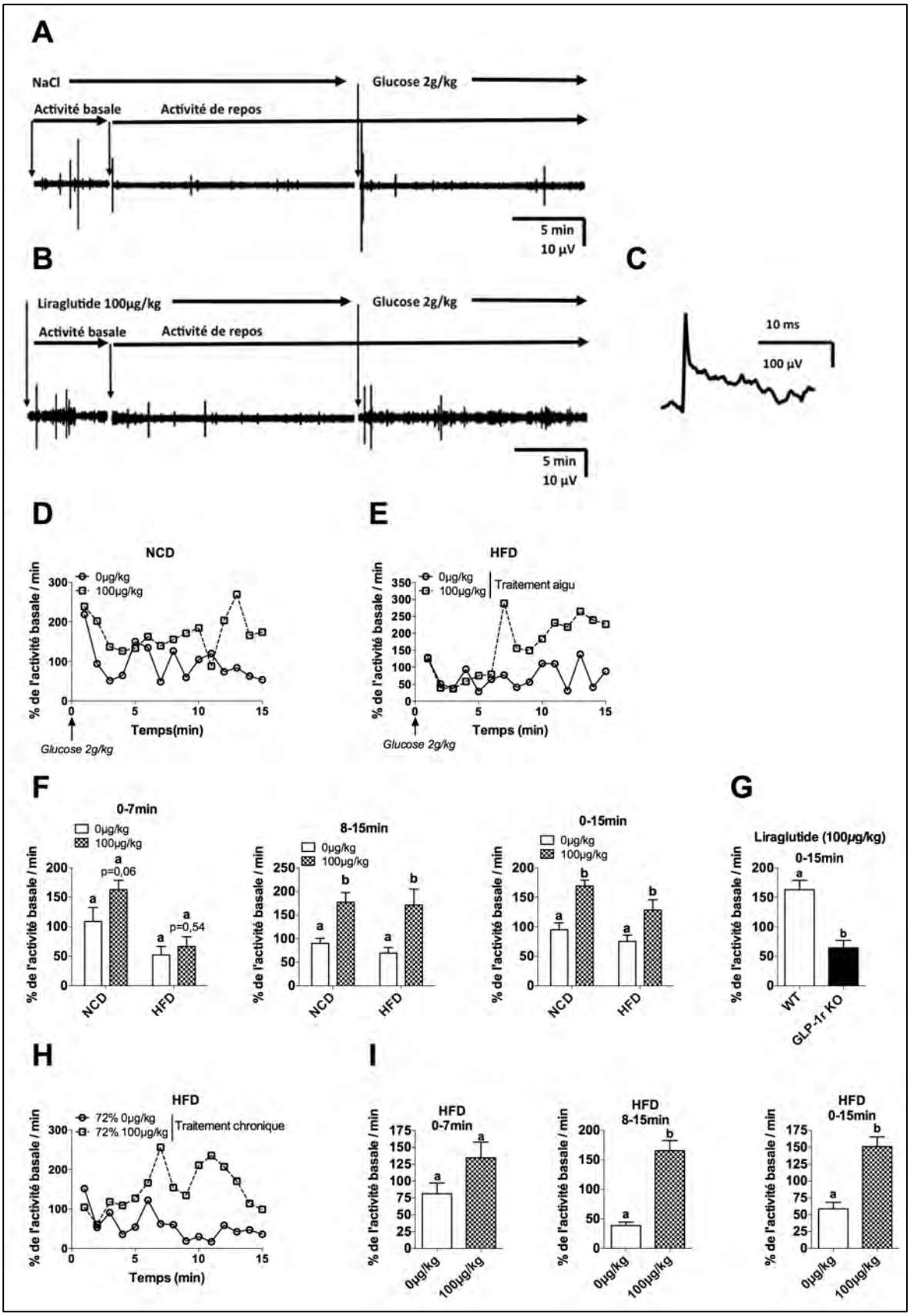



Figure 10 : Mesure de l'activité vagale en réponse au liraglutide. Mesure de l'activité électrique du nerf vague en réponse au glucose en présence de NaCl (A) ou en présence de liraglutide (B). C : Exemple de potentiel d'action. D : Nombre de potentiels d'action exprimé en pourcentage du nombre de potentiels d'action en période basal, par minute, pendant 15 minutes, après l'injection duodénale de glucose chez les souris NCD (D) et des souris HFD (E). F : Aire sous la courbe des souris NCD et HFD entre 0 et 7 min, entre 8 et 15min et entre 0 et 15min après l'injection duodénale de glucose. G : Aire sous la courbe des souris GLP-1rKO entre 0 et 7 min entre 0 et 15min après l'injection duodénal de glucose. D : Nombre de potentiels d'action exprimé en pourcentage du nombre de potentiels d'action en période basal, par minute, pendant 15 minutes après l'injection duodénale de glucose chez des souris HFD après traitement chronique (2 semaines) avec du NaCl et du liraglutide. F : Aire sous la courbe des souris HFD après traitement chronique (2 semaines) avec du NaCl et du liraglutide entre 0 et 7 min, entre 8 et 15min et entre 0 et 15min après l'injection duodénale de glucose. Les valeurs représentées avec les mêmes lettres ne sont pas différentes, la comparaison statistique des moyennes ± écart type à la moyenne se fait entre les différentes conditions pour

## C. Discussion

Cette étude nous a permis de montrer que le liraglutide, agoniste du GLP-1r, était capable d'induire la sécrétion d'insuline chez des souris saines et que cette action est médiée par une activation électrique du nerf vague *via* le GLP-1r. Bien que le liraglutide induisent la sécrétion d'insuline chez des souris HFD en réponse au glucose oral, il semble que cet effet soit altéré si le glucose est administré en intrapéritonéal. D'autre part, nous avons également démontré que la première phase d'activation du nerf vague par le liraglutide est absente chez les souris HFD mais peut être restaurée après traitement chronique avec le liraglutide.

Le GLP-1 est une molécule dont l'action hypoglycémiante est réalisée de manière endocrinienne sur la cellule β ou de manière nerveuse en recrutant l'axe intestin-cerveau-périphérie nécessitant le nerf vague. Comme nous l'avons montré précédemment au laboratoire, les inhibiteurs de DPP4 agissent *via* cet axe nerveux même à faible dose [812]. Bien que l'effet hypoglycémiant des agonistes du GLP-1r tels que le liraglutide soit clairement démontré, le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé. Par cette étude, nous démontrons que son action hypoglycémiante passe par l'induction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose *via* le recrutement du nerf vague et le récepteur au GLP-1r. En effet, son action est absente chez les souris ayant subi une vagotomie subdiaphragmatique ou invalidées pour le GLP-1r. De plus, on observe une augmentation de l'activité électrique du nerf vague en réponse au glucose. Chez des souris nourries sous régime gras et rendues diabétiques, le liraglutide semble agir correctement lorsque le glucose est administré oralement mais pas lorsqu'il est injecté dans le péritoine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le glucose oral stimule la sécrétion de GLP-1 et que le liraglutide associé à ce dernier puisse stimuler correctement la sécrétion d'insuline tandis que seul, comme c'est le cas après injection intrapéritonéale de glucose, le liraglutide ne semble pas efficace. Les résultats révèlent également que le glucose injecté dans le péritoine est capable de stimuler la sécrétion d'insuline chez les souris HFD mais pas lorsqu'il est donné oralement. Le régime HFD est dépourvu de sucre. Or, il a été démontré que le glucose présent dans le lumen régulait l'expression des transporteurs au glucose et donc son absorption [264]. Ainsi, chez les souris HFD, il est possible que les capacités absorptives de l'intestin soient altérées. De plus, la détection intestinale du glucose nécessaire à la sécrétion d'insuline peut être altérée. En effet, il est possible que le GLP-1 libéré en réponse au glucose oral n'agisse pas correctement comme nous l'avons démontré dans le chapitre 4. Ici, nous montrons effectivement que chez les souris HFD, le liraglutide ne stimule pas l'activité électrique du nerf vague entre 0 et 7min après l'injection intra-duodénale de glucose révélant une altération du recrutement précoce de l'axe intestin-cerveau chez les souris HFD. Cette altération peut s'expliquer par différents phénomènes : un atteinte nerveuse décrite chez les animaux et les patients diabétiques, la neuropathie [395], une désensibilisation au GLP-1r décrit dans un contexte glucolipotoxique [800, 801] ou une altération du microbiote impactant la réponse au GLP-1 (cf Chapitre 4). Bien que l'effet nerveux du liraglutide pour le

contrôle de la glycémie soit mis en évidence dans cette étude, qu'en est-il de la voie de signalisation impliquée ? Des articles ont décrit que le liraglutide pouvait activer la NOS *via* la voie dépendante d'AKT [945]. D'ailleurs, ceci est également observé avec les inhibiteurs de DPP4 qui peuvent également activer la NOS *via* AKT [946]. Or, au cours du Chapitre 4, nous avons montré que la voie du GLP-1r dépendante du NO était altérée au niveau nerveux. Ceci pourrait expliquer l'absence de réponse précoce au liraglutide au cours de la mesure d'activité électrique du nerf vague.

Le traitement chronique avec l'agoniste permet de restaurer cette phase précoce d'activation électrique du nerf vague. Ces effets pourraient être médiés par le fait que le liraglutide, comme le GLP-1 , est connu pour favoriser la neurogenèse et donc l'amélioration de la neuropathie [947]. Ces mêmes effets sont observés au cours de traitement chronique avec les inhibiteurs de DPP4 [941].

# X. Chapitre 6 : Influence du cycle circadien sur l'action du GLP-1 et ses altérations possibles au cours du diabète de type 2.

## A. Introduction

Le rythme circadien régit le fonctionnement de toutes les cellules. Pendant longtemps, les scientifiques ont pensé que le cycle circadien des cellules trouvait son origine dans le SNC, et plus précisément le SCN composé de quinze à vingt milles neurones. En effet, ce noyau est en étroite relation avec les nerfs optiques qui peuvent détecter la luminosité et donc le cycle jour/nuit. Bien que chaque neurone de ce noyau ait un fonctionnement rythmique autonome, les nerfs optiques, en réceptionnant la lumière, influencent l'activité électrique des neurones du SCN. Une fois l'information réceptionnée, le SCN la relaie à la glande pinéale. Cette dernière, une fois activée, peut produire à partir du tryptophane, la mélatonine ou hormone du sommeil. En effet, la concentration de mélatonine est augmentée au cours de la nuit. En réalité, lorsque la lumière stimule le SCN alors ce dernier envoie un message inhibiteur à la glande pinéale. La mélatonine, une fois libérée, se trouve dans le sang et cible les organes et les cellules exprimant son récepteur afin de réguler leurs fonctions de manière circadienne. Le SNC est capable de réguler l'activité d'autres zones cérébrales et d'autres noyaux hypothalamiques dont le DMH, le VMH ou le PVH. Par ces régulations, le SCN contrôle les cycles journaliers de la prise alimentaire, de l'activité physique, de la pression artérielle, de la température et du métabolisme périphérique… Cependant il est suggéré que l'activité du SCN pouvait être médiée par d'autres signaux notamment les nutriments et la prise alimentaire [948].

Bien qu'il existe cette régulation centrale « chef d'orchestre des cycles journaliers périphériques », comme au niveau des neurones du SCN, chaque cellule possède dans son cytoplasme un ensemble de protéines, comprenant des facteurs de transcription ou des protéines d'interaction, capable de réguler de façon cyclique le fonctionnement cellulaire. L'expression de ces protéines « clock » est réalisée de façon cyclique par des systèmes de répression ou d'activation mutuels. Le changement de leur concentration, de leur localisation intracellulaire ou alors de leurs modifications post traductionnelles régulatrices mènent à une oscillation journalière de leur fonction. Parmi ces protéines, nous distinguons : Clock, Bmal1 (brain–muscle-Arnt-like 1), Per1, 2 et 3 (period1, 2 et 3), Cry1 et 2 (cryptochrome 1 et 2). Le premier à avoir été découvert est Clock [949]. Au cours des périodes de jour, Bmal1 et Clock se dimérisent pour réguler la transcription de nombreux gènes dont les répresseurs de leur transcription Cry et Per *via* la séquence E-box présente dans leur promoteur. Lorsque ces deux dernières protéines sont exprimées, elles se dimérisent et sont phosphorylées pour inhiber l'activité de Bmal1 et Clock au cours de la nuit. Ainsi Per et Bmal1 possèdent des variations opposées de leur expression au cours de la journée. Ensuite, Cry et Per sont ubiquitinilés pour être dégradés et induire un nouveau

cycle. Au cours de la journée, Clock et Bmal1 contrôlent également des gènes dont l'expression est différentielle au cours du cycle. Pour cela, ces gènes possèdent une séquence E-box dans leur promoteur. Une autre voie implique REV-ERBα (reverse erythroblastosis virus α), ou Nr1d1 (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1) et RORα (RAR-related orphan receptor α) dont la transcription est modulée par le couple Bmal1/Clock. REV-ERBα et RORα respectivement inhibent et activent en retour la transcription de Bmal1. Au cours de la journée, pour inhiber la transcription de Bmal1, REV-ERBα se fixe sur une séquence RRE présente dans le promoteur de Bmal1 [950]. Dans les cellules, la quantité des ARN codant ces gènes représente 5 à 10% de la totalité. L'expression de ces gènes peut être sous l'influence des nutriments. En effet, le glucose peut diminuer Per1 et Per2 au niveau des fibroblastes en culture [951], modifier les phases de prise alimentaire chez le rongeur [952], ou décaler l'expression de Per2 dans le foie et le cerveau [953].

Comment ces gènes influencent-ils le métabolisme ? Il a été montré que les sécrétions d'insuline [954], de glucagon [955], de leptine ou encore de ghréline [956] étaient régulées de façon circadienne. De la même façon, le cycle circadien peut influencer la fonctionnalité des enzymes métaboliques telles que les enzymes lipogéniques et néoglucogéniques [957, 958] ou des facteurs de transcription tels que PPAR, jouant un rôle déterminant dans le métabolisme du foie, du tissu adipeux ou des muscles. D'autre part, la cellule β, sécrétrice d'insuline, possède également des oscillations de l'expression des protéines « clock » mais également de PDX-1, facteur de transcription clé dans la production d'insuline et la survie des cellules β .[959] Cette rythmicité s'explique par le fait que les tissus métaboliques possèdent dans chaque cellule une rythmicité importante de l'expression de leurs protéines « clock » [960]. Bmal1 et Clock, *via* la régulation de l'expression des gènes possédant des séquences E-box dans leur promoteur, peuvent moduler le profil transcriptionnel de chaque cellule et donc modifier leur métabolisme. Une autre activité peu connue des protéines « clock » est leur fonction de modifications épigénétiques de l'ADN [961]. Par exemple, la protéine Clock est capable de réguler l'expression de Bmal1 *via* des modifications épigénétiques des séquences promotrices [962]. Inversement, l'environnement peut influencer la rythmicité du cycle circadien en induisant des modifications épigénétiques [963]. Par ce mécanisme d'action, les protéines « clock » peuvent influencer le métabolisme très sensible aux modifications épigénétiques [961].

Il est connu que les perturbations du cycle circadien sont associées à des risques plus important des développer des maladies métaboliques. En effet, le travail de nuit, la diminution du temps de sommeil peuvent engendrer obésité ou DT2 [964, 965]. De la même façon, chez la souris, perturber le cycle jour/nuit induit des altérations de la tolérance au glucose et des modifications de l'expression de FOXO1, de la G6P ou de la PEPCK [226]. Chez les rongeurs et chez l'homme, l'ingestion d'un régime gras ne semble pas influencer l'expression rythmique des protéines « clock » au niveau du foie mais induit une perte de

rythmicité de la sécrétion d'insuline [966]. Cet effet se fait de façon très précoce [967]. De la même façon, on observe une altération de l'expression des protéines « clock » chez l'homme suite à l'ingestion d'un régime gras et sucré [968]. Inversement, sous régime normal, l'invalidation des gènes « clock » altère le métabolisme global. En effet, les souris invalidées pour Clock, Bmal1 ou Per développent obésité et DT2 [969-972] par modification de la prise alimentaire, de l'adiposité, de la tolérance au glucose de la sécrétion d'insuline ou de la sensibilité à l'insuline. Les effets peuvent être différents si les invalidations se font de manière ciblée sur certains tissus ou sur plusieurs protéines « clock ». Par exemple, l'invalidation de Bmal1 au niveau du muscle ou au niveau du foie diminue la sensibilité à l'insuline en diminuant la capture du glucose et son oxydation [973-975] tandis que la double invalidation Bmal1/Clock dans le foie améliore la sensibilité à l'insuline [974].

Qu'en est-il de l'intestin ? L'intestin est aussi capable d'exprimer les protéines « clock » à la fois au niveau épithélial, au niveau du SNE et au niveau du système immunitaire [976]. Ainsi, comme pour le reste de l'organisme, on peut imaginer que certaines fonctions intestinales sont modulées par le cycle circadien comme la prolifération épithéliale et la perméabilité, la fonction motrice, l'absorption des nutriments, la détection des nutriments, ... L'absorption du glucose est modulée de façon journalière. En effet, l'expression et l'activité de SGLT1 est cyclique et ces cycles sont indépendants de l'apport en nutriment [977, 978]. De la même façon, lors d'études transcriptomiques, il a été montré que la concentration des ARNm codant les protéines impliquées dans la prolifération et la différentiation cellulaire variait de manière cyclique. D'ailleurs, la prolifération des colonocytes se fait de manière circadienne [979, 980]. D'autre part, l'invalidation de Clock augmente la perméabilité intestinale et l'endotoxémie [981]. Le rythme circadien peut également contrôler la motilité intestinale induite par la CCK [982]. Enfin, il peut également moduler l'activité du système immunitaire inné en faisant osciller l'expression des récepteurs aux fragments bactériens, TLR et NOD [948]. Ce dernier résultat suggère que l'interaction hôte-microbiote peut varier au cours de la journée et qu'ainsi, le microbiote pourrait avoir un effet non-négligeable sur la régulation nycthémérale du métabolisme. En effet, une étude a montré que l'expression circadienne des protéines « clock » des cellules épithéliales était sous le contrôle du microbiote. Elle a également démontré que perturber le microbiote par un traitement antibiotique était suffisant pour déréguler l'expression des protéines « clock » et augmenter la sécrétion de corticostérone par les cellules épithéliales iléales, hormone connue pour réguler le métabolisme énergétique en périphérie. Ensuite les auteurs ont montré que cette sécrétion était sous le contrôle des protéines « clock » elles-mêmes sous le contrôle des TLR. Enfin, cette étude montre qu'altérer la détection du microbiote par les cellules épithéliales est responsable d'un état prédiabétique dû à une surproduction de corticostéroïdes [983]. Une autre étude a également montré que la fréquence de certaines bactéries au niveau intestinal pouvait osciller au cours du cycle comme celle des *Lactobacillus*, que ces oscillations étaient perdues lorsque les animaux étaient invalidés pour les gènes Per et que ces oscillations bactériennes étaient sous

l'influence de la prise alimentaire. Les auteurs de cette étude ont également montré que modifier les périodes de prise alimentaire pouvait engendrer des modifications des oscillations bactériennes journalières et induire une dysbiose intestinale ayant des conséquences sur le métabolisme. Cette dysbiose associée à une perturbation du rythme circadien peut constituer un facteur de risque dans le développement des maladies métaboliques [984]. Une autre étude a également montré que l'oscillation de la fréquence de certaines bactéries était associée à une oscillation du métabolome bactérien et donc de la fonctionnalité du microbiote intestinal. Ces deux variations sont particulièrement altérées chez les souris nourries d'un régime riche en gras et en sucre. Ces altérations sont associées à des modifications du cycle circadien du foie et de l'hypothalamus qui ne sont pas observées chez une souris axénique dépourvue de microbiote [985].

De nombreuses hormones du système endocrinien global sont sous l'influence du cycle circadien comme l'insuline, le glucagon, la corticostérone, … La ghréline, hormone stomacale, est, elle aussi, sous l'influence du cycle circadien. Qu'en est-il du GLP-1 ? Peu d'études ont été réalisées. Chez l'homme, un même repas n'induit pas la même augmentation de la concentration de GLP-1 plasmatique s'il est ingéré le matin ou l'après-midi. Cet effet est également observé pour le pic de glucose et l'insuline. Le matin, le GLP-1 et l'insuline sont sécrétés en plus grande quantité ce qui induit une meilleure tolérance au glucose en comparaison de l'après-midi [986]. Chez le rongeur, un gavage de glucose a été réalisé à différent temps de la journée après 4h de jeun. Il a été observé que juste avant la nuit le GLP-1 était fortement sécrété en réponse au glucose et que ceci était associé à une plus grande sécrétion d'insuline et une meilleure tolérance au glucose. L'inverse est observé avant le jour correspondant à la phase de jeûne chez le rongeur. Une variation des protéines Bmal1 et REV-ERB$\alpha$ et également du PPG est observée au niveau des entérocytes. Cette même étude a également montré que modifier le cycle de nutrition ou alors le cycle jour/nuit impactait la sécrétion d'insuline et de GLP-1 en réponse au glucose oral [987]. Une autre étude du même groupe a montré qu'au cours d'un régime enrichi en gras et en sucre, il n'y avait plus de variations de sécrétion de GLP-1 et également d'insuline en réponse au glucose entre le jour et la nuit. Ceci pourrait être dû à une perturbation de l'expression des protéines « clock » induite par le palmitate présent dans le régime au niveau des cellules L [988].

Dans ce contexte, nous nous sommes posés plusieurs questions 1) l'action du GLP-1 peut-elle être modulée au cours du cycle, 2) si modulation il y a, est-ce que cette modulation de l'action du GLP-1 pourrait être en lien avec des variations circadiennes du microbiote intestinal, et 3) la perturbation de ces régulations peuvent-elles jouer un rôle dans la perte de sensibilité au GLP-1 au cours du diabète ?

## B. Résultats

### *1. Oscillations nycthémérales des sécrétions hormonales, des gènes et des bactéries de l'ileon chez des souris contrôles*

Nous avons sacrifié des souris C57/Bl6 mâles, âgées de 10 semaines et nourries sous régime normal, à l'état nourries toutes les 4h d'un cycle journalier complet. 45 min avant leur euthanasie, elles reçoivent oralement un inhibiteur de DPP4 (sitagliptine, 400µg/souris) pour mesurer la concentration de GLP-1 sans induire le biais de sa dégradation par la DPP4. Nous avons déterminé la concentration plasmatique d'insuline (veine caudale), de glucagon (veine porte), de GLP-1 (veine porte) et du glucose. Nous avons calculé à partir de ces valeurs l'index de résistance au GLP-1 pour la sécrétion d'insuline de la manière suivante (concentration de GLP-1 x glycémie / insulinémie). Nous avons également mesuré l'expression de différents gènes au niveau de l'iléon : les gènes « clock » comme Bmal1, REV-ERBα, Clock, Per1/2/3, Cry1/2 ; les gènes impliqués dans la sécrétion et l'action du GLP-1 comme la DPP4, le PPG, le GLP-1r, les protéines neuronales et axonales comme PGP9.5 et Prph, et enfin les protéines impliquées dans l'absorption du glucose. Pour évaluer le rôle du microbiote, nous avons mesuré par quantification MiSeq la fréquence des bactéries dans l'iléon.

Les résultats montrent que la sécrétion de GLP-1 ne varie pas au cours de 24h (**Figure 11A**) tandis que celles de l'insuline et du glucagon oscillent de manière antiparallèle (**Figure 11B, C**). De façon intéressante, la glycémie varie également entre le jour et la nuit (**Figure 11D**). Pendant la phase de jour, la glycémie et le glucagon sont hauts tandis que pendant la nuit, période de nutrition pour les rongeurs, la glycémie est basse et l'insuline est haute (**Figure 11A-D**). L'index de résistance au GLP-1 nous montre que juste avant la nuit il diminue fortement et augmente au cours de la nuit pour attendre un pic en début de jour (**Figure E**).

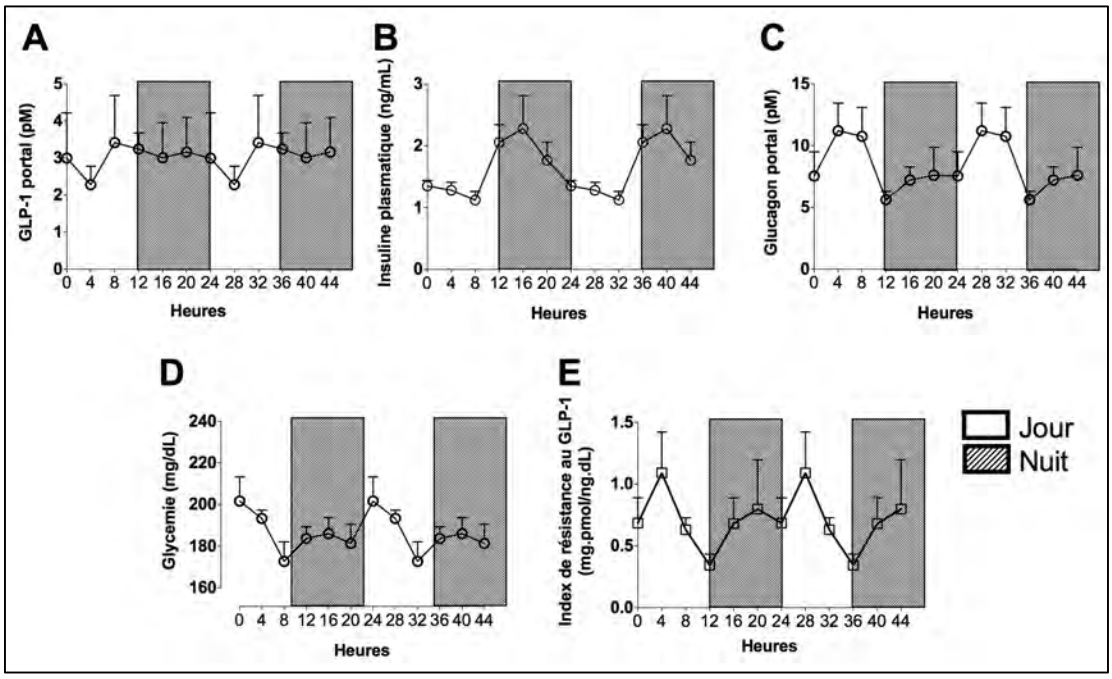



Figure 11 : Oscillations circadiennes des sécrétions hormonales, de la glycémie et de l'index de résistance au GLP-1. Concentration portale de GLP-1(A), concentration plasmatique d'insuline (B), concentration portale du glucagon (C), glycémie (D) et index de résistance au GLP-1 (E) 45 min après un gavage avec un inhibiteur de DPP4, chez des souris contrôles à l'état nourri au cours de 24h.

Nous avons également regardé la variation de l'expression d'ARNm, par RT-qPCR (real-time reverse and quantitative transcription), des protéines « clock » au niveau de l'iléon, où sont concentrées les cellules L sécrétrices de GLP-1. Nous avons pu remarquer que l'expression de Bmal1 diminuait au cours du jour et augmentait au cours de la nuit tandis que celle de Nr1d1 et Per1/2 augmentait au cours du jour et diminuait au cours de la nuit. L'expression de Cry1 suit celle de Bmal1 de façon légèrement décalée. L'expression de Clock et Cry2 oscille peu (**Figure 12A, B, C et D**). Ces observations coïncident avec les boucles de rétrocontrôle entre les protéines « clock » décrites dans la bibliographie [950]. Nous nous sommes intéressés ensuite à l'expression de gènes impliqués dans l'absorption du glucose et la détection intestinale du glucose dépendante du GLP-1. Nous avons remarqué que l'expression du GLP-1r oscillait de façon à ce qu'elle atteigne un pic élevé en début de nuit et un niveau très bas au début du jour. Ceci montre qu'au début de la prise alimentaire, correspondant à la nuit chez la souris, l'organisme est très sensible au GLP-1 et cette sensibilité décroit au cours du temps (**Figure 12E**), ce qui coïncide avec l'index de résistance au GLP-1. De la même façon, l'expression de la protéine axonale, la périphérine, (Prph) oscille de façon totalement parallèle avec celle du GLP-1 suggérant que les neurones puissent augmenter le nombre de leurs dendrites parallèlement à une augmentation du GLP-1r optimisant ainsi la sensibilité au GLP-1 au cours de la journée. La protéine PGP9.5 oscille peu. Enfin, nous nous sommes intéressés au gène codant le PPG, précurseur du GLP-1. Son expression iléale augmente au cours de la journée et diminue pendant la nuit tandis que celle de la DPP4 diminue au cours de la journée et augmente au cours de nuit (**Figure 12G**). Ceci montre que le GLP-1 est produit pendant le période de jeûne afin de pouvoir être sécrété au cours de la nuit, période de prise alimentaire. De la même façon, l'expression de DPP4 augmente au cours de la nuit afin de contrôler la biodisponibilité du GLP-1 sécrété en période postprandiale. Enfin, l'expression des protéines senseurs SGLT1 et Glut2 oscille de manière synchrone et indépendamment des phases de prise alimentaire. En effet, leur expression augmente au cours de la journée et diminue au cours de la nuit (**Figure 12H**) suggérant, comme pour le PPG, que l'iléon prépare sa détection du glucose au cours de la journée et ralentit cette détection au cours de la nuit. Ces résultats coïncident avec ceux observés par d'autres [977, 978].

Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'action du GLP-1. Nous avons étudié par corrélation (Pearson) quel était le lien entre les expressions du GLP-1r et des protéines « clock ». La concentration d'ARNm du GLP-1r corrèle avec celle des ARNm de Bmal1, Per1/2 et Cry1/2 (**Figure 12I**). Ainsi, un lien existe entre l'expression du GLP-1r et celle des protéines « clock ». Dans un second temps, nous avons analysé le microbiote de l'iléon de nos souris. Nous nous sommes tout d'abord intéressés aux *Lactobacillus* que nous avons montré associés à l'expression du GLP-1r au cours du chapitre 4. La fréquence des *Lactobacillus* n'oscille pas au cours de la journée et ne corrèle par avec la quantité d'ARNm codant le GLP-1r (**Figure 12J**). Lorsque l'on étudie par corrélation (Pearson) l'expression des protéines « clock » et la fréquence des bactéries, seul le genre *Alistipes* semble corréler à l'expression des protéines « clock » associées à l'expression du GLP-1r. D'ailleurs, sa fréquence augmente au cours de la journée et diminue au cours de la nuit de manière décalée à l'expression du GLP-1r (**Figure 12K,L**).

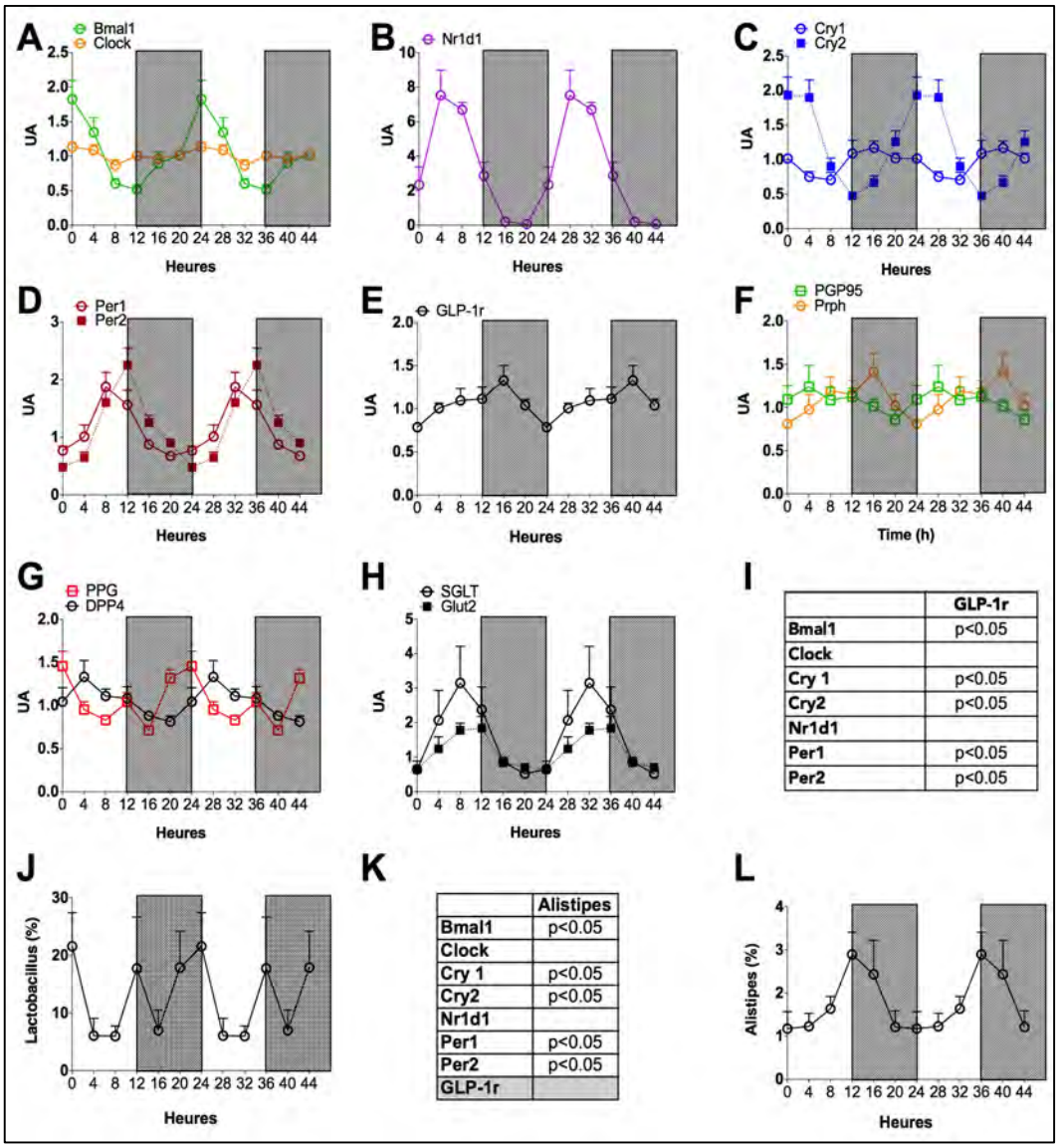



Figure 12 : <u>L'expression des gènes iléaux impliqués dans la régulation du cycle circadien et dans la détection du glucose et la fréquence des bactéries oscillent au cours de la journée.</u> A-H : Quantité des ARNm codant les gènes iléaux (de façon relative à l'expression de RPL19). I : Corrélation significative entre les protéines « clock » et le GLP-1r (analyse de Pearson). J : Fréquence de *Lactobacillus* au cours de la journée. K : Corrélation significative entre les protéines « clock » et la fréquence de *Alistipes* (analyse de Pearson). L : Fréquence de *Alistipes* au cours de la journée.

### 2. *L'action du GLP-1 est différente entre le jour et la nuit*

Afin de déterminer l'action réelle du GLP-1 entre la phase de jour et la phase de nuit, nous avons tout d'abord déterminé la concentration portale de GLP-1 (**Figure 13A**), la concentration plasmatique d'insuline (**Figure 13B**), la glycémie (**Figure 13C**) et l'index de résistance au GLP-1 (**Figure 13D**) 15 minutes après un gavage oral de glucose chez des souris mises à jeun pendant les 12h de jour et manipulées au début de la nuit ou des souris mises à jeun pendant les 12h de nuit et manipulées au début du jour. Aucune variation de la sécrétion de GLP-1 induite par le glucose n'est observée, résultat que nous avions déjà observé dans la figure 12. La glycémie est plus importante au cours de la nuit suggérant une plus grande absorption intestinale. L'insuline plasmatique est aussi plus fortement augmentée en réponse au glucose au cours de la nuit suggérant une meilleure détection intestinale du glucose. En effet, lorsque nous calculons l'index de résistance au GLP-1 (comme effectué précédemment), il est très faible au cours de la nuit. Un test dynamique dose-réponse au GLP-1 a également été effectué comme dans l'article décrit dans le chapitre 4. Pour cela, nous avons injecté différentes doses de GLP-1 (0, 2,2, 7, 63nmol/kg, intrapéritonéal) en conditions d'hyperglycémie (injection intraveineuse de glucose (2g/kg) 5 minutes après celle du GLP-1) à des souris mises à jeun pendant les 12h de jour et manipulées au début de la nuit ou des souris mises à jeun pendant les 12h de nuit et manipulées au début du jour. Nous observons que la sensibilité est accrue pendant la nuit (**Figure 13E**). Nous avons également mesuré la concentration des ARNm codant les protéines « clock ». Le profil nous montre que Bmal1 est diminué au cours de la nuit et que Per3 augmente au cours de cette même phase. Per1/2 et Nr1d1 tendent également à augmenter (**Figure 13F**) ce qui coïncide avec les profils observés dans la figure 12. Ces résultats suggèrent qu'une souris adulte saine possède différentes sensibilités au GLP-1 au cours de 24h avec une sensibilité plus accrue au moment de la prise alimentaire. Cette différence circadienne de sensibilité au GLP-1 est associée à un profil particulier de l'expression des protéines « clock ».

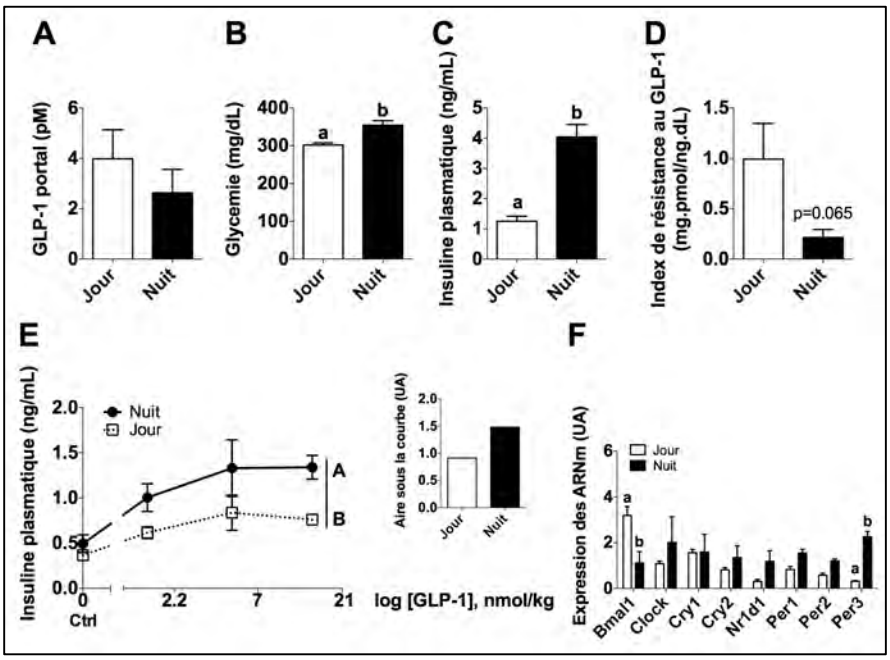



Figure 13 : <u>La sensibilité au GLP-1 pour la sécrétion d'insuline est augmentée au cours de la nuit, phase de prise alimentaire</u>. Concentration portale de GLP-1 (A), glycémie (B), concentration plasmatique d'insuline (C) et index de résistance au GLP-1 (D) 15 minutes après un gavage oral de glucose (2g/kg). E : Concentration plasmatique d'insuline après injection intrapéritonéale de GLP-1 à différente concentration et conditions d'hyperglycémie. F : Expression de ARNm iléaux codant le protéines « clock ». Les valeurs représentées avec les mêmes lettres ne sont pas différentes. La comparaison statistique des moyennes ± écart type à la moyenne se fait entre le jour et la nuit. Les lettres en minuscules identifient la comparaison entre valeurs tandis que les lettres en majuscules identifient la comparaison de l'allure des courbes.

### 3. *Les souris résistantes au GLP-1 montrent des altérations de l'expression des protéines « clock » au niveau iléal*

Afin de déterminer si la régulation nycthémérale pouvait jouer un rôle dans la résistance au GLP-1 observée chez les modèles murins de DT2, chez les souris axéniques ou traitées pendant un mois aux antibiotiques (Ampicilline, Néomycine, Métronidazole 0,1%) (cf. chapitre 4), nous avons mesuré la concentration des ARNm iléaux codant les protéines « clock ». Nous avons observé, chez les souris HFD particulièrement, un profil qui se rapproche de ce que l'on observe chez les animaux normaux, sains, au cours du jour, phase de résistance au GLP-1 : une baisse significative de Nr1d1 et une tendance à la baisse de Per1/2/3 et de Cry2 et à une augmentation de Bmal1 (**Figure 14A**). On observe ces mêmes observations chez les souris axéniques ou traitées aux antibiotiques pendant 1 mois suggérant un rôle du microbiote dans ces altérations (**Figure 14B**).

Enfin, lorsque l'on mesure la sécrétion circadienne d'insuline chez les animaux DT2 (régime en gras et/ou en sucre pendant 3mois) à l'état nourris, on observe un hyperinsulinisme connu chez les animaux HC-HFD et une perte de cyclisation de la sécrétion de l'hormone chez les deux modèles de DT2 (**Figure 14C**) suggérant une perte de la régulation circadienne de la sécrétion d'insuline. Cette altération pourrait être en lien avec la résistance au GLP-1 que nous avons démontrée chez ces animaux au cours du Chapitre 4. D'ailleurs, lorsque l'on étudie la fréquence de *Alistipes* chez ces animaux au niveau iléal, nous observons une augmentation de leur fréquence pouvant expliquer les altérations circadiennes de l'expression des protéines clock et de la sécrétion d'insuline (**Figure 14D**).

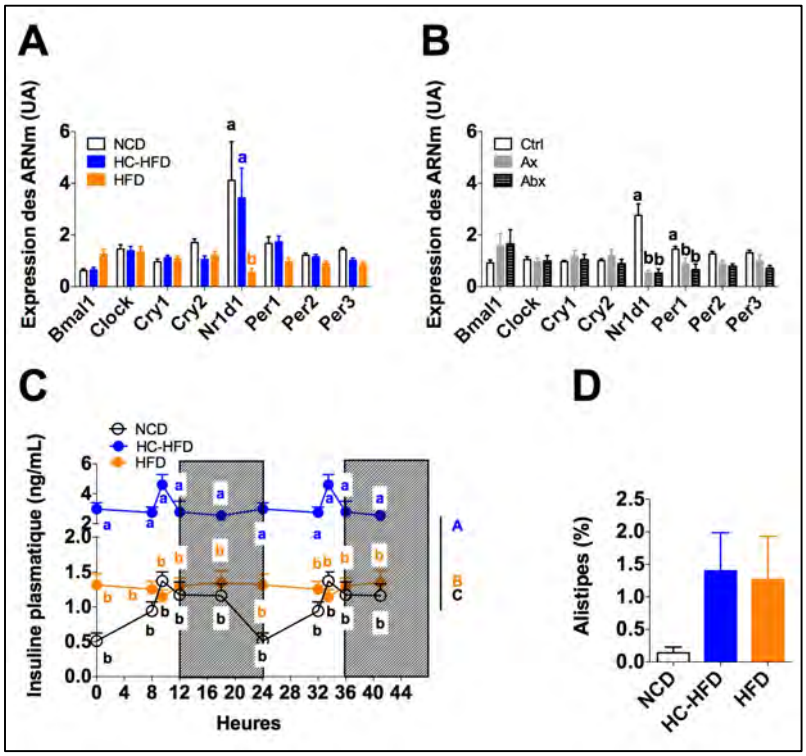



Figure 14 <u>Dérégulation de l'expression des protéines « clock » dans l'iléon et de la sécrétion d'insuline chez des animaux résistants au GLP-1</u>
Concentration des ARNm codant les protéines « clock » dans l'iléon des souris sous régime HC-HFD ou HFD pendant 3 mois (A) ou des souris axénique ou traitées aux antibiotiques pendant 1mois. C : Concentration plasmatique d'insuline au cours de la journée chez des souris NCD, HC-HFD ou HFD. D : Fréquence des Alistipes dans l'iléon des souris NCD, HC-HFD et HFD. Les valeurs représentées avec les mêmes lettres ne sont pas différentes. La comparaison statistique des moyennes ± écart type à la moyenne se fait entre le jour et la nuit. Les lettres en minuscules identifient la comparaison entre valeurs tandis que les lettres en majuscules identifient la comparaison de l'allure des courbes.

## C. Discussion et conclusion

Cette étude nous a permis de mettre en évidence que la sensibilité au GLP-1 variait au cours des cycles jour/nuit avec une plus forte sensibilité pendant la période de prise alimentaire correspondant à la nuit chez la souris. Le niveau de sensibilité au GLP-1 pourrait être associé un profil d'expression des protéines « clock » particulier au niveau de l'iléon qui contrôlerait ensuite l'expression d'autres gènes comme le GLP-1r, le PPG ou la DPP4 pour le contrôle de la détection intestinale du glucose et du métabolisme glucidique en périphérie. Pour vérifier cette hypothèse, il aurait été intéressant d'utiliser des agonistes ou des antagonistes des protéines « clock » – il en existe notamment pour Nr1d1 [989] – ou des animaux invalidés pour Bmal1, Clock, Per1/2, et d'étudier la réponse au GLP-1 notamment pour la sécrétion d'insuline ou la vidange gastrique… D'autre part, des études ont montré que le travail de nuit, associé à une perturbation du cycle circadien, corrélait avec une plus forte atteinte de problème de motilité intestinale et de mal-être intestinal (nausée, diarrhée, colique, …) [990]. Il a été également montré que chez l'homme, l'activité motrice de l'intestin variait au cours de la journée avec une forte activation en période de réveil et postprandiale et une plus faible activation la nuit, période de jeûne [991]. Ces études suggèrent que l'activité des neurones intestinaux est sous le contrôle du cycle circadien. On peut également supposer que cette différence d'activité du SNE modifie l'action du GLP-1 pour le contrôle du métabolisme glucidique. En réalité, un étude a montré que les neurones myentériques exprimaient bien les protéines « clock » de façon différentielle suivant la période du cycle [976]. Dans notre modèle d'analyse cellulaire, la culture primaire de neurones entériques, il serait intéressant de voir la réponse au GLP-1 pour la production de NO lors de l'inhibition des protéines « clock » soit par invalidation génétique – neurones provenant d'animaux invalidés – soit par technique de siRNA ou soit par modulation pharmacologique. On peut également se poser la question suivante : est ce que la communication de l'axe intestin-cerveau *via* le nerf vague peut être modulé par le cycle circadien impactant ainsi la réponse au GLP-1 ? En effet, les ganglions nodaux du nerf vague expriment de façon rythmique les protéines « clock ». Il semble même que ces expressions et ces régulations circadiennes soient importantes pour la détection de la distension stomacale et la régulation de la prise alimentaire [992]. Ainsi, la détection du GLP-1 par le nerf vague pourrait être différentielle au cours de la journée et donc moduler la régulation du métabolisme glucidique par le GLP-1 au cours de la journée. Une étude suggère d'ailleurs que l'expression vagale du GLP-1r était différente suivant les phases de prise alimentaire ou de jeûne [993].

Dans cette étude, nous avons également mis en évidence que la fréquence de certaines bactéries iléales pouvait corréler avec l'expression des protéines « clock », elles-mêmes associées à l'expression de l'ARNm du GLP-1r, comme c'est le cas d'*Alistipes*. Aucune étude ne rapporte un lien entre ce genre bactérien et le cycle circadien aujourd'hui. Contrairement à notre étude décrite dans le chapitre 4, nous n'avons montré ni oscillation de la fréquence des *Lactobacillus*, ni corrélation entre la fréquence des *Lactobacillus* et

l'expression de l'ARNm du GLP-1r montrant que la voie de régulation impliquant les *Lactobacillus* n'est pas en lien avec les modifications circadiennes de l'expression du GLP-1r et que ceci pourrait passer par d'autres voies microbiennes. Cependant, il a été montré que *Lactobacillus Reuteri* oscillait et que ceci était dépendant de la prise alimentaire [984] associée à une modulation de l'expression du GLP-1r [993]. La différence de résultat entre notre étude et cette étude dépend peut-être du lieu de prélèvement. En effet, nous analysons la flore iléale et non pas fécale qui reflète une flore éliminée et non pas résidente sur le lieu de sécrétion du GLP-1. Le lien entre le microbiote intestinal, les régulations circadiennes de l'expression des protéines « clock » et le métabolisme a été suggéré dans de nombreuses études [984]. D'ailleurs, lorsque l'on étudie les voies métaboliques bactériennes au cours du cycle, les voies nitrinergiques liées au microbiote qui peut refléter la production de NO bactérien, oscillent de manière circadienne tandis que ces voies n'oscillent plus si l'expression des gènes Per1/2 est absente chez l'hôte [984]. Ainsi, on peut imaginer que la régulation circadienne de l'expression du GLP-1r et son action nerveuse ou dépendante du NO sont sous le contrôle des protéines « clock », elles-mêmes sous le contrôle des bactéries intestinales.

Au cours du chapitre 4, nous avons montré que les altérations d'action du GLP-1 dans le cadre du DT2 étaient en association avec la dysbiose intestinale. Dans cette étude, nous montrons que dans des modèles murins de DT2, l'expression des protéines « clock » est altérée au niveau iléal et comparable à l'expression des protéines clock en période de jour qui est aussi la période de moindre sensibilité au GLP-1. D'ailleurs chez ces animaux, la fréquence d'*Alistipes* est modifiée suggérant également un rôle de la dysbiose diabétique dans ces altérations. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes intéressés aux souris axéniques et aux souris traitées aux antibiotiques pendant 1 mois. Nous avons démontré au cours du chapitre 4 que ces deux modèles étaient particulièrement résistants au GLP-1. Ici, nous montrons que l'expression des gènes iléaux codant les protéines « clock » étaient modifiées et suivait les mêmes modifications que dans l'iléon des souris DT2. Ceci révèle que les modifications observées au cours du DT2 peuvent être en lien avec le microbiote. Pour compléter ces résultats, il aurait été intéressant d'étudier la sécrétion d'insuline au cours de la journée chez les souris axéniques et les souris traitées aux antibiotiques pendant 1 mois.

Cette étude a permis de mettre en évidence un nouveau système de régulation de l'action du GLP-1 jusqu'alors inconnu et permettrait d'optimiser les traitements au GLP-1 en choisissant de manière adéquate le moment d'injection ou l'associer à un probiotique permettant d'améliorer la régulation circadienne dépendante du microbiote.

# XI. Chapitre 7 : Conclusion et perspectives

Le DT2 est un problème sociétal majeur touchant de plus en plus de personnes dans le monde. Cette pathologie est, pour la majorité des cas, associée à une mauvaise nutrition, enrichie en gras saturé et en sucre, un appauvrissement en fibres et une augmentation de la sédentarité. Le fonctionnement de nos cellules et de nos tissus n'a pas pu s'adapter correctement à ce rapide changement de mode de vie et d'environnement. Longtemps associé à l'obésité, aujourd'hui un nouveau phénotype diabétique émerge : celui des patients diabétiques minces. Le diabète est une maladie complexe touchant de nombreux organes dont l'altération participe à l'aggravation du diabète. Bien qu'il existe aujourd'hui de nombreux traitements, beaucoup de patients n'atteignent pas l'objectif thérapeutique de l'Hb1Ac < 6,5-7%. Ceci pourrait s'expliquer par la complexité et l'atteinte multi-tissulaire de la maladie. Depuis quelques dizaines d'années, le GLP-1, hormone intestinale hypoglycémiante, constitue un véritable espoir thérapeutique. En effet, il régule de nombreuses fonctions et de nombreux tissus impliqués dans la régulation du métabolisme glucidique comme les sécrétions d'insuline et de glucagon, la vidange gastrique, la prise alimentaire et des actions récemment découvertes : la néoglucogenèse hépatique, la modulation du fonctionnement cardio-vasculaire, la protection neuronale, l'immuno-modulation intestinale, … Bien qu'aujourd'hui les actions du GLP-1 soit bien définies, son mécanisme d'action, d'un point de vue moléculaire ou la voie de signalisation du GLP-1r ne sont pas très bien décrits et caractérisés et nécessitent de gagner en connaissance afin d'optimiser le traitement.

Pour ces différentes actions hypoglycémiantes, il constitue aujourd'hui le traitement de première intention tout comme la metformine. Les effets secondaires sont modestes bien qu'il engendre dans certains cas des incommodations intestinales (nausée, mal-être, …) et également des pancréatites, mais ce dernier effet secondaire reste controversé. D'autre part, certains patients ne répondent pas correctement aux traitements et n'atteignent pas l'objectif thérapeutique d'une Hb1Ac < 6,5-7%. Cette absence de réponse pourrait s'expliquer par une action altérée du GLP-1 au cours du DT2. Des études chez le rongeur et la souris ont effectivement mis en évidence des modifications de l'exposition à la membrane du GLP-1r dans des contextes d'hyperglycémie et d'hyperlipidémie caractéristiques du DT2 [800, 801]. De la même façon, l'action du GLP-1 étant essentiellement nerveuse, la neuropathie diabétique pourrait expliquer l'absence de réponses au traitement chez certains patients. En effet, ceci a été démontré au laboratoire : les patients DT2 atteints de neuropathie ne répondent pas correctement au traitement inhibiteur de DPP4 [906].

Depuis plusieurs dizaines d'années, un nouveau facteur peut expliquer les altérations métaboliques du DT2 et de l'obésité, le microbiote intestinal. Cette composante de l'intestin a été très longtemps négligée dans les pathologies nutritionnelles et intestinales. Pourtant, il représente 2 kg de notre poids total, est composé de plus de cellules que notre

organisme entier et constitue un véritable écosystème diversifié. Les études de ces dernières années montrent une dysbiose intestinale associée aux pathologies métaboliques, mais également à d'autres pathologies telles que l'autisme, la schizophrénie, la maladie de Parkinson, les maladies inflammatoires intestinales, les maladies cardiovasculaires, les cancers intestinaux et non-intestinaux, ... Notre relation de tolérance pacifique avec le microbiote et sa fonctionnalité sont des critères déterminants dans notre physiologie et notre intégrité. De plus, des études ont montré que le microbiote était essentiel dans notre réponse aux traitements telles que les chimiothérapies [994, 995] suggérant qu'en plus d'être impliqué dans différentes pathologies, il est critique pour notre réponse aux traitements. Ainsi, au cours des pathologies métaboliques, le microbiote dysbiotique pourrait modifier la réponse aux traitements antidiabétiques de certains patients. D'ailleurs, une étude, réalisée en collaboration avec notre laboratoire, a montré qu'associer des prébiotiques ou des probiotiques à la metformine ou à un inhibiteur de DPP4 chez la souris améliorait la réponse au traitement [996]. Ainsi, le microbiote pourrait être un facteur déterminant dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'absence de réponse au traitement. Dans ce cadre-là, nous nous sommes posés deux questions : quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'action du GLP-1 ? Le microbiote pourrait-il influencer son action ?

Lors de ma première étude, nous avons pu identifier que 1) l'action nerveuse du GLP-1 recrutant l'axe vagal intestin-cerveau pour le contrôle de la glycémie nécessitait la production de NO par le SNE, 2) moduler le microbiote par des traitements antibiotiques ou l'utilisation de souris axéniques modifiait la réponse au GLP-1 et la production de NO entérique et enfin, 3) l'action du GLP-1 et la production de NO induite sont altérés chez les souris diabétiques et que ceci est associé à une dysbiose. Ce dernier résultat a été confirmé dans la seconde étude qui met en évidence qu'un traitement basé sur le GLP-1, le liraglutide, agoniste du GLP-1r, ne stimulait pas correctement le nerf vague et qu'en traitement chronique la molécule restaure cette action. Enfin, dans une troisième étude, nous avons pu mettre en évidence que 1) l'action du GLP-1 était différente au cours du cycle jour/nuit 2) que le microbiote oscillait au cours du cycle journalier et que certaines étaient étroitement liée au protéines « clock » intestinales 3) au cours du DT2, les protéines « clock » intestinales et les bactéries oscillantes étaient modifiées suggérant qu'il pourrait constituer un facteur essentiel dans le développement de la résistance au GLP-1. Suite à ces études, de nombreuses questions restent cependant sans réponse.

### A. Comment le microbiote modifie-t-il l'action nerveuse du GLP-1 ?

Par quels mécanismes les bactéries agissent pour moduler l'activité du GLP-1 ? Est-ce une action directe sur les neurones ou de manière indirecte *via* d'autres cellules (cellules gliales ou immunitaires) ? Quels fragments bactériens ou métabolites sont déterminants dans la modulation de l'action de l'hormone ?

Ces questions pourraient être explorées. En effet, dans l'introduction de cette thèse, nous avons montré que le SNE exprimait les protéines de détection du microbiote. Nous avons montré, au cours du chapitre 4, que les souris invalidées pour ces protéines sont résistantes au GLP-1 suggérant que la détection du microbiote est essentielle pour la réponse au GLP-1. Cependant, est-ce la détection directe par les neurones ou *via* les cellules partenaires de neurones comme les cellules gliales ou les cellules du système immunitaire. Nous savons que le fonctionnement des neurones entériques est sous le contrôle des cellules gliales et des cytokines [580, 593]. Nous savons également que dans le cadre du DT2, le contexte cytokinique (IL6, IL1β) et l'activité des cellules gliales – leur influence neurotrophique ou la modulation de l'activation neuronale – est modifiées [426, 477, 610, 622]. Ces modifications pourraient mener à terme à la modulation de la réponse au GLP-1 induite par le microbiote. Il serait intéressant de mesurer la réponse au GLP-1 chez des animaux invalidés pour certaines cytokines ou le récepteur à ces cytokines et également chez des souris dont les cellules gliales sont détruites [997]. Enfin, nous pourrions mesurer in vitro la réponse au GLP-1 pour la production de NO dans des contextes cytokiniques particuliers ou en l'absence de cellules gliales.

Pour étudier quel(s) fragment(s) ou métabolite(s) bactérien(s) pourraient influencer la réponse au GLP-1, nous pourrions dans un premier temps étudier le métabolome des souris contrôles *versus* des souris diabétiques, résistantes au GLP-1. Dans un second temps, nous pourrions récupérer le lumen de l'iléon que l'on pourrait filtrer afin d'éliminer les bactéries et de comparer sur des cultures primaires de neurones entériques, l'effet du lumen avec ou sans bactéries sur la réponse au GLP-1.

Pour étudier et approfondir l'effet possible des *Lactobacillus*, nous pourrions proposer ces bactéries en traitement probiotique chez des souris diabétiques résistantes au GLP-1 ou coloniser des souris axéniques avec ces bactéries. Nous pourrions également tester leur influence, *in vitro,* en forme active ou inactive, sur des neurones entériques en culture comme il l'a été réalisé dans l'étude suivante, sur des cellules gliales [604]. Ces expériences sont en cours de réalisation au laboratoire. Si l'effet se confirme, nous pourrions envisager d'utiliser différents mutants de *Lactobacillus* (mutants pour les enzymes des voies métaboliques) en gavage probiotique et également en culture de neurones. Ces expériences vont être réalisée à l'avenir grâce à une collaboration avec Philippe Sansonetti dont nous avons obtenu le *Lactobacillus Casei* et pour lequel il dispose de mutants. Nous devons dans un premier temps tester l'effet du *Lactobacillus Casei*, *in vivo* et *in vitro,* pour l'action du GLP-1 et si l'effet s'avère positif, nous testerons les différents mutants.

J'ai cité au cours de mon introduction les expériences du groupe de Perez-Burgos [590]. En effet, au cours de cette étude, ils évaluent l'influence des bactéries sur les afférences vagales qui font synapses ou non avec les IPAN et montrent que *Lactobacillus Rhamnosus* JB-1 facilite l'activation du nerf vague par l'intermédiaire des IPAN. Des études précédentes avaient montré que *Lactobacillus Reuteri* activait les neurones de types IPAN [872]. Pour cela, il dispose d'une technique *ex vivo* innovante (**Figure 15**) : elle consiste à

récupérer un fragment intestinal et de le fixer sur un support permettant d'injecter une solution contenant des bactéries dans le lumen et des molécules pharmacologiques au niveau de la séreuse intestinale tout en mesurant l'activité électrique du nerf vague. Les influences de la bactérie sur l'activité vagale peuvent être multiples : 1) en activant les motoneurones et interneurones entériques modifiant alors le transit et la distension de la paroi intestinale qui stimule les mécanorécepteurs exprimés par le nerf vague ou 2) en activant les IPAN véhiculant l'information au nerf vague qui fait synapse avec ces neurones. Pour éliminer l'influence de la distension intestinale, il utilise des inhibiteurs des canaux calciques (ω-conotoxines), et un inhibiteur des récepteurs cholinergiques de type muscarinique (mecamylamine) qui stoppent les contractions intestinales. Il vérifie au cours d'expériences contrôles que cela n'inhibe pas l'activation du nerf vague. L'utilisation de ces inhibiteurs n'inhibent pas l'effet de la bactérie donc son effet n'est pas médié par la modification du transit et l'activation de mécanorécepteurs. Dans un second temps, il active les IPAN avec un activateur des canaux potassique $IK_{Ca}$, TRAM-34, et l'utilisation de cet activateur mime l'effet de *Lactobacillus Rhamnosus JB-1* sur l'activité vagale, tandis que l'utilisation d'un inhibiteur de ces canaux n'active pas le nerf vague. Ainsi, ces *Lactobacillus* activent le nerf vague par l'intermédiaire des IPAN.

Cette technique pourrait être utilisée dans l'étude de l'action du GLP-1 modulé par le microbiote. Pour cela, nous pourrions 1) infuser différents contenus iléaux (souris contrôles, diabétiques résistantes au GLP-1 ou à différentes période du cycle circadien), ou différentes bactéries (*Lactobacillus, Alistipes*) dans le lumen puis 2) mettre du GLP-1, avec ou sans Exendine 9-39, avec des inhibiteurs du transit ou des IPAN, avec des modulateurs pharmacologiques de protéines « clock » dans le compartiment dans lequel baigne l'iléon qui pourrait provenir 3) d'animaux contrôles, diabétiques résistants au GLP-1, invalidés pour différentes protéines (GLP-1r, TLR, NOD, protéines « clock »). Ces expériences pourraient nous éclairer sur l'axe nerveux intestin-cerveau activé par le GLP-1 et moduler par le microbiote.

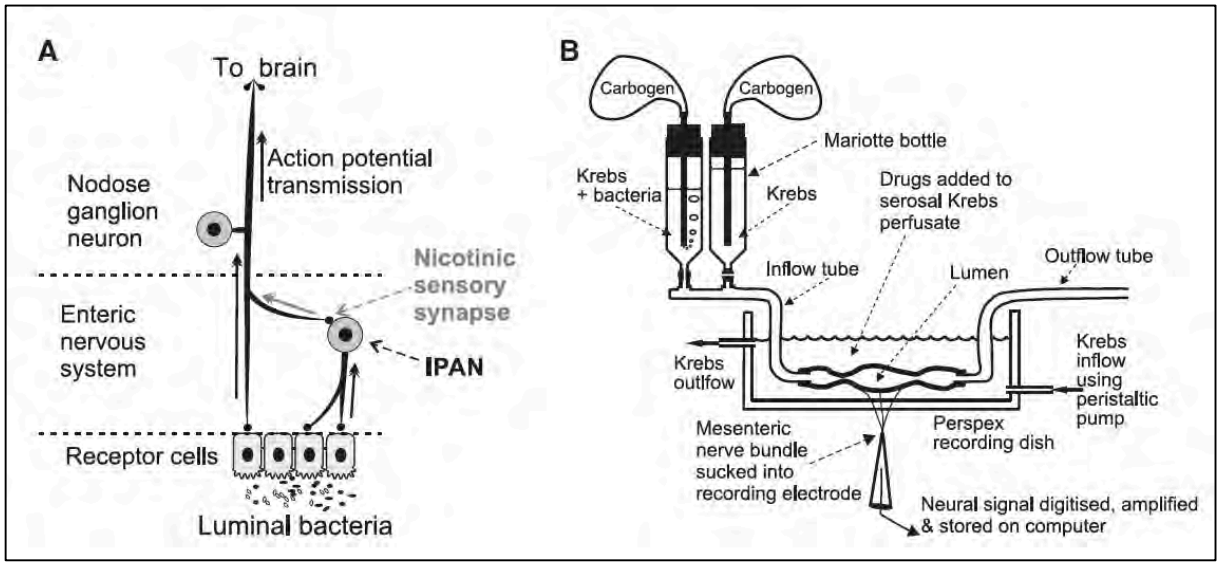



Figure 15 : Technique d'étude de l'activation du SNE et du nerf vague par les bactéries. Issu de Perez-Burgos et al.

Pour comprendre l'effet du microbiote sur le nerf vague, il aurait été intéressant de mesurer l'activité électrique en réponse au GLP-1 par électrophysiologie, comme décrit dans le chapitre 5, chez des souris axéniques, traitées aux antibiotiques ou des souris axéniques recolonisées avec différentes flores ou bactéries (NCD, HFD, *Lactobacillus, Alsitipes*, …).

Nous avons vu au cours du chapitre 5 qu'un traitement chronique avec du Liraglutide, agoniste du GLP-1r, pouvait améliorer la réponse électrique du nerf vague en réponse au glucose et à la molécule. Cet effet pourrait passer par l'effet neurotrophique du GLP-1 mais également par une modulation du microbiote et du système immunitaire. En effet, les souris invalidées pour le GLP-1r montrent une légère inflammation intestinale, possèdent un phénotype aggravé lorsque l'on induit une inflammation intestinale et montrent un microbiote différent des souris contrôles. Un traitement à l'exendine 4, agoniste du GLP-1r, modifie le système immunitaire intestinal [798]. Ainsi, nous pourrions imaginer que lorsque l'on traite chroniquement avec un agoniste du GLP-1r on modifie le système immunitaire intestinal qui modifie en retour la qualité du microbiote. Ceci pourrait être contrôlé au sein du laboratoire dont une des thématiques est le système immunitaire intestinal. D'autre part, ce microbiote différentiel pourrait être bénéfique pour les neurones et donc la réponse au GLP-1. Pour répondre à cette question, nous pourrions coloniser des souris axéniques avec de la flore de souris diabétiques traitées ou non avec des agonistes du GLP-1r et voir si la résistance au GLP-1 de la souris axénique est modifiée ou non. De plus, nous pourrions traiter chroniquement une souris axénique avec ces agonistes pour voir si la réponse au GLP-1 est améliorée ou non. Si ce n'était pas le cas, alors ceci suggérerait que cela passe par le microbiote.

### B. Quelle est la voie de signalisation intracellulaire impliquée ?

Parmi l'ensemble de ces travaux, il nous reste également à identifier comment le GLP-1 module la production de NO au niveau du SNE. Certaines études ont montré qu'au niveau endothélial [753, 756] les MAPK, l'AKT, la PKA ou encore l'AMPK modulaient l'activation ou l'inhibition de la eNOS par phosphorylations. Au niveau cérébral et particulièrement au niveau du NTS, il a été montré que le GLP-1 modulait deux types de voies par l'intermédiaire de la PKA : la voie AMPK et la voie ERK1/2 (MAPK p44/42) [770]. Or, il a été également montré que l'AMPK ou la PKA pouvaient moduler l'activation par phosphorylation de la nNOS au niveau cérébral [771-773]. Ainsi, il serait intéressant de mesurer, *in vivo*, l'état de phosphorylation de la nNOS en réponse au GLP-1 dans nos différents modèles animaux où la sensibilité au GLP-1 est altérée. *In vitro*, sur des neurones entériques en culture, nous pourrions évaluer 1) l'induction de la phosphorylation de la nNOS en réponse au GLP-1, 2) l'importance des différentes kinases (PKA, AMPK, MAPK, …) dans les mécanismes de phosphorylation par l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs pharmacologiques. Nous savons que la protéine EPAC est critique pour la voie de

signalisation du GLP-1. Nous avons mesuré l'expression de EPAC1/2 au niveau iléal et nous observons une baisse de l'expression de la protéine EPAC1 dans l'iléon des souris diabétiques et axéniques renforçant l'altération de la voie de signalisation du GLP-1 (**données non montrées**).

De la même façon, au cours du cycle nycthéméral, il serait intéressant d'évaluer l'état de phosphorylation de la nNOS entérique au cours de la journée pour voir si elle coïncide avec l'expression du récepteur au GLP-1. Une autre question persiste : comment le cycle nycthéméral contrôle-t-il l'expression du GLP-1r ? Il serait intéressant de regarder la séquence promotrice du GLP-1r afin d'évaluer les séquences spécifiques aux protéines « clock ». Il est possible que cette régulation passe par des mécanismes de modifications épigénétiques. Il serait intéressant de les évaluer puisque le microbiote ou les stress nutritionnels peuvent modifier l'expression génique *via* de tels mécanismes. Dans nos études, nous nous sommes concentrés sur l'expression de l'ARNm du GLP-1r pour étudier les altérations de sa voie de signalisation et il aurait été intéressant d'évaluer la présence à la membrane neuronale du récepteur, mais les techniques dont nous disposons aujourd'hui sont assez limitées. Cependant, nous pourrions utiliser les souris du groupe de Fiona Gribble [734] sous régime gras ou alors les dériver en souris axéniques.

Enfin, nous avons montré que le liraglutide pouvait améliorer la réponse vagale à la molécule et au glucose. Le liraglutide comme le GLP-1 ont été démontré comme étant des facteurs neurotrophiques [774, 998]. Il serait intéressant de voir si cet effet est observable au niveau des neurones entériques. Nous avons remarqué au cours du chapitre 6 que l'expression de l'ARNm du GLP-1r était fortement associée à celle de la périphérine suggérant que le GLP-1 pourrait avoir un effet trophique sur les dendrites et les axones ou inversement. Pour vérifier cela, nous pourrions incuber des neurones en culture avec du GLP-1 de manière chronique et mesurer l'induction de la synaptogenèse entre les différents neurones. Il existe un outil développé récemment permettant par immunocytologie et par l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques des axones (HCS Synaptogenesis Assay, Thermofisher Scientific) de mesurer le nombre de neurites, leur longueur, le nombre de vésicules présynaptiques, et le nombre de synapses. Pour cela, il faut disposer d'un microscope confocal et du logiciel de quantification automatique du même fournisseur (Thermo Scientific™ HCS Studio™ Software). Cette technique pourrait être aussi utilisée pour étudier l'effet des bactéries et également du cycle nycthéméral puisque l'expression de la périphérine est modulée par ces deux facteurs.

### C. Le nerf vague

Au cours des différentes études, nous nous sommes focalisés sur le SNE et avons montré que l'effet du NO produit par le SNE en réponse au GLP-1 pouvait passer par le nerf vague. Or, peut-être que les altérations de réponse au GLP-1 se font directement sur le nerf vague qui innerve de façon extrinsèque l'intestin. En effet, nous avons montré au cours du chapitre 4 que l'expression de l'ARNm du GLP-1r était diminuée dans les modèles résistants

au GLP-1 (souris nourries avec le régime HFD, souris contrôles traitées aux antibiotiques) suggérant que la réponse au niveau du nerf vague pourrait être altérée également. Au cours de ma thèse, j'ai mis en place la culture des ganglions nodaux du nerf vague mais par faute de temps je n'ai pas pu approfondir la question.

Pour étudier l'interaction entre les neurones du SNE et les neurones du nerf vague, nous pourrions utiliser la technologie « AXIS™: AXon Investigation System » (Millipore). Cette technique consiste à utiliser des chambres de croissance axonale permettant d'un côté de déposer un milieu avec des neurones et déposer dans un autre compartiment, isolé du premier, d'autres milieux ou neurones (**Figure 16**). Les deux compartiments sont en communication par un « filtre » permettant la formation d'axones de part et d'autre des compartiments. Ce type de technique permettrait 1) de maintenir isolés les neurones vagaux des neurones entériques 2) de stimuler les neurones entériques maintenus dans un compartiment isolé des neurones vagaux et de mesurer la réponse au niveau vagal. Ce modèle *in vitro* simulerait l'interaction nerveuse du nerf vague avec le SNE qui a lieu au niveau physiologique. De la même façon cette technique permettrait d'étudier l'influence des bactéries. Elle permet également de générer des altérations axonales et de mesurer la régénération en réponse à certains stimuli. Une telle technique permettrait d'étudier le pouvoir régénérateur du liraglutide sur les neurones vagaux.

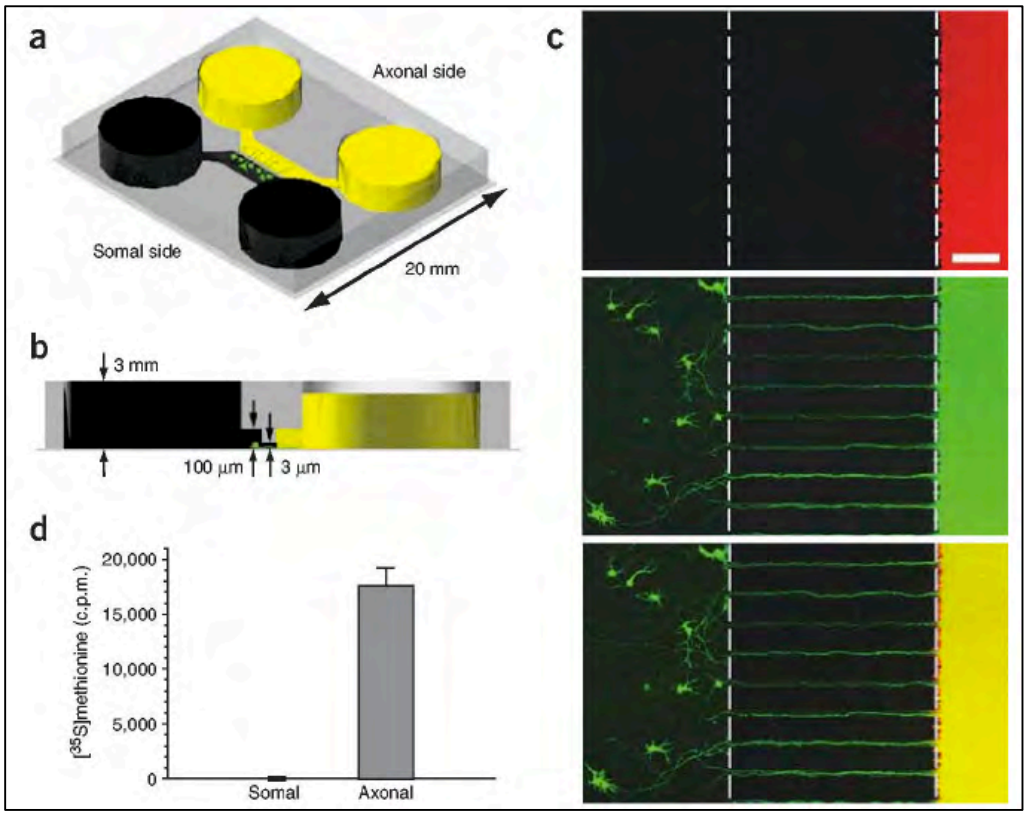



Figure 16 : « AXIS™: AXon Investigation System ». A et B : Schéma du montage. C : Formation des axones entre les deux compartiments. D : Intégration de la méthionine radioactive dans les axones reflétant ainsi leur formation. Issu de Taylor et al., 2005.

## D. Augmentation de la sécrétion de GLP-1 ?

Dans nos études, nous avons pu remarquer que les souris diabétiques présentaient une augmentation de la quantité de GLP-1 au niveau de la veine porte en réponse au glucose. Différents mécanismes peuvent expliquer cette variation : un rétrocontrôle altéré du GLP-1 sur sa propre sécrétion, un contrôle modifié de la sécrétion par les autres hormones ou neurotransmetteurs intestinaux, une détection altérée du glucose *via* SGLT1/3, ou une baisse de l'activité de la DPP4 sur le site de sécrétion. La résistance au GLP-1 observée dans ce modèle de souris ne peut être à l'origine de cette augmentation puisque le GLP-1 stimule sa propre sécrétion [707, 708]. La détection du glucose n'est pas augmentée chez ces souris et au contraire, on observe une baisse de l'expression de SGLT au niveau iléal (**données non montrées**). La résistance à l'insuline ne peut pas expliquer cette augmentation puisque l'insuline stimule la sécrétion de GLP-1 [707, 708]. La neuropathie du SNE pourrait également expliquer la modification de la sécrétion du GLP-1 en réponse au glucose [693]. Enfin, nous avons observé que chez les souris HFD l'expression de la DPP4 était diminuée dans l'iléon, site d'expression du GLP-1 (**données non montrées**). Il est possible que l'augmentation de la quantité de GLP-1 dans la veine porte pourrait être due à une baisse de l'activité de la DPP4 qu'il serait intéressant de mesurer. Chez les souris axéniques ou chez les souris contrôles traitées pendant 1 mois aux antibiotiques, qui hyper-sécrètent le GLP-1, nous n'observons aucune variation de l'expression de la DPP4 (**données non montrées**) suggérant que le microbiote n'intervient pas dans ces régulations. Au cours du cycle nycthéméral, nous observons une oscillation de l'expression de la DPP4 et il est possible qu'il existe une régulation de l'expression et de l'activité de la DPP4 au cours du cycle.

L'ensemble de ces expériences permettrait de compléter les données acquises au cours de ma thèse et de gagner en connaissance sur la physiopathologie du DT2, le métabolisme du GLP-1 (action, sécrétion), l'implication du microbiote et les régulations circadiennes. D'autres modèles animaux pourraient être utilisés pour ces études : le poisson-zèbre permettant d'acquérir une très grande quantité de données et également le *Caenorhabditis elegans* modèle réductionniste parfait pour l'étude de l'intestin et du microbiote. D'autre part, certaines parties de ces études pourraient être extrapolées à l'homme comme le traitement probiotique de patients DT2 traités avec des thérapies basées sur le GLP-1 et l'évaluation de leur profil glycémique, ou encore l'étude de leur microbiote et de l'expression du GLP-1r ou même des protéines « clock » dans l'iléon. Pour cela, nous pouvons disposer de biopsies iléales de patients DT2 au laboratoire. Ceci permettrait de gagner en connaissance chez l'homme et également d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement du DT2.

## E. Conclusion générale

J'ai commencé l'écriture de ce manuscrit par la citation de Claude Bernard « *La nature de notre esprit nous porte à chercher l'essence ou le pourquoi des choses* » résumant ma passion et mon intérêt pour la recherche. J'ai toujours été intriguée par le fonctionnement de l'organisme et sa complexité. Au cours de ces années d'apprentissages et de découvertes du monde de la recherche, j'ai été amenée à étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les maladies métaboliques, telles que le DT2 et l'obésité, apportant une compréhension supplémentaire dans le but de développer des traitements plus efficaces, de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'améliorer le quotidien des patients. Cependant, l'étude bibliographique réalisée dans ce manuscrit m'a aussi permis de comprendre que la manière de nous nourrir, de nous dépenser ou de vivre est un facteur déterminant dans la mise en place des maladies métaboliques. L'influence génétique et le microbiote présent dans notre intestin ne semblent être que des facteurs prédisposants. Notre mauvaise alimentation se traduit par deux phénomènes : un apport excédentaire en nutriments et des aliments de moins bonne qualité nutritionnelle (sans parler de tous les éléments non-alimentaires que l'on peut trouver associés). Ainsi, si le nombre de patients atteints de DT2 évolue de manière parallèle à ceux atteints d'obésité, l'émergence d'un nouveau phénotype diabétique non associé à l'obésité nous révèle l'importance pour le contrôle du métabolisme énergétique, de la qualité des nutriments tels qu'un enrichissement en acides gras saturés et un appauvrissement en fibres et en vitamines. La primatologue Jane Goodall a intitulé un de ses livres « nous sommes ce que nous mangeons », œuvre où elle propose des éléments concrets aux consommateurs qui veulent se réapproprier la liberté de bien se nourrir, et je trouve que cette phrase met en lumière une cause non négligeable des maladies métaboliques. Une étude récente dans le « British Medical Journal » montre que la prédisposition génétique à l'obésité n'influence pas la perte de poids induite par un changement hygiéno-diététique, un traitement pharmacologique ou chirurgical [999] révélant qu'aujourd'hui nous pouvons résoudre en grande partie les maladies métaboliques avec les outils dont on dispose. La recherche concernant ces maladies constitue la dépense sanitaire la plus importante à travers le monde et paradoxalement, peu d'efforts ou des efforts trop peu efficaces (campagnes publicitaires, indications sur la qualité de nos aliments) sont réalisés pour améliorer notre manière de manger ou changer nos habitudes de vie. La résolution des maladies métaboliques nécessite à la fois la découverte précise de tous les mécanismes moléculaires impliqués dans leur physiopathologie, mais également de passer par un changement d'état d'esprit global : comprendre pourquoi aujourd'hui les populations se réfugient dans la nourriture et réapprendre à nous nourrir selon nos besoins physiologiques et non parce que les aliments nous sont facilement accessibles. Cette remise en question pourrait garantir dans le futur le ralentissement voire la résolution de la pandémie des maladies métaboliques.

# XII. Références


1. Boutibonnes, P., *L'œil de Leeuwenhoek et l'invention de la microscopie* Alliage, 1999. **39**: p. 56-66.
2. Nezelof, C., *Henri dutrochet (1776–1847): an unheralded discoverer of the cell.* Annals of Diagnostic Pathology. **7**(4): p. 264-272.
3. Schwann, T., *Mikroskopische Untersuchungen Über Die Übereinstimmung in Der Struktur und Dem Wachstum Der Tiere und Pflanzen.* 2012: Trapeza.
4. Tan, S.Y. and L. Rogers, *Louis Pasteur (1822-1895): the germ theorist.* Singapore Med J, 2007. **48**(1): p. 4-5.
5. Trevathan, W.R., *Evolutionary medicine.* Annual Review of Anthropology, 2007. **36**(1): p. 139.
6. Trevathan, W., E.O. Smith, and J.J. McKenna, *Evolutionary medicine.* 1999: Oxford University Press on Demand.
7. Cordain, L., et al., *Physical activity, energy expenditure and fitness: an evolutionary perspective.* Int J Sports Med, 1998. **19**(5): p. 328-35.
8. Eaton, S.B., M. Konner, and M. Shostak, *Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective.* Am J Med, 1988. **84**(4): p. 739-49.
9. Hu, F.B., et al., *Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women.* N Engl J Med, 2001. **345**(11): p. 790-7.
10. Hu, F.B., et al., *Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women: a prospective study.* JAMA, 1999. **282**(15): p. 1433-9.
11. Diamond, J., *The double puzzle of diabetes.* Nature, 2003. **423**(6940): p. 599-602.
12. Hill, J.O., *Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective.* Endocr Rev, 2006. **27**(7): p. 750-61.
13. Chakravarthy, M.V. and F.W. Booth, *Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases.* J Appl Physiol (1985), 2004. **96**(1): p. 3-10.
14. Hales, C.N. and D.J. Barker, *The thrifty phenotype hypothesis.* Br Med Bull, 2001. **60**: p. 5-20.
15. Barker, D.J., et al., *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth.* Diabetologia, 1993. **36**(1): p. 62-7.
16. Hales, C.N., et al., *Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64.* BMJ, 1991. **303**(6809): p. 1019-22.
17. Ravelli, A.C., et al., *Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine.* Lancet, 1998. **351**(9097): p. 173-7.
18. Eriksson, J.G., et al., *Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals.* Diabetologia, 2002. **45**(3): p. 342-8.
19. Rother, E., et al., *Hypothalamic JNK1 and IKKbeta activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding.* Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 770-81.
20. Godfrey, K.M., et al., *Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity.* Diabetes, 2011. **60**(5): p. 1528-34.
21. Kaar, J.L., et al., *Maternal obesity, gestational weight gain, and offspring adiposity: the exploring perinatal outcomes among children study.* J Pediatr, 2014. **165**(3): p. 509-15.
22. Ponzio, B.F., et al., *Implications of maternal nutrient restriction in transgenerational programming of hypertension and endothelial dysfunction across F1-F3 offspring.* Life Sci, 2012. **90**(15-16): p. 571-7.
23. Smith, C.J. and K.K. Ryckman, *Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome.* Diabetes Metab Syndr Obes, 2015. **8**: p. 295-302.
24. diabète, A.f.d. *Les 90 ans de la découverte de l'insuline.* Available from: http://www.afd.asso.fr/diabete-recherche/insuline-histoire-decouverte.
25. Balkau, B., et al., *A review of the metabolic syndrome.* Diabetes Metab, 2007. **33**(6): p. 405-13.
26. Federation, I.D., *IDF Diabetes Atlas, 7th edn.* 2015.
27. Hardie, D.G., *Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase.* Am J Clin Nutr, 2011. **93**(4): p. 891S-6.
28. Sanders, M.J., et al., *Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade.* Biochem J, 2007. **403**(1): p. 139-48.
29. Woods, A., et al., *LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade.* Curr Biol, 2003. **13**(22): p. 2004-8.
30. Woods, A., et al., *Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells.* Cell Metab, 2005. **2**(1): p. 21-33.
31. McBride, A., et al., *The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor.* Cell Metab, 2009. **9**(1): p. 23-34.
32. Pehmoller, C., et al., *Genetic disruption of AMPK signaling abolishes both contraction- and insulin-stimulated TBC1D1 phosphorylation and 14-3-3 binding in mouse skeletal muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(3): p. E665-75.
33. Marsin, A.S., et al., *Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1247-55.
34. Jorgensen, S.B., et al., *The alpha2-5'AMP-activated protein kinase is a site 2 glycogen synthase kinase in skeletal muscle and is responsive to glucose loading.* Diabetes, 2004. **53**(12): p. 3074-81.

35. Gwinn, D.M., et al., *AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint.* Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 214-26.
36. Kawaguchi, T., et al., *Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase.* J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 3829-35.
37. Koo, S.H., et al., *The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism.* Nature, 2005. **437**(7062): p. 1109-11.
38. Zheng, D., et al., *Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase.* J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(3): p. 1073-83.
39. Zong, H., et al., *AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 15983-7.
40. Salt, I.P., et al., *AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release.* Biochem J, 1998. **335 ( Pt 3)**: p. 533-9.
41. McCrimmon, R.J., et al., *Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 444-50.
42. Yamauchi, T., et al., *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.* Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1288-95.
43. Howard. *History of the Pancreas.* Available from: http://pancreasclub.com/home/pancreas/.
44. Jorgens, V. and H.O. Minkowski, *Past masters: Oskar Minkowski (1858-1931).* Diabetologia, 2005. **48**(8): p. A7.
45. Gosmanov, N.R., A.R. Gosmanov, and J.E. Gerich, *Glucagon Physiology*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
46. Quesada, I., et al., *Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes.* J Endocrinol, 2008. **199**(1): p. 5-19.
47. Roder, P.V., et al., *Pancreatic regulation of glucose homeostasis.* Exp Mol Med, 2016. **48**: p. e219.
48. Giddings, S.J., J. Chirgwin, and M.A. Permutt, *Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo.* Diabetes, 1982. **31**(7): p. 624-9.
49. Knoch, K.P., et al., *cAMP-dependent phosphorylation of PTB1 promotes the expression of insulin secretory granule proteins in beta cells.* Cell Metab, 2006. **3**(2): p. 123-34.
50. Inagaki, N., et al., *c-Jun represses the human insulin promoter activity that depends on multiple cAMP response elements.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(3): p. 1045-9.
51. Sander, M., et al., *Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development.* Genes Dev, 1997. **11**(13): p. 1662-73.
52. Gosmain, Y., et al., *Pax6 is crucial for beta-cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion.* Mol Endocrinol, 2012. **26**(4): p. 696-709.
53. Aramata, S., et al., *Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1730**(1): p. 41-6.
54. Vander Mierde, D., et al., *Glucose activates a protein phosphatase-1-mediated signaling pathway to enhance overall translation in pancreatic beta-cells.* Endocrinology, 2007. **148**(2): p. 609-17.
55. Harding, H.P., et al., *Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival.* Mol Cell, 2001. **7**(6): p. 1153-63.
56. Itoh, N. and H. Okamoto, *Translational control of proinsulin synthesis by glucose.* Nature, 1980. **283**(5742): p. 100-2.
57. Permutt, M.A. and D.M. Kipnis, *Insulin biosynthesis. I. On the mechanism of glucose stimulation.* J Biol Chem, 1972. **247**(4): p. 1194-9.
58. Fu, Z., E.R. Gilbert, and D. Liu, *Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes.* Curr Diabetes Rev, 2013. **9**(1): p. 25-53.
59. Sener, A. and W.J. Malaisse, *L-leucine and a nonmetabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase.* Nature, 1980. **288**(5787): p. 187-9.
60. Itoh, Y., et al., *Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40.* Nature, 2003. **422**(6928): p. 173-6.
61. Crespin, S.R., W.B. Greenough, 3rd, and D. Steinberg, *Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids.* J Clin Invest, 1969. **48**(10): p. 1934-43.
62. Stein, D.T., et al., *Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat.* J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2728-35.
63. Gonzalo, S. and M.E. Linder, *SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway.* Mol Biol Cell, 1998. **9**(3): p. 585-97.
64. Rhee, J.S., et al., *Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs.* Cell, 2002. **108**(1): p. 121-33.
65. Bratanova-Tochkova, T.K., et al., *Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion.* Diabetes, 2002. **51 Suppl 1**: p. S83-90.
66. Hugl, S.R., M.F. White, and C.J. Rhodes, *Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17771-9.

67. Cousin, S.P., et al., *Stimulation of pancreatic beta-cell proliferation by growth hormone is glucose-dependent: signal transduction via janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signalling.* Biochem J, 1999. **344 Pt 3**: p. 649-58.
68. Leto, D. and A.R. Saltiel, *Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(6): p. 383-96.
69. Accili, D., et al., *Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene.* Nat Genet, 1996. **12**(1): p. 106-9.
70. Kido, Y., J. Nakae, and D. Accili, *Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 972-9.
71. Tamemoto, H., et al., *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1.* Nature, 1994. **372**(6502): p. 182-6.
72. Withers, D.J., et al., *Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice.* Nature, 1998. **391**(6670): p. 900-4.
73. Falasca, M., et al., *The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling.* J Biol Chem, 2007. **282**(38): p. 28226-36.
74. Cho, H., et al., *Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice.* J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38349-52.
75. Cho, H., et al., *Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta).* Science, 2001. **292**(5522): p. 1728-31.
76. Andjelkovic, M., et al., *Role of translocation in the activation and function of protein kinase B.* J Biol Chem, 1997. **272**(50): p. 31515-24.
77. Kitamura, T., et al., *Requirement for activation of the serine-threonine kinase Akt (protein kinase B) in insulin stimulation of protein synthesis but not of glucose transport.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3708-17.
78. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.* Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
79. Brady, M.J., F.J. Bourbonais, and A.R. Saltiel, *The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells.* J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14063-6.
80. Alemany, S., et al., *The protein phosphatases involved in cellular regulation. Evidence that dephosphorylation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase in the glycogen and microsomal fractions of rat liver are catalysed by the same enzyme: protein phosphatase-1.* Eur J Biochem, 1986. **156**(1): p. 101-10.
81. Geetha, T., et al., *Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A and catalytic subunit delta, new members in the phosphatidylinositide 3 kinase insulin-signaling pathway.* J Endocrinol, 2012. **214**(3): p. 437-43.
82. Zhang, T., et al., *Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1.* Cell Metab, 2012. **15**(1): p. 75-87.
83. Rena, G., et al., *Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B.* J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17179-83.
84. Zhang, W., et al., *FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression.* J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10105-17.
85. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.* Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
86. Agati, J.M., D. Yeagley, and P.G. Quinn, *Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription.* J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18751-9.
87. Yecies, J.L., et al., *Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways.* Cell Metab, 2011. **14**(1): p. 21-32.
88. Shah, O.J., et al., *4E-BP1 and S6K1: translational integration sites for nutritional and hormonal information in muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(4): p. E715-29.
89. Jeong, J.Y., et al., *Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase.* Diabetes Metab J, 2012. **36**(5): p. 328-35.
90. Roth, U., et al., *The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway.* J Biol Chem, 2004. **279**(4): p. 2623-31.
91. Deprez, J., et al., *Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades.* J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17269-75.
92. Kotani, K., et al., *Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(12): p. 6971-82.
93. Bandyopadhyay, G., et al., *Evidence for involvement of protein kinase C (PKC)-zeta and noninvolvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes.* Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4721-31.
94. Farese, R.V., et al., *Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes.* J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2289-301.
95. Michael, M.D., et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 87-97.
96. Lu, M., et al., *Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1.* Nat Med, 2012. **18**(3): p. 388-95.

97. Marks, J.L., et al., *Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization.* Endocrinology, 1990. **127**(6): p. 3234-6.
98. Bruning, J.C., et al., *Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction.* Science, 2000. **289**(5487): p. 2122-5.
99. Scherer, T., et al., *Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis.* Cell Metab, 2011. **13**(2): p. 183-94.
100. Koch, L., et al., *Central insulin action regulates peripheral glucose and fat metabolism in mice.* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2132-47.
101. Obici, S., et al., *Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production.* Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1376-82.
102. Chen, M., S.C. Woods, and D. Porte, Jr., *Effect of cerebral intraventricular insulin on pancreatic insulin secretion in the dog.* Diabetes, 1975. **24**(10): p. 910-4.
103. Paranjape, S.A., et al., *Influence of insulin in the ventromedial hypothalamus on pancreatic glucagon secretion in vivo.* Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1521-7.
104. Mirshamsi, S., et al., *Leptin and insulin stimulation of signalling pathways in arcuate nucleus neurones: PI3K dependent actin reorganization and KATP channel activation.* BMC Neurosci, 2004. **5**: p. 54.
105. Pocai, A., et al., *Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production.* Nature, 2005. **434**(7036): p. 1026-31.
106. Filippi, B.M., et al., *Insulin activates Erk1/2 signaling in the dorsal vagal complex to inhibit glucose production.* Cell Metab, 2012. **16**(4): p. 500-10.
107. Mojsov, S., et al., *Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing.* J Biol Chem, 1986. **261**(25): p. 11880-9.
108. Furuta, M., et al., *Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice.* J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27197-202.
109. Kendall, D.M., et al., *Somatostatin coordinately regulates glucagon gene expression and exocytosis in HIT-T15 cells.* J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2496-502.
110. Philippe, J., C. Morel, and M. Cordier-Bussat, *Islet-specific proteins interact with the insulin-response element of the glucagon gene.* J Biol Chem, 1995. **270**(7): p. 3039-45.
111. Dumonteil, E., et al., *Glucose regulates proinsulin and prosomatostatin but not proglucagon messenger ribonucleic acid levels in rat pancreatic islets.* Endocrinology, 2000. **141**(1): p. 174-80.
112. Dumonteil, E., et al., *Chronic exposure to high glucose concentrations increases proglucagon messenger ribonucleic acid levels and glucagon release from InR1G9 cells.* Endocrinology, 1999. **140**(10): p. 4644-50.
113. Gevrey, J.C., et al., *Protein hydrolysates stimulate proglucagon gene transcription in intestinal endocrine cells via two elements related to cyclic AMP response element.* Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 926-36.
114. Gosmain, Y., et al., *Pax-6 and c-Maf functionally interact with the alpha-cell-specific DNA element G1 in vivo to promote glucagon gene expression.* J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 35024-34.
115. St-Onge, L., et al., *Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas.* Nature, 1997. **387**(6631): p. 406-9.
116. Ahlgren, U., et al., *beta-cell-specific inactivation of the mouse Ipf1/Pdx1 gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes.* Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1763-8.
117. Ritz-Laser, B., et al., *The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6.* Diabetologia, 2002. **45**(1): p. 97-107.
118. Ritz-Laser, B., et al., *Ectopic expression of the beta-cell specific transcription factor Pdx1 inhibits glucagon gene transcription.* Diabetologia, 2003. **46**(6): p. 810-21.
119. Sosa-Pineda, B., et al., *The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas.* Nature, 1997. **386**(6623): p. 399-402.
120. Gosmain, Y., et al., *Glucagon gene expression in the endocrine pancreas: the role of the transcription factor Pax6 in alpha-cell differentiation, glucagon biosynthesis and secretion.* Diabetes Obes Metab, 2011. **13 Suppl 1**: p. 31-8.
121. Cooperberg, B.A. and P.E. Cryer, *Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans.* Diabetes Care, 2009. **32**(12): p. 2275-80.
122. Bollheimer, L.C., et al., *Stimulatory short-term effects of free fatty acids on glucagon secretion at low to normal glucose concentrations.* Metabolism, 2004. **53**(11): p. 1443-8.
123. Olofsson, C.S., et al., *Palmitate stimulation of glucagon secretion in mouse pancreatic alpha-cells results from activation of L-type calcium channels and elevation of cytoplasmic calcium.* Diabetes, 2004. **53**(11): p. 2836-43.
124. Hong, J., et al., *Fatty acid-induced effect on glucagon secretion is mediated via fatty acid oxidation.* Diabetes Metab Res Rev, 2007. **23**(3): p. 202-10.
125. Leclercq-Meyer, V., et al., *Multiple effects of leucine on glucagon, insulin, and somatostatin secretion from the perfused rat pancreas.* Endocrinology, 1985. **116**(3): p. 1168-74.
126. Xu, E., et al., *Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system.* Cell Metab, 2006. **3**(1): p. 47-58.
127. Gromada, J., et al., *Somatostatin inhibits exocytosis in rat pancreatic alpha-cells by G(i2)-dependent activation of calcineurin and depriming of secretory granules.* J Physiol, 2001. **535**(Pt 2): p. 519-32.
128. Ma, X., et al., *Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(1): p. 198-212.

129. Dunning, B.E., J.E. Foley, and B. Ahren, *Alpha cell function in health and disease: influence of glucagon-like peptide-1.* Diabetologia, 2005. **48**(9): p. 1700-13.
130. Ding, W.G., et al., *Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca2+-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism.* Diabetes, 1997. **46**(5): p. 792-800.
131. Li, Y., et al., *beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1.* Diabetes, 2005. **54**(2): p. 482-91.
132. Berts, A., E. Gylfe, and B. Hellman, *Cytoplasmic Ca2+ in glucagon-producing pancreatic alpha-cells exposed to carbachol and agents affecting Na+ fluxes.* Endocrine, 1997. **6**(1): p. 79-83.
133. Ito, K., et al., *Neurotransmitters partially restore glucose sensitivity of insulin and glucagon secretion from perfused streptozotocin-induced diabetic rat pancreas.* Diabetologia, 1995. **38**(11): p. 1276-84.
134. Miki, T., et al., *ATP-sensitive K+ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis.* Nat Neurosci, 2001. **4**(5): p. 507-12.
135. Mayo, K.E., et al., *International Union of Pharmacology. XXXV. The glucagon receptor family.* Pharmacol Rev, 2003. **55**(1): p. 167-94.
136. Abrahamsen, N., K. Lundgren, and E. Nishimura, *Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP.* J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15853-7.
137. Hjorth, S.A., et al., *Glucagon and glucagon-like peptide 1: selective receptor recognition via distinct peptide epitopes.* J Biol Chem, 1994. **269**(48): p. 30121-4.
138. Conarello, S.L., et al., *Glucagon receptor knockout mice are resistant to diet-induced obesity and streptozotocin-mediated beta cell loss and hyperglycaemia.* Diabetologia, 2007. **50**(1): p. 142-50.
139. Gelling, R.W., et al., *Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1438-43.
140. Sorensen, H., et al., *Glucagon receptor knockout mice display increased insulin sensitivity and impaired beta-cell function.* Diabetes, 2006. **55**(12): p. 3463-9.
141. Andersen, B., et al., *Inhibition of glycogenolysis in primary rat hepatocytes by 1, 4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol.* Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 545-50.
142. Band, G.C. and C.T. Jones, *Functional activation by glucagon of glucose 6-phosphatase and gluconeogenesis in the perfused liver of the fetal guinea pig.* FEBS Lett, 1980. **119**(1): p. 190-4.
143. Pilkis, S.J., et al., *Regulation by glucagon of hepatic pyruvate kinase, 6-phosphofructo 1-kinase, and fructose-1,6-bisphosphatase.* Fed Proc, 1982. **41**(10): p. 2623-8.
144. Rothermel, J.D., et al., *Effects of the specific cAMP antagonist, (Rp)-adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate, on the cAMP-dependent protein kinase-induced activity of hepatic glycogen phosphorylase and glycogen synthase.* J Biol Chem, 1984. **259**(24): p. 15294-300.
145. Ishibashi, H. and G.L. Cottam, *Glucagon-stimulated phosphorylation of pyruvate kinase in hepatocytes.* J Biol Chem, 1978. **253**(24): p. 8767-71.
146. Oh, K.J., et al., *CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis.* BMB Rep, 2013. **46**(12): p. 567-74.
147. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1.* Nature, 2001. **413**(6852): p. 179-83.
148. Matsumoto, M., et al., *Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver.* Cell Metab, 2007. **6**(3): p. 208-16.
149. Ozcan, L., et al., *Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 739-51.
150. Cynober, L.A., *Plasma amino acid levels with a note on membrane transport: characteristics, regulation, and metabolic significance.* Nutrition, 2002. **18**(9): p. 761-6.
151. Pegorier, J.P., et al., *Induction of ketogenesis and fatty acid oxidation by glucagon and cyclic AMP in cultured hepatocytes from rabbit fetuses. Evidence for a decreased sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA inhibition after glucagon or cyclic AMP treatment.* Biochem J, 1989. **264**(1): p. 93-100.
152. Gerich, J.E., et al., *Prevention of human diabetic ketoacidosis by somatostatin. Evidence for an essential role of glucagon.* N Engl J Med, 1975. **292**(19): p. 985-9.
153. Longuet, C., et al., *The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting.* Cell Metab, 2008. **8**(5): p. 359-71.
154. Kawaguchi, T., et al., *Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation/dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13710-5.
155. Iizuka, K. and Y. Horikawa, *ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome.* Endocr J, 2008. **55**(4): p. 617-24.
156. Richter, W.O., H. Robl, and P. Schwandt, *Human glucagon and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) stimulate free fatty acid release from human adipose tissue in vitro.* Peptides, 1989. **10**(2): p. 333-5.
157. Vons, C., et al., *Regulation of fatty-acid metabolism by pancreatic hormones in cultured human hepatocytes.* Hepatology, 1991. **13**(6): p. 1126-30.
158. Zhou, H.R. and J.J. Pestka, *Deoxynivalenol (Vomitoxin)-Induced Cholecystokinin and Glucagon-Like Peptide-1 Release in the STC-1 Enteroendocrine Cell Model Is Mediated by Calcium-Sensing Receptor and Transient Receptor Potential Ankyrin-1 Channel.* Toxicol Sci, 2015. **145**(2): p. 407-17.

159. Dastre, A., *Revue des Deux mondes - Chapitre : l'évolution de la physiologie du foie.* 1903. **Tome 17**.
160. Froissart, R., et al., *Glucose-6-phosphatase deficiency.* Orphanet J Rare Dis, 2011. **6**: p. 27.
161. Sutherland, E.W. and G.A. Robison, *The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism.* Diabetes, 1969. **18**(12): p. 797-819.
162. Argaud, D., et al., *Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate.* J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12854-61.
163. Massillon, D., *Regulation of the glucose-6-phosphatase gene by glucose occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Differential effect of glucose and xylitol.* J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 4055-62.
164. van Schaftingen, E., et al., *The regulatory protein of liver glucokinase.* Adv Enzyme Regul, 1992. **32**: p. 133-48.
165. Fujimoto, Y., E.P. Donahue, and M. Shiota, *Defect in glucokinase translocation in Zucker diabetic fatty rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(3): p. E414-23.
166. Fujimoto, Y., et al., *Glucose toxicity is responsible for the development of impaired regulation of endogenous glucose production and hepatic glucokinase in Zucker diabetic fatty rats.* Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2479-90.
167. She, P., et al., *Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6508-17.
168. Burgess, S.C., et al., *Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase.* J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48941-9.
169. Kimura, T., et al., *Hypoglycemia-associated hyperammonemia caused by impaired expression of ornithine cycle enzyme genes in C/EBPalpha knockout mice.* J Biol Chem, 1998. **273**(42): p. 27505-10.
170. Rui, L., *Energy metabolism in the liver.* Compr Physiol, 2014. **4**(1): p. 177-97.
171. Towle, H.C., E.N. Kaytor, and H.M. Shih, *Regulation of the expression of lipogenic enzyme genes by carbohydrate.* Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 405-33.
172. Jeoung, N.H., et al., *Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homoeostasis during starvation.* Biochem J, 2006. **397**(3): p. 417-25.
173. Jessen, N. and L.J. Goodyear, *Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle.* J Appl Physiol (1985), 2005. **99**(1): p. 330-7.
174. Rose, A.J. and E.A. Richter, *Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated?* Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 260-70.
175. Wright, D.C., et al., *Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca2+-dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(6): p. E1062-6.
176. Jensen, T.E., et al., *Caffeine-induced Ca(2+) release increases AMPK-dependent glucose uptake in rodent soleus muscle.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(1): p. E286-92.
177. Wright, D.C., et al., *Ca2+ and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions.* Diabetes, 2004. **53**(2): p. 330-5.
178. O'Neill, H.M., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(38): p. 16092-7.
179. Birk, J.B. and J.F. Wojtaszewski, *Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle.* J Physiol, 2006. **577**(Pt 3): p. 1021-32.
180. Hespel, P. and E.A. Richter, *Mechanism linking glycogen concentration and glycogenolytic rate in perfused contracting rat skeletal muscle.* Biochem J, 1992. **284 ( Pt 3)**: p. 777-80.
181. Hargreaves, M. and E.A. Richter, *Regulation of skeletal muscle glycogenolysis during exercise.* Can J Sport Sci, 1988. **13**(4): p. 197-203.
182. Nielsen, J.N. and J.F. Wojtaszewski, *Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise.* Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 233-7.
183. Nielsen, J.N., et al., *Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content.* J Physiol, 2001. **531**(Pt 3): p. 757-69.
184. He, Z., et al., *Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(3): p. E424-30.
185. Tang, Y., et al., *Adipose tissue mTORC2 regulates ChREBP-driven de novo lipogenesis and hepatic glucose metabolism.* Nat Commun, 2016. **7**: p. 11365.
186. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity.* Nat Med, 2001. **7**(8): p. 941-6.
187. Satoh, N., et al., *The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats.* Neurosci Lett, 1997. **224**(3): p. 149-52.
188. Senba, E., et al., *Stress-induced c-fos expression in the rat brain: activation mechanism of sympathetic pathway.* Brain Res Bull, 1993. **31**(3-4): p. 329-44.
189. Migrenne, S., et al., *Importance of the gut-brain axis in the control of glucose homeostasis.* Curr Opin Pharmacol, 2006. **6**(6): p. 592-7.
190. Seoane-Collazo, P., et al., *Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis.* Endocrine, 2015. **50**(2): p. 276-91.
191. Penicaud, L., et al., *Brain glucose sensing: a subtle mechanism.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006. **9**(4): p. 458-62.

192. Leloup, C., et al., *Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role?* Neuroscience, 2016. **323**: p. 110-20.
193. Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens, *Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization.* Diabetes, 2000. **49**(10): p. 1635-42.
194. Gardemann, A., H. Strulik, and K. Jungermann, *A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver.* FEBS Lett, 1986. **202**(2): p. 255-9.
195. Hamilton-Wessler, M., et al., *The role of liver glucosensors in the integrated sympathetic response induced by deep hypoglycemia in dogs.* Diabetes, 1994. **43**(8): p. 1052-60.
196. Russek, M., *Participation of hepatic glucoreceptors in the control of intake of food.* Nature, 1963. **197**: p. 79-80.
197. Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens, *Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice.* Diabetes, 2000. **49**(10): p. 1643-8.
198. Burcelin, R. and B. Thorens, *Evidence that extrapancreatic GLUT2-dependent glucose sensors control glucagon secretion.* Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1282-9.
199. Nishizawa, M., et al., *The hepatic vagal reception of intraportal GLP-1 is via receptor different from the pancreatic GLP-1 receptor.* J Auton Nerv Syst, 2000. **80**(1-2): p. 14-21.
200. Burcelin, R., et al., *Glucose competence of the hepatoportal vein sensor requires the presence of an activated glucagon-like peptide-1 receptor.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1720-8.
201. Soty, M., et al., *A gut-brain neural circuit controlled by intestinal gluconeogenesis is crucial in metabolic health.* Mol Metab, 2015. **4**(2): p. 106-17.
202. Vatamaniuk, M.Z., et al., *Acetylcholine affects rat liver metabolism via type 3 muscarinic receptors in hepatocytes.* Life Sci, 2003. **72**(16): p. 1871-82.
203. Li, J.H., et al., *Hepatic muscarinic acetylcholine receptors are not critically involved in maintaining glucose homeostasis in mice.* Diabetes, 2009. **58**(12): p. 2776-87.
204. Shimazu, T. and S. Ogasawara, *Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver.* Am J Physiol, 1975. **228**(6): p. 1787-93.
205. Takahashi, A., et al., *Effects of hepatic nerve stimulation on blood glucose and glycogenolysis in rat liver: studies with in vivo microdialysis.* J Auton Nerv Syst, 1996. **61**(2): p. 181-5.
206. Takahashi, A., et al., *Effects of ventromedial hypothalamus stimulation on glycogenolysis in rat liver using in vivo microdialysis.* Metabolism, 1997. **46**(8): p. 897-901.
207. Jansen, A.S., J.L. Hoffman, and A.D. Loewy, *CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study.* Brain Res, 1997. **766**(1-2): p. 29-38.
208. Brunicardi, F.C., et al., *Splanchnic neural regulation of insulin and glucagon secretion in the isolated perfused human pancreas.* Am J Surg, 1987. **153**(1): p. 34-40.
209. Holst, J.J., et al., *Autonomic nervous control of the endocrine secretion from the isolated, perfused pig pancreas.* J Auton Nerv Syst, 1986. **17**(1): p. 71-84.
210. Rodriguez-Diaz, R., et al., *Noninvasive in vivo model demonstrating the effects of autonomic innervation on pancreatic islet function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(52): p. 21456-61.
211. Berthoud, H.R. and T.L. Powley, *Identification of vagal preganglionics that mediate cephalic phase insulin response.* Am J Physiol, 1990. **258**(2 Pt 2): p. R523-30.
212. Medina, A., et al., *Involvement of the parasympathetic nervous system in the initiation of regeneration of pancreatic beta-cells.* Endocr J, 2013. **60**(5): p. 687-96.
213. Taborsky, G.J., Jr. and T.O. Mundinger, *Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia.* Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1055-62.
214. Wu, X., et al., *Hypothalamus-brain stem circuitry responsible for vagal efferent signaling to the pancreas evoked by hypoglycemia in rat.* J Neurophysiol, 2004. **91**(4): p. 1734-47.
215. Sivitz, W.I., et al., *Effect of acute and antecedent hypoglycemia on sympathetic neural activity and catecholamine responsiveness in normal rats.* Diabetes, 2001. **50**(5): p. 1119-25.
216. Bamshad, M., et al., *Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue.* Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 2): p. R291-9.
217. Bartness, T.J., et al., *Brain-adipose tissue cross talk.* Proc Nutr Soc, 2005. **64**(1): p. 53-64.
218. Lam, T.K., et al., *Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism.* Science, 2005. **309**(5736): p. 943-7.
219. Haque, M.S., et al., *Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats.* Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1706-12.
220. Shiuchi, T., et al., *Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system.* Cell Metab, 2009. **10**(6): p. 466-80.
221. Berthoud, H.R. and B. Jeanrenaud, *Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats.* Endocrinology, 1979. **105**(1): p. 146-51.
222. Ramadori, G., et al., *SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance.* Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 301-12.
223. Chan, O., et al., *Blockade of GABA(A) receptors in the ventromedial hypothalamus further stimulates glucagon and sympathoadrenal but not the hypothalamo-pituitary-adrenal response to hypoglycemia.* Diabetes, 2006. **55**(4): p. 1080-7.

224. Minokoshi, Y., et al., *AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus.* Nature, 2004. **428**(6982): p. 569-74.
225. Kalsbeek, A., et al., *Circadian control of the daily plasma glucose rhythm: an interplay of GABA and glutamate.* PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3194.
226. Oishi, K. and N. Itoh, *Disrupted daily light–dark cycle induces the expression of hepatic gluconeogenic regulatory genes and hyperglycemia with glucose intolerance in mice.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **432**(1): p. 111-115.
227. Paranjape, S.A., et al., *Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **301**(5): p. E978-83.
228. Konner, A.C., et al., *Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production.* Cell Metab, 2007. **5**(6): p. 438-49.
229. Berglund, E.D., et al., *Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice.* J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 1000-9.
230. Huo, L., et al., *Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons.* Cell Metab, 2009. **9**(6): p. 537-47.
231. Goncalves, G.H., et al., *Hypothalamic agouti-related peptide neurons and the central melanocortin system are crucial mediators of leptin's antidiabetic actions.* Cell Rep, 2014. **7**(4): p. 1093-103.
232. Roman, E.A., et al., *Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism.* Mol Cell Endocrinol, 2010. **314**(1): p. 62-9.
233. Sudo, M., Y. Minokoshi, and T. Shimazu, *Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats.* Am J Physiol, 1991. **261**(3 Pt 1): p. E298-303.
234. Baumgartner, I., et al., *Hepatic-portal vein infusions of glucagon-like peptide-1 reduce meal size and increase c-Fos expression in the nucleus tractus solitarii, area postrema and central nucleus of the amygdala in rats.* J Neuroendocrinol, 2010. **22**(6): p. 557-63.
235. Parker, J.A., et al., *Glucagon and GLP-1 inhibit food intake and increase c-fos expression in similar appetite regulating centres in the brainstem and amygdala.* Int J Obes (Lond), 2013. **37**(10): p. 1391-8.
236. Lerche, S., et al., *Glucagon-like peptide-1 inhibits blood-brain glucose transfer in humans.* Diabetes, 2008. **57**(2): p. 325-31.
237. Shi, X., et al., *Central GLP-2 enhances hepatic insulin sensitivity via activating PI3K signaling in POMC neurons.* Cell Metab, 2013. **18**(1): p. 86-98.
238. Knauf, C., et al., *Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3554-63.
239. Mighiu, P.I., et al., *Hypothalamic glucagon signaling inhibits hepatic glucose production.* Nat Med, 2013. **19**(6): p. 766-72.
240. Larsen, P.J., N. Vrang, and M. Tang-Christensen, *Central pre-proglucagon derived peptides: opportunities for treatment of obesity.* Curr Pharm Des, 2003. **9**(17): p. 1373-82.
241. Leloup, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing.* Diabetes, 2006. **55**(7): p. 2084-90.
242. Niijima, A., H. Kannan, and H. Yamashita, *Neural control of blood glucose homeostasis; effect of microinjection of glucose into hypothalamic nuclei on efferent activity of pancreatic branch of vagus nerve in the rat.* Brain Res Bull, 1988. **20**(6): p. 811-5.
243. Leloup, C., et al., *Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion.* Brain Res Mol Brain Res, 1998. **57**(2): p. 275-80.
244. Lam, T.K., et al., *Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis.* Nat Med, 2005. **11**(3): p. 320-7.
245. Ibrahim, N., et al., *Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels.* Endocrinology, 2003. **144**(4): p. 1331-40.
246. Joly-Amado, A., et al., *Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning.* EMBO J, 2012. **31**(22): p. 4276-88.
247. Borg, M.A., et al., *Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats.* J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 361-5.
248. Arluison, M., et al., *Distribution and anatomical localization of the glucose transporter 2 (GLUT2) in the adult rat brain--an immunohistochemical study.* J Chem Neuroanat, 2004. **28**(3): p. 117-36.
249. Marty, N., et al., *Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors.* J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3545-53.
250. Bady, I., et al., *Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding.* Diabetes, 2006. **55**(4): p. 988-95.
251. Kim, J.G., et al., *Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding.* Nat Neurosci, 2014. **17**(7): p. 908-10.
252. Chari, M., et al., *Glucose transporter-1 in the hypothalamic glial cells mediates glucose sensing to regulate glucose production in vivo.* Diabetes, 2011. **60**(7): p. 1901-6.

253. Ainscow, E.K., et al., *Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels.* J Physiol, 2002. **544**(Pt 2): p. 429-45.
254. Canis, M., et al., *Increased densities of monocarboxylate transporter MCT1 after chronic hyperglycemia in rat brain.* Brain Res, 2009. **1257**: p. 32-9.
255. Pierre, K., et al., *Enhanced expression of three monocarboxylate transporter isoforms in the brain of obese mice.* J Physiol, 2007. **583**(Pt 2): p. 469-86.
256. Ionescu, E., et al., *Increases in plasma insulin levels in response to electrical stimulation of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve.* Endocrinology, 1983. **112**(3): p. 904-10.
257. Wan, S., F.H. Coleman, and R.A. Travagli, *Glucagon-like peptide-1 excites pancreas-projecting preganglionic vagal motoneurons.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1474-82.
258. Wilson, T.H. and R.K. Crane, *The specificity of sugar transport by hamster intestine.* Biochim Biophys Acta, 1958. **29**(1): p. 30-2.
259. Drozdowski, L.A. and A.B.R. Thomson, *Intestinal sugar transport.* World Journal of Gastroenterology : WJG, 2006. **12**(11): p. 1657-1670.
260. Riklis, E. and J.H. Quastel, *Effects of cations on sugar absorption by isolated surviving guinea pig intestine.* Can J Biochem Physiol, 1958. **36**(3): p. 347-62.
261. Wild, G.E., et al., *Small intestinal Na+,K+-adenosine triphosphatase activity and gene expression in experimental diabetes mellitus.* Dig Dis Sci, 1999. **44**(2): p. 407-14.
262. Baud, G., et al., *Bile Diversion in Roux-en-Y Gastric Bypass Modulates Sodium-Dependent Glucose Intestinal Uptake.* Cell Metab, 2016. **23**(3): p. 547-53.
263. Elfeber, K., et al., *Localization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier.* Histochem Cell Biol, 2004. **121**(3): p. 201-7.
264. Miyamoto, K., et al., *Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars.* Biochem J, 1993. **295 ( Pt 1)**: p. 211-5.
265. Margolskee, R.F., et al., *T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na+-glucose cotransporter 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(38): p. 15075-80.
266. Sharp, P.A. and E.S. Debnam, *The role of cyclic AMP in the control of sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes.* Exp Physiol, 1994. **79**(2): p. 203-14.
267. Stumpel, F., B. Scholtka, and K. Jungermann, *A new role for enteric glucagon-37: acute stimulation of glucose absorption in rat small intestine.* FEBS Lett, 1997. **410**(2-3): p. 515-9.
268. Aschenbach, J.R., T. Borau, and G. Gabel, *Glucose uptake via SGLT-1 is stimulated by beta(2)-adrenoceptors in the ruminal epithelium of sheep.* J Nutr, 2002. **132**(6): p. 1254-7.
269. Stumpel, F., et al., *Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption via hepatoenteral nerves in the rat.* Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1863-9.
270. Dyer, J., et al., *Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(2): p. G241-8.
271. Osswald, C., et al., *Mice without the regulator gene Rsc1A1 exhibit increased Na+-D-glucose cotransport in small intestine and develop obesity.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(1): p. 78-87.
272. Wright, E.M., E. Turk, and M.G. Martin, *Molecular basis for glucose-galactose malabsorption.* Cell Biochem Biophys, 2002. **36**(2-3): p. 115-21.
273. Wright, E.M., M.G. Martin, and E. Turk, *Intestinal absorption in health and disease--sugars.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(6): p. 943-56.
274. Mahraoui, L., et al., *Regulation of expression of the human fructose transporter (GLUT5) by cyclic AMP.* Biochem J, 1994. **301 ( Pt 1)**: p. 169-75.
275. Gouyon, F., et al., *Fructose modulates GLUT5 mRNA stability in differentiated Caco-2 cells: role of cAMP-signalling pathway and PABP (polyadenylated-binding protein)-interacting protein (Paip) 2.* Biochem J, 2003. **375**(Pt 1): p. 167-74.
276. Cui, X.L., et al., *Cyclic AMP stimulates fructose transport in neonatal rat small intestine.* J Nutr, 2004. **134**(7): p. 1697-703.
277. Fordtran, J.S., F.C. Rector, Jr., and N.W. Carter, *The mechanisms of sodium absorption in the human small intestine.* J Clin Invest, 1968. **47**(4): p. 884-900.
278. Malo, C., *Separation of two distinct Na+/D-glucose cotransport systems in the human fetal jejunum by means of their differential specificity for 3-O-methylglucose.* Biochim Biophys Acta, 1990. **1022**(1): p. 8-16.
279. Kellett, G.L. and P.A. Helliwell, *The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane.* Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 155-62.
280. Helliwell, P.A., M.G. Rumsby, and G.L. Kellett, *Intestinal sugar absorption is regulated by phosphorylation and turnover of protein kinase C betaII mediated by phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent pathways.* J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28644-50.
281. Au, A., et al., *Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2.* Biochem J, 2002. **367**(Pt 1): p. 247-54.
282. Walker, J., et al., *5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) enhances GLUT2-dependent jejunal glucose transport: a possible role for AMPK.* Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 485-91.

283. Helliwell, P.A., et al., *Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes.* Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 163-9.
284. Madara, J.L. and J.R. Pappenheimer, *Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia.* J Membr Biol, 1987. **100**(2): p. 149-64.
285. Rajas, F., et al., *The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats.* Gastroenterology, 1999. **117**(1): p. 132-9.
286. Croset, M., et al., *Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ.* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 740-6.
287. Mithieux, G., et al., *Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2006. **143**(2): p. 195-200.
288. Mutel, E., et al., *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. **60**(12): p. 3121-31.
289. Penhoat, A., et al., *Intestinal gluconeogenesis is crucial to maintain a physiological fasting glycemia in the absence of hepatic glucose production in mice.* Metabolism, 2014. **63**(1): p. 104-11.
290. Fiserova-Bergerova, V., *Inhalation anesthesia using physiologically based pharmacokinetic models.* Drug Metab Rev, 1992. **24**(4): p. 531-57.
291. Mithieux, G., et al., *Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein.* Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 321-9.
292. Gerich, J.E., *Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications.* Diabet Med, 2010. **27**(2): p. 136-42.
293. Rahmoune, H., et al., *Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes.* Diabetes, 2005. **54**(12): p. 3427-34.
294. Santer, R. and J. Calado, *Familial renal glucosuria and SGLT2: from a mendelian trait to a therapeutic target.* Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(1): p. 133-41.
295. Rieg, T., et al., *Increase in SGLT1-mediated transport explains renal glucose reabsorption during genetic and pharmacological SGLT2 inhibition in euglycemia.* Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **306**(2): p. F188-93.
296. Powell, D.R., et al., *Improved glycemic control in mice lacking Sglt1 and Sglt2.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(2): p. E117-30.
297. Gerich, J.E., et al., *Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis.* Diabetes Care, 2001. **24**(2): p. 382-91.
298. Stumvoll, M., et al., *Renal glucose production and utilization: new aspects in humans.* Diabetologia, 1997. **40**(7): p. 749-57.
299. Meyer, C., et al., *Effects of physiological hyperinsulinemia on systemic, renal, and hepatic substrate metabolism.* Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 2): p. F915-21.
300. George, A.M., A.G. Jacob, and L. Fogelfeld, *Lean diabetes mellitus: An emerging entity in the era of obesity.* World J Diabetes, 2015. **6**(4): p. 613-20.
301. Kiani, I.G., et al., *Frequency of Metabolic Syndrome in Type-2 Diabetes Mellitus.* J Ayub Med Coll Abbottabad, 2016. **28**(1): p. 59-62.
302. !!! INVALID CITATION !!! .
303. Holman, R.R., *Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states.* Diabetes Res Clin Pract, 1998. **40 Suppl**: p. S21-5.
304. Steil, G.M., et al., *Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(5): p. E788-96.
305. Minn, A.H., et al., *Increased insulin translation from an insulin splice-variant overexpressed in diabetes, obesity, and insulin resistance.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(3): p. 794-803.
306. van Citters, G.W., et al., *Elevated glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide, but not glucose, associated with hyperinsulinemic compensation for fat feeding.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5191-8.
307. van Haeften, T.W. and T.B. Twickler, *Insulin-like growth factors and pancreas beta cells.* Eur J Clin Invest, 2004. **34**(4): p. 249-55.
308. Jetton, T.L., et al., *Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase.* Diabetes, 2005. **54**(8): p. 2294-304.
309. Hardy, S., et al., *Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40.* J Biol Chem, 2005. **280**(14): p. 13285-91.
310. Nolan, C.J., et al., *Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling.* Diabetologia, 2006. **49**(9): p. 2120-30.
311. Chen, C., L. Bumbalo, and J.L. Leahy, *Increased catalytic activity of glucokinase in isolated islets from hyperinsulinemic rats.* Diabetes, 1994. **43**(5): p. 684-9.
312. Ahren, B., et al., *Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice.* Metabolism, 1997. **46**(1): p. 97-106.
313. Magnan, C., et al., *Lipid infusion lowers sympathetic nervous activity and leads to increased beta-cell responsiveness to glucose.* J Clin Invest, 1999. **103**(3): p. 413-9.
314. Gunton, J.E., et al., *Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes.* Cell, 2005. **122**(3): p. 337-49.
315. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes.* J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1802-12.

316. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.* Diabetes, 2003. **52**(1): p. 102-10.
317. Zhao, N.Q., et al., *[Role of apoptosis and mitochondrial apoptotic pathway in glucolipotoxicity-induced islet beta-cell dysfunction].* Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008. **28**(11): p. 2009-13.
318. Krauss, S., et al., *Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction.* J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1831-42.
319. Lameloise, N., et al., *Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 803-9.
320. Ihara, Y., et al., *Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes.* Diabetes, 1999. **48**(4): p. 927-32.
321. Matsuoka, T., et al., *Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells.* J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 144-50.
322. Miyata, T., et al., *Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1.* J Clin Invest, 1994. **93**(2): p. 521-8.
323. Olson, L.K., et al., *Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein.* J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 514-9.
324. Kharroubi, I., et al., *Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: role of nuclear factor-kappaB and endoplasmic reticulum stress.* Endocrinology, 2004. **145**(11): p. 5087-96.
325. Maedler, K., et al., *Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function.* Diabetes, 2003. **52**(3): p. 726-33.
326. El-Assaad, W., et al., *Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death.* Endocrinology, 2003. **144**(9): p. 4154-63.
327. Maedler, K., et al., *Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function.* Diabetes, 2001. **50**(1): p. 69-76.
328. Cnop, M., et al., *Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation.* Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1771-7.
329. Busch, A.K., et al., *Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipoapoptosis.* Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2917-24.
330. Samuel, V.T., *Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance.* Trends Endocrinol Metab, 2011. **22**(2): p. 60-5.
331. Lafontan, M. and D. Langin, *Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue.* Prog Lipid Res, 2009. **48**(5): p. 275-97.
332. Jo, J., et al., *Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth.* PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3): p. e1000324.
333. Vidal-Puig, A., et al., *Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents.* J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2553-61.
334. Capeau, J., et al., *Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies.* Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 1073-7.
335. Despres, J.P. and I. Lemieux, *Abdominal obesity and metabolic syndrome.* Nature, 2006. **444**(7121): p. 881-7.
336. Arner, P., *Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues.* Ann Med, 1995. **27**(4): p. 435-8.
337. Ong, J.M. and P.A. Kern, *Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue.* J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 305-11.
338. Schipper, H.S., et al., *Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism.* Trends Endocrinol Metab, 2012. **23**(8): p. 407-15.
339. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes.* Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-3246.
340. Lumeng, C.N., et al., *Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes.* Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3239-46.
341. Feuerer, M., et al., *Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters.* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 930-9.
342. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1.* Science, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
343. Gao, Z., et al., *Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes.* Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 2024-34.
344. Hirosumi, J., et al., *A central role for JNK in obesity and insulin resistance.* Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
345. Nakamura, T., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis.* Cell, 2010. **140**(3): p. 338-48.
346. Yuan, M., et al., *Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta.* Science, 2001. **293**(5535): p. 1673-7.
347. Aguirre, V., et al., *Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action.* J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1531-7.

348. Odegaard, J.I. and A. Chawla, *Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis.* Science, 2013. **339**(6116): p. 172-7.
349. Pfeiffer, A., et al., *Circulating tumor necrosis factor alpha is elevated in male but not in female patients with type II diabetes mellitus.* Horm Metab Res, 1997. **29**(3): p. 111-4.
350. Hotamisligil, G.S., et al., *IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance.* Science, 1996. **271**(5249): p. 665-8.
351. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.* Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
352. Ventre, J., et al., *Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice.* Diabetes, 1997. **46**(9): p. 1526-31.
353. Jager, J., et al., *Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression.* Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 241-51.
354. He, J., et al., *Interleukin-1alpha inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes.* Mol Endocrinol, 2006. **20**(1): p. 114-24.
355. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects.* J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45777-84.
356. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase.* Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
357. Reynolds, C.M., et al., *Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells—implications for diet-induced insulin resistance.* Molecular Nutrition & Food Research, 2012. **56**(8): p. 1212-1222.
358. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4.* J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
359. Holland, W.L., et al., *Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1858-70.
360. Jornayvaz, F.R. and G.I. Shulman, *Diacylglycerol activation of protein kinase Cepsilon and hepatic insulin resistance.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 574-84.
361. Wong, S.W., et al., *Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner.* J Biol Chem, 2009. **284**(40): p. 27384-92.
362. Finucane, O.M., et al., *Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1beta secretion and insulin resistance despite obesity.* Diabetes, 2015. **64**(6): p. 2116-28.
363. Oh, D.Y., et al., *GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects.* Cell, 2010. **142**(5): p. 687-98.
364. Oh da, Y., et al., *A Gpr120-selective agonist improves insulin resistance and chronic inflammation in obese mice.* Nat Med, 2014. **20**(8): p. 942-7.
365. Rosqvist, F., et al., *Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans.* Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2356-68.
366. Jans, A., et al., *Impact of dietary fat quantity and quality on skeletal muscle fatty acid metabolism in subjects with the metabolic syndrome.* Metabolism, 2012. **61**(11): p. 1554-65.
367. Davis, S.D., *Radiology of the pleural fissures: an historical perspective.* Clin Imaging, 1992. **16**(4): p. 277-8.
368. Schubert, K.M., M.P. Scheid, and V. Duronio, *Ceramide inhibits protein kinase B/Akt by promoting dephosphorylation of serine 473.* J Biol Chem, 2000. **275**(18): p. 13330-5.
369. Muoio, D.M. and P.D. Neufer, *Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle.* Cell Metab, 2012. **15**(5): p. 595-605.
370. Unger, R.H. and L. Orci, *The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus.* Lancet, 1975. **1**(7897): p. 14-6.
371. Baron, A.D., et al., *Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics.* Diabetes, 1987. **36**(3): p. 274-83.
372. Li, X.C., T.D. Liao, and J.L. Zhuo, *Long-term hyperglucagonaemia induces early metabolic and renal phenotypes of Type 2 diabetes in mice.* Clin Sci (Lond), 2008. **114**(9): p. 591-601.
373. Reaven, G.M., et al., *Documentation of hyperglucagonemia throughout the day in nonobese and obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus.* J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(1): p. 106-10.
374. Larsson, H. and B. Ahren, *Islet dysfunction in insulin resistance involves impaired insulin secretion and increased glucagon secretion in postmenopausal women with impaired glucose tolerance.* Diabetes Care, 2000. **23**(5): p. 650-7.
375. Lee, Y., et al., *Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 13217-22.
376. Dinneen, S., et al., *Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM.* Diabetologia, 1995. **38**(3): p. 337-43.
377. Zhang, Q., et al., *Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes.* Cell Metab, 2013. **18**(6): p. 871-82.
378. Zhou, H., et al., *Reversal of defective glucagon responses to hypoglycemia in insulin-dependent autoimmune diabetic BB rats.* Endocrinology, 2007. **148**(6): p. 2863-9.

379. Chastain, M.A., *The glucagonoma syndrome: a review of its features and discussion of new perspectives.* Am J Med Sci, 2001. **321**(5): p. 306-20.
380. Burcelin, R., et al., *In vivo and in vitro regulation of hepatic glucagon receptor mRNA concentration by glucose metabolism.* J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8088-93.
381. Portois, L., et al., *Identification of a glucose response element in the promoter of the rat glucagon receptor gene.* J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8181-90.
382. Svoboda, M., L. Portois, and W.J. Malaisse, *Glucose regulation of the expression of the glucagon receptor gene.* Mol Genet Metab, 1999. **68**(2): p. 258-67.
383. Charbonneau, A., C.G. Unson, and J.M. Lavoie, *High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise.* J Physiol, 2007. **579**(Pt 1): p. 255-67.
384. Bhathena, S.J., et al., *Decreased glucagon receptors in diabetic rat hepatocytes. Evidence for regulation of glucagon receptors by hyperglucagonemia.* J Clin Invest, 1978. **61**(6): p. 1488-97.
385. Joshi, R.L., et al., *Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality.* EMBO J, 1996. **15**(7): p. 1542-7.
386. Araki, E., et al., *Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene.* Nature, 1994. **372**(6502): p. 186-90.
387. Bruning, J.C., et al., *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles.* Cell, 1997. **88**(4): p. 561-72.
388. Bruning, J.C., et al., *A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance.* Mol Cell, 1998. **2**(5): p. 559-69.
389. LeRoith, D. and O. Gavrilova, *Mouse models created to study the pathophysiology of Type 2 diabetes.* Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(5-6): p. 904-12.
390. Zisman, A., et al., *Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance.* Nat Med, 2000. **6**(8): p. 924-8.
391. Bluher, M., et al., *Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance.* Dev Cell, 2002. **3**(1): p. 25-38.
392. Kulkarni, R.N., et al., *Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes.* Cell, 1999. **96**(3): p. 329-39.
393. Landowski, L.M., et al., *Axonopathy in peripheral neuropathies: Mechanisms and therapeutic approaches for regeneration.* J Chem Neuroanat, 2016.
394. Zochodne, D.W., *Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms.* Muscle Nerve, 2007. **36**(2): p. 144-66.
395. Vinik, A.I., et al., *Diabetic autonomic neuropathy.* Diabetes Care, 2003. **26**(5): p. 1553-79.
396. Dyck, P.J., et al., *Capillary number and percentage closed in human diabetic sural nerve.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(8): p. 2513-7.
397. Korthals, J.K., M.A. Gieron, and P.J. Dyck, *Intima of epineurial arterioles is increased in diabetic polyneuropathy.* Neurology, 1988. **38**(10): p. 1582-6.
398. Timperley, W.R., et al., *Small vessel disease in progressive diabetic neuropathy associated with good metabolic control.* J Clin Pathol, 1985. **38**(9): p. 1030-8.
399. Williams, E., et al., *Electron microscopical studies of vessels in diabetic peripheral neuropathy.* J Clin Pathol, 1980. **33**(5): p. 462-70.
400. Bucala, R., K.J. Tracey, and A. Cerami, *Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes.* J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 432-8.
401. Kihara, M. and P.A. Low, *Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy.* Exp Neurol, 1995. **132**(2): p. 180-5.
402. Xu, Q.G., et al., *Local sensory ganglion ischemia induced by endothelin vasoconstriction: vulnerability of diabetic neurons and microvessels.* Neuroscience, 2003. **122**(4): p. 897-905.
403. Zochodne, D.W., C. Cheng, and H. Sun, *Diabetes increases sciatic nerve susceptibility to endothelin-induced ischemia.* Diabetes, 1996. **45**(5): p. 627-32.
404. Stevens, E.J., A.L. Carrington, and D.R. Tomlinson, *Nerve ischaemia in diabetic rats: time-course of development, effect of insulin treatment plus comparison of streptozotocin and BB models.* Diabetologia, 1994. **37**(1): p. 43-8.
405. Cherian, P.V., et al., *Nodal Na(+)-channel displacement is associated with nerve-conduction slowing in the chronically diabetic BB/W rat: prevention by aldose reductase inhibition.* J Diabetes Complications, 1996. **10**(4): p. 192-200.
406. Greene, D.A., S.A. Lattimer, and A.A. Sima, *Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications.* N Engl J Med, 1987. **316**(10): p. 599-606.
407. Roberts, R.E. and W.G. McLean, *Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats.* Brain Res, 1997. **754**(1-2): p. 147-56.
408. Duzhyy, D.E., et al., *Upregulation of T-type Ca2+ channels in long-term diabetes determines increased excitability of a specific type of capsaicin-insensitive DRG neurons.* Mol Pain, 2015. **11**: p. 29.
409. Huang, Y., et al., *The role of TNF-alpha/NF-kappa B pathway on the up-regulation of voltage-gated sodium channel Nav1.7 in DRG neurons of rats with diabetic neuropathy.* Neurochem Int, 2014. **75**: p. 112-9.
410. Chandna, A.R., et al., *RAGE mediates the inactivation of nAChRs in sympathetic neurons under high glucose conditions.* Eur J Neurosci, 2015. **41**(3): p. 341-51.

411. Vincent, A.M., et al., *Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy.* Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 612-28.
412. Zochodne, D.W., et al., *Nitric oxide synthase activity and expression in experimental diabetic neuropathy.* J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(9): p. 798-807.
413. Zochodne, D.W., et al., *Does diabetes target ganglion neurones? Progressive sensory neurone involvement in long-term experimental diabetes.* Brain, 2001. **124**(Pt 11): p. 2319-34.
414. Guo, C., et al., *Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat.* Neurogastroenterol Motil, 2004. **16**(3): p. 335-45.
415. Cheng, C. and D.W. Zochodne, *Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes.* Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2363-71.
416. Liuzzi, F.J., S.M. Bufton, and A.I. Vinik, *Streptozotocin-induced diabetes mellitus causes changes in primary sensory neuronal cytoskeletal mRNA levels that mimic those caused by axotomy.* Exp Neurol, 1998. **154**(2): p. 381-8.
417. Terada, M., H. Yasuda, and R. Kikkawa, *Delayed Wallerian degeneration and increased neurofilament phosphorylation in sciatic nerves of rats with streptozocin-induced diabetes.* J Neurol Sci, 1998. **155**(1): p. 23-30.
418. Yagihashi, S., M. Kamijo, and K. Watanabe, *Reduced myelinated fiber size correlates with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats.* Am J Pathol, 1990. **136**(6): p. 1365-73.
419. Sayers, N.M., et al., *Neurotrophin-3 prevents the proximal accumulation of neurofilament proteins in sensory neurons of streptozocin-induced diabetic rats.* Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2372-80.
420. Brussee, V., F.A. Cunningham, and D.W. Zochodne, *Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy.* Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1824-30.
421. Sposato, V., et al., *Streptozotocin-induced diabetes is associated with changes in NGF levels in pancreas and brain.* Arch Ital Biol, 2007. **145**(2): p. 87-97.
422. Xu, G. and A.A. Sima, *Altered immediate early gene expression in injured diabetic nerve: implications in regeneration.* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(10): p. 972-83.
423. Kennedy, J.M. and D.W. Zochodne, *Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus.* J Peripher Nerv Syst, 2005. **10**(2): p. 144-57.
424. Ewing, D.J., et al., *Autonomic neuropathy, QT interval lengthening, and unexpected deaths in male diabetic patients.* Diabetologia, 1991. **34**(3): p. 182-5.
425. Purkayastha, S. and D. Cai, *Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome.* Mol Metab, 2013. **2**(4): p. 356-63.
426. Arruda, A.P., et al., *Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion.* Endocrinology, 2011. **152**(4): p. 1314-26.
427. Valdearcos, M., et al., *Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function.* Cell Rep, 2014. **9**(6): p. 2124-38.
428. Horvath, T.L., et al., *Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14875-80.
429. Castro, G., et al., *Diet-induced obesity induces endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the amygdala of rats.* FEBS Open Bio, 2013. **3**: p. 443-9.
430. Purkayastha, S., G. Zhang, and D. Cai, *Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK-beta and NF-kappaB.* Nat Med, 2011. **17**(7): p. 883-7.
431. Purkayastha, S., et al., *Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 2939-44.
432. Habchi, M., et al., *Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control.* Clin Endocrinol (Oxf), 2014. **81**(5): p. 696-701.
433. Drougard, A., et al., *Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes.* Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(4): p. 557-73.
434. Meng, Q. and D. Cai, *Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway.* J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32324-32.
435. Kleinridders, A., et al., *MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity.* Cell Metab, 2009. **10**(4): p. 249-59.
436. Burgos-Ramos, E., et al., *Differential insulin receptor substrate-1 (IRS1)-related modulation of neuropeptide Y and proopiomelanocortin expression in nondiabetic and diabetic IRS2-/- mice.* Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1129-40.
437. Fuente-Martin, E., et al., *Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes.* J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 3900-13.
438. Fuente-Martin, E., et al., *Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **302**(12): p. E1586-98.
439. Tsang, R., Z. Ao, and C. Cheeseman, *Influence of vascular and luminal hexoses on rat intestinal basolateral glucose transport.* Can J Physiol Pharmacol, 1994. **72**(4): p. 317-26.
440. Dyer, J., et al., *Changes in the levels of intestinal Na+/glucose co-transporter (SGLT1) in experimental diabetes.* Biochem Soc Trans, 1997. **25**(3): p. 479S.
441. Fedorak, R.N., et al., *Altered glucose carrier expression: mechanism of intestinal adaptation during streptozocin-induced diabetes in rats.* Am J Physiol, 1991. **261**(4 Pt 1): p. G585-91.
442. Lorenz-Meyer, H., et al., *Structural and functional studies on the transformation of the intestinal mucosa in rats with experimental diabetes.* Res Exp Med (Berl), 1977. **170**(2): p. 89-99.

443. Ferraris, R.P., D.M. Casirola, and R.R. Vinnakota, *Dietary carbohydrate enhances intestinal sugar transport in diabetic mice.* Diabetes, 1993. **42**(11): p. 1579-87.
444. Damci, T., et al., *Increased intestinal permeability as a cause of fluctuating postprandial blood glucose levels in Type 1 diabetic patients.* Eur J Clin Invest, 2003. **33**(5): p. 397-401.
445. Lee, Y.J., Y.J. Lee, and H.J. Han, *Regulatory mechanisms of Na(+)/glucose cotransporters in renal proximal tubule cells.* Kidney Int Suppl, 2007(106): p. S27-35.
446. Vestri, S., et al., *Changes in sodium or glucose filtration rate modulate expression of glucose transporters in renal proximal tubular cells of rat.* J Membr Biol, 2001. **182**(2): p. 105-12.
447. Mogensen, C.E., *Maximum tubular reabsorption capacity for glucose and renal hemodynamcis during rapid hypertonic glucose infusion in normal and diabetic subjects.* Scand J Clin Lab Invest, 1971. **28**(1): p. 101-9.
448. Chang, A.Y. and D.I. Schneider, *Rate of gluconeogenesis and levels of gluconeogenic enzymes in liver and kidney of diabetic and normal Chinese hamsters.* Biochim Biophys Acta, 1970. **222**(3): p. 587-92.
449. Triscari, J., et al., *Carbohydrate metabolism in lean and obese Zucker rats.* Metabolism, 1979. **28**(2): p. 183-9.
450. Meyer, C., et al., *Abnormal renal and hepatic glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus.* J Clin Invest, 1998. **102**(3): p. 619-24.
451. Krebs, H.A., R.N. Speake, and R. Hems, *Acceleration of Renal Gluconeogenesis by Ketone Bodies and Fatty Acids.* Biochem J, 1965. **94**: p. 712-20.
452. Furness, J.B., W.A. Kunze, and N. Clerc, *Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses.* Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 1): p. G922-8.
453. Ferraris, R.P. and J. Diamond, *Regulation of intestinal sugar transport.* Physiol Rev, 1997. **77**(1): p. 257-302.
454. Kunzelmann, K. and M. Mall, *Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease.* Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 245-89.
455. Kaji, I., et al., *SCFA transport in rat duodenum.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **308**(3): p. G188-97.
456. Drover, V.A., et al., *CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood.* J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1290-7.
457. Shim, J., et al., *Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice.* J Lipid Res, 2009. **50**(3): p. 491-500.
458. Stremmel, W., *Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein.* J Clin Invest, 1988. **82**(6): p. 2001-10.
459. Jia, L., J.L. Betters, and L. Yu, *Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport.* Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 239-59.
460. Broer, S., *Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia.* Physiol Rev, 2008. **88**(1): p. 249-86.
461. Peng, X., et al., *Effects of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients.* Burns, 2004. **30**(2): p. 135-9.
462. Li, N. and J. Neu, *Glutamine deprivation alters intestinal tight junctions via a PI3-K/Akt mediated pathway in Caco-2 cells.* J Nutr, 2009. **139**(4): p. 710-4.
463. Ding, L.A. and J.S. Li, *Effects of glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation in TPN-rats with endotoxemia.* World J Gastroenterol, 2003. **9**(6): p. 1327-32.
464. Watanabe, J., et al., *Isolation of tryptophan as an inhibitor of ovalbumin permeation and analysis of its suppressive effect on oral sensitization.* Biosci Biotechnol Biochem, 2004. **68**(1): p. 59-65.
465. Usami, M., et al., *Effect of gamma-linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation.* Nutrition, 2003. **19**(2): p. 150-6.
466. Suzuki, T., S. Yoshida, and H. Hara, *Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability.* Br J Nutr, 2008. **100**(2): p. 297-305.
467. Ye, D., I. Ma, and T.Y. Ma, *Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **290**(3): p. G496-504.
468. Mankertz, J., et al., *Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma.* J Cell Sci, 2000. **113 ( Pt 11)**: p. 2085-90.
469. Musch, M.W., et al., *T cell activation causes diarrhea by increasing intestinal permeability and inhibiting epithelial Na+/K+-ATPase.* J Clin Invest, 2002. **110**(11): p. 1739-47.
470. Madsen, K.L., et al., *Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora.* Inflamm Bowel Dis, 1999. **5**(4): p. 262-70.
471. Yamada, T., et al., *Serotonin stimulates endotoxin translocation via 5-HT3 receptors in the rat ileum.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(5): p. G782-8.
472. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability.* Gut, 2009. **58**(8): p. 1091-103.
473. Viana, M.L., et al., *The role of L-arginine-nitric oxide pathway in bacterial translocation.* Amino Acids, 2013. **45**(5): p. 1089-96.
474. Berkes, J., et al., *Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation.* Gut, 2003. **52**(3): p. 439-51.
475. Kozakova, H., et al., *Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization.* Cell Mol Immunol, 2016. **13**(2): p. 251-62.

476. Brun, P., et al., *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G518-25.
477. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
478. Cani, P.D., et al., *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia.* Diabetologia, 2007. **50**(11): p. 2374-83.
479. Wang, Z., et al., *The role of bifidobacteria in gut barrier function after thermal injury in rats.* J Trauma, 2006. **61**(3): p. 650-7.
480. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis.* Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
481. Denou, E., et al., *Defective NOD2 peptidoglycan sensing promotes diet-induced inflammation, dysbiosis, and insulin resistance.* EMBO Mol Med, 2015. **7**(3): p. 259-74.
482. Liou, A.P., et al., *The extracellular calcium-sensing receptor is required for cholecystokinin secretion in response to L-phenylalanine in acutely isolated intestinal I cells.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(4): p. G538-46.
483. Parker, H.E., et al., *Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells.* Diabetologia, 2009. **52**(2): p. 289-98.
484. Reimann, F., et al., *Glucose sensing in L cells: a primary cell study.* Cell Metab, 2008. **8**(6): p. 532-9.
485. Reimann, F., G. Tolhurst, and F.M. Gribble, *G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation.* Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 421-31.
486. Jang, H.J., et al., *Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(38): p. 15069-74.
487. Freeman, S.L., et al., *Luminal glucose sensing in the rat intestine has characteristics of a sodium-glucose cotransporter.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(3): p. G439-45.
488. Gribble, F.M., et al., *A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line.* Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1147-54.
489. Tolhurst, G., et al., *Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca2+ and cAMP.* Endocrinology, 2011. **152**(2): p. 405-13.
490. Matsumura, K., et al., *Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion.* Biochem Biophys Res Commun, 2005. **336**(4): p. 1028-32.
491. Duca, F.A. and T.K. Lam, *Gut microbiota, nutrient sensing and energy balance.* Diabetes Obes Metab, 2014. **16 Suppl 1**: p. 68-76.
492. Duca, F.A., et al., *Increased oral detection, but decreased intestinal signaling for fats in mice lacking gut microbiota.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39748.
493. Tolhurst, G., et al., *Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2.* Diabetes, 2012. **61**(2): p. 364-71.
494. Akiba, Y., et al., *Short-chain fatty acid sensing in rat duodenum.* J Physiol, 2015. **593**(3): p. 585-99.
495. Everard, A. and P.D. Cani, *Gut microbiota and GLP-1.* Rev Endocr Metab Disord, 2014. **15**(3): p. 189-96.
496. Everard, A., et al., *Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice.* Diabetes, 2011. **60**(11): p. 2775-86.
497. Palazzo, M., et al., *Activation of enteroendocrine cells via TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4296-303.
498. Nguyen, A.T., et al., *Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway.* Diabetes, 2014. **63**(2): p. 471-82.
499. Kahles, F., et al., *GIP secretion is induced by inflammatory stimuli in an IL-1-dependent manner in mice.* Diabetes Obes Metab, 2016.
500. Kidd, M., et al., *IL1beta- and LPS-induced serotonin secretion is increased in EC cells derived from Crohn's disease.* Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(4): p. 439-50.
501. Bogunovic, M., et al., *Enteroendocrine cells express functional Toll-like receptors.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(6): p. G1770-83.
502. Fredborg, M., et al., *G protein-coupled receptor120 (GPR120) transcription in intestinal epithelial cells is significantly affected by bacteria belonging to the Bacteroides, Proteobacteria, and Firmicutes phyla.* J Anim Sci, 2012. **90 Suppl 4**: p. 10-2.
503. Swartz, T.D., et al., *Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and sodium glucose luminal transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota.* Br J Nutr, 2012. **107**(5): p. 621-30.
504. Levi, S., et al., *Campylobacter pylori, gastrin, acid secretion, and duodenal ulcers.* Lancet, 1989. **2**(8663): p. 613.
505. Moss, S.F., et al., *Effect of Helicobacter pylori on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease.* Lancet, 1992. **340**(8825): p. 930-2.
506. Kuhre, R.E., et al., *Fructose stimulates GLP-1 but not GIP secretion in mice, rats, and humans.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014. **306**(7): p. G622-30.
507. Moriarty, P., et al., *Characterization of cholecystokininA and cholecystokininB receptors expressed by vagal afferent neurons.* Neuroscience, 1997. **79**(3): p. 905-13.
508. Schreihofer, D.A., et al., *Cholecystokinin induces Fos expression in catecholaminergic neurons of the macaque monkey caudal medulla.* Brain Res, 1997. **770**(1-2): p. 37-44.

509. Friis-Hansen, L., et al., *Impaired gastric acid secretion in gastrin-deficient mice.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 1): p. G561-8.
510. Koh, T.J., et al., *Gastrin deficiency results in altered gastric differentiation and decreased colonic proliferation in mice.* Gastroenterology, 1997. **113**(3): p. 1015-25.
511. Buchan, A.M., et al., *Mechanism of action of the calcium-sensing receptor in human antral gastrin cells.* Gastroenterology, 2001. **120**(5): p. 1128-39.
512. Walsh, J.H., C.T. Richardson, and J.S. Fordtran, *pH dependence of acid secretion and gastrin release in normal and ulcer subjects.* J Clin Invest, 1975. **55**(3): p. 462-8.
513. Kim, D.Y. and M. Camilleri, *Serotonin: a mediator of the brain-gut connection.* Am J Gastroenterol, 2000. **95**(10): p. 2698-709.
514. Rudd, P., et al., *Issues in patient compliance: the search for therapeutic sufficiency.* Cardiology, 1992. **80 Suppl 1**: p. 2-10.
515. Date, Y., et al., *The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats.* Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1120-8.
516. Fournel, A., et al., *Apelin targets gut contraction to control glucose metabolism via the brain.* Gut, 2015.
517. Dray, C., et al., *The intestinal glucose-apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice.* Gastroenterology, 2013. **144**(4): p. 771-80.
518. Wattez, J.S., et al., *Apelin stimulates both cholecystokinin and glucagon-like peptide 1 secretions in vitro and in vivo in rodents.* Peptides, 2013. **48**: p. 134-6.
519. Cani, P.D., et al., *GLUT2 and the incretin receptors are involved in glucose-induced incretin secretion.* Mol Cell Endocrinol, 2007. **276**(1-2): p. 18-23.
520. Hansen, L. and J.J. Holst, *The effects of duodenal peptides on glucagon-like peptide-1 secretion from the ileum. A duodeno--ileal loop?* Regul Pept, 2002. **110**(1): p. 39-45.
521. Lim, G.E., et al., *Insulin regulates glucagon-like peptide-1 secretion from the enteroendocrine L cell.* Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 580-91.
522. Anini, Y. and P.L. Brubaker, *Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion.* Diabetes, 2003. **52**(2): p. 252-9.
523. Anini, Y. and P.L. Brubaker, *Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells.* Endocrinology, 2003. **144**(7): p. 3244-50.
524. Hansen, L., et al., *Neural regulation of glucagon-like peptide-1 secretion in pigs.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(5): p. E939-47.
525. Ellingsgaard, H., et al., *Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells.* Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1481-9.
526. Gagnon, J., et al., *Chronic Exposure to TNFalpha Impairs Secretion of Glucagon-Like Peptide-1.* Endocrinology, 2015. **156**(11): p. 3950-60.
527. Coelho-Aguiar Jde, M., et al., *The enteric glia: identity and functions.* Glia, 2015. **63**(6): p. 921-35.
528. Bayliss, W.M. and E.H. Starling, *The movements and innervation of the small intestine.* J Physiol, 1899. **24**(2): p. 99-143.
529. LANGLEY, J.N., *THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM.* Brain, 1903. **26**(1): p. 1-26.
530. Langley, J.N. and R. Magnus, *Some observations of the movements of the intestine before and after degenerative section of the mesenteric nerves.* J Physiol, 1905. **33**(1): p. 34-51.
531. Le Douarin, N.M. and M.A. Teillet, *The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo.* J Embryol Exp Morphol, 1973. **30**(1): p. 31-48.
532. Furness, J.B. and M. Costa, *Types of nerves in the enteric nervous system.* Neuroscience, 1980. **5**(1): p. 1-20.
533. Furness, J.B., *Types of neurons in the enteric nervous system.* J Auton Nerv Syst, 2000. **81**(1-3): p. 87-96.
534. Angel, F. and M. Neunlist, *Neurones intrinsèques de l'intestin : de la structure à la fonction (partie1).* Hépato-Gastro et Oncologie Digestive, 1995. **2**(6): p. 537-44.
535. Kirchgessner, A.L. and M.D. Gershon, *Innervation of the pancreas by neurons in the gut.* J Neurosci, 1990. **10**(5): p. 1626-42.
536. Kuntz, A., *The structural organization of the inferior mesenteric ganglia.* The Journal of Comparative Neurology, 1940. **72**(2): p. 371-382.
537. Kuntz, A. and C. Van Buskirk, *Reflex inhibition of bile flow and intestinal motility mediated through decentralized celiac plexus.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1941(46): p. 519-523.
538. Crowcroft, P.J., M.E. Holman, and J.H. Szurszewski, *Excitatory input from the distal colon to the inferior mesenteric ganglion in the guinea-pig.* The Journal of Physiology, 1971. **219**(2): p. 443-461.
539. Galligan, J.J., J.B. Furness, and M. Costa, *Effects of cholinergic blockade, adrenergic blockade and sympathetic denervation on gastrointestinal myoelectric activity in guinea pig.* J Pharmacol Exp Ther, 1986. **238**(3): p. 1114-25.
540. Stark, M.E. and J.H. Szurszewski, *Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease.* Gastroenterology, 1992. **103**(6): p. 1928-49.
541. Sanders, K.M. and S.M. Ward, *Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission.* Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 1): p. G379-92.
542. Crist, J.R., X.D. He, and R.K. Goyal, *Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle.* J Physiol, 1992. **447**: p. 119-31.

543. Costa, M., et al., *Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum.* Neuroscience, 1996. **75**(3): p. 949-67.
544. Bertrand, P.P., et al., *Analysis of the responses of myenteric neurons in the small intestine to chemical stimulation of the mucosa.* Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. G422-35.
545. Kirchgessner, A.L., H. Tamir, and M.D. Gershon, *Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity.* J Neurosci, 1992. **12**(1): p. 235-48.
546. Sayegh, A.I., M. Covasa, and R.C. Ritter, *Intestinal infusions of oleate and glucose activate distinct enteric neurons in the rat.* Auton Neurosci, 2004. **115**(1-2): p. 54-63.
547. Sayegh, A.I. and R.C. Ritter, *Cholecystokinin activates specific enteric neurons in the rat small intestine.* Peptides, 2003. **24**(2): p. 237-44.
548. Kunze, W.A., et al., *Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons.* Neuroscience, 1997. **76**(2): p. 619-34.
549. Kunze, W.A., et al., *Intracellular recording from myenteric neurons of the guinea-pig ileum that respond to stretch.* J Physiol, 1998. **506 ( Pt 3)**: p. 827-42.
550. Cannon, W.B., *ŒSOPHAGEAL PERISTALSIS AFTER BILATERAL VAGOTOMY.* American Journal of Physiology -- Legacy Content, 1907. **19**(3): p. 436-444.
551. Kelly, K.A., C.F. Code, and L.R. Elveback, *Patterns of canine gastric electrical activity.* Am J Physiol, 1969. **217**(2): p. 461-70.
552. Hansen, M.B., *Neurohumoral control of gastrointestinal motility.* Physiol Res, 2003. **52**(1): p. 1-30.
553. Frokjaer, J.B., et al., *Modulation of vagal tone enhances gastroduodenal motility and reduces somatic pain sensitivity.* Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(4): p. 592-8.
554. Blanquet, F., A. Abysique, and J. Gonella, *In vivo study of the role of muscarinic receptors in the parasympathetic control of rabbit colonic motility.* J Auton Nerv Syst, 1994. **46**(3): p. 217-27.
555. Greenwood, B. and N.W. Read, *Vagal control of fluid transport, transmural potential difference, and motility in the ferret jejunum.* Am J Physiol, 1985. **249**(6 Pt 1): p. G651-4.
556. Gillis, R.A., et al., *Inhibitory control of proximal colonic motility by the sympathetic nervous system.* Am J Physiol, 1987. **253**(4 Pt 1): p. G531-9.
557. Xiao, W., et al., *Glutamate prevents intestinal atrophy via luminal nutrient sensing in a mouse model of total parenteral nutrition.* FASEB J, 2014. **28**(5): p. 2073-87.
558. Zhang, X., et al., *Regulation of transepithelial ion transport in the rat late distal colon by the sympathetic nervous system.* Physiol Res, 2015. **64**(1): p. 103-10.
559. Kim, J.J. and W.I. Khan, *5-HT7 receptor signaling: improved therapeutic strategy in gut disorders.* Front Behav Neurosci, 2014. **8**: p. 396.
560. Proietti, M., et al., *ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism.* Immunity, 2014. **41**(5): p. 789-801.
561. Matteoli, G., et al., *A distinct vagal anti-inflammatory pathway modulates intestinal muscularis resident macrophages independent of the spleen.* Gut, 2014. **63**(6): p. 938-48.
562. Wan Saudi, W.S., et al., *Neuropeptide S inhibits gastrointestinal motility and increases mucosal permeability through nitric oxide.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **309**(8): p. G625-34.
563. Dhawan, S., et al., *Cholinergic receptor activation on epithelia protects against cytokine-induced barrier dysfunction.* Acta Physiol (Oxf), 2015. **213**(4): p. 846-59.
564. Neves, A.R., et al., *Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease.* Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(3): p. 444-57.
565. Kuntz, A., *On the occurrence of reflex arcs in the myenteric and submucous plexuses.* Anat. Rec., 1922(24): p. 193-21.
566. Gershon, M.D. and A.L. Kirchgessner, *Identification, characterization and projections of intrinsic primary afferent neurones of the submucosal plexus: activity-induced expression of c-fos immunoreactivity.* J. Auton. Nerv. Syst., 1991(33): p. 185-187.
567. Kunze, W.A.A., et al., *Influence of the mucosa on the excitability of myenteric neurons.* Neuroscience, 1997. **76**(2): p. 619-634.
568. Kirchgessner, A.L., M.T. Liu, and M.D. Gershon, *In situ identification and visualization of neurons that mediate enteric and enteropancreatic reflexes.* Journal of Comparative Neurology, 1996. **371**(2): p. 270-286.
569. Kunze, W.A.A., et al., *The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation.* The Journal of Physiology, 2000. **526**(Pt 2): p. 375-385.
570. Neunlist, M., et al., *Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs.* The Journal of Physiology, 2001. **536**(Pt 3): p. 727-739.
571. Balen, D., et al., *Revised immunolocalization of the Na+-d-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2008. **295**(2): p. C475-C489.
572. Rühl, A., et al., *Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system.* The Journal of Comparative Neurology, 2005. **490**(1): p. 1-11.
573. Soret, R., et al., *Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats.* Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1772-1782.e4.

574. Michel, K., et al., *Serotonin Excites Neurons in the Human Submucous Plexus via 5-HT3 Receptors.* Gastroenterology, 2005. **128**(5): p. 1317-1326.
575. Zhu, J.X., et al., *Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat.* The Journal of Physiology, 2001. **530**(Pt 3): p. 431-442.
576. Neya, T., M. Mizutani, and T. Yamasato, *Role of 5-HT3 receptors in peristaltic reflex elicited by stroking the mucosa in the canine jejunum.* The Journal of Physiology, 1993. **471**: p. 159-173.
577. Lee, J., et al., *Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus.* American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2012. **302**(6): p. R657-R666.
578. Gulley, S., et al., *Cholecystokinin1 receptors mediate the increase in Fos-like immunoreactivity in the rat myenteric plexus following intestinal oleate infusion.* Physiology & Behavior, 2005. **86**(1–2): p. 128-135.
579. Bohórquez, D.V., et al., *Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells.* The Journal of Clinical Investigation, 2015. **125**(2): p. 782-786.
580. Xia, Y., et al., *IL-1β and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system.* Journal of Clinical Investigation, 1999. **103**(9): p. 1309-1316.
581. Nathalie, Q., et al., *Effects of tumor necrosis factor α on leptin-sensitive intestinal vagal mechanoreceptors in the cat.* Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 2013. **91**(11): p. 941-950.
582. Ammori, J.B., et al., *Effect of intestinal inflammation on neuronal survival and function in the dorsal motor nucleus of the vagus.* Surgery, 2008. **144**(2): p. 149-158.
583. Nøhr, M.K., et al., *GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as Cosensors for Short-Chain Fatty Acids in Enteroendocrine Cells vs FFAR3 in Enteric Neurons and FFAR2 in Enteric Leukocytes.* Endocrinology, 2013. **154**(10): p. 3552-3564.
584. Perry, R.J., et al., *Acetate mediates a microbiome–brain–β-cell axis to promote metabolic syndrome.* Nature, 2016. **534**(7606): p. 213-217.
585. De Vadder, F., et al., *Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits.* Cell, 2014. **156**(1–2): p. 84-96.
586. Barajon, I., et al., *Toll-like Receptors 3, 4, and 7 Are Expressed in the Enteric Nervous System and Dorsal Root Ganglia.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2009. **57**(11): p. 1013-1023.
587. Anitha, M., et al., *Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like Receptor 4 signaling.* Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 1006-1016.e4.
588. Sato, M. and H. Koyano, *Autoradiographic study on the distribution of vagal afferent nerve fibers in the gastroduodenal wall of the rabbit.* Brain Research, 1987. **400**(1): p. 101-109.
589. Berthoud, H.R., *Anatomical demonstration of vagal input to nicotinamide acetamide dinucleotide phosphate diaphorase-positive (nitrergic) neurons in rat fundic stomach.* J Comp Neurol, 1995. **358**(3): p. 428-39.
590. Perez-Burgos, A., et al., *The gut-brain axis rewired: adding a functional vagal nicotinic "sensory synapse".* FASEB J, 2014. **28**(7): p. 3064-74.
591. Gabella, G., *Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells.* Neuroscience, 1981. **6**(3): p. 425-36.
592. Hanani, M., O. Zamir, and P. Baluk, *Glial cells in the guinea pig myenteric plexus are dye coupled.* Brain Res, 1989. **497**(2): p. 245-9.
593. McClain, J.L., et al., *Ca2+ responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice.* Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 497-507 e1.
594. Savidge, T.C., et al., *Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione.* Gastroenterology, 2007. **132**(4): p. 1344-58.
595. Neunlist, M., et al., *Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(1): p. G231-41.
596. Xiao, W., et al., *GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation.* Mol Neurobiol, 2014. **50**(2): p. 274-89.
597. Xiao, W.D., et al., *The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation.* Mol Cell Neurosci, 2011. **46**(2): p. 527-34.
598. Aube, A.C., et al., *Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption.* Gut, 2006. **55**(5): p. 630-7.
599. Aikawa, H. and K. Suzuki, *Enteric gliopathy in niacin-deficiency induced by CNS glio-toxin.* Brain Research, 1985. **334**(2): p. 354-356.
600. Nasser, Y., et al., *Role of enteric glia in intestinal physiology: effects of the gliotoxin fluorocitrate on motor and secretory function.* American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2006. **291**(5): p. G912-G927.
601. Cheadle, G.A., et al., *Cholinergic signaling in the gut: a novel mechanism of barrier protection through activation of enteric glia cells.* Surg Infect (Larchmt), 2014. **15**(4): p. 387-93.
602. Geboes, K., et al., *Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease.* Gastroenterology, 1992. **103**(2): p. 439-47.
603. da Silveira, A.B., et al., *Enteroglial cells act as antigen-presenting cells in chagasic megacolon.* Hum Pathol, 2011. **42**(4): p. 522-32.

604. Turco, F., et al., *Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells.* Gut, 2014. **63**(1): p. 105-15.
605. Murakami, M., T. Ohta, and S. Ito, *Lipopolysaccharides enhance the action of bradykinin in enteric neurons via secretion of interleukin-1beta from enteric glial cells.* J Neurosci Res, 2009. **87**(9): p. 2095-104.
606. Gabanyi, I., et al., *Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages.* Cell, 2016. **164**(3): p. 378-91.
607. Liu, M.T., et al., *5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice.* J Neurosci, 2009. **29**(31): p. 9683-99.
608. Abdo, H., et al., *Enteric glial cells protect neurons from oxidative stress in part via reduced glutathione.* FASEB J, 2010. **24**(4): p. 1082-94.
609. Gulbransen, B.D. and K.A. Sharkey, *Purinergic neuron-to-glia signaling in the enteric nervous system.* Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1349-58.
610. von Boyen, G.B., et al., *Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines.* J Neuroendocrinol, 2006. **18**(11): p. 820-5.
611. Kabouridis, P.S., et al., *Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria.* Neuron, 2015. **85**(2): p. 289-95.
612. Bohorquez, D.V., et al., *Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells.* J Clin Invest, 2015. **125**(2): p. 782-6.
613. Bohorquez, D.V., et al., *An enteroendocrine cell-enteric glia connection revealed by 3D electron microscopy.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89881.
614. Covasa, M., J. Grahn, and R.C. Ritter, *Reduced hindbrain and enteric neuronal response to intestinal oleate in rats maintained on high-fat diet.* Auton Neurosci, 2000. **84**(1-2): p. 8-18.
615. Nezami, B.G., et al., *MicroRNA 375 mediates palmitate-induced enteric neuronal damage and high-fat diet-induced delayed intestinal transit in mice.* Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 473-83 e3.
616. Voss, U., et al., *Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e81413.
617. Voss, U., et al., *The enteric nervous system of P2Y13 receptor null mice is resistant against high-fat-diet- and palmitic-acid-induced neuronal loss.* Purinergic Signal, 2014. **10**(3): p. 455-64.
618. Stenkamp-Strahm, C.M., et al., *High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes.* Cell Tissue Res, 2013. **354**(2): p. 381-94.
619. Du, F., et al., *Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats.* Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(11): p. 1229-e114.
620. Anitha, M., et al., *GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway.* J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 344-56.
621. Chen, P.M., H. Gregersen, and J.B. Zhao, *Advanced glycation end-product expression is upregulated in the gastrointestinal tract of type 2 diabetic rats.* World J Diabetes, 2015. **6**(4): p. 662-72.
622. Stenkamp-Strahm, C., et al., *High-fat diet and age-dependent effects on enteric glial cell populations of mouse small intestine.* Auton Neurosci, 2013. **177**(2): p. 199-210.
623. Guy, R.J., et al., *Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy: surgical considerations and changes in vagus nerve morphology.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1984. **47**(7): p. 686-91.
624. Takahashi, T., et al., *Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats.* Gastroenterology, 1997. **113**(5): p. 1535-44.
625. Marathe, C.S., et al., *Relationships between gastric emptying, postprandial glycemia, and incretin hormones.* Diabetes Care, 2013. **36**(5): p. 1396-405.
626. Parker, H.E., et al., *Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion.* Diabetologia, 2012. **55**(9): p. 2445-55.
627. Raybould, H.E., *Sensing of glucose in the gastrointestinal tract.* Auton Neurosci, 2007. **133**(1): p. 86-90.
628. Dube, P.E. and P.L. Brubaker, *Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **293**(2): p. E460-5.
629. Tolhurst, G., F. Reimann, and F.M. Gribble, *Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion.* J Physiol, 2009. **587**(1): p. 27-32.
630. Gorboulev, V., et al., *Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion.* Diabetes, 2012. **61**(1): p. 187-96.
631. Kim, M., et al., *D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells.* Gastroenterology, 2001. **121**(6): p. 1400-6.
632. Young, R.L., et al., *Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes.* Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3532-41.
633. Bertrand, R.L., et al., *A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine.* Endocrinology, 2011. **152**(1): p. 36-47.
634. Nauck, M.A., et al., *Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down?* Diabetologia, 2011. **54**(1): p. 10-8.
635. Balen, D., et al., *Revised immunolocalization of the Na+-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody.* Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(2): p. C475-89.

636. Diez-Sampedro, A., et al., *A glucose sensor hiding in a family of transporters.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11753-8.
637. Liu, M., S. Seino, and A.L. Kirchgessner, *Identification and characterization of glucoresponsive neurons in the enteric nervous system.* J Neurosci, 1999. **19**(23): p. 10305-17.
638. Roosen, L., et al., *Specific hunger- and satiety-induced tuning of guinea pig enteric nerve activity.* J Physiol, 2012. **590**(17): p. 4321-33.
639. See, N.A. and P. Bass, *Glucose-induced ion secretion in rat jejunum: a mucosal reflex that requires integration by the myenteric plexus.* J Auton Nerv Syst, 1993. **42**(1): p. 33-40.
640. Amato, A., et al., *Role of cholinergic neurons in the motor effects of glucagon-like peptide-2 in mouse colon.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(5): p. G1038-44.
641. Amato, A., et al., *Peripheral motor action of glucagon-like peptide-1 through enteric neuronal receptors.* Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(6): p. 664-e203.
642. Yang, N., et al., *Activation of submucosal 5-HT(3) receptors elicits a somatostatin-dependent inhibition of ion secretion in rat colon.* Br J Pharmacol, 2010. **159**(8): p. 1623-5.
643. Grabauskas, G., et al., *Essential elements for glucosensing by gastric vagal afferents: immunocytochemistry and electrophysiology studies in the rat.* Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 296-307.
644. Zhou, S.Y., et al., *Inhibition of gastric motility by hyperglycemia is mediated by nodose ganglia KATP channels.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011. **300**(3): p. G394-400.
645. Vincent, K.M., J.W. Sharp, and H.E. Raybould, *Intestinal glucose-induced calcium-calmodulin kinase signaling in the gut-brain axis in awake rats.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(7): p. e282-93.
646. Lee, J., et al., *Glucose sensing by gut endocrine cells and activation of the vagal afferent pathway is impaired in a rodent model of type 2 diabetes mellitus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012. **302**(6): p. R657-66.
647. Nelson, D.W., et al., *Localization and activation of glucagon-like peptide-2 receptors on vagal afferents in the rat.* Endocrinology, 2007. **148**(5): p. 1954-62.
648. Nakagawa, A., et al., *Receptor gene expression of glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic polypeptide, in rat nodose ganglion cells.* Auton Neurosci, 2004. **110**(1): p. 36-43.
649. Monnikes, H., G. Lauer, and R. Arnold, *Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat.* Brain Res, 1997. **770**(1-2): p. 277-88.
650. Raybould, H.E., et al., *Expression of 5-HT3 receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(3): p. G367-72.
651. Imeryuz, N., et al., *Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms.* Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. G920-7.
652. Nagell, C.F., et al., *Glucagon-like peptide-2 inhibits antral emptying in man, but is not as potent as glucagon-like peptide-1.* Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(4): p. 353-8.
653. Nishizawa, M., et al., *Intraportal GLP-1 stimulates insulin secretion predominantly through the hepatoportal-pancreatic vagal reflex pathways.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **305**(3): p. E376-87.
654. Balkan, B. and X. Li, *Portal GLP-1 administration in rats augments the insulin response to glucose via neuronal mechanisms.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1449-54.
655. Rasmussen, B.A., et al., *Duodenal activation of cAMP-dependent protein kinase induces vagal afferent firing and lowers glucose production in rats.* Gastroenterology, 2012. **142**(4): p. 834-843 e3.
656. Moran, T.H., et al., *Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors.* Am J Physiol, 1998. **274**(3 Pt 2): p. R618-25.
657. Tang-Christensen, M., et al., *The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake.* Nat Med, 2000. **6**(7): p. 802-7.
658. Cooper, M.S., et al., *Cholecystokinin-58 and cholecystokinin-8 produce similar but not identical activations of myenteric plexus and dorsal vagal complex.* Regul Pept, 2008. **148**(1-3): p. 88-94.
659. Plamboeck, A., et al., *Characterisation of oral and i.v. glucose handling in truncally vagotomised subjects with pyloroplasty.* Eur J Endocrinol, 2013. **169**(2): p. 187-201.
660. McIntyre, N., C.D. Holdsworth, and D.S. Turner, *New Interpretation of Oral Glucose Tolerance.* Lancet, 1964. **2**(7349): p. 20-1.
661. Brown, J.C., et al., *Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide.* Recent Prog Horm Res, 1975. **31**: p. 487-532.
662. Lauritsen, K.B., et al., *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) and insulin release after small-bowel resection in man.* Scand J Gastroenterol, 1980. **15**(7): p. 833-40.
663. Moody, A.J., et al., *Relationship of glicentin to proglucagon and glucagon in the porcine pancreas.* Nature, 1981. **289**(5797): p. 514-6.
664. Holst, J.J., *Evidence that glicentin contains the entire sequence of glucagon.* Biochemical Journal, 1980. **187**(2): p. 337-343.
665. Bell, G.I., R.F. Santerre, and G.T. Mullenbach, *Hamster preproglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides.* Nature, 1983. **302**(5910): p. 716-8.
666. Mojsov, S., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas.* J Clin Invest, 1987. **79**(2): p. 616-9.

667. Schmidt, W.E., E.G. Siegel, and W. Creutzfeldt, *Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets.* Diabetologia, 1985. **28**(9): p. 704-7.
668. Kieffer, T.J., C.H. McIntosh, and R.A. Pederson, *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV.* Endocrinology, 1995. **136**(8): p. 3585-96.
669. Deacon, C.F., et al., *Degradation of endogenous and exogenous gastric inhibitory polypeptide in healthy and in type 2 diabetic subjects as revealed using a new assay for the intact peptide.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(10): p. 3575-81.
670. Hansen, L., et al., *Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine.* Endocrinology, 1999. **140**(11): p. 5356-63.
671. Nauck, M.A., et al., *Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus.* J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 301-7.
672. Drucker, D.J. and P.L. Brubaker, *Proglucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(11): p. 3953-7.
673. Drucker, D.J., et al., *Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line.* Mol Endocrinol, 1994. **8**(12): p. 1646-55.
674. Trinh, D.K., et al., *Pax-6 activates endogenous proglucagon gene expression in the rodent gastrointestinal epithelium.* Diabetes, 2003. **52**(2): p. 425-33.
675. Hoyt, E.C., et al., *Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum.* Diabetes, 1996. **45**(4): p. 434-9.
676. Wichmann, A., et al., *Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit.* Cell Host Microbe, 2013. **14**(5): p. 582-90.
677. Reimer, R.A. and M.I. McBurney, *Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats.* Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 3948-56.
678. Tappenden, K.A., et al., *Short-chain fatty acids increase proglucagon and ornithine decarboxylase messenger RNAs after intestinal resection in rats.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996. **20**(5): p. 357-62.
679. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1.* Obes Res, 2005. **13**(6): p. 1000-7.
680. Cani, P.D., et al., *Involvement of endogenous glucagon-like peptide-1(7-36) amide on glycaemia-lowering effect of oligofructose in streptozotocin-treated rats.* J Endocrinol, 2005. **185**(3): p. 457-65.
681. Yi, F., et al., *Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells.* Endocrinology, 2008. **149**(5): p. 2341-51.
682. Schjoldager, B., et al., *Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions.* Dig Dis Sci, 1989. **34**(9): p. 1411-9.
683. Baldassano, S., et al., *Glucagon-like peptide-2 modulates neurally evoked mucosal chloride secretion in guinea pig small intestine in vitro.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(4): p. G800-5.
684. Cinci, L., et al., *GLP-2 receptor expression in excitatory and inhibitory enteric neurons and its role in mouse duodenum contractility.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(9): p. e383-92.
685. Sigalet, D.L., et al., *The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation.* Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(12): p. 1318-e350.
686. Trivedi, S., et al., *Glucagon-like peptide-2 increases dysplasia in rodent models of colon cancer.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **302**(8): p. G840-9.
687. Myojo, S., et al., *Trophic effects of glicentin on rat small-intestinal mucosa in vivo and in vitro.* J Gastroenterol, 1997. **32**(3): p. 300-5.
688. Zhu, X., et al., *Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10293-8.
689. Jackson, R.S., et al., *Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency.* J Clin Invest, 2003. **112**(10): p. 1550-60.
690. Nie, Y., et al., *Regulation of pancreatic PC1 and PC2 associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats.* J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 955-65.
691. Deacon, C.F., et al., *Glucagon-like peptide 1 undergoes differential tissue-specific metabolism in the anesthetized pig.* Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 1): p. E458-64.
692. Anini, Y., T. Hansotia, and P.L. Brubaker, *Muscarinic receptors control postprandial release of glucagon-like peptide-1: in vivo and in vitro studies in rats.* Endocrinology, 2002. **143**(6): p. 2420-6.
693. Panaro, B.L., et al., *The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo.* Cell Metab, 2014. **20**(6): p. 1018-29.
694. Wolnerhanssen, B.K., et al., *Gut hormone secretion, gastric emptying, and glycemic responses to erythritol and xylitol in lean and obese subjects.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2016. **310**(11): p. E1053-61.
695. Shekerov, T. and D. Keremurchuev, *[Historical development and organization of dental services in the Burgas District].* Stomatologiia (Sofiia), 1973. **55**(3): p. 258-63.
696. Diakogiannaki, E., et al., *Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor.* Diabetologia, 2013. **56**(12): p. 2688-96.

697. Edfalk, S., P. Steneberg, and H. Edlund, *Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion.* Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2280-7.
698. Hirasawa, A., et al., *Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120.* Nat Med, 2005. **11**(1): p. 90-4.
699. Hansen, K.B., et al., *2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. E1409-17.
700. Mace, O.J., M. Schindler, and S. Patel, *The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine.* J Physiol, 2012. **590**(12): p. 2917-36.
701. Oya, M., et al., *The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells.* J Biol Chem, 2013. **288**(7): p. 4513-21.
702. Yadav, H., et al., *Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion.* J Biol Chem, 2013. **288**(35): p. 25088-97.
703. Massimino, S.P., et al., *Fermentable dietary fiber increases GLP-1 secretion and improves glucose homeostasis despite increased intestinal glucose transport capacity in healthy dogs.* J Nutr, 1998. **128**(10): p. 1786-93.
704. Chimerel, C., et al., *Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells.* Cell Rep, 2014. **9**(4): p. 1202-8.
705. Kahles, F., et al., *GLP-1 secretion is increased by inflammatory stimuli in an IL-6-dependent manner, leading to hyperinsulinemia and blood glucose lowering.* Diabetes, 2014. **63**(10): p. 3221-9.
706. Breton, J., et al., *Gut Commensal E. coli Proteins Activate Host Satiety Pathways following Nutrient-Induced Bacterial Growth.* Cell Metab, 2016. **23**(2): p. 324-34.
707. Kappe, C., et al., *Evidence for paracrine/autocrine regulation of GLP-1-producing cells.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2013. **305**(10): p. C1041-C1049.
708. Lim, G.E., et al., *Insulin Regulates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion from the Enteroendocrine L Cell.* Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 580-591.
709. Grigoryan, M., et al., *Regulation of mouse intestinal L cell progenitors proliferation by the glucagon family of peptides.* Endocrinology, 2012. **153**(7): p. 3076-88.
710. Sayers, S.R., et al., *Proglucagon Promoter Cre-Mediated AMPK Deletion in Mice Increases Circulating GLP-1 Levels and Oral Glucose Tolerance.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0149549.
711. Kappe, C., et al., *Evidence for paracrine/autocrine regulation of GLP-1-producing cells.* Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(10): p. C1041-9.
712. Suzuki, A., H. Nakauchi, and H. Taniguchi, *Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(9): p. 5034-9.
713. Mentlein, R., *Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides.* Regul Pept, 1999. **85**(1): p. 9-24.
714. Plamboeck, A., et al., *Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig.* Diabetologia, 2005. **48**(9): p. 1882-90.
715. Meier, J.J., et al., *Secretion, degradation, and elimination of glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in patients with chronic renal insufficiency and healthy control subjects.* Diabetes, 2004. **53**(3): p. 654-62.
716. Cani, P.D., et al., *Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats.* Br J Nutr, 2007. **98**(1): p. 32-7.
717. Hansen, C.F., et al., *Hypertrophy dependent doubling of L-cells in Roux-en-Y gastric bypass operated rats.* PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65696.
718. Egerod, K.L., et al., *A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin.* Endocrinology, 2012. **153**(12): p. 5782-95.
719. Orskov, C., et al., *Proglucagon products in plasma of noninsulin-dependent diabetics and nondiabetic controls in the fasting state and after oral glucose and intravenous arginine.* J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 415-23.
720. Yang, L., et al., *Puerarin Protects Pancreatic beta-Cells in Obese Diabetic Mice via Activation of GLP-1R Signaling.* Mol Endocrinol, 2016. **30**(3): p. 361-71.
721. Aranias, T., et al., *Lipid-rich diet enhances L-cell density in obese subjects and in mice through improved L-cell differentiation.* J Nutr Sci, 2015. **4**: p. e22.
722. Alssema, M., et al., *Preserved GLP-1 and exaggerated GIP secretion in type 2 diabetes and relationships with triglycerides and ALT.* Eur J Endocrinol, 2013. **169**(4): p. 421-30.
723. Toft-Nielsen, M.B., et al., *Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(8): p. 3717-23.
724. Hansen, C.F., et al., *Novel insight into the distribution of L-cells in the rat intestinal tract.* Am J Transl Res, 2013. **5**(3): p. 347-58.
725. Kampmann, K., et al., *Abundance and turnover of GLP-1 producing L-cells in ileal mucosa are not different in patients with and without type 2 diabetes.* Metabolism, 2016. **65**(3): p. 84-91.
726. Lee, S.A., et al., *CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(6): p. 2553-61.
727. McKillop, A.M., et al., *Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1(7-36)amide degradation in type 2 diabetic subjects.* Diabetes Res Clin Pract, 2008. **79**(1): p. 79-85.

728. Kirino, Y., et al., *Altered dipeptidyl peptidase-4 activity during the progression of hyperinsulinemic obesity and islet atrophy in spontaneously late-stage type 2 diabetic rats.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(2): p. E372-9.
729. Vasu, S., et al., *Differential molecular and cellular responses of GLP-1 secreting L-cells and pancreatic alpha cells to glucotoxicity and lipotoxicity.* Exp Cell Res, 2015. **336**(1): p. 100-8.
730. Vasu, S., et al., *Responses of GLP1-secreting L-cells to cytotoxicity resemble pancreatic beta-cells but not alpha-cells.* J Mol Endocrinol, 2015. **54**(1): p. 91-104.
731. Scrocchi, L.A., et al., *Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene.* Nat Med, 1996. **2**(11): p. 1254-8.
732. Schirra, J., et al., *Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans.* J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1421-30.
733. Pyke, C. and L.B. Knudsen, *The glucagon-like peptide-1 receptor--or not?* Endocrinology, 2013. **154**(1): p. 4-8.
734. Richards, P., et al., *Identification and characterization of GLP-1 receptor-expressing cells using a new transgenic mouse model.* Diabetes, 2014. **63**(4): p. 1224-33.
735. Aroor, A. and R. Nistala, *Tissue-specific expression of GLP1R in mice: is the problem of antibody nonspecificity solved?* Diabetes, 2014. **63**(4): p. 1182-4.
736. Hallbrink, M., et al., *Different domains in the third intracellular loop of the GLP-1 receptor are responsible for Galpha(s) and Galpha(i)/Galpha(o) activation.* Biochim Biophys Acta, 2001. **1546**(1): p. 79-86.
737. Montrose-Rafizadeh, C., et al., *Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells.* Endocrinology, 1999. **140**(3): p. 1132-40.
738. Flamez, D., et al., *Altered cAMP and Ca2+ signaling in mouse pancreatic islets with glucagon-like peptide-1 receptor null phenotype.* Diabetes, 1999. **48**(10): p. 1979-86.
739. Drucker, D.J., et al., *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3434-8.
740. Wheeler, M.B., et al., *Functional expression of the rat glucagon-like peptide-I receptor, evidence for coupling to both adenylyl cyclase and phospholipase-C.* Endocrinology, 1993. **133**(1): p. 57-62.
741. Holz, G.G.t., C.A. Leech, and J.F. Habener, *Activation of a cAMP-regulated Ca(2+)-signaling pathway in pancreatic beta-cells by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1.* J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17749-57.
742. Sonoda, N., et al., *Beta-Arrestin-1 mediates glucagon-like peptide-1 signaling to insulin secretion in cultured pancreatic beta cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(18): p. 6614-9.
743. Quoyer, J., et al., *GLP-1 mediates antiapoptotic effect by phosphorylating Bad through a beta-arrestin 1-mediated ERK1/2 activation in pancreatic beta-cells.* J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 1989-2002.
744. Baggio, L.L. and D.J. Drucker, *Biology of incretins: GLP-1 and GIP.* Gastroenterology, 2007. **132**(6): p. 2131-57.
745. Holz, G.G.t., W.M. Kuhtreiber, and J.F. Habener, *Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37).* Nature, 1993. **361**(6410): p. 362-5.
746. Wang, H., et al., *Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells.* Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 720-31.
747. Alarcon, C., B. Wicksteed, and C.J. Rhodes, *Exendin 4 controls insulin production in rat islet beta cells predominantly by potentiation of glucose-stimulated proinsulin biosynthesis at the translational level.* Diabetologia, 2006. **49**(12): p. 2920-9.
748. Li, Y., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis.* J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 471-8.
749. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity.* Diabetologia, 2004. **47**(5): p. 806-15.
750. Yusta, B., et al., *GLP-1 receptor activation improves beta cell function and survival following induction of endoplasmic reticulum stress.* Cell Metab, 2006. **4**(5): p. 391-406.
751. Buteau, J., et al., *Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor.* Diabetes, 2003. **52**(1): p. 124-32.
752. Ishii, M., et al., *Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism.* J Biol Chem, 2014. **289**(39): p. 27235-45.
753. Erdogdu, O., et al., *Exendin-4 protects endothelial cells from lipoapoptosis by PKA, PI3K, eNOS, p38 MAPK, and JNK pathways.* J Mol Endocrinol, 2013. **50**(2): p. 229-41.
754. Krasner, N.M., et al., *Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97554.
755. Hattori, Y., et al., *A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells.* Diabetologia, 2010. **53**(10): p. 2256-63.
756. Han, L., et al., *Exendin-4 directly improves endothelial dysfunction in isolated aortas from obese rats through the cAMP or AMPK-eNOS pathways.* Diabetes Res Clin Pract, 2012. **97**(3): p. 453-60.
757. Selley, E., et al., *Exenatide induces aortic vasodilation increasing hydrogen sulphide, carbon monoxide and nitric oxide production.* Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 69.
758. Chai, W., et al., *Glucagon-like peptide 1 recruits microvasculature and increases glucose use in muscle via a nitric oxide-dependent mechanism.* Diabetes, 2012. **61**(4): p. 888-96.
759. Aronis, K.N., J.P. Chamberland, and C.S. Mantzoros, *GLP-1 promotes angiogenesis in human endothelial cells in a dose-dependent manner, through the Akt, Src and PKC pathways.* Metabolism, 2013. **62**(9): p. 1279-86.

760. Cabou, C., et al., *Brain GLP-1 signaling regulates femoral artery blood flow and insulin sensitivity through hypothalamic PKC-delta.* Diabetes, 2011. **60**(9): p. 2245-56.
761. Dong, Z., et al., *Protein kinase A mediates glucagon-like peptide 1-induced nitric oxide production and muscle microvascular recruitment.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013. **304**(2): p. E222-8.
762. Deane, A.M., et al., *Effects of exogenous glucagon-like peptide-1 on gastric emptying and glucose absorption in the critically ill: relationship to glycemia.* Crit Care Med, 2010. **38**(5): p. 1261-9.
763. Andrews, C.N., et al., *Nitrergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(5): p. G1359-65.
764. Tolessa, T., et al., *Inhibitory effect of glucagon-like peptide-1 on small bowel motility. Fasting but not fed motility inhibited via nitric oxide independently of insulin and somatostatin.* J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 764-74.
765. Hayes, M.R., L. Bradley, and H.J. Grill, *Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling.* Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2654-9.
766. Turton, M.D., et al., *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding.* Nature, 1996. **379**(6560): p. 69-72.
767. McMahon, L.R. and P.J. Wellman, *PVN infusion of GLP-1-(7-36) amide suppresses feeding but does not induce aversion or alter locomotion in rats.* Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. R23-9.
768. Dalvi, P.S., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4, regulates feeding-associated neuropeptides in hypothalamic neurons in vivo and in vitro.* Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2208-22.
769. Knauf, C., et al., *Role of central nervous system glucagon-like Peptide-1 receptors in enteric glucose sensing.* Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2603-12.
770. Hayes, M.R., et al., *Intracellular Signals Mediating the Food Intake-Suppressive Effects of Hindbrain Glucagon-like Peptide-1 Receptor Activation.* Cell Metab, 2016. **23**(4): p. 745.
771. Murphy, B.A., et al., *AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons.* American Journal of Physiology - Cell Physiology, 2009. **297**(3): p. C750-C758.
772. Osuka, K., et al., *Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 in the nucleus intermediolateralis after spinal cord injury in mice.* Neuroscience, 2007. **145**(1): p. 241-247.
773. Osuka, K., et al., *Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser1412 in the dentate gyrus of rat brain after transient forebrain ischemia.* Neurochemistry International, 2013. **63**(4): p. 269-274.
774. Perry, T., et al., *A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: a promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 958-66.
775. Perry, T., et al., *Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (Abeta) levels and protects hippocampal neurons from death induced by Abeta and iron.* J Neurosci Res, 2003. **72**(5): p. 603-12.
776. Perry, T., et al., *Evidence of GLP-1-mediated neuroprotection in an animal model of pyridoxine-induced peripheral sensory neuropathy.* Exp Neurol, 2007. **203**(2): p. 293-301.
777. During, M.J., et al., *Glucagon-like peptide-1 receptor is involved in learning and neuroprotection.* Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1173-9.
778. Aronow, W.S. and D.T. Danahy, *Efficacy of trimazosin and prazosin therapy on cardiac and exercise performance in outpatients with chronic congestive heart failure.* Am J Med, 1978. **65**(1): p. 155-60.
779. Oka, J.I., N. Goto, and T. Kameyama, *Glucagon-like peptide-1 modulates neuronal activity in the rat's hippocampus.* Neuroreport, 1999. **10**(8): p. 1643-6.
780. Gilman, C.P., et al., *Glucagon-like peptide 1 modulates calcium responses to glutamate and membrane depolarization in hippocampal neurons.* J Neurochem, 2003. **87**(5): p. 1137-44.
781. Jolivalt, C.G., et al., *GLP-1 signals via ERK in peripheral nerve and prevents nerve dysfunction in diabetic mice.* Diabetes Obes Metab, 2011. **13**(11): p. 990-1000.
782. Creutzfeldt, W.O., et al., *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients.* Diabetes Care, 1996. **19**(6): p. 580-6.
783. Prigeon, R.L., et al., *Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **285**(4): p. E701-7.
784. D'Alessio, D.A., et al., *Glucagon-like peptide 1 enhances glucose tolerance both by stimulation of insulin release and by increasing insulin-independent glucose disposal.* J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 2263-6.
785. Zadeh-Tahmasebi, M., et al., *Activation of Short and Long Chain Fatty Acid Sensing Machinery in the Ileum Lowers Glucose Production in Vivo.* J Biol Chem, 2016. **291**(16): p. 8816-24.
786. Toft-Nielson, M., S. Madsbad, and J.J. Holst, *The effect of glucagon-like peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones.* Diabetes, 1996. **45**(5): p. 552-6.
787. Barragan, J.M., et al., *Neural contribution to the effect of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on arterial blood pressure in rats.* Am J Physiol, 1999. **277**(5 Pt 1): p. E784-91.
788. Cabou, C., et al., *Brain glucagon-like peptide-1 regulates arterial blood flow, heart rate, and insulin sensitivity.* Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2577-87.
789. Mangmool, S., et al., *Epac is required for GLP-1R-mediated inhibition of oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes.* Mol Endocrinol, 2015. **29**(4): p. 583-96.
790. Bose, A.K., et al., *Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury.* Diabetes, 2005. **54**(1): p. 146-51.

791. Nikolaidis, L.A., et al., *Recombinant glucagon-like peptide-1 increases myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with pacing-induced dilated cardiomyopathy.* Circulation, 2004. **110**(8): p. 955-61.
792. Wallner, M., et al., *Exenatide exerts a PKA-dependent positive inotropic effect in human atrial myocardium: GLP-1R mediated effects in human myocardium.* J Mol Cell Cardiol, 2015. **89**(Pt B): p. 365-75.
793. Du, J., et al., *Exendin-4 induces myocardial protection through MKK3 and Akt-1 in infarcted hearts.* Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(4): p. C270-83.
794. Gros, R., et al., *Cardiac function in mice lacking the glucagon-like peptide-1 receptor.* Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2242-52.
795. Yoneda, A., et al., *Cell-adhesion molecules and fibroblast growth factor signalling in Hirschsprung's disease.* Pediatr Surg Int, 2001. **17**(4): p. 299-303.
796. Yoshino, M., et al., *Keratinocyte growth factor receptor expression in normal colorectal epithelial cells and differentiated type of colorectal cancer.* Oncol Rep, 2005. **13**(2): p. 247-52.
797. Koehler, J.A., et al., *GLP-1R agonists promote normal and neoplastic intestinal growth through mechanisms requiring Fgf7.* Cell Metab, 2015. **21**(3): p. 379-91.
798. Yusta, B., et al., *GLP-1R Agonists Modulate Enteric Immune Responses Through the Intestinal Intraepithelial Lymphocyte GLP-1R.* Diabetes, 2015. **64**(7): p. 2537-49.
799. Baggio, L.L., J.G. Kim, and D.J. Drucker, *Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo.* Diabetes, 2004. **53 Suppl 3**: p. S205-14.
800. Hodson, D.J., et al., *Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human beta cell connectivity.* J Clin Invest, 2013. **123**(10): p. 4182-94.
801. Xu, G., et al., *Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes.* Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1551-8.
802. Duca, F.A., Y. Sakar, and M. Covasa, *Combination of obesity and high-fat feeding diminishes sensitivity to GLP-1R agonist exendin-4.* Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2410-5.
803. Ten Kulve, J.S., et al., *Decreased Hypothalamic Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Expression in Type 2 Diabetes Patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2016. **101**(5): p. 2122-9.
804. Ronveaux, C.C., G. de Lartigue, and H.E. Raybould, *Ability of GLP-1 to decrease food intake is dependent on nutritional status.* Physiol Behav, 2014. **135**: p. 222-9.
805. Widmann, C., W. Dolci, and B. Thorens, *Internalization and homologous desensitization of the GLP-1 receptor depend on phosphorylation of the receptor carboxyl tail at the same three sites.* Mol Endocrinol, 1997. **11**(8): p. 1094-102.
806. Rajan, S., et al., *Chronic hyperglycemia downregulates GLP-1 receptor signaling in pancreatic beta-cells via protein kinase A.* Mol Metab, 2015. **4**(4): p. 265-76.
807. Thompson, A. and V. Kanamarlapudi, *Agonist-induced internalisation of the glucagon-like peptide-1 receptor is mediated by the Galphaq pathway.* Biochem Pharmacol, 2015. **93**(1): p. 72-84.
808. Burcelin, R., M. Serino, and C. Cabou, *A role for the gut-to-brain GLP-1-dependent axis in the control of metabolism.* Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 744-52.
809. Krieger, J.P., et al., *Knockdown of GLP-1 Receptors in Vagal Afferents Affects Normal Food Intake and Glycemia.* Diabetes, 2016. **65**(1): p. 34-43.
810. Ahren, B., *Sensory nerves contribute to insulin secretion by glucagon-like peptide-1 in mice.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(2): p. R269-72.
811. Fujiwara, K., et al., *Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats.* J Neurochem, 2012. **121**(1): p. 66-76.
812. Waget, A., et al., *Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice.* Endocrinology, 2011. **152**(8): p. 3018-29.
813. Wettergren, A., M. Wojdemann, and J.J. Holst, *Glucagon-like peptide-1 inhibits gastropancreatic function by inhibiting central parasympathetic outflow.* Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 1): p. G984-92.
814. Delgado-Aros, S., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1 and feeding on gastric volumes in diabetes mellitus with cardio-vagal dysfunction.* Neurogastroenterol Motil, 2003. **15**(4): p. 435-43.
815. Holmes, G.M., et al., *Vagally mediated effects of glucagon-like peptide 1: in vitro and in vivo gastric actions.* J Physiol, 2009. **587**(Pt 19): p. 4749-59.
816. Meier, J.J., et al., *Erythromycin antagonizes the deceleration of gastric emptying by glucagon-like peptide 1 and unmasks its insulinotropic effect in healthy subjects.* Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2212-8.
817. Abbott, C.R., et al., *The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway.* Brain Res, 2005. **1044**(1): p. 127-31.
818. Tang-Christensen, M., et al., *Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats.* Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. R848-56.
819. Williams, D.L., D.G. Baskin, and M.W. Schwartz, *Evidence that intestinal glucagon-like peptide-1 plays a physiological role in satiety.* Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1680-7.
820. Searcy, D.G., *Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria.* Cell Res, 2003. **13**(4): p. 229-38.

821. Burcelin, R., et al., *Flore intestinale : de nouveaux concepts pour la régulation du métabolisme énergétique.* Sang Thrombose Vaisseaux, 2009. **21**(7): p. 322-333.
822. Neuman, H., et al., *Microbial endocrinology: the interplay between the microbiota and the endocrine system.* FEMS Microbiol Rev, 2015. **39**(4): p. 509-21.
823. Aagaard, K., et al., *The placenta harbors a unique microbiome.* Sci Transl Med, 2014. **6**(237): p. 237ra65.
824. Romano-Keeler, J. and J.H. Weitkamp, *Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development.* Pediatr Res, 2015. **77**(1-2): p. 189-95.
825. Collado, M.C., et al., *Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 23129.
826. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system.* Science, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
827. Littman, D.R. and E.G. Pamer, *Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses.* Cell Host Microbe, 2011. **10**(4): p. 311-23.
828. Hill, D.A. and D. Artis, *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis.* Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 623-67.
829. McVey Neufeld, K.A., et al., *The microbiome is essential for normal gut intrinsic primary afferent neuron excitability in the mouse.* Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(2): p. 183-e88.
830. Diaz Heijtz, R., et al., *Normal gut microbiota modulates brain development and behavior.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(7): p. 3047-52.
831. Neufeld, K.M., et al., *Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice.* Neurogastroenterol Motil, 2011. **23**(3): p. 255-64, e119.
832. Macpherson, A.J., et al., *A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria.* Science, 2000. **288**(5474): p. 2222-6.
833. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine.* Science, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
834. Neish, A.S., et al., *Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination.* Science, 2000. **289**(5484): p. 1560-3.
835. Servin, A.L., *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.* FEMS Microbiol Rev, 2004. **28**(4): p. 405-40.
836. Hooper, L.V. and J.I. Gordon, *Commensal host-bacterial relationships in the gut.* Science, 2001. **292**(5519): p. 1115-8.
837. Farthing, M.J., *Bugs and the gut: an unstable marriage.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 233-9.
838. Nyangale, E.P., D.S. Mottram, and G.R. Gibson, *Gut microbial activity, implications for health and disease: the potential role of metabolite analysis.* J Proteome Res, 2012. **11**(12): p. 5573-85.
839. Skagen, K., et al., *The Carnitine-butyrobetaine-trimethylamine-N-oxide pathway and its association with cardiovascular mortality in patients with carotid atherosclerosis.* Atherosclerosis, 2016. **247**: p. 64-9.
840. Carbonero, F., et al., *Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease.* Front Physiol, 2012. **3**: p. 448.
841. Morita, H., et al., *Synthesis of nitric oxide from the two equivalent guanidino nitrogens of L-arginine by Lactobacillus fermentum.* J Bacteriol, 1997. **179**(24): p. 7812-5.
842. Asano, Y., et al., *Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(11): p. G1288-95.
843. Yarullina, D.R., et al., *Role of Nitric Oxide Produced by Lactobacilli in Relaxation of Intestinal Smooth Muscles.* Bull Exp Biol Med, 2016. **160**(3): p. 343-6.
844. Sharma, R., C. Young, and J. Neu, *Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota.* J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 305879.
845. Sansonetti, P., *Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk.* Gut, 2002. **50 Suppl 3**: p. III2-8.
846. Wahlström, A., et al., *Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism.* Cell Metabolism. **24**(1): p. 41-50.
847. Kersten, S., et al., *Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene.* J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 28488-93.
848. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
849. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
850. Cani, P.D., et al., *Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor.* Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1484-90.
851. Cani, P.D., et al., *Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study.* Eur J Clin Nutr, 2006. **60**(5): p. 567-72.
852. McNelis, J.C., et al., *GPR43 Potentiates beta-Cell Function in Obesity.* Diabetes, 2015. **64**(9): p. 3203-17.
853. Hong, Y.H., et al., *Acetate and propionate short chain fatty acids stimulate adipogenesis via GPCR43.* Endocrinology, 2005. **146**(12): p. 5092-9.
854. Ge, H., et al., *Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids.* Endocrinology, 2008. **149**(9): p. 4519-26.

855. Tsukumo, D.M., et al., *Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(8): p. 1986-98.
856. Poggi, M., et al., *C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet.* Diabetologia, 2007. **50**(6): p. 1267-76.
857. Amar, J., et al., *Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men.* Am J Clin Nutr, 2008. **87**(5): p. 1219-23.
858. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.
859. Boutagy, N.E., et al., *Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant?* Biochimie, 2016. **124**: p. 11-20.
860. Schertzer, J.D., et al., *NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance.* Diabetes, 2011. **60**(9): p. 2206-15.
861. Zhou, Y.J., et al., *NOD1 activation induces innate immune responses and insulin resistance in human adipocytes.* Diabetes Metab, 2012. **38**(6): p. 538-43.
862. Tazoe, H., et al., *Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon.* Biomed Res, 2009. **30**(3): p. 149-56.
863. Karaki, S., et al., *Expression of the short-chain fatty acid receptor, GPR43, in the human colon.* J Mol Histol, 2008. **39**(2): p. 135-42.
864. Bowman, C.C., et al., *Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products.* Glia, 2003. **43**(3): p. 281-91.
865. Barajon, I., et al., *Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia.* J Histochem Cytochem, 2009. **57**(11): p. 1013-23.
866. Nohr, M.K., et al., *GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes.* Endocrinology, 2013. **154**(10): p. 3552-64.
867. Guo, L.H., et al., *Combinations of TLR and NOD2 ligands stimulate rat microglial P2X4R expression.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **349**(3): p. 1156-62.
868. Brun, P., et al., *Toll like receptor-2 regulates production of glial-derived neurotrophic factors in murine intestinal smooth muscle cells.* Mol Cell Neurosci, 2015. **68**: p. 24-35.
869. Anitha, M., et al., *Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling.* Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 1006-16 e4.
870. Patel, V., A.M. Patel, and J.J. McArdle, *Synaptic abnormalities of mice lacking toll-like receptor (TLR)-9.* Neuroscience, 2016. **324**: p. 1-10.
871. McVey Neufeld, K.A., et al., *The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by changes in calbindin.* Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(5): p. 627-36.
872. Kunze, W.A., et al., *Lactobacillus reuteri enhances excitability of colonic AH neurons by inhibiting calcium-dependent potassium channel opening.* Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2009. **13**(8b): p. 2261-2270.
873. Mao, Y.K., et al., *Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 1465.
874. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
875. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
876. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
877. Duca, F.A., et al., *Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats.* Diabetes, 2014. **63**(5): p. 1624-36.
878. Murphy, E.F., et al., *Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models.* Gut, 2010. **59**(12): p. 1635-42.
879. Cho, I., et al., *Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity.* Nature, 2012. **488**(7413): p. 621-6.
880. Wu, X., et al., *Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes.* Curr Microbiol, 2010. **61**(1): p. 69-78.
881. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes.* Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
882. Creely, S.J., et al., *Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(3): p. E740-7.
883. Caesar, R., et al., *Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice.* Gut, 2012. **61**(12): p. 1701-7.
884. Ghoshal, S., et al., *Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides.* J Lipid Res, 2009. **50**(1): p. 90-7.
885. Harris, H.W., et al., *Chylomicrons alter the fate of endotoxin, decreasing tumor necrosis factor release and preventing death.* J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 1028-34.
886. Watson, A.J. and C.A. Duckworth, *Gut microbiota control gut permeability through GLP-2.* Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 779-81.
887. Everard, A., et al., *Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 9066-71.
888. Membrez, M., et al., *Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice.* FASEB J, 2008. **22**(7): p. 2416-26.

889. Carvalho, B.M., et al., *Modulation of gut microbiota by antibiotics improves insulin signalling in high-fat fed mice.* Diabetologia, 2012. **55**(10): p. 2823-34.
890. Amar, J., et al., *Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment.* EMBO Mol Med, 2011. **3**(9): p. 559-72.
891. Le, T.K., et al., *Oral administration of Bifidobacterium spp. improves insulin resistance, induces adiponectin, and prevents inflammatory adipokine expressions.* Biomed Res, 2014. **35**(5): p. 303-10.
892. Wise, J., *Eating a yoghurt a day is linked to lower risk of type 2 diabetes.* BMJ, 2014. **349**: p. g7081.
893. Xu, J. and W. Verstraete, *Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli.* Appl Microbiol Biotechnol, 2001. **56**(3-4): p. 504-7.
894. Lamine, F., et al., *Nitric oxide released by Lactobacillus farciminis improves TNBS-induced colitis in rats.* Scand J Gastroenterol, 2004. **39**(1): p. 37-45.
895. Panwar, H., et al., *Lactobacillus strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential.* Eur J Nutr, 2014. **53**(7): p. 1465-74.
896. Hsieh, F.C., et al., *Oral administration of Lactobacillus reuteri GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats.* Nutr Metab (Lond), 2013. **10**(1): p. 35.
897. Bahmani, F., et al., *The Consumption of Synbiotic Bread Containing Lactobacillus sporogenes and Inulin Affects Nitric Oxide and Malondialdehyde in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.* J Am Coll Nutr, 2015: p. 1-8.
898. Hulston, C.J., A.A. Churnside, and M.C. Venables, *Probiotic supplementation prevents high-fat, overfeeding-induced insulin resistance in human subjects.* Br J Nutr, 2015. **113**(4): p. 596-602.
899. Simon, M.C., et al., *Intake of Lactobacillus reuteri improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept.* Diabetes Care, 2015. **38**(10): p. 1827-34.
900. Holst, J.J., *The Physiology of Glucagon-like Peptide 1.* Physiol Rev, 2007. **87**(4): p. 1409-39.
901. Farilla, L., et al., *Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets.* Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5149-58.
902. Ding, L. and J. Zhang, *Glucagon-like peptide-1 activates endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells.* Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(1): p. 75-81.
903. Pujadas, G., et al., *The pivotal role of high glucose-induced overexpression of PKCbeta in the appearance of glucagon-like peptide-1 resistance in endothelial cells.* Endocrine, 2015.
904. Dalle, S., R. Burcelin, and P. Gourdy, *Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic beta-cell impairments in type 2 diabetes.* Cell Signal, 2013. **25**(2): p. 570-9.
905. Ten Kulve, J.S., et al., *Decreased hypothalamic glucagon-like peptide-1 receptor expression in type 2 diabetes patients.* J Clin Endocrinol Metab, 2015: p. jc20153291.
906. Lobinet, E., et al., *Autonomic Diabetic Neuropathy Impairs Glucose and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor-Regulated Glucagon Concentration in Type 1 Diabteci Patients.* Journal of Endocrinolgy and Metabolism, 2015. **5**(4): p. 229-237.
907. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome.* Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-9.
908. Prajapati, B., et al., *Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes.* Curr Diabetes Rev, 2014. **10**(3): p. 190-200.
909. Hosoi, T., et al., *Subdiaphragmatic vagotomy fails to inhibit intravenous leptin-induced IL-1beta expression in the hypothalamus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **282**(2): p. R627-31.
910. Franklin, K.B.J. and G. Paxinos, *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* 1997, San Diego: Academic Press. xxii p., 186 p. of plates.
911. Smith, T.H., et al., *An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse.* J Vis Exp, 2013(78).
912. Everard, A., et al., *Microbiome of prebiotic-treated mice reveals novel targets involved in host response during obesity.* ISME J, 2014. **8**(10): p. 2116-30.
913. Garidou, L., et al., *The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing RORgammat and Controls Metabolic Disease.* Cell Metab, 2015. **22**(1): p. 100-12.
914. Serino, M., et al., *Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota.* Gut, 2012. **61**(4): p. 543-53.
915. Burcelin, R., et al., *Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2002. **282**(4): p. E834-42.
916. Yang, L., et al., *Puerarin protects pancreatic beta-cells in obese diabetic mice via activation of GLP-1R signaling.* Mol Endocrinol, 2016: p. me20151213.
917. Tolessa, T., et al., *Glucagon-like peptide-1 retards gastric emptying and small bowel transit in the rat: effect mediated through central or enteric nervous mechanisms.* Dig Dis Sci, 1998. **43**(10): p. 2284-90.
918. Krieger, J.P., W. Langhans, and S.J. Lee, *Vagal mediation of GLP-1's effects on food intake and glycemia.* Physiol Behav, 2015. **152**(Pt B): p. 372-80.
919. Ruttimann, E.B., et al., *Intrameal hepatic portal and intraperitoneal infusions of glucagon-like peptide-1 reduce spontaneous meal size in the rat via different mechanisms.* Endocrinology, 2009. **150**(3): p. 1174-81.
920. Veedfald, S., et al., *The insulinotropic effect of exogenous GLP-1 is not affected by acute vagotomy in anaesthetized pigs.* Exp Physiol, 2016.

921. Rotondo, A., et al., *Glucagon-like peptide-1 relaxes gastric antrum through nitric oxide in mice.* Peptides, 2011. **32**(1): p. 60-4.
922. Murphy, B.A., et al., *AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons.* Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **297**(3): p. C750-8.
923. Canabal, D.D., et al., *Glucose, insulin, and leptin signaling pathways modulate nitric oxide synthesis in glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(4): p. R1418-28.
924. Mekkes, M.C., et al., *The development of probiotic treatment in obesity: a review.* Benef Microbes, 2014. **5**(1): p. 19-28.
925. Panwar, H., et al., *Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes - prospects and perspectives.* Diabetes Metab Res Rev, 2013. **29**(2): p. 103-12.
926. Perry, R.J., et al., *Acetate mediates a microbiome-brain-beta-cell axis to promote metabolic syndrome.* Nature, 2016. **534**(7606): p. 213-7.
927. De Vadder, F., et al., *Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits.* Cell, 2014. **156**(1-2): p. 84-96.
928. Macho Fernandez, E., et al., *Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide.* Gut, 2011. **60**(8): p. 1050-9.
929. Brun, P., et al., *Toll-like receptor 2 regulates intestinal inflammation by controlling integrity of the enteric nervous system.* Gastroenterology, 2013. **145**(6): p. 1323-33.
930. Mayer, E.A., K. Tillisch, and A. Gupta, *Gut/brain axis and the microbiota.* J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 926-38.
931. Varin, E.M., et al., *Inhibition of the MAP3 kinase Tpl2 protects rodent and human beta-cells from apoptosis and dysfunction induced by cytokines and enhances anti-inflammatory actions of exendin-4.* Cell Death Dis, 2016. **7**: p. e2065.
932. Green, A.D., et al., *Co-culture of clonal beta cells with GLP-1 and glucagon-secreting cell line impacts on beta cell insulin secretion, proliferation and susceptibility to cytotoxins.* Biochimie, 2016. **125**: p. 119-25.
933. Younan, S.M. and L.A. Rashed, *Impairment of the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in obese and diabetic rats is related to the down-regulation of its pancreatic receptors.* Gen Physiol Biophys, 2007. **26**(3): p. 181-93.
934. Ozbek, M., et al., *Evaluation of beta cell dysfunction by mixed meal tolerance test and oral L-arginine in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2009. **117**(10): p. 573-6.
935. Tang, Z.Q., et al., *Stimulation of insulin secretion by large-dose oral arginine administration in healthy adults.* Exp Ther Med, 2013. **6**(1): p. 248-252.
936. Ochoa-Reparaz, J. and L.H. Kasper, *The Second Brain: Is the Gut Microbiota a Link Between Obesity and Central Nervous System Disorders?* Curr Obes Rep, 2016. **5**(1): p. 51-64.
937. Fujiwara, K., et al., *Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats.* Journal of Neurochemistry, 2012. **121**(1): p. 66-76.
938. Nagamatsu, S., et al., *DPP-4 inhibitor des-F-sitagliptin treatment increased insulin exocytosis from db/db mice β cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **412**(4): p. 556-560.
939. Balas, B., et al., *The Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Vildagliptin Suppresses Endogenous Glucose Production and Enhances Islet Function after Single-Dose Administration in Type 2 Diabetic Patients.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2007. **92**(4): p. 1249-1255.
940. Mu, J., et al., *Inhibition of DPP-4 with sitagliptin improves glycemic control and restores islet cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes.* European Journal of Pharmacology, 2009. **623**(1–3): p. 148-154.
941. Tsuboi, K., et al., *The dipeptidyl peptidase IV inhibitor vildagliptin suppresses development of neuropathy in diabetic rodents: effects on peripheral sensory nerve function, structure and molecular changes.* Journal of Neurochemistry, 2016. **136**(4): p. 859-870.
942. Secher, A., et al., *The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss.* The Journal of Clinical Investigation. **124**(10): p. 4473-4488.
943. Gault, Victor A., et al., *Administration of an acylated GLP-1 and GIP preparation provides added beneficial glucose-lowering and insulinotropic actions over single incretins in mice with Type 2 diabetes and obesity.* Clinical Science, 2011. **121**(3): p. 107-117.
944. Degn, K.B., et al., *One Week's Treatment With the Long-Acting Glucagon-Like Peptide 1 Derivative Liraglutide (NN2211) Markedly Improves 24-h Glycemia and α- and β-Cell Function and Reduces Endogenous Glucose Release in Patients with Type 2 Diabetes.* Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1187-1194.
945. Li, P.-C., et al., *The GLP-1 receptor agonists exendin-4 and liraglutide alleviate oxidative stress and cognitive and micturition deficits induced by middle cerebral artery occlusion in diabetic mice.* BMC Neuroscience, 2016. **17**(1): p. 1-14.
946. Ishii, M., et al., *Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism.* Journal of Biological Chemistry, 2014.
947. Hamilton, A., et al., *Novel GLP-1 mimetics developed to treat type 2 diabetes promote progenitor cell proliferation in the brain.* Journal of Neuroscience Research, 2011. **89**(4): p. 481-489.
948. Froy, O. and N. Chapnik, *Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine.* Molecular Immunology, 2007. **44**(8): p. 1954-1960.

949. Vitaterna, M.H., et al., *Mutagenesis and Mapping of a Mouse Gene, Clock, Essential for Circadian Behavior.* Science (New York, N.Y.), 1994. **264**(5159): p. 719-725.
950. Asher, G. and P. Sassone-Corsi, *Time for Food: The Intimate Interplay between Nutrition, Metabolism, and the Circadian Clock.* Cell, 2015. **161**(1): p. 84-92.
951. Hirota, T., et al., *Glucose Down-regulates Per1 and Per2mRNA Levels and Induces Circadian Gene Expression in Cultured Rat-1 Fibroblasts.* Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(46): p. 44244-44251.
952. Stephan, F.K. and A.J. Davidson, *Glucose, but not fat, phase shifts the feeding-entrained circadian clock.* Physiology & Behavior, 1998. **65**(2): p. 277-288.
953. Iwanaga, H., et al., *Per2 Gene Expressions in the Suprachiasmatic Nucleus and Liver Differentially Respond to Nutrition Factors in Rats.* Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2005. **29**(3): p. 157-161.
954. La Fleur, S.E., et al., *A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations.* J Neuroendocrinol, 1999. **11**(8): p. 643-52.
955. Ruiter, M., et al., *The Daily Rhythm in Plasma Glucagon Concentrations in the Rat Is Modulated by the Biological Clock and by Feeding Behavior.* Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1709-1715.
956. Bodosi, B., et al., *Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation.* American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2004. **287**(5): p. R1071-R1079.
957. Fukuda, H. and N. Iritani, *Diurnal variations of lipogenic enzyme mRNA quantities in rat liver.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, 1991. **1086**(3): p. 261-264.
958. Tiedgen, M. and H.J. Seitz, *Dietary Control of Circadian Variations in Serum Insulin, Glucagon and Hepatic Cyclic AMP.* The Journal of Nutrition, 1980. **110**(5): p. 876-882.
959. Pulimeno, P., et al., *Autonomous and self-sustained circadian oscillators displayed in human islet cells.* Diabetologia, 2013. **56**(3): p. 497-507.
960. Yang, X., et al., *Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism.* Cell, 2006. **126**(4): p. 801-810.
961. Orozco-Solis, R. and P. Sassone-Corsi, *Epigenetic control and the circadian clock: Linking metabolism to neuronal responses.* Neuroscience, 2014. **264**: p. 76-87.
962. Hirayama, J., et al., *CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function.* Nature, 2007. **450**(7172): p. 1086-1090.
963. Crosio, C., et al., *Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock.* Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1241-1247.
964. Karlsson, B., A. Knutsson, and B. Lindahl, *Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people.* Occupational and Environmental Medicine, 2001. **58**(11): p. 747-752.
965. Sekine, M., et al., *A dose–response relationship between short sleeping hours and childhood obesity: results of the Toyama Birth Cohort Study.* Child: Care, Health and Development, 2002. **28**(2): p. 163-170.
966. Honma, K., et al., *Loss of circadian rhythm of circulating insulin concentration induced by high-fat diet intake is associated with disrupted rhythmic expression of circadian clock genes in the liver.* Metabolism, 2016. **65**(4): p. 482-491.
967. Lizier, M., et al., *The nutrigenomic investigation of C57BL/6N mice fed a short-term high-fat diet highlights early changes in clock genes expression.* Genes & Nutrition, 2013. **8**(5): p. 465-474.
968. Pivovarova, O., et al., *Changes of Dietary Fat and Carbohydrate Content Alter Central and Peripheral Clock in Humans.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **100**(6): p. 2291-2302.
969. Turek, F.W., et al., *Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice.* Science, 2005. **308**(5724): p. 1043-1045.
970. Lee, J., et al., *Loss of Bmal1 leads to uncoupling and impaired glucose-stimulated insulin secretion in β-cells.* Islets, 2011. **3**(6): p. 381-388.
971. Dallmann, R. and D.R. Weaver, *Altered body mass regulation in male mPeriod mutant mice on high fat diet.* Chronobiology international, 2010. **27**(6): p. 1317-1328.
972. Marcheva, B., et al., *Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinemia and Diabetes.* Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-631.
973. Dyar, K.A., et al., *Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock().* Molecular Metabolism, 2014. **3**(1): p. 29-41.
974. Zhou, B., et al., *CLOCK/BMAL1 regulates circadian change of mouse hepatic insulin sensitivity by SIRT1.* Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2196-2206.
975. Jacobi, D., et al., *Hepatic Bmal1 Regulates Rhythmic Mitochondrial Dynamics and Promotes Metabolic Fitness.* Cell Metabolism, 2015. **22**(4): p. 709-720.
976. Hoogerwerf, W.A., et al., *Clock Gene Expression in the Murine Gastrointestinal Tract: Endogenous Rhythmicity and Effects of a Feeding Regimen.* Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1250-1260.
977. Tavakkolizadeh, A., et al., *Diurnal rhythmicity in intestinal SGLT-1 function, V max, and mRNA expression topography.* American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology, 2001. **280**(2): p. G209-G215.
978. Stearns, A.T., et al., *Diurnal expression of the rat intestinal sodium-glucose co-transporter SGLT1 is independent of local luminal factors.* Surgery, 2009. **145**(3): p. 294-302.

979. Hoogerwerf, W.A., et al., *Transcriptional Profiling of mRNA Expression in the Mouse Distal Colon.* Gastroenterology, 2008. **135**(6): p. 2019-2029.
980. Yoshida, D., et al., *The circadian clock controls fluctuations of colonic cell proliferation during the light/dark cycle via feeding behavior in mice.* Chronobiology International, 2015. **32**(8): p. 1145-1155.
981. Summa, K.C., et al., *Disruption of the Circadian Clock in Mice Increases Intestinal Permeability and Promotes Alcohol-Induced Hepatic Pathology and Inflammation.* PLoS ONE, 2013. **8**(6): p. e67102.
982. Merle, A., et al., *Nycthemeral variations of cholecystokinin action on intestinal motility in rats: effects of melatonin and S 20928, a melatonin receptor antagonist.* Neuropeptides, 2000. **34**(6): p. 385-391.
983. Mukherji, A., et al., *Homeostasis in Intestinal Epithelium Is Orchestrated by the Circadian Clock and Microbiota Cues Transduced by TLRs.* Cell, 2013. **153**(4): p. 812-827.
984. Thaiss, Christoph A., et al., *Transkingdom Control of Microbiota Diurnal Oscillations Promotes Metabolic Homeostasis.* Cell, 2014. **159**(3): p. 514-529.
985. Leone, V., et al., *Effects of Diurnal Variation of Gut Microbes and High-Fat Feeding on Host Circadian Clock Function and Metabolism.* Cell Host & Microbe, 2015. **17**(5): p. 681-689.
986. Lindgren, O., et al., *Differential Islet and Incretin Hormone Responses in Morning Versus Afternoon after Standardized Meal in Healthy Men.* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(8): p. 2887-2892.
987. Gil-Lozano, M., et al., *Circadian Secretion of the Intestinal Hormone GLP-1 by the Rodent L Cell.* Diabetes, 2014. **63**(11): p. 3674-3685.
988. Gil-Lozano, M., et al., *High-Fat Diet and Palmitate Alter the Rhythmic Secretion of Glucagon-Like Peptide-1 by the Rodent L-cell.* Endocrinology, 2016. **157**(2): p. 586-599.
989. Vieira, E., et al., *Involvement of the Clock Gene Rev-erb alpha in the Regulation of Glucagon Secretion in Pancreatic Alpha-Cells.* PLoS ONE, 2013. **8**(7): p. e69939.
990. Caruso, C.C., S.L. Lusk, and B.W. Gillespie, *Relationship of work schedules to gastrointestinal diagnoses, symptoms, and medication use in auto factory workers.* American Journal of Industrial Medicine, 2004. **46**(6): p. 586-598.
991. Frexinos, J., L. Bueno, and J. Fioramonti, *Diurnal changes in myoelectric spiking activity of the human colon.* Gastroenterology, 1985. **88**(5 Pt 1): p. 1104-10.
992. Kentish, S.J., et al., *Circadian Variation in Gastric Vagal Afferent Mechanosensitivity.* The Journal of Neuroscience, 2013. **33**(49): p. 19238-19242.
993. Ronveaux, C.C., G. de Lartigue, and H.E. Raybould, *Ability of GLP-1 to decrease food intake is dependent on nutritional status.* Physiology & Behavior, 2014. **135**: p. 222-229.
994. Sivan, A., et al., *Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy.* Science, 2015. **350**(6264): p. 1084-9.
995. Hannani, D., et al., *Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade: obligatory contribution of IL-2 receptors and negative prognostic impact of soluble CD25.* Cell Res, 2015. **25**(2): p. 208-24.
996. Stenman, L.K., et al., *Probiotic B420 and prebiotic polydextrose improve efficacy of antidiabetic drugs in mice.* Diabetology & Metabolic Syndrome, 2015. **7**: p. 75.
997. Bush, T.G., et al., *Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice.* Cell, 1998. **93**(2): p. 189-201.
998. Briyal, S., S. Shah, and A. Gulati, *Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide in the rat brain following focal cerebral ischemia.* Neuroscience, 2014. **281c**.
999. Livingstone, K.M., et al., *FTO genotype and weight loss: systematic review and meta-analysis of 9563 individual participant data from eight randomised controlled trials.* BMJ, 2016. **354**: p. i4707.

Selon l'organisation mondiale de la santé, le diabète de type II (DT2), caractérisé par un défaut de contrôle de la glycémie, est une des causes principales de décès dans le monde. Le GLP-1, sécrété par l'intestin après un repas, contribue au contrôle de la glycémie en stimulant la sécrétion d'insuline par le pancréas et en inhibant la vidange gastrique et la prise alimentaire. Ces actions sont principalement médiées par le nerf vague selon un axe intestin-cerveau-organes périphériques, bien que l'hormone puisse aussi agir de manière endocrine directement sur ses organes cibles *via* son récepteur (GLP-1r). Des stratégies thérapeutiques basées sur le GLP-1 sont donc utilisées pour traiter les patients diabétiques, mais les réponses sont hétérogènes voire inefficaces pour le contrôle glycémique. Les mécanismes moléculaires responsables sont inconnus mais pourraient être en lien avec la modification du microbiote intestinal, élément déterminant dans le développement des maladies métaboliques. Nous avons d'abord montré que des souris rendues diabétiques (régimes riches en graisse) perdent leur sensibilité aux actions hypoglycémiantes du GLP-1 et présentent une neuropathie entérique, une baisse de l'expression du GLP-1r intestinal et vagal et une altération de l'axe intestin-cerveau. De plus, dans les neurones entériques en culture primaire issus de ces souris diabétiques, la production de NO induite par le GLP-1, est diminuée. Tous ces effets sont retrouvés chez des souris axéniques ou traitées aux antibiotiques sous régime normal démontrant l'implication du microbiote. À l'inverse, des souris sous régime gras traitées aux antibiotiques ont une amélioration de l'action du GLP-1. Cette action hormonale intestinale pourrait aussi dépendre du cycle nycthéméral pour lequel nous avons observé une oscillation de la sécrétion d'insuline, de l'expression du GLP-1r et des bactéries intestinales. De plus, les souris contrôles répondent moins bien à l'hormone au cours du jour que de la nuit et les souris diabétiques, axéniques et antibiotiques – modèles résistants au GLP-1 – ont des variations très marquées et communes de l'expression des "clock genes". L'ensemble de ces résultats montre qu'au cours diabète, l'action du GLP-1 est diminuée. Cette diminution peut s'expliquer par une baisse de l'expression neuronale du GLP-1r et une diminution de la voie de signalisation dépendant du NO capable de réguler la sécrétion d'insuline induite par le GLP-1. Le microbiote et/ou la régulation circadienne semblent déterminants dans la sensibilité au GLP-1.

According to the World Health Organisation, Type II Diabetes, characterized by an alteration of glycemic control, causes numerous death around the world. After a meal, gut secretes Glucagon-Like Peptide one (GLP-1) which regulates glycemia by stimulation of insulin secretion and inhibition of gastric emptying and food intake. Although GLP-1 acts as an endocrine hormone on its target organs through the GLP1 receptor, its action is mainly mediated by nervous pathway involving vagus nerve and gut-brain-periphery axis. Thus, GLP-1 based therapies are used to control glycaemia in type 2 diabetic patients, but, efficiency of the treatment is heterogeneous defining a state of GLP-1 unresponsiveness. Molecular mechanisms involved in this unresponsiveness are not known but could be linked to the changes in gut microbiota (dysbiosis), key element in the development of metabolic diseases. We first found that diabetic mice (high fat diet) are unresponsive to hypoglycemic action of GLP-1 and present enteric neuropathy, impaired gut-brain axis and reduction of GLP-1r and neuronal NO synthase expression in the ileum. In addition, GLP-1-induced nitric oxide production in primary neuron culture is decreased. These effects were also found in germ-free or antibiotic-treated mice under normal chow diet, indicating the involvement of gut microbiota. By contrast, high fat diet mice treated with antibiotics show an improvement of GLP-1 action. This gut incretin action could also depend on the circadian cycle for which we observed a wavering of insulin secretion, GLP-1r expression and gut microbiota. Moreover, the GLP-1 response of control mice is better in the day than in the night and the different mice model resistant to GLP-1 (HFD, axenic or antibiotics) present the same marked variations in the expression of major clock genes. Overall our results show that in type 2 diabetes GLP-1 action is lowered and can be explained by decreased neuronal expression of GLP-1r as well as the NO-dependent signaling pathway regulating insulin secretion induced by GLP-1. Microbiota or the circadian clock seems essential in this GLP-1 sensitivity.